

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA

"LA SAPIENZA"

DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA

XVII CICLO

Coordinatore Chiar.mo Prof. Pietro Melchiorri

**Lo Stress Prenatale nel ratto come modello di depressione:
accertamento della validità predittiva con l'imipramina e
studio della neurogenesi dopo trattamento con una nuova
molecola, l'agomelatina (S-20098)**

Dottoranda: Dr. Anna Rita Zuena

Anni Accademici 2001-2005

Sommario

Sommario	2
INTRODUZIONE	4
La depressione nell'uomo	4
La serotonina	5
Il sonno	7
L'asse ipotalamo-ipofisi-surrene	7
Il volume dell'ippocampo	10
La neurogenesi	12
La zona subventricolare (SVZ)	13
Il sistema ippocampale	14
I fattori di regolazione	16
Il trattamento farmacologico della depressione	22
Classi di farmaci antidepressivi e loro meccanismo d'azione	22
La neurogenesi come nuova ipotesi sul meccanismo di azione dei farmaci antidepressivi	24
L'agomelatina: un nuovo farmaco con proprietà antidepressive	25
Modelli animali di depressione	27
Lo Stress Prenatale nel ratto: un modello animale di depressione protratta nel tempo per lo studio di farmaci antidepressivi	31
1) disregolazione dell'asse HHS	32
2) alterazioni del ritmo circadiano e del sonno.....	32
3) alterazioni del comportamento.....	34
4) alterazioni a carico del sistema serotoninergico	34
5) riduzione della neurogenesi	35
PREMESSE E SCOPI DELLA RICERCA.....	37
MATERIALI E METODI	41
Animali e condizioni di allevamento	41
Procedura di Stress Prenatale.....	41
Fase I	43
Trattamento cronico con imipramina.....	43
Test del nuoto forzato	43
Neurochimica	44
Binding dei recettori corticosteroidi nell'ippocampo.....	44
Determinazione quantitativa dell'mRNA dei recettori 5-HT1A nella corteccia prefrontale	46
Analisi statistica	47
Fase II	47
Trattamento cronico con agomelatina	47
Valutazione in vivo della neurogenesi.....	48

Somministrazione di BrdU	49
Procedura di perfusione e prelievo dei cervelli	50
Immunoistochimica per la quantificazione della BrdU incorporata	51
Analisi quantitativa della immunoreattività della BrdU	52
Determinazione del fenotipo delle nuove cellule.....	52
Immunofluorescenza per la determinazione del fenotipo neuronale	52
Analisi dell'immunofluorescenza per la colocalizzazione BrdU-NeuN	53
Western Blotting per la valutazione dell'espressione del BDNF e dei recettori mGlu nell'ippocampo	54
Analisi statistica	56
RISULTATI	57
Fase I	57
Effetti dell'imipramina sul comportamento nel test del nuoto forzato	57
Effetti dell'imipramina sulla densità dei recettori corticosteroidi nell'ippocampo.....	59
Effetti dell'imipramina sui livelli di mRNA dei recettori 5-HT1A nella corteccia	60
Fase II	62
Effetti dell'agomelatina sulla neurogenesi nel giro dentato	62
Effetti dell'agomelatina sul differenziamento cellulare.....	63
Effetti dell'agomelatina sull'espressione del BDNF nell'ippocampo.....	65
Effetti dell'agomelatina sull'espressione dei recettori mGlu1 e mGlu5 nell'ippocampo	67
DISCUSSIONE	70
Bibliografia.....	86

INTRODUZIONE

La depressione nell'uomo

La depressione, definita anche come psicosi affettiva, è tra le patologie psichiatriche dell'uomo quella più diffusa. Approssimativamente l'11% di tutti gli esseri umani adulti ha esperienza di un episodio di depressione maggiore almeno una volta nella vita. La depressione maggiore è una patologia complessa la cui gravità può variare notevolmente ed è bene distinguerla dagli stati di afflizione, tristezza, delusione o demoralizzazione che rientrano nella fisiologica e momentanea risposta del nostro organismo ad eventi spiacevoli della vita. La depressione maggiore comprende diversi sintomi che, per costituire una condizione clinica riconoscibile, si devono presentare insieme con una certa frequenza e cronicità (per più di due settimane). I sintomi che caratterizzano la depressione si distinguono in sintomi psichici e somatici: i primi, comprendono un abbassamento del tono dell'umore, la perdita di motivazione, di interessi e di fiducia nelle proprie capacità, il rallentamento psicomotorio, la difficoltà a concentrarsi, tutti sintomi che comportano la difficoltà a svolgere anche le abituali attività giornaliere; i sintomi somatici sono costituiti invece dalla perdita dell'appetito, i disturbi del sonno e il disinteresse sessuale (cfr. DSM-IV, American Psychiatric Association, 1994 e ICD-10, World Health Organisation, 1992).

La variabilità, complessità e soggettività della malattia depressiva fa sì che sia molto importante individuare e caratterizzare le disfunzioni psicobiologiche che compaiono con una certa regolarità nei pazienti affetti da depressione maggiore, al fine di poter realizzare modelli animali su cui studiare gli effetti terapeutici di farmaci antidepressivi. Nei paragrafi successivi prenderemo in esame alcuni squilibri di natura neurobiologica tipici della depressione maggiore e, precisamente, modifiche del sistema serotoninergico, del sonno, dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e del volume dell'ippocampo.

La serotonina

La storia dei meccanismi biochimici che sono alla base della depressione ha inizio con la teoria monoaminergica, proposta nel 1965 e secondo la quale la depressione sarebbe determinata da un deficit funzionale di trasmettitori monoaminergici in alcune aree cerebrali. Inizialmente l'ipotesi riguardava solo la noradrenalina, ma studi successivi dimostrarono il ruolo chiave anche della serotonina (5-HT). A sostegno di questa teoria c'è l'evidenza che i farmaci antidepressivi producono un aumento della disponibilità della 5-HT nelle sinapsi (per una review cfr. Blier, 1998). D'altro canto, l'osservazione che farmaci (ad esempio, amfetamina e cocaina) capaci di stimolare la trasmissione monoaminergica non inducono effetti antidepressivi, ha reso necessario chiamare in causa l'esistenza di meccanismi più complessi: il coinvolgimento di altri neurotrasmettitori (dopamina, acetilcolina, glutammato), di fattori di crescita, di sistemi neuroendocrini ed infine,

ma non in ordine di importanza, di alterazioni genetiche che, secondo molti autori, sarebbero i principali fattori predisponenti (Kalia, 2005). Al di là della coesistenza di alterazioni a carico di differenti sistemi neurobiologici, le alterazioni biochimiche che maggiormente caratterizzano e accomunano i pazienti depressi, anche se i risultati non sono sempre concordi, sono le disfunzioni a livello del sistema serotoninergico (Coppen et al., 1982; Meltzer, 1990; Feldman, 1997). Mediante analisi *post-mortem* eseguite su cervelli di pazienti depressi, è stata riscontrata una riduzione dei livelli di 5-HT (Cheetham et al., 1989; Mann et al., 1989) e dei suoi metaboliti (Asberg et al., 1984). Più recentemente, *in vivo* mediante la PET eseguita su pazienti affetti da depressione maggiore, sono state messe in evidenza sia delle riduzioni (Drevets et al., 1997; Sargent et al., 2000) che degli aumenti (Attar-Levy et al., 1999; Mintun et al., 2004) dei recettori 5-HT in alcune aree cerebrali.

La classificazione dei recettori per la 5-HT è estremamente complessa a causa dell'esistenza di un numero incredibilmente elevato di recettori e sottotipi recettoriali diversi scoperti negli anni. Tuttavia, a livello del SNC, i recettori della 5-HT che svolgono un ruolo primario nella fisiopatologia della depressione sono: i) recettori pre-sinaptici 5-HT₁ (con sottotipi recettoriali 5-HT_{1A} e 5-HT_{1D}) e ii) recettori post-sinaptici, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ e 5-HT₄. I recettori pre-sinaptici sono autorecettori, e in condizioni fisiologiche svolgono un ruolo inibitorio sulla sintesi e sul rilascio della 5-HT. In particolare, il sottotipo

5-HT_{1A} è un autorecettore somato-dendritico ed ha il compito di ridurre il flusso neuronale mediante l'inibizione del *firing*; il sottotipo pre-sinaptico 5-HT_{1D} è invece localizzato nel terminale assonico e quando lega la 5-HT, inibisce il suo ulteriore rilascio. I recettori post-sinaptici, ed in particolare il sottotipo 5-HT_{2A}, una volta legata la serotonina, hanno il compito di trasdurre l'input nervoso attraverso modifiche che, alla fine, determina la modifica di un grande numero di risposte cellulari.

Il sonno

I disturbi del sonno sono molto spesso associati alla malattia depressiva e in genere sono rappresentati da un aumento della frammentazione del sonno, una riduzione del tempo di esordio della fase REM, un aumento della densità e della frequenza della fase REM nella prima parte della notte (per una review cfr. Argyropoulos and Wilson, 2005). L'alterazione di questi parametri ben si correla con i dati sperimentali relativi alla 5-HT: un aumento della disponibilità di 5-HT nelle sinapsi, causato dal blocco del *reuptake* della 5-HT (ottenuto mediante trattamento con antidepressivi triciclici e SSRI) riduce la frequenza del sonno paradossale (Doghramji, 1989; Gursky and Krahn, 2000).

L'asse ipotalamo-ipofisi-surrene

Ogni stimolo interno o esterno all'organismo, sia reale che immaginato, evoca una risposta di stress, la quale serve per ripristinare l'omeostasi e per facilitare l'adattamento. Essenziale per la risposta di

stress è l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS) che si conclude con la secrezione dell'ormone glucocorticoideo (cortisolo nell'uomo e corticosterone nel ratto). Questo ormone agisce sull'organismo fondamentalmente secondo due modalità. Con la prima, controlla la sensibilità o la soglia di risposta del sistema ipotalamo-ipofisi-surrene allo stress, regolandone l'attività di base. Inoltre, promuove la coordinazione di eventi circadiani, come il ciclo sonno/veglia, il consumo di cibo, ed è coinvolto nei processi legati all'attenzione, all'integrazione delle informazioni sensorie e alla selezione della risposta. Con la seconda modalità, l'ormone ha il compito di inibire la risposta di attivazione dell'asse indotta dallo stress, agendo con un meccanismo di feedback negativo. Lo steroide regola le capacità di un individuo di reagire allo stress, di adattarsi ad esso od anche di riprendersi da questo stato. Lo steroide promuove inoltre l'apprendimento e i processi di memorizzazione.

Un breve periodo di stress controllato può essere benefico per emozioni e salute. Al contrario, la mancanza di controllo può produrre uno stato cronico di stress, che può favorire la vulnerabilità alle malattie.

Le azioni dell'ormone glucocorticoideo nel SNC sono mediate dai recettori GR (glucocorticoidei) e MR (mineralcorticoidei). I recettori GR sono diffusi in tutto il cervello, ma sono maggiormente presenti nell'ipotalamo dove reprimono l'attività dei geni per il CRH (*corticotropin releasing hormone*) e la vasopressina. La maggior parte degli MR sono

invece localizzati nell'ippocampo e legano l'ormone glucocorticoideo con un'affinità che è circa 10 volte più alta rispetto ai recettori GR. Quindi i recettori MR, in condizioni di secrezione basale dell'ormone, sono praticamente tutti occupati. D'altra parte i recettori GR sono occupati solo quando i livelli dell'ormone aumentano, cioè al picco di secrezione del ritmo circadiano o in condizioni di stress acuto. Il blocco farmacologico dei recettori corticosteroidi, determina un incremento dei livelli di glucocorticoidi circolanti sia in condizioni basali che di stress (Spencer et al., 1998), che dimostra così il loro fondamentale ruolo nella regolazione dell'attività dell'asse IIS: l'attivazione dei recettori MR è sufficiente a mantenere una bassa attività basale dell'asse; l'attivazione dei recettori GR è necessaria per mantenere i livelli normali di attività dell'asse al picco del ciclo circadiano e durante uno stress acuto. Anche in queste circostanze, tuttavia, l'attivazione dei recettori MR sembra essere molto importante perché faciliterebbe (potenzierebbe) l'azione dei recettori GR (Spencer et al., 1998). Quindi, l'idea di un tempo per cui solo i recettori GR sarebbero responsabili del feedback negativo è superata ed oggi sappiamo che anche i recettori MR partecipano a questa risposta ed in maniera importante.

L'iperattività dell'asse IIS è una tra le più rilevanti caratteristiche ormonali osservate in un consistente numero di soggetti affetti da depressione maggiore (per una review cfr. Holsboer, 2003). Questa iperattività è caratterizzata da un'ipersecrezione di cortisolo (Holsboer et al., 1984; Rubin et al., 1987; Maes et al., 1998; Weber et al., 2000), da

una resistenza al test di soppressione al desametazone (Heuser et al., 1994; Zobel et al., 2001), da un aumento dei livelli del fattore di rilascio della corticotropina (CRF) nel liquido cerebrospinale (Nemeroff et al., 1984; Heuser et al., 1998) e parallelamente da una riduzione dei livelli dei recettori glucocorticoidei (GR), accertata mediante studi *post-mortem* nella corteccia (Webster et al., 2002) ed anche nelle cellule mononucleate del sangue (Calfa et al., 2003).

Il volume dell'ippocampo

Come detto precedentemente, tradizionalmente si pensa che alla base dello sviluppo della depressione maggiore ci sia un difetto neurochimico. Ma negli ultimi anni, con l'affermarsi di tecnologie innovative soprattutto nel campo della diagnostica per immagini, è stato possibile evidenziare nel cervello di pazienti affetti da depressione maggiore, e soprattutto in quelli con associata iperattività dell'asse HHS (Sapolsky, 2000), la presenza di alterazioni neuroanatomiche; in particolare, è stata osservata una riduzione del volume dell'ippocampo (Bremner et al., 2000; MacQueen et al., 2003). L'ipotesi attualmente più accreditata è che sia la riduzione della neurogenesi (cioè una ridotta capacità del cervello adulto di generare nuove cellule nervose) a contribuire alla riduzione del volume ippocampale (Duman, 2004). Questa ipotesi è sostenuta da alcune evidenze sperimentali di notevole risalto: da una parte, il trattamento con i farmaci antidepressivi in pazienti affetti da depressione, è in grado di ridurre l'atrofia cellulare (dati *post-mortem*) e ripristinare il volume dell'ippocampo (dati *in vivo*)

(Sheline et al., 2003) e, dall'altra, il trattamento di animali con antidepressivi è in grado di aumentare la neurogenesi (Santarelli et al., 2003; Malberg et al., 2000).

Prima ancora di entrare in dettaglio nell'analisi del fenomeno della neurogenesi, vorrei qui brevemente accennare al fatto che questa scoperta ha acceso un intenso dibattito nella comunità scientifica, dibattito che non ha ancora trovato una convergenza di opinioni. Quello che si può notare, da un'analisi attenta delle più recenti pubblicazioni scientifiche, è che la scoperta della neurogenesi ha rafforzato la tendenza a considerare la depressione umana come malattia dovuta ad un'alterazione organica del cervello. Sono molte infatti le pubblicazioni scientifiche che riportano nella riduzione della neurogenesi la causa principale della depressione. Tuttavia, in un recente lavoro, Henn e Vollmayr (2004) hanno voluto appositamente rianalizzare le evidenze a sostegno di una diminuita neurogenesi alla base dello sviluppo della depressione; essi affermano che per nessuno degli studi da loro analizzati è possibile dimostrare questo e così concludono:

...“These findings suggest to us that at present neurogenesis must be considered more of an epiphenomenon than an etiologic variable in depression.”

Ma cerchiamo ora di approfondire il fenomeno della neurogenesi che, oltre ad essere un tema di grande attualità, è parte integrante degli studi da me svolti nella presente tesi.

La neurogenesi

Negli anni '60 Joseph Altman, mediante studi di autoradiografia nel ratto, trovò cellule neuronali "nuove" in due particolari aree del cervello, il giro dentato della formazione ippocampale e i bulbi olfattori (Altman and Das, 1965). Questa scoperta fu per molti anni sottovalutata probabilmente perché si scontrava con la radicata idea che i neuroni adulti non fossero in grado di proliferare. Poi, come spesso accade nella scienza, diversi anni dopo (siamo alla fine degli anni '90) alcuni studiosi mediante tecniche più evolute, riuscirono non solo a riprodurre gli esperimenti di Altman, ma anche a dimostrare che la neurogenesi era un fenomeno osservabile nei primati, compreso l'uomo (Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1998). Nel sistema nervoso centrale, questa nuova forma di plasticità neuronale, per cui le cellule staminali possono originare neuroni nuovi, sembra essere prerogativa solo di due aree: la zona subventricolare e il giro dentato dell'ippocampo.

Dal momento della scoperta dell'esistenza di un processo di neurogenesi in precise regioni del cervello adulto, sono emerse due principali linee di ricerca. La prima consiste nell'isolare cellule staminali neuronali allo scopo di studiarne le caratteristiche e le proprietà biologiche fondamentali per raggiungere poi l'obiettivo finale di manipolarle per potenziare e migliorare i meccanismi di riparo e rigenerazione. La seconda si pone, invece, l'obiettivo di tentare di comprendere la rilevanza funzionale del processo di neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo. Tuttavia stabilire il potenziale contributo

funzionale dei nuovi neuroni nell'ippocampo non è cosa semplice, considerando che ancora non è neanche stata del tutto chiarita la funzione del giro dentato stesso. In generale, l'ippocampo ha come funzione principale quella di consolidare la memoria: processa le informazioni per permetterne l'immagazzinamento nelle aree corticali. La neurogenesi che si ha nell'ippocampo adulto potrebbe servire ad ottimizzare questo meccanismo e permettere il processamento di nuove e complesse informazioni che l'individuo riceve nel corso della vita. Per proporre un solido modello che stabilisca il ruolo fisiologico dei nuovi neuroni nei circuiti ippocampali è necessario però definire quanto questi siano funzionalmente simili ai neuroni già esistenti, analizzarne il fenotipo neurotrasmettitoriale e le proiezioni assionali. Le conoscenze attuali del processo di neurogenesi, che si limitano soltanto all'osservazione del fenomeno, sono insufficienti per stabilire il preciso ruolo fisiologico dei nuovi neuroni e per determinare quanto questo ruolo sia correlato alla plasticità sinaptica e alla memoria. Consideriamo ora le due aree cerebrali dove è stata dimostrata la presenza di neurogenesi, la zona subventricolare e il giro dentato dell'ippocampo.

La zona subventricolare (SVZ)

La SVZ, collocata su tutta la parete del ventricolo laterale, comprende la più ampia popolazione di cellule proliferanti nel cervello adulto di roditori (Altman, 1963; Privat and Leblond, 1972), di scimmie (Gould et al., 1999a; 1999b; Kaplan, 1985; Kornack and Rakic, 2001), e in quello umano (Bernier, 2000; Eriksson et al., 1998), ed è stato

stimato che circa 30.000 nuove cellule sono prodotte bilateralmente ogni giorno nella SVZ del topo (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Le nuove cellule generate nella SVZ, ancora indifferenziate, si muovono per raggiungere i bulbi olfattori (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Kornack and Rakic, 2001) seguendo un flusso di migrazione rostrale; dopo aver raggiunto la parte centrale dei bulbi olfattori, le nuove cellule si distaccano dalla catena, migrano radialmente e avanzano fino agli strati cellulari superiori dove terminano la loro differenziazione. Le nuove cellule si differenziano principalmente in neuroni che accrescono poi il loro albero dendritico e si integrano perfettamente nei circuiti già esistenti, mediante nuove sinapsi. Il numero di cellule nei bulbi olfattori è mantenuto costante dal fenomeno della morte cellulare che permette infatti il continuo e necessario turnover.

Il sistema ippocampale

La formazione ippocampale è composta da varie aree anatomicamente distinte: i) la corteccia entorinale; ii) il subiculum; iii) il corno di ammore, diviso in aree organizzate in una regione superiore (CA1 e CA2) e una regione inferiore (CA3 e CA4); iv) il giro dentato (DG). L'ippocampo forma un circuito di tre fondamentali connessioni: gli *inputs* sono trasferiti dalle regioni neocorticali al DG, attraverso la via della corteccia entorinale; l'informazione è quindi trasferita dal DG all'area CA3 attraverso le *mossy fibers*, e da qui verso l'area CA1 (e subiculum), mediante le fibre collaterali di Schaffer; da qui l'informazione ritorna attraverso la corteccia entorinale, alle aree

associative corticali. Le cellule proliferano nella zona dello strato subgranulare (SGZ), localizzato tra l'ileo e lo strato granulare (GCL) del DG dove esse poi migrano e si differenziano in neuroni maturi (Altman, 1963; Altman and Das, 1965). Studi effettuati nel ratto hanno dimostrato che le nuove cellule presentano una grande attività proliferativa durante la prima settimana dalla loro nascita (Hastings and Gould, 1999). La maggior parte di queste cellule neo-formate sono solo parzialmente differenziate (Dayer et al., 2003), e quelle che non completano la differenziazione muoiono entro una settimana dalla loro generazione: processo che interessa circa il 60% delle cellule neo-nate (Hastings and Gould, 1999; Dayer et al., 2003). Le cellule che sopravvivono, invece, si iniziano ad integrare nel GCL circa 4-10 giorni dopo la loro generazione e comunque, molto tempo prima di aver raggiunto la maturazione completa, esse formano dendriti, ricevono contatti sinaptici ed estendono i loro assoni nella regione CA3 (Cameron and McKay, 2001; Markakis and Gage, 1999). Di tutte le cellule che sopravvivono circa il 70-75% si differenzia in neuroni e solo una bassa percentuale (10%) si differenzia in glia (Steiner et al., 2004). Il significato della maggior differenziazione neuronale rispetto a quella gliale non si conosce. Tuttavia, è stato individuato un particolare ceppo di topi, nei quali c'è una maggiore differenziazione nel fenotipo gliale (28%), e una minore differenziazione nel fenotipo neuronale (49%); in questi animali si osserva un peggioramento delle performance cognitive nel test del *water maze*, test di apprendimento in cui, come noto, è

funzionalmente coinvolto l'ippocampo (Kempermann and Gage, 2002). Quindi sembra si possa affermare che la maggiore differenziazione in neuroni rispetto alle cellule gliali sia necessaria soprattutto per il ruolo che essi svolgono nei processi di apprendimento e memoria. E' anche importante evidenziare che negli ultimi anni si è fortemente rivalutata la funzione delle cellule gliali, che sembrano ricoprire ruoli tutt'altro che secondari nel sistema nervoso centrale. Dopo che negli scorsi anni, gli astrociti sono stati promossi da semplici cellule di supporto strutturale, ad elementi in grado di produrre fattori di crescita e di modificare le connessioni delle cellule nervose stimolando la formazione di nuove sinapsi, uno studio condotto in California attribuisce a queste cellule una ulteriore proprietà nuova e inattesa: gli esperimenti di Song e dei suoi colleghi, descritti su Nature (Song et al., 2002), mostrano infatti che le cellule gliali, in particolare gli astrociti, sono in grado di stimolare la proliferazione delle cellule staminali e di dirigere il destino delle nuove cellule verso l'acquisizione del fenotipo neurale.

I fattori di regolazione

Nel sistema nervoso di un individuo adulto, gli esatti meccanismi che controllano il destino delle cellule nervose neo-formate rimangono ancora oggi largamente sconosciuti. Tuttavia, negli ultimi anni sono stati individuati molti fattori che influenzano la divisione, la migrazione e la differenziazione delle cellule progenitrici neuronali. Vediamo alcuni dei più importanti.

Ormoni corticosteroidi - Storicamente i corticosteroidi sono stati i primi fattori ad essere studiati per la loro influenza sulla neurogenesi nell'adulto (McEwen et al., 1993). La soppressione della secrezione di corticosterone in seguito a surrenalectomia (adx) bilaterale nel ratto, stimola la nascita di cellule gliali e neuronali nel DG (Cameron and Gould, 1994; Gould et al., 1992), ma l'attività mitotica nella SVZ rimane immutata (Rodriguez et al., 1998), suggerendo quindi l'esistenza di un'influenza inibitoria area-specifica del corticosterone. E' stato inoltre dimostrato che la proliferazione cellulare aumenta entro le 24 ore dall'adx e rimane costante nei 6 giorni seguenti; le nuove cellule generate sopravvivono per almeno 4 settimane in assenza di corticosterone, indicando che la loro sopravvivenza è indipendente dal corticosterone (Rodriguez et al., 1998). Il meccanismo mediante il quale il corticosterone impedisce la proliferazione cellulare ancora oggi rimane sconosciuto.

Glutammato - Il blocco dei sottotipi NMDA dei recettori del glutammato, nel ratto, aumenta la genesi delle cellule entro poche ore dal trattamento (Cameron et al., 1995); la somministrazione di NMDA, al contrario, comporta una diminuzione della proliferazione cellulare (Cameron et al., 1995; Ormerod et al., 2003), fenomeno che è in accordo con le proprietà antiproliferative del glutammato nelle cellule corticali *in vitro* (LoTurco et al., 1995). Il meccanismo mediante il quale il glutammato (*in vivo*), attraverso i recettori NMDA, inibisce la proliferazione cellulare non è tuttora noto.

Nei progenitori neuronali è stata rilevata anche la presenza di recettori AMPA del glutammato (Gallo et al., 1995), ed è stato dimostrato che la somministrazione di LY451646, una molecola che potenzia l'attività dei recettori AMPA, aumenta il numero delle cellule proliferanti in un modo dose-dipendente (Bai et al., 2003). Nell'insieme i dati sperimentali sul ruolo del glutammato nella neurogenesi, suggeriscono che questo neurotrasmettitore esercita una complessa influenza sulla proliferazione delle cellule, con un effetto sostanzialmente stimolatorio, mediato dai recettori AMPA, ed inibitorio, mediato dall'attivazione dei recettori NMDA. E' ormai accertato che i recettori metabotropici del glutammato (mGlu) sono implicati nel fenomeno della plasticità neuronale; tuttavia, gli studi relativi al loro ruolo nel fenomeno della neurogenesi sono solo all'inizio. I pochi dati sperimentali a disposizione suggeriscono comunque che questi recettori, e particolarmente quelli del gruppo I (con sottotipi recettoriali mGlu1 e mGlu5) sono implicati nel processo di neurogenesi: è stato infatti mostrato che il recettore mGlu1 svolge un ruolo facilitatorio sul processo di neurogenesi nell'ippocampo (Baskys et al., 2005); inoltre, il sottotipo recettoriale mGlu5 è espresso in zone di attiva neurogenesi (Di Giorgi Gerevini et al., 2004).

Serotonina - Negli anni '70 fu proposto che i neuroni serotoninergici neo-formati potessero agire come segnali umorali governanti lo sviluppo neuronale e la neurogenesi (Azmitia, 2001; Kronenberg et al., 2003). Da allora, molti studi hanno mostrato che,

nell'adulto, la 5-HT stimola la proliferazione cellulare nel DG e nella SVZ. Infatti, nel ratto, sia l'inibizione della sintesi della 5-HT ottenuta mediante la somministrazione di para-cloro-fenilalanina, sia la lesione dei neuroni serotoninergici del *raphe*, comporta una diminuzione della proliferazione cellulare (Brezun and Daszuta, 1999).

Fattori trofici - E' stato dimostrato che molti fattori trofici hanno un'azione mitogenica nelle regioni neurogeniche del cervello adulto. Così oggi, sono chiaramente noti, nella SVZ gli effetti proliferativi del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e del fattore di crescita epidermico (EGF) (Kuhn et al., 1997; Jin et al., 2003) e, nel DG, l'effetto proliferativo del fattore di crescita insulino-simile (IGF-I) (Aberg et al., 2000).

Il fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF) è un membro della famiglia delle proteine neurotrofiche ed è ampiamente distribuito nel SNC sia del feto che del neonato e dell'adulto. E' particolarmente importante il suo ruolo nel corso dello sviluppo principalmente perché previene la morte neuronale (Linnarsson et al., 2000) e, nell'adulto, ha l'importante compito di modulare la funzionalità neuronale e l'integrità strutturale (Lessmann et al., 2003). Il BDNF è inoltre un importante modulatore della trasmissione sinaptica nell'ippocampo ed è, conseguentemente, implicato nei processi di apprendimento e memoria (Kovalchuk et al., 2002; Ying et al., 2002). La somministrazione cronica intracerebroventricolare di BDNF fa aumentare la neurogenesi sia nella SVZ che nel DG (Zigava et al., 1998) e in quest'ultima area, si osserva invece una ridotta proliferazione e

sopravvivenza delle cellule in topi resi knockout per il BDNF (Lee et al., 2002). Questi dati indicano che il BDNF è un regolatore positivo della neurogenesi. Inoltre, anche gli stimoli ambientali, come per esempio un arricchimento dell'ambiente, inducono un aumento della neurogenesi, e, al contempo, stimolano la produzione di BDNF in diverse aree cerebrali (Ickes et al., 2000).

Apprendimento - L'apprendimento influenza molti aspetti della neurogenesi. Nel test del *water maze* e nel test di condizionamento del riflesso di ammiccamento (*eyeblink*), la neurogenesi risulta stimolata sia immediatamente dopo l'apprendimento del compito, che una settimana dopo la fine dei test (Gould et al., 1999c). I meccanismi per cui la proliferazione e la sopravvivenza cellulare sono modificate durante l'apprendimento, sono ancora sconosciuti ma, i fattori trofici, giocano certamente un ruolo importante. Il BDNF ippocampale, infatti, aumenta durante i compiti di apprendimento e diminuisce una volta che sia stato raggiunto un livello asintotico delle performance (Gomez-Pinilla et al., 1998; Kesslak et al., 1998).

Stress - In molti studi è stato osservata una diminuzione della proliferazione cellulare in seguito all'esposizione a diversi tipi di stress. In età adulta nei ratti maschi, ma non nelle femmine, uno stress lieve, come l'esposizione all'odore del predatore, fa diminuire il numero delle cellule proliferanti (Falconer and Galea, 2003; Tanapat et al., 2001); questo effetto è transitorio in quanto scompare dopo 3 settimane. Inoltre è stato dimostrato che uno stress da contenzione ripetuto (3 o 6

settimane) è in grado di diminuire la proliferazione cellulare nel DG (Pham et al., 2003) e che anche uno stress acuto, indotto esponendo l'animale per esempio al freddo o al nuoto forzato, riduce la proliferazione cellulare in questa area (Heine et al., 2004). Una riduzione della neurogenesi si verifica anche in seguito ad eventi stressanti durante il periodo postnatale come per esempio la deprivazione materna, ovvero una separazione prolungata della madre dai piccoli. I ratti privati della madre sono caratterizzati da una ridotta proliferazione cellulare nel GCL, sia quando sono ancora neonati (proliferazione misurata a 21 giorni di vita dopo 7 giorni di separazione materna) (Lee et al., 2001; Park et al., 2002), che in età adulta (proliferazione misurata a 2-3 mesi di età in seguito a 3 ore giornaliere di separazione materna eseguita dal 1° al 14° giorno di vita) (Mirescu et al., 2004).

Poiché gli episodi di stress attivano l'asse HHS, con conseguente aumento dei livelli di corticosterone plasmatico, e poiché è stato dimostrato che il corticosterone impedisce la proliferazione cellulare (Cameron and Gould, 1994; Gould et al., 1992) si può ipotizzare il coinvolgimento di tale ormone nella riduzione della neurogenesi indotta dallo stress. A questo proposito alcuni esperimenti dimostrano che prevenendo l'aumento del corticosterone (mediante la surrenalectomia), stimolato dall'evento stressante (odore del predatore), si riesce a bloccare anche la riduzione della neurogenesi (Tanapat et al., 2001) ed inoltre, questa normalizzazione della neurogenesi previene l'atrofia ippocampale indotta dallo stress.

Il trattamento farmacologico della depressione

Classi di farmaci antidepressivi e loro meccanismo d'azione

Il trattamento farmacologico antidepressivo ha come obiettivo quello di alleviare i sintomi della malattia.

I primi farmaci antidepressivi, introdotti negli anni '50, sono gli inibitori delle monoamino-ossidasi (IMAO) e gli antidepressivi triciclici (TCA) (Alpers and Himwich, 1972). Questi farmaci sono stati utilizzati per il trattamento della depressione per molti anni, e la loro efficacia è stata ed è ancora ampiamente documentata; tuttavia, l'alta incidenza di effetti collaterali che essi producono ha stimolato la ricerca di nuovi farmaci meglio tollerati e meno tossici. Dopo decenni di lenti progressi, negli anni '80 emergono nuove classi di farmaci antidepressivi: gli inibitori selettivi della ricaptazione della 5-HT (SSRI) come fluoxetina, sertalina e fluvoxamina; gli inibitori della ricaptazione della 5-HT e della NA (SNRI) come la venlafaxina; gli antagonisti selettivi di alcuni sottotipi recettoriali noradrenergici e serotoninergici (NaSSA) come la mirtazapina; gli inibitori selettivi della ricaptazione della NA (NASI) come la reboxetina e gli inibitori della ricaptazione di NA/DA (NDRI) come il bupropione. Sebbene l'efficacia di questi nuovi farmaci non superi quella dei precedenti, la loro relativa sicurezza e tollerabilità ha portato alla loro rapida diffusione di utilizzo. La scelta del farmaco da utilizzare per il trattamento della depressione dipende da molte variabili tra le quali la più importante è la risposta del paziente: gli SSRI, la venlafaxina, la mirtazapina e il bupropione sono ampiamente accettati come farmaci di

prima scelta, i TCS e da ultimo gli IMAO sono solitamente riservati a quei pazienti che non rispondono ad un ciclo di terapia a piene dosi con uno dei farmaci più nuovi (ICSI Health Care Guideline, 2004).

La conoscenza delle proprietà farmacologiche e dei meccanismi d'azione dei farmaci antidepressivi rimane tutt'oggi incompleta. I farmaci antidepressivi, indipendentemente dalla classe di appartenenza, hanno la proprietà di indurre un aumento della disponibilità sinaptica di neurotrasmettitori aminergici, noradrenalina (NA), dopamina (DA) e/o 5-HT bloccandone la ricaptazione neuronale, riducendone il catabolismo attraverso l'inibizione delle MAO, rimuovendo il tono inibitorio sul rilascio o sull'attività neuronale.

Il principale effetto dei triciclici è il blocco non selettivo della ricaptazione delle monoamine dalle terminazioni nervose, probabilmente dovuto alla competizione per i trasportatori di membrana, NAT, SERT e DAT (Amara and Kuhar, 1993; Blakely et al., 1994; Miller et al., 1999). Il principale problema nell'uso dei triciclici, come anche degli IMAO, è l'ampio spettro di effetti collaterali clinicamente rilevanti (secchezza delle fauci, costipazione, visione offuscata, tremori, ipotensione ortostatica, cardiotoxicità) conseguente alla loro azione su diversi sistemi neurotrasmettitoriali (principalmente, colinergico, istaminergico e adrenergico). Gli SSRI sono potenti inibitori selettivi della ricaptazione neuronale della 5-HT e, alle dosi normalmente utilizzate, non hanno interazioni significative con gli altri neurotrasmettitori; questa maggior selettività nei confronti della 5-HT spiega la riduzione degli effetti

collaterali rispetto ai triciclici (Baldessarini, 1989; Stahl, 1998) che comprendono nausea, anoressia, insonnia e disfunzioni sessuali.

I nuovi farmaci antidepressivi come la venlafaxina, la mirtazapina e il bupropione, detti "atipici", hanno un meccanismo d'azione simile a quello degli SSRI con diversa selettività per le monoamine a seconda della classe a cui appartengono, e presentano effetti collaterali sostanzialmente non molto diversi dagli SSRI.

Malgrado tutti gli antidepressivi siano in grado di facilitare la trasmissione monoaminergica gli effetti terapeutici da essi indotti si osservano solo dopo diverse settimane di assunzione continuata del farmaco (Blier and de Montigny, 1994). Per poter spiegare tale ritardo bisogna ipotizzare che si instauri un fenomeno di "adattamento" recettoriale: in seguito al trattamento prolungato con antidepressivi ed al conseguente accumulo di monoamine a livello sinaptico, si verificherebbe una desensibilizzazione dei recettori catecolaminergici e serotoninergici (Blier and Montigny, 1998).

La neurogenesi come nuova ipotesi sul meccanismo di azione dei farmaci antidepressivi

La scoperta della neurogenesi nell'adulto ed il fatto che alcuni antidepressivi stimolano la proliferazione cellulare e la neurogenesi (Santarelli et al., 2003; Malberg et al., 2000), ha aperto una nuova ipotesi sul meccanismo di azione dei farmaci antidepressivi. Pertanto, l'azione ritardata del trattamento antidepressivo potrebbe essere spiegata con il tempo necessario alla nascita e alla differenziazione di

nuovi neuroni che corrisponde infatti al tempo necessario per la comparsa dell'efficacia clinica del farmaco (Malberg and Schechter, 2005). E' interessante inoltre il fatto che, nel ratto, il trattamento cronico, ma non quello acuto, con antidepressivi aumenta il BDNF (sia l'mRNA che la proteina) in diverse strutture limbiche (Nibuya et al., 1995, 1996; Russo-Neustadt et al., 1999; Okamoto et al., 2003) e, l'infusione intracerebroventricolare di questa neurotrofina ad animali *learned helplessness* (un classico modello animale di depressione), sembra produca un effetto antidepressivo (Shirayama et al., 2002). La comparsa dell'aumento di BDNF dopo trattamento cronico con antidepressivi coinciderebbe con il tempo di comparsa degli effetti terapeutici, e ciò suggerisce che l'azione degli antidepressivi potrebbe essere mediata proprio dal BDNF. Questa ipotesi è confermata dall'osservazione che la comparsa degli effetti antidepressivi richiede l'attivazione dei recettori TrkB (recettori che legano il BDNF) (Saarelainen et al., 2003). Pertanto la capacità di indurre proliferazione cellulare e neurogenesi da parte di nuovi farmaci antidepressivi, può rappresentare una strategia innovativa per la scoperta di nuovi molecole.

L'agomelatina: un nuovo farmaco con proprietà antidepressive

Lo sviluppo di nuove terapie più efficaci si rende necessario per due problemi fondamentali che sono legati al trattamento della depressione con i farmaci antidepressivi attualmente disponibili. Il primo problema è che il ritardo nella comparsa degli effetti benefici del

farmaco (Blier and de Montigny, 1994) potrebbe contribuire all'alta percentuale (15%) di suicidi tra i pazienti depressi (Mann et al., 2005). Il secondo è che, tra i pazienti depressi, esiste una grande variabilità nella sensibilità al trattamento antidepressivo, come indicato dal fatto che almeno un terzo dei pazienti non risponde ad alcun trattamento antidepressivo (Joyce and Paykel, 1989; Quitkin et al., 1996).

La ricerca di nuovi antidepressivi più efficaci rispetto a quelli attualmente in uso, ha portato alla sperimentazione di una nuova molecola, l'agomelatina. L'agomelatina (S 20098) è un agonista specifico dei recettori MT_1 e MT_2 della melatonina (Ying et al., 1996) e anche un antagonista selettivo dei recettori $5-HT_{2C}$ della serotonina (Millan et al., 2003). Come agonista, l'agomelatina mima gli effetti della melatonina su diversi sistemi (Ying et al., 1996; Martinet et al., 1996): per esempio somministrazioni croniche di agomelatina nel ratto sono in grado di risincronizzare un ritmo circadiano alterato (Van Reeth et al., 1997). Inoltre studi preclinici hanno recentemente evidenziato che l'agomelatina è in grado di indurre effetti antidepressivi in alcuni modelli animali di depressione (che saranno analizzati nel prossimo paragrafo). Nel modello di stress cronico moderato (CMS) nel ratto, il trattamento cronico con agomelatina produce gli stessi effetti sul consumo di zucchero dell'imipramina e della fluoxetina (Papp et al., 2003); inoltre l'agomelatina produce effetti sul tempo di immobilità paragonabili a quelli dell'imipramina nel modello del nuoto forzato nel ratto (Bourin et al., 2004) e, studi preliminari indicano che sembrerebbe essere efficace

anche nel modello del learned helplessness (Bertaina-Anglade et al., 2002). Recenti studi clinici (Loo et al., 2002; Kennedy and Emsley, 2005) mostrano che l'agomelatina ha una efficacia antidepressiva paragonabile a quella degli antidepressivi classici anche in pazienti affetti da depressione severa ed inoltre possiede un buon profilo di tollerabilità.

Modelli animali di depressione

In generale possiamo affermare che quando si parla di un *modello* ci si riferisce ad una rappresentazione semplificata di un sistema molto più complesso. Se alla parola modello, si aggiunge l'attributo *animale*, le cose si complicano perché lo scopo della "costruzione" di un modello animale è quello di avere un substrato sperimentale che cerca di simulare una malattia umana e di studiarne (i) le cause (eziologia), (ii) la fisiopatologia, (iii) la sintomatologia e (iv) la risposta ad un trattamento (usualmente farmacologico). Un esempio di un modello animale che ben risponde a questi quattro criteri è quello delle malattie batteriche; in questo caso infatti si conosce l'eziologia (cioè il batterio specifico causa della malattia), si conosce come questo agisce nel provocare la patologia (fisiopatologia), si conoscono bene i sintomi e, infine, si conoscono o si possono conoscere e studiare, i farmaci che sono in grado di debellare il batterio. Le cose si fanno molto più complesse quando alla definizione "*modello animale*" aggiungiamo le parole "*in psichiatria*" perché la malattia da riprodurre nell'animale è una

malattia strettamente umana e quindi non presente in altre specie. In tal caso il modello animale di depressione rispetta solo due dei quattro requisiti perché non conosciamo l'eziologia e la fisiopatologia della malattia depressiva. Perciò un modello animale di depressione si limiterà a riprodurre solo alcuni dei sintomi che caratterizzano la depressione umana al fine di poter poi studiare farmaci in grado di ridurli od abolirli. In effetti, tutti i modelli animali di depressione finora messi a punto tentano di associare le osservazioni comportamentali o neurochimiche riscontrate negli animali da laboratorio con una o più caratteristiche della depressione nell'uomo descritte dal DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) o ICD-10 (World Health Organisation, 1992).

La validità dei modelli animali in psichiatria, secondo Willner (1991), può essere stabilita sulla base di quanto ciascuno di essi rispetti tre criteri fondamentali. Il primo criterio è la *face validity* che stabilisce quanto i sintomi osservati nel modello animale somiglino a quelli dei pazienti umani. Il secondo criterio, la *predictive validity*, indirizza la questione su quanto il modello risponda alle stesse manipolazioni ed interventi che vengono utilizzate per l'uomo; in pratica la validità predittiva nei modelli animali in psichiatria è determinata in larga misura dalla loro risposta ai farmaci impiegati in terapia, nelle stesse condizioni di trattamento che si usano per l'uomo. Il terzo criterio è la *construct validity* che stabilisce il grado di coerenza che c'è tra il modello animale ed il razionale teorico della malattia. Questo criterio che in alcuni modelli viene considerato soddisfatto, è oggettivamente difficile da raggiungere

proprio perché si basa sulla conoscenza delle cause delle malattie psichiatriche.

I modelli di depressione animale sviluppati nel corso degli anni, riconosciuti come modelli che rispettano (più o meno bene a seconda del tipo) i criteri di validità proposti da Willner, sono almeno 18.

Alcuni di essi possono essere valutati sulla base della *predictive validity*; altri per la *face* e *predictive validity*, ed altri ancora sembra per tutti e tre i criteri, e quindi *face*, *predictive* e *construct validity* (per una ampia review sull'argomento cfr. Yadid et al., 2000). Descriverli tutti sarebbe estremamente lungo ed esula dagli scopi di questa tesi, quindi riporterò brevemente i più utilizzati.

Uno dei primi modelli animali di depressione messo a punto è il *learned helplessness* (Seligman and Beagley, 1975), impotenza appresa, nel quale una prolungata esposizione dell'animale ad una serie di stimoli inevitabili, influenza successivamente la sua capacità di saperli evitare, inducendo una condizione di cosiddetta *impotenza* con perdita di peso corporeo, agitazione, disturbi del sonno, perdita della libido e deficit cognitivi. Uno dei più recenti è invece il modello di *stress cronico moderato* (CMS) (Willner, 1997): l'esposizione degli animali ad una serie di stress moderati (usualmente per alcune settimane) induce una diminuzione della risposta a stimoli gratificanti (come per esempio l'assunzione di zucchero), alterazioni nello schema del sonno (Cheeta et al., 1997) e riduzione dell'attività locomotoria (D'Aquila et al., 1994). Questo modello riprodurrebbe una condizione di anedonia, definita come

l'incapacità a rispondere al piacere che rappresenta il sintomo che più caratterizza la depressione umana (Klein, 1974). Il modello del *behavioral despair* (disperazione comportamentale) utilizza il test del nuoto forzato (Porsolt test; Porsolt et al., 1977) per creare una condizione di disperazione; quando l'animale è costretto a nuotare in una piccola vasca dalla quale non può fuggire, dopo un periodo di nuoto vigoroso, si immobilizza (disperazione); i farmaci antidepressivi diminuiscono il tempo di immobilità. I *modelli di separazione* (Kaufman and Rosenblum, 1967; Hinde et al., 1978) utilizzano la separazione dei piccoli dalla madre, o l'isolamento degli adulti dal gruppo, per produrre comportamenti alterati quali la riduzione dell'attività, dell'appetito, del gioco e di altre interazioni sociali, sintomi anch'essi facilmente riscontrabili in un paziente severamente depresso. Il modello di *distruzione del bulbo olfattorio* (Cairncross et al., 1977), crea negli animali una serie di comportamenti che vanno dall'irritabilità e iperattività al deterioramento dell'apprendimento condizionato, che si accompagnano ad un aumento dei livelli circolanti di corticosteroidi. Più recentemente è stato messo a punto un modello genetico di depressione, il modello *Flinders Sensitive Line* (FSL), ottenuto attraverso la selezione di ratti che mostrano un'alta sensibilità ai farmaci colinergici. Tali animali sono caratterizzati da una riduzione dell'appetito e dell'attività locomotoria, da deficit cognitivi, da un comportamento di anedonia in risposta a stimoli gratificanti ed uno schema alterato del sonno (per una review cfr. Overstreet, 2005).

Esiste un generale consenso sul fatto che nella sperimentazione di farmaci antidepressivi è estremamente importante utilizzare modelli animali caratterizzati da una "sintomatologia depressiva" protratta nel tempo. Infatti, considerando l'assoluta inefficacia degli antidepressivi negli individui sani, e la latenza nella comparsa dell'effetto antidepressivo nell'uomo, il modello animale ideale dovrebbe essere caratterizzato da sintomi depressivi che persistono almeno per diverse settimane.

Lo Stress Prenatale nel ratto: un modello animale di depressione protratta nel tempo per lo studio di farmaci antidepressivi

Il modello di Stress Prenatale (SP) nel ratto consiste nel sottoporre ratte gravide ad uno stress da contenzione durante l'ultima settimana di gestazione (Maccari et al., 1995), periodo durante il quale l'asse HHS fetale inizia a rilasciare i propri ormoni, l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e il corticosterone (Boudouresque et al., 1988). Lo stress da contenzione induce nelle madri, mediante l'attivazione dell'asse HHS, un aumento dei livelli plasmatici di corticosterone che attraversa la barriera placentare e influenza lo sviluppo neuroendocrino della progenie (ratti siglati come SP).

La progenie di madri stressate durante la gravidanza presenta, in età adulta, sintomi assimilabili a quelli della depressione umana descritti precedentemente. Più precisamente animali SP presentano:

1) *disregolazione dell'asse IIS*

Lo SP induce nei ratti una prolungata secrezione di corticosterone in risposta allo stress; tale alterazione persiste per tutto il corso della vita: prima dello svezzamento (Henry et al., 1994), in età adulta ed anche durante l'invecchiamento (Vallee et al., 1999). Inoltre, i ratti adulti SP presentano una riduzione dei recettori glucocorticoidei (GR) e mineralcorticoidei (MR) ippocampali, rispetto ad animali di controllo (Henry et al., 1994; Maccari et al., 1995; Barbazanges et al., 1996; Koehl et al., 1999). E' stato dimostrato che l'alterazione del controllo a feedback negativo sull'asse IIS nei ratti SP è legata all'aumento del corticosterone circolante materno evocato dai ripetuti stress da contenzione. Infatti, se nelle ratte gravide si inibisce il rilascio di corticosterone mediante asportazione delle ghiandole surrenali, seguita da una terapia sostitutiva con corticosterone che ha lo scopo di mantenere dei livelli fisiologici di corticosterone circolante, nella prole SP non si osserva più né la disregolazione dell'asse IIS, né la diminuzione dei recettori corticosteroidi nell'ippocampo (Barbazanges et al., 1996).

2) *alterazioni del ritmo circadiano e del sonno*

Molti processi fisiologici e comportamentali del nostro organismo fluttuano enormemente sulla base di un ritmo regolare nel corso delle 24 ore. Questo ritmo giornaliero o ritmo circadiano, è scandito da un sistema interno all'organismo collocato nel nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo, l'orologio circadiano (Stephan and Zucker, 1972; Turek and Van Reeth, 1995), ed è regolato da stimoli neurochimici e

comportamentali (Van Reeth and Turek, 1989; Piggins and Loudon, 2005). E' stato dimostrato che lo SP nel ratto adulto induce uno sfasamento della secrezione giornaliera di corticosterone, con livelli di corticosterone più alti alla fine del periodo di luce in entrambi i sessi, e un aumento della secrezione di corticosterone nell'intero ciclo diurno nelle femmine (Koehl et al., 1997; 1999). Gli effetti dello SP sulla secrezione circadiana del corticosterone potrebbero essere dovuti alla riduzione dei recettori corticosteroidi dell'ippocampo. Infatti, nei ratti maschi è stata osservata una riduzione dei recettori MR sia all'inizio che alla fine del periodo di luce (Koehl et al., 1999). In sintesi possiamo affermare che i ratti SP mostrano un'alterata funzionalità circadiana dell'asse HHS che conferma l'ipotesi di alterazioni nella risposta omeostatica.

Lo SP induce altre importanti alterazioni come la modifica dei parametri sonno-veglia negli animali adulti (Kant et al., 1995; Cespuglio et al., 1995). Sia in condizioni di base che in risposta ad uno stress da contenzione acuto, i ratti SP mostrano un aumento della quantità di sonno paradossale, positivamente correlato con i livelli di corticosterone plasmatici (Hubain et al., 1998; Dugovic et al., 1999) ed un aumento della frammentazione del sonno, un aumento del tempo totale di sonno leggero ad onde lente ed una diminuzione della percentuale di sonno profondo ad onde lente rispetto alla quantità totale di sonno (Dugovic et al., 1999; Maccari et al., 2003). Alterazioni del ritmo circadiano e del

sonno sono sintomi caratteristici della depressione (Argyropoulos and Wilson, 2005; Rosenwasser and Wirz-Justice, 1997).

3) alterazioni del comportamento

I ratti SP in età adulta mostrano un aumento del comportamento ansioso nel test del *Plus Maze*, utilizzato per lo screening di farmaci ansiolitici. E' stato anche dimostrato che nei ratti maschi SP, sottoposti al test del nuoto forzato (Porsolt test), un test classicamente usato per accertare l'efficacia di farmaci antidepressivi (Porsolt, 1978), si osserva un aumento dell'immobilità associato ad una diminuzione del tempo di nuoto (Maccari et al., 2001). Inoltre i ratti SP mostrano un aumento del comportamento di auto-somministrazione di psicostimolanti come l'anfetamina (Deminiere et al., 1992; Henry et al., 1995) e la nicotina (Koehl et al., 2000). Questi dati si accordano con quanto riscontrato nei pazienti affetti da depressione che mostrano sia un comportamento ansioso (Stahl, 1993; Rouillon, 1999), che una maggiore tendenza all'abuso di droghe (Sullivan et al., 2005; Cornelius et al., 2005).

4) alterazioni a carico del sistema serotoninergico

Le disfunzioni che si osservano nel cervello di ratti SP consistono in un aumento sia del contenuto, che dei recettori per la 5-HT nella corteccia (Peters 1986, 1990). Anche per quanto riguarda i soggetti umani, ci sono numerose evidenze, raccolte con studi *in vivo* (Drevets et al., 1997; Sargent et al., 2000), e *post-mortem* (Cheetham et al., 1989; Mann et al., 1989), che indicano la presenza di un'alterazione della

trasmissione serotoninergica nel cervello dei pazienti affetti da patologia di tipo depressiva.

5) riduzione della neurogenesi

In ratti SP è stato osservato che la proliferazione cellulare nel DG è ridotta, rispetto ai controlli, del 38% in età giovanile, del 59% in età adulta e del 55% durante la senescenza. Ciò indica che lo SP induce una significativa riduzione della proliferazione cellulare in tutte le fasi della vita (Lemaire et al., 2000). È stato dimostrato, inoltre, che le cellule proliferanti si differenziano per il 70% in neuroni e per il 20% in glia; tale fenomeno si osserva sia nei ratti di controllo che nei ratti SP ed indica che lo SP, pur influenzando la proliferazione cellulare non influenza invece il differenziamento. Infine, in questo studio si dimostra che la ridotta neurogenesi che caratterizza gli animali SP è associata a minori performance cognitive, valutate mediante il test di apprendimento *water maze*, a conferma del ruolo chiave che la neurogenesi gioca nei processi di apprendimento e memoria.

Nel momento in cui si intraprende uno studio sulla neurogenesi è importante definire gli obiettivi sperimentali che si vogliono raggiungere. Infatti, tale processo può essere studiato considerando le tre fasi che lo costituiscono: la proliferazione cellulare, la sopravvivenza e il differenziamento del fenotipo cellulare. Ognuna di queste fasi ha un significato funzionale diverso. Se si valuta solo la proliferazione, non si avranno indicazioni del numero di cellule proliferanti che saranno poi in

grado di sopravvivere e di diventare cellule funzionali, poiché, come abbiamo detto, buona parte di tali cellule andrà incontro ad una consistente morte cellulare. Valutando la sopravvivenza, invece, si possono avere informazioni sul grado di integrazione delle cellule nei circuiti. Solamente con l'analisi del fenotipo cellulare, si può stimare quante delle cellule sopravvissute ed integrate si sono differenziate in neuroni e quante in glia.

PREMESSE E SCOPI DELLA RICERCA

Da quanto è stato riportato nell'introduzione, è evidente che alcune delle alterazioni riscontrate in soggetti umani affetti da depressione maggiore possono essere riprodotte nel ratto con il modello di Stress Prenatale. Le alterazioni neurobiologiche presenti in animali SP che danno al modello una buona *face validity* sono rappresentate da: **i) disregolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene**, parametro neuroendocrino osservato in soggetti affetti da depressione maggiore; **ii) alterazioni del ritmo circadiano e del sonno** che possono essere paragonate alle anomalie del ritmo circadiano, alle alterazioni della regolazione del ciclo sonno-veglia e all'incremento del sonno paradossoso presenti in pazienti umani depressi; **iii) alterazioni del comportamento**: i ratti SP mostrano un comportamento ansioso che è caratteristico della depressione umana; **iv) alterazioni a carico del sistema serotoninergico** che ricordano le disfunzioni serotoninergiche riscontrate in pazienti affetti da depressione maggiore; **v) riduzione della neurogenesi**: recentemente è stata evidenziata nel cervello di pazienti affetti da depressione maggiore una riduzione del volume dell'ippocampo probabilmente conseguente ad una ridotta neurogenesi; anche nei ratti SP è possibile evidenziare la riduzione della neurogenesi nel giro dentato (Lemaire et al., 2000).

E' importante sottolineare che la validità di questo modello è rafforzata dal fatto che la maggior parte delle alterazioni permangono durante tutta la vita, dagli stadi precoci dello sviluppo, fino

all'invecchiamento. Quindi, lo Stress Prenatale indotto durante un preciso periodo della gravidanza "produce un animale" con un profilo di disturbi cronici che può essere utilizzato come modello per la valutazione di farmaci, potenzialmente antidepressivi, da sperimentare in fasi diverse della vita, dallo sviluppo all'invecchiamento, fasi in cui l'organismo, come noto, subisce delle profonde modifiche neurobiologiche che possono a loro volta influire sull'azione dei farmaci.

Primo obiettivo di questo studio è stato **verificare la *predictive validity*** del modello di SP. La *predictive validity*, cerca di stabilire quanto il modello risponda ai trattamenti farmacologici che si utilizzano nell'uomo. Uno dei farmaci più indicati, ancora oggi, per il trattamento della depressione maggiore, è l'antidepressivo triciclico imipramina, sebbene sia, come del resto gli altri triciclici, riservato solitamente a quei pazienti che non rispondono ad un ciclo di terapia con uno dei farmaci più nuovi come, per esempio, gli SSRI (ICSI Health Care Guideline, 2004). L'imipramina, inoltre, è stato, ed è, uno dei farmaci di maggiore utilizzo in campo pre-clinico per stabilire la *predictive validity* in molti modelli animali di depressione e può essere quindi considerato un farmaco di riferimento.

Lo studio di ***predictive validity del modello dello SP*** ha avuto lo scopo di verificare se il trattamento cronico **con imipramina** fosse in grado di normalizzare alcuni parametri alterati nei ratti SP. In particolare, abbiamo valutato: i) il comportamento degli animali alla fine del trattamento farmacologico mediante il test del nuoto forzato (Porsolt

test); ii) l'espressione dei recettori corticosteroidi MR e GR nell'ippocampo, che fornisce una valutazione sulla attività dell'asse ISS; iii) l'attività serotoninergica cerebrale, mediante la quantificazione dell'mRNA che codifica per il recettore 5-HT_{1A} nella corteccia prefrontale.

I risultati di questo studio sono stati pubblicati:

S. Morley-Fletcher, M. Darnaudery, E. Mocaer, N. Froger, L. Lanfumey, G. Laviola, P. Casolini, A.R. Zuena, L. Marzano, M. Hamon, S. Maccari Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT_{1A} receptor mRNA in prenatally stressed rats. Neuropharmacology 2004 Nov; 47(6): 841

Secondo obiettivo di questa ricerca è stato quello di utilizzare una molecola di recente acquisizione l'agomelatina, che ha mostrato possedere un buon effetto antidepressivo sia nell'uomo che in diversi modelli animali di depressione per **stabilire se i)** il trattamento cronico con **l'agomelatina fosse in grado di ripristinare la diminuita neurogenesi** ippocampale presente nei ratti SP. Inoltre sono stati valutati gli effetti del trattamento cronico con agomelatina su ii) l'espressione della neurotrofina BDNF, importante fattore di regolazione sia della neurogenesi (Zigava et al., 1998; Lee et al., 2002) che dell'azione dei farmaci antidepressivi (Shirayama et al., 2002); iii) l'espressione dei recettori metabotropici del glutammato del gruppo I, l'mGlu1 e l'mGlu5, poiché il sistema glutammatergico potrebbe rappresentare un importante target per le nuove terapie antidepressive

(Palucha et al., 2004; Paul e Skolnick, 2003), ed è stato anche dimostrato che il trattamento con farmaci antidepressivi tradizionali modifica l'espressione e la funzione dei recettori mGlu nel cervello di ratto (Matrisciano, 2002).

I risultati di questo studio sono in fase di preparazione per essere sottoposti alla pubblicazione sulla rivista Journal of Neuroscience:

S. Maccari, S. Morley-Fletcher, J. Mairesse, O. Viltart, A. Daszuta, A. Soumier, M. Hery, C. Gabriel, E. Mocaer, A.R. Zuena, P. Matteucci, C. Cinque, A. Catalani, P. Casolini Chronic treatment with agomelatine reverses the decrease in hippocampal neurogenesis and survival in prenatally stressed adult rats. J. Neurosci. In preparation

MATERIALI E METODI

Animali e condizioni di allevamento

Sono stati utilizzati ratte femmine nullipare Sprague-Dawley del peso di circa 250 gr e ratti maschi Sprague-Dawley di accertata fertilità forniti dalla ditta Harlan-Italy. Dal loro arrivo gli animali sono stati lasciati indisturbati in un ambiente a temperatura costante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), con un ciclo luce-buio di 12 ore (la luce si accende alle ore 08:00). Cibo ed acqua sono stati forniti *ad libitum*. Quattro settimane dopo l'arrivo le ratte femmine sono state raggruppate quattro per gabbia per coordinare e sincronizzare il loro ciclo estrale (7 giorni). In seguito sono state accoppiate ognuna con un maschio per tutta la durata del ciclo estrale, al termine del quale, sono state poste singolarmente in gabbie di Plexiglass (50 x 35 x 25 cm). Le ratte gravide sono state successivamente suddivise in modo casuale in un gruppo di Controllo ed in un gruppo sottoposto a stress durante la gravidanza.

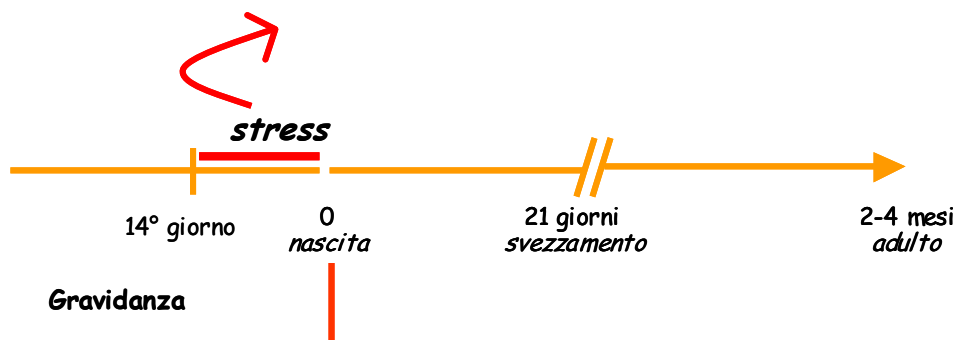
Procedura di Stress Prenatale

Lo Stress Prenatale (SP) è stato indotto secondo il protocollo descritto da Maccari et al., 1995: dal 14° giorno di gravidanza, fino al giorno del parto, le ratte gravide sono state sottoposte quotidianamente a tre sessioni di stress da contenzione (ore 09:00, 12:00, 17:00), che

consiste nel mantenerle in cilindri di plastica trasparente per 45 min. (diametro=7 cm; lunghezza=19 cm) sotto una luce molto intensa (60 Watt). Le ratte gravide del gruppo di Controllo sono state, invece, lasciate indisturbate nelle loro gabbie per tutto il periodo della gravidanza. La prole è stata svezzata al 21° giorno dalla nascita, suddivisa in base al sesso in gruppi di quattro animali per gabbia mantenuti nelle stesse condizioni fino all'età adulta quando sono stati sottoposti agli esperimenti. E' stata utilizzata solo la progenie maschile adulta proveniente da nidiaste costituite da almeno 10-14 piccoli e con un numero bilanciato di maschi e femmine. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con i principi della tutela degli animali di laboratorio (Direttive della Comunità Europea e della Legge Italiana).



Stress da contenzione sulle ratte gravide dal 14° giorno di gravidanza fino al parto 3X45 min



Fase I

Trattamento cronico con imipramina

La prole maschile adulta costituita da 48 animali provenienti da dodici nidiatae di Controllo e dodici nidiatae SP è stata suddivisa e sottoposta a trattamento cronico con imipramina o con soluzione salina (veicolo), secondo il seguente schema:

12 ratti maschi (uno per ogni nidiata) Controllo-imipramina

12 ratti maschi (uno per ogni nidiata) Controllo-veicolo

12 ratti maschi (uno per ogni nidiata) SP-imipramina

12 ratti maschi (uno per ogni nidiata) SP-veicolo

L'imipramina (Sigma), sciolta in salina (0,9%) è stata iniettata per via intraperitoneale (i.p.) alla dose di 10 mg/kg in un volume di 2 ml. Le somministrazioni sono state effettuate una volta al giorno per 21 giorni, due ore prima del periodo di buio (ore 18:00). I ratti non trattati con imipramina sono stati iniettati con uno stesso volume di salina (2 ml/kg). All'inizio del trattamento gli animali avevano 4 mesi di età.

Test del nuoto forzato

Una settimana dopo la fine del trattamento antidepressivo con imipramina gli animali sono stati sottoposti al test del nuoto forzato (versione riadattata del test del nuoto forzato, Porsolt et al., 1978). Un contenitore cilindrico di plastica trasparente (altezza=59 cm; diametro=25 cm) è stato riempito di acqua alla temperatura di 25°C

fino ad un livello di 36 cm. Nella prima sessione (giorno 1, Pretest) i ratti sono stati posti per 15 min nell'acqua per un ambientamento; successivamente sono stati rimossi dall'acqua e asciugati in una stanza riscaldata prima di ritornare nella propria gabbia. Ventiquattro ore dopo (giorno 2, Test) i ratti sono stati messi di nuovo nel cilindro per 5 min ed è stata misurata la durata del comportamento passivo di immobilità (galleggiamento nell'acqua con i soli movimenti necessari per tenere la testa fuori dall'acqua). Poiché nel test del nuoto forzato i farmaci antidepressivi modificano alcuni schemi di comportamento attivo (Lucki, 1997), sono stati registrati il comportamento di "climbing" (movimenti attivi con le zampe anteriori, di solito diretti verso le pareti del cilindro) e quello di "swimming" (movimenti attivi di nuoto intorno al cilindro).

Neurochimica

Al termine del test del nuoto forzato tutti gli animali sono stati decapitati, il cervello è stato rapidamente rimosso e sezionato per il prelievo dell'ippocampo e della corteccia prefrontale. Il tessuto prelevato è stato congelato in ghiaccio secco e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo per l'analisi neurochimica.

Binding dei recettori corticosteroidi nell'ippocampo

Per la valutazione dei recettori corticosteroidi totali (MR + GR) nell'ippocampo sono stati utilizzati 6 degli animali precedentemente sottoposti al test del nuoto forzato, per ogni gruppo sperimentale (Controllo-veicolo, Controllo-imipramina, SP-veicolo, SP-imipramina).

L'ippocampo di ogni animale è stato omogeneizzato in 2 ml di tampone TEGDM (Tris-HCl 30 mM; sodio molibdato 10 mM; ditiotreitolo 1mM e glicerolo 10%). Gli omogenati sono stati quindi ultracentrifugati a 105,000 g (4°C) per 60 min., al fine di separare il citosol dalle membrane cellulari. Dopo la centrifugazione, il citosol è stato passato per due volte in colonne di resina Sephadex LH-20, precedentemente preparata con tampone TEGM (Tris-HCl 10 mM; sodio molibdato 10 mM e β -mercaptoetanol 2.3 mM), allo scopo di eliminare il corticosterone libero citosolico che, altrimenti, durante la fase di incubazione può competere con l'ormone triziato (Casolini et al., 1993, 1997). Aliquote di citosol (140 μ l) sono state incubate in provette contenenti corticosterone triziato (3 H-B) alla concentrazione saturante di 40 nM (attività specifica 76.5 Ci/mmol; New England Nuclear, Italia). Il valore di legame aspecifico è stato valutato in parallele provette di incubazione contenenti una concentrazione di corticosterone freddo (non triziato) 500 volte superiore alla concentrazione di quello caldo. Il citosol è stato quindi lasciato in incubazione *overnight* ad una temperatura di 4°C. Il complesso 3 H-B- recettore è stato separato dal 3 H-B libero per mezzo di una cromatografia ad esclusione molecolare effettuata mediante colonne di resina Sephadex LH-20. La radioattività presente nell'eluato raccolto alla fine della cromatografia è stata determinata, dopo aggiunta del liquido di scintillazione, con un β -counter. Poiché in un precedente lavoro era stato osservato che l'affinità dei recettori corticosteroidi non è influenzata dallo SP (Henry et al., 1994; Maccari et al., 1995;

Barbanzages et al., 1996; Koehl et al., 1997, 1999), nel presente studio è stata misurata solamente la densità di tali recettori (Bmax, espressa come fmol/mg proteina). La concentrazione delle proteine citosoliche è stata determinata secondo il metodo di Lowry (1951) utilizzando l'albumina come standard.

Determinazione quantitativa dell'mRNA dei recettori 5-HT_{1A} nella corteccia prefrontale

Per la valutazione dell'mRNA dei recettori 5-HT_{1A} nella corteccia prefrontale sono stati utilizzati 6 degli animali precedentemente sottoposti al test del nuoto forzato, per ogni gruppo sperimentale (Controllo-veicolo, Controllo-imipramina, SP-veicolo, SP-imipramina). L'amplificazione è stata realizzata mediante PCR competitiva inversa (RT-PCR) (Siebert and Larrick, 1992), nella quale gli mRNA dei geni analizzati sono retro-trascritti ed amplificati in presenza di uno standard interno di mRNA omologo, modificato mediante la delezione di alcuni nucleotidi, utilizzando una RT-PCR Access System Kit (Promega, Madison, WI, USA). La determinazione quantitativa dell'mRNA del recettore 5-HT_{1A} nella corteccia prefrontale è stata effettuata come descritto da Le Poul et al. (2000). La retro-trascrizione (45 min a 48°C) è stata effettuata con 0.5 µg di RNA tissutale totale in presenza di uno standard di RNA deleto a diluizioni crescenti (da 10⁻⁶ a 3 x 10⁻⁸). La sequenza di primers di oligonucleotidi utilizzata è stata la seguente: "upstream" 5'-CTCTACGGGCGCATCTTCAGA-3' (nucleotidi 762-782) e "downstream" 5'-CCCAGAGTCTTCACCGTCTTC-3' (nucleotidi 1165-1145)

(Albert et al., 1990). L'amplificazione è stata effettuata con 1-2 unità di Tfl DNA polimerasi, 1 mM di MgSO₄ e 1 pg/μl di ogni primer per 30 cicli (1 min a 95°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C). Dopo la separazione elettroforetica su gel di agarosio al 2% marcato con bromuro d'etidio al 4%, sia lo standard che l'amplificato sono stati quantificati con un software analizzatore di gel (NIH 1.6). I livelli di mRNA sono stati espressi come attomoli (amol) di uno standard sintetico di RNA per microgrammo di RNA totale.

Analisi statistica

Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) 2x2 [gruppo (Controllo vs SP) e trattamento (veicolo vs imipramina)], seguita dal test "t di Student".

Fase II

Trattamento cronico con agomelatina

La prole maschile adulta proveniente da dodici nidiata SP e dodici nidiata di Controllo è stata sottoposta a trattamento cronico con agomelatina o a trattamento con il solo veicolo in cui è stata sciolta l'agomelatina, secondo il seguente schema:

12 ratti maschi (uno per ogni nidiata) Controllo-agomelatina

12 ratti maschi (uno per ogni nidiata) Controllo-veicolo

12 ratti maschi (uno per ogni nidiata) SP-agomelatina

12 ratti maschi (uno per ogni nidiata) SP-veicolo

L'agomelatina (Servier; Francia) è stata sciolta in idrossietilcellulosa (HEC 1%) e iniettata i.p. alla dose di 40 mg/kg in un volume di 1 ml. Le somministrazioni sono state effettuate una volta al giorno per 6 settimane, due ore prima del periodo di buio (ore 18:00). I ratti veicolo hanno ricevuto iniezioni di HEC nello stesso volume (HEC 1%, 1 ml/kg). All'inizio del trattamento gli animali avevano 2 mesi di età.

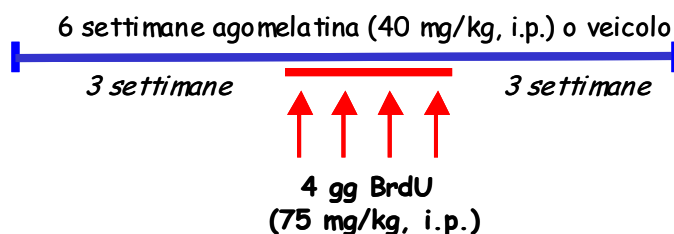
Valutazione in vivo della neurogenesi

Negli studi originali sulla proliferazione cellulare *in vivo* è stata utilizzata la [³H] timidina ([³H]dT) incorporata nelle cellule durante la sintesi del DNA (fase S del ciclo cellulare). Le cellule in mitosi attiva sono state poi evidenziate mediante autoradiografia. Più recentemente, invece della [³H]dT, si utilizza la Bromo desossiUridina (BrdU), un analogo della timidina (Nowakowski et al., 1989), rivelata mediante immunostochimica. Il tempo che intercorre tra l'ultima somministrazione di BrdU e il sacrificio dell'animale può essere adattato alla tappa della neurogenesi che si vuole studiare: la proliferazione cellulare, la sopravvivenza o la determinazione del fenotipo cellulare. Per studiare la proliferazione cellulare gli animali devono essere sacrificati subito dopo l'ultima somministrazione di BrdU, in una breve finestra di tempo che può andare da poche ore a pochi giorni. La sopravvivenza delle nuove cellule che si sono formate, invece, viene usualmente osservata sacrificando l'animale dopo un periodo di tempo più lungo

(diverse settimane dall'ultima somministrazione di BrdU). Noi abbiamo studiato la sopravvivenza cellulare.

Somministrazione di BrdU

Dopo 3 settimane dall'inizio del trattamento con agomelatina (durato 6 settimane), 6 animali per ogni gruppo sperimentale (Controllo-agomelatina, Controllo-veicolo, SP-agomelatina, SP-veicolo) sono stati iniettati i.p. anche con BrdU (75 mg/kg in un volume di 3 ml di salina), due volte al giorno (ore 11:00 e 15:00) per 4 giorni. Il trattamento con agomelatina è proseguito fino alla 6^a settimana quando gli animali sono stati sacrificati, 24 ore dopo l'ultima iniezione di agomelatina. (Dall'ultima somministrazione di BrdU erano trascorsi 18 giorni, periodo di tempo che permette di analizzare la sopravvivenza delle cellule che hanno proliferato).



Gli animali, in un numero di 6 per ciascun gruppo sperimentale (Controllo-veicolo, SP-veicolo, Controllo-agomelatina, SP-agomelatina) trattati con BrdU, sono stati sacrificati mediante perfusione e il cervello prelevato per l'analisi immunohistochimica e l'immunofluorescenza.

Gli animali, in un numero di 6 per ciascun gruppo sperimentale (Controllo-veicolo, SP-veicolo, Controllo-agomelatina, SP-agomelatina)

non trattati con BrdU, sono stati sacrificati mediante decapitazione ed il cervello isolato per il prelievo dell'ippocampo, utilizzato per determinare, mediante Western Blotting, l'espressione del BDNF e dei recettori metabotropici del glutammato (mGlu).

Procedura di perfusione e prelievo dei cervelli

Per effettuare la perfusione cerebrale gli animali sono stati rapidamente anestetizzati mediante somministrazione di pentobarbital (60 mg/kg i.p.); subito dopo sono stati perfusi per via aortica con 150 ml di salina (0.9%), e 400 ml di paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0.1M (pH=7.4). Dopo la perfusione i cervelli sono stati prelevati e fissati per 24 ore in paraformaldeide e successivamente tagliati in fettine di 40 μ m mediante un vibratomo (Leica) nell'intervallo che comprende tutto l'ippocampo e va da -1.8 a -6.1 posteriormente al bregma (Paxinos and Watson, 1997). In 6 diverse provette contenenti PBS (0.1 M; pH=7.4) + Sodio Azide (0.1%) sono state poste circa 16 fettine di ogni cervello in maniera tale che ciascuna provetta contenesse fettine non sequenziali, ma distanziate tra loro di 240 μ m; questa accortezza sperimentale è necessaria al fine di evitare che la stessa cellula possa essere contata in più di una fettina. Le provette contenenti le fettine sono state poi conservate a -20°C fino al momento dell'analisi immunohistochimica e dell'immunofluorescenza.

Immunoistochimica per la quantificazione della BrdU incorporata

Tutte le fettine contenute in una provetta, 16 fettine per ogni animale, sono state utilizzate per l'analisi immunoistochimica delle cellule che hanno incorporato la BrdU. Le fettine sono state trattate con HCl 2 M (20 min a 37°C) per permettere la denaturazione del DNA e poi lavate in tampone borato per 5 min (0.1 M; pH=8.4). Successivamente le fettine sono state abbondantemente lavate con PBS, preincubate per 45 min. con PBS contenente 0.1% di Triton X-100 e 3% di siero di asino (NDS; Jackson) e incubate per 48 ore (in agitatore a 4°C) con un anticorpo primario monoclonale anti-BrdU (1:500; Boeringer) diluito in PBS contenente 0.1% di Triton X-100 e 1% di NDS. Le fettine sono state successivamente incubate per 2 ore con un anticorpo secondario specifico anti-mouse (1:500; Jackson) diluito in PBS contenente 0.1% di Triton X-100 e 1% di NDS. La immunoreattività è stata rivelata mediante il sistema avidina-biotina-perossidasi (ABC Elite kit; Vector Laboratories) utilizzando la 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma) come cromogeno (10 min di incubazione). Dopo diversi lavaggi con PBS le sezioni sono state montate su vetrino e disidratate in soluzioni crescenti di etanolo (70%, 96% e 100%). Infine è stato eseguito un passaggio in xilolo e i vetrini sono stati coperti con coprioggetto, usando come fissante la colla Entellan (Merck).

Analisi quantitativa della immunoreattività della BrdU

Le cellule marcate con l'anticorpo anti-BrdU sono state contate su un totale di 16 fettine per ogni animale nella zona subgranulare (SGZ), nell'ileo (H) e nello strato di cellule granulari (GCL) del giro dentato, nell'intervallo che comprende tutto l'ippocampo e va da -1.8 a -6.1 posteriormente al bregma (Paxinos and Watson, 1997), utilizzando un microscopio ottico (Zeiss; ingrandimento 40x). La conta cellulare è stata effettuata per due volte da 2 sperimentatori diversi non a conoscenza del trattamento.

Determinazione del fenotipo delle nuove cellule

Un altro passo importante quando si studia la neurogenesi è stabilire il fenotipo delle cellule che sono sopravvissute, ovvero definire la percentuale di cellule che si differenziano in neuroni. A questo scopo si effettua una doppia immunomarcatura fluorescente della BrdU con un marker neuronale (proteina neuronale nucleare specifica NeuN).

Immunofluorescenza per la determinazione del fenotipo neuronale

Sedici fettine per ogni animale sono state messe in una provetta e sono state utilizzate per la determinazione del fenotipo neuronale. Le fettine trattate con HCl 2 M (20 min a 37°C) per permettere la denaturazione del DNA e poi lavate in tampone borato per 5 min (0.1 M; pH=8.4), sono state poi incubate per 48 ore (in agitatore a 4°C) con l'anticorpo primario ratto-anti-BrdU (1:500; ImmunologicalsDirect)

insieme all'anticorpo primario monoclonale anti-NeuN per marcare i neuroni (1:1000; Chemicon). Dopo diversi lavaggi in PBS le fettine sono state incubate per 1 ora con i rispettivi anticorpi secondari fluorescenti: anti-rat (1:300; Jackson), anti-mouse (1:300; Invitrogen). Le fettine sono state infine montate su vetrino utilizzando come montante una soluzione in grado di rallentare il decadimento della fluorescenza: 10gr Mowiol (Sigma), 2.5 gr DABCO (Sigma), 90 ml PBS 0.1M, pH=7.4 e 40 ml glicerina.

Analisi dell'immunofluorescenza per la colocalizzazione BrdU-NeuN

L'immunofluorescenza è stato visualizzata mediante un microscopio confocale (Zeiss, LSM510 a scansione laser) con obiettivo 40x, che ha permesso di analizzare e visualizzare cellule marcate con due diversi anticorpi (doppia immunomarcatura) sulla stessa fettina mediante due immagini distinte: una che mostra solo le cellule marcate con l'anticorpo anti-BrdU che hanno una colorazione rossa, ed una che evidenzia le cellule marcate con l'anticorpo anti-NeuN che hanno, invece, una colorazione verde. Il microscopio permette anche l'integrazione in un'unica immagine che permette di osservare la colocalizzazione della doppia immunofluorescenza BrdU-NeuN in quanto tutte le cellule che hanno incorporato BrdU e si sono differenziate in neuroni hanno una colorazione differente dalle precedenti, giallo-arancione. Il microscopio confocale fornisce anche una immagine tridimensionale delle cellule marcate che ha permesso di escludere che

la colorazione giallo-arancio osservata sull'immagine bidimensionale non fosse dovuta alla sovrapposizione di due cellule diverse ma ad una reale colocalizzazione dei due anticorpi sulla stessa cellula. Al fine di determinare la percentuale di cellule che si sono differenziate in neuroni (colocalizzazione BrdU-NeuN) rispetto a tutte le cellule che hanno incorporato BrdU, su tutte le 16 fettine di ogni animale sono state selezionate 50 cellule BrdU-positive a caso e ogni cellula è stata analizzata in tutta la sua profondità (analisi tridimensionale) mediante una serie di scansioni di 1 μ m.

Western Blotting per la valutazione dell'espressione del BDNF e dei recettori mGlu nell'ippocampo

Per il Western Blotting sono stati utilizzati 6 animali per ogni gruppo sperimentale, sacrificati per decapitazione. Il cervello è stato rapidamente rimosso, posto su ghiaccio e sezionato per il prelievo dell'ippocampo. Gli ippocampi prelevati sono stati congelati e conservati a -80°C suddivisi in due emi-ippocampi: un emi-ippocampo è stato utilizzato per determinare l'espressione del BDNF ed uno per l'espressione dei sottotipi recettoriali mGlu1 ed mGlu5.

Per la determinazione del BDNF, gli emi-ippocampi sono stati omogeneizzati a 4°C con Politron (Kinematica) in 500 μ l/50 mg tessuto di buffer di lisi (TRIS 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Leupeptina 10 μ g/ml, Aprotinina 10 μ g/ml). Il dosaggio delle proteine è stato effettuato con il metodo Bradford e 70 μ g di proteine sono stati diluiti 1:4 con sodio dodecil solfato (SDS)/ blu di bromofenolo loading buffer, contenente 0.5

M di ditiotreitolo e bollite per 5 min. L'elettroforesi è stata eseguita con un apparato "Protean xi II Cell" (BioRad) usando un gel di poliacrilamide alla concentrazione del 12%. I campioni e lo standard (di peso molecolare noto) sono stati caricati all'interno dei pozzetti del gel di poliacrilamide e fatti migrare *overnight* ad una corrente costante di 6 mA. Il trasferimento delle proteine separate è stato effettuato su membrana di nitrocellulosa (Hybond, Amersham Bioscience), utilizzando un sistema *electroblotting* (BioRad, Transblot SD) ad una corrente di 450 mA per 4 ore a 4°C. Al termine del trasferimento, la membrana è stata colorata con Rosso Ponceau (1%) in acido acetico (5%), per poter controllare l'efficienza di trasferimento. Al fine di bloccare i siti aspecifici di legame, le membrane sono state incubate per 1 ora in tampone TTBS (10 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.5% Tween-20, pH 7.4), contenente il 2% di latte in polvere non grasso. Le membrane sono state quindi incubate *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario policlonale anti-BDNF (1:500 in TTBS) (Santa Cruz Biotechnology). Quindi, sono state lavate due volte per 7 min in tampone TTBS e poi nuovamente incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario (Amersham Bioscience) diluito in TTBS (anti-rabbit 1:10000). Al fine di verificare l'esatto caricamento delle proteine nei diversi pozzetti, le stesse membrane sono state incubate *overnight* a 4°C con l'anticorpo primario monoclonale anti- β -actina (1:1000 in TTBS) (Sigma). Quindi, sono state lavate due volte per 7 min in tampone TTBS e poi nuovamente incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario (Amersham Bioscience) diluito in TTBS (anti-mouse 1:5000).

Per la determinazione dei recettori mGlu1 ed mGlu5, gli emi-ippocampi sono stati sottoposti alle stesse procedure utilizzate per il BDNF lievemente modificate: il buffer di lisi (TRIS 100 mM, NaCl 5 M, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Leupeptina 10 µg/ml, Aprotinina 10 µg/ml), la concentrazione del gel di poliacrilammide all'8%, e gli anticorpi primari anti-mGluR1 (1:500 in TTBS) e mGluR5 (1:1000 in TTBS) (Upstate).

L'immunomarcatura è stata rivelata mediante il sistema di analisi a chemiluminescenza (ECL, Amersham Bioscience). Le lastre fotografiche (Kodak) così ottenute, sono state esposte alla reazione di chemiluminescenza per un tempo compreso tra i 30 e 40 minuti. La densità ottica delle bande è stata determinata utilizzando un software di densitometria (Scion Image).

Analisi statistica

Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) 2x2 [gruppo (Controllo vs SP) e trattamento (veicolo vs imipramina)], seguita dal test "t di Student".

RISULTATI

Fase I

Effetti dell'imipramina sul comportamento nel test del nuoto forzato (Fig. 1, Fig. 2)

Lo Stress Prenatale (SP) aumenta il tempo di immobilità durante il test del nuoto forzato, e il trattamento con imipramina elimina questo effetto. I tempi di immobilità sono stati analizzati con l'ANOVA a due vie, una per le due diverse condizioni (presenza o assenza di SP) e l'altra per i due diversi trattamenti (imipramina o veicolo) ed è stato dimostrato un marcato effetto del trattamento ($F_{1,40}=8.05$, $p<0.01$), ed una differenza significativa fra le due condizioni ($F_{1,40}=4.59$, $p<0.05$). Il t di Student condotto separatamente sui gruppi trattati o no con imipramina, indica che i ratti SP non trattati rimangono in una condizione di immobilità per un tempo maggiore rispetto ai controlli ($t_{20}=-2.56$; $p<0.05$), e che il trattamento cronico con imipramina riporta i tempi di immobilità a valori simili a quelli dei controlli-veicolo ed elimina quindi l'effetto dello Stress Prenatale ($t_{20}=2.79$; $p<0.05$ SP-imipramina vs SP-veicolo). L'imipramina non ha invece alcun effetto negli animali di controllo (**Fig. 1**). Lo Stress Prenatale non modifica l'attività di "climbing" e "swimming" nel test del nuoto forzato (dati non mostrati), mentre il trattamento con imipramina modifica l'attività di "climbing" ($F_{1,40}=10.08$, $p<0.01$). Un'analisi condotta separatamente sui gruppi SP e controlli mostra un aumento

significativo del "climbing" indotto dal trattamento con l'antidepressivo nel gruppo SP ($t_{20}=2.59$; $p<0.05$ SP-veicolo vs SP-imipramina), e nessuna variazione nel gruppo di controllo (**Fig. 2**).

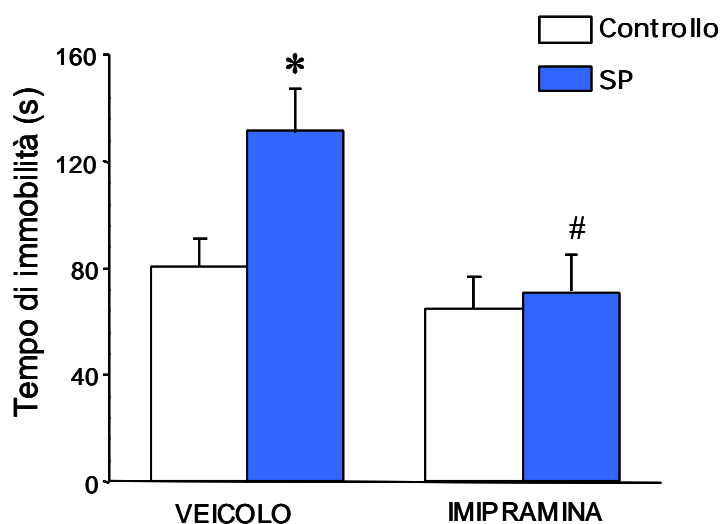


Fig. 1 Effetto del trattamento cronico con imipramina (10 mg/kg i.p., 1 volta al giorno, per 21 giorni) sul tempo di immobilità (media \pm E.S.) nel test del nuoto forzato (n=12 per ogni gruppo di trattamento).

Test t di Student

* $p<0.05$ SP-veicolo vs Controllo-veicolo

$p<0.05$ SP-imipramina vs SP-veicolo

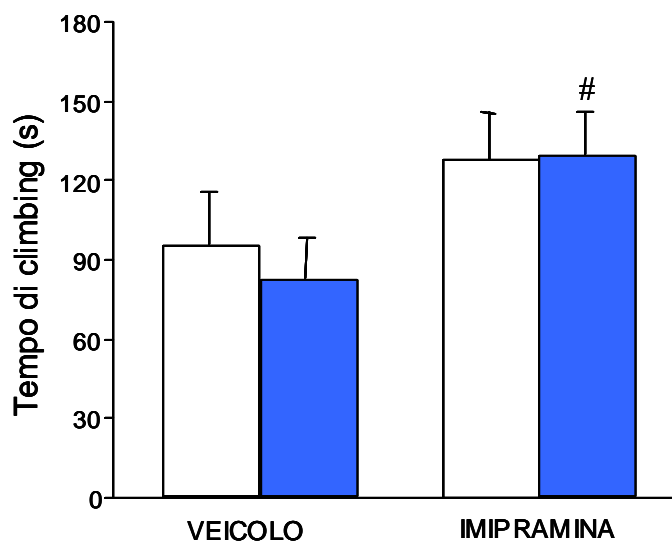


Fig. 2 Effetto del trattamento cronico con imipramina (10 mg/kg i.p., 1 volta al giorno, per 21 giorni) sul tempo di "climbing" (media \pm E.S.) nel test del nuoto forzato (n=12 per ogni gruppo di trattamento).

Test t di Student

$p<0.05$ SP-imipramina vs SP-veicolo

Effetti dell'imipramina sulla densità dei recettori corticosteroidi nell'ippocampo (Fig. 3)

L'analisi statistica (ANOVA 2X2) relativa ai dati sulla densità dei recettori corticosteroidi nell'ippocampo mostra una significativa interazione tra condizione e trattamento ($F_{1,26}=4.20$, $p<0.05$). Una analisi condotta separatamente sui gruppi trattati e non trattati con l'antidepressivo, dimostra che lo Stress Prenatale riduce i livelli totali (MR+GR) di recettori corticosteroidi, ($t_{10}=2.08$; $p<0.05$); tali livelli aumentano significativamente in seguito al trattamento con imipramina nel gruppo SP, ritornando a livelli simili a quelli riscontrati nei controlli ($t_{10}=-2.5$; $p<0.05$ SP-veicolo vs SP-imipramina). L'antidepressivo non ha invece alcun effetto nel gruppo di controllo.

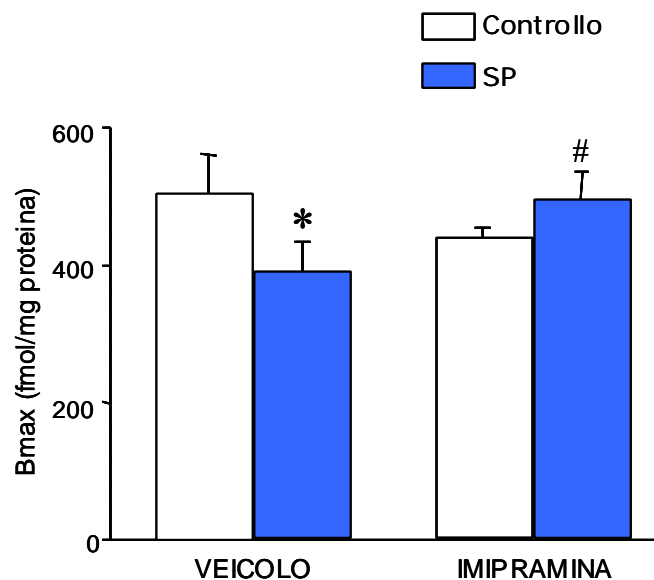


Fig. 3 Effetto del trattamento cronico con imipramina (10 mg/kg i.p., 1 volta al giorno, per 21 giorni) sulla capacità di legame (media \pm E.S.: B_{max} , fmol/mg proteina) dei recettori corticosteroidi totali (MR + GR) nell'ippocampo (n=6 per ogni gruppo di trattamento)

Test t di Student

* $p<0.05$ SP-veicolo vs Controllo-veicolo

$p<0.05$ SP-imipramina vs SP-veicolo

Effetti dell'imipramina sui livelli di mRNA dei recettori 5-HT_{1A} nella corteccia (Fig. 4)

Lo Stress Prenatale modifica significativamente i livelli di mRNA dei recettori 5-HT_{1A} e il trattamento con imipramina cancella tale effetto. Un significativo effetto della condizione (presenza o assenza di SP) ($F_{1,18}=4.48$, $p<0.05$) e del trattamento (imipramina o veicolo) ($F_{1,18}=7.07$, $p<0.05$) è messo in evidenza dall'ANOVA 2x2, con una interazione ai limiti della significatività ($F_{1,18}=3.92$, $p=0.06$). I livelli di mRNA dei recettori 5-HT_{1A} nella corteccia prefrontale sono significativamente più alti (+89%) nei ratti SP rispetto ai controlli ($t_{10}=-2.4$; $p<0.05$). Dopo il trattamento cronico con imipramina nel gruppo SP si osserva una marcata riduzione (-51% rispetto al gruppo SP-veicolo) che riporta i livelli di mRNA a valori uguali a quelli dei controlli ($t_9=2.51$; $p<0.05$ SP-imipramina vs SP-veicolo). Al contrario, nessun effetto dell'imipramina si osserva nel gruppo di controllo.

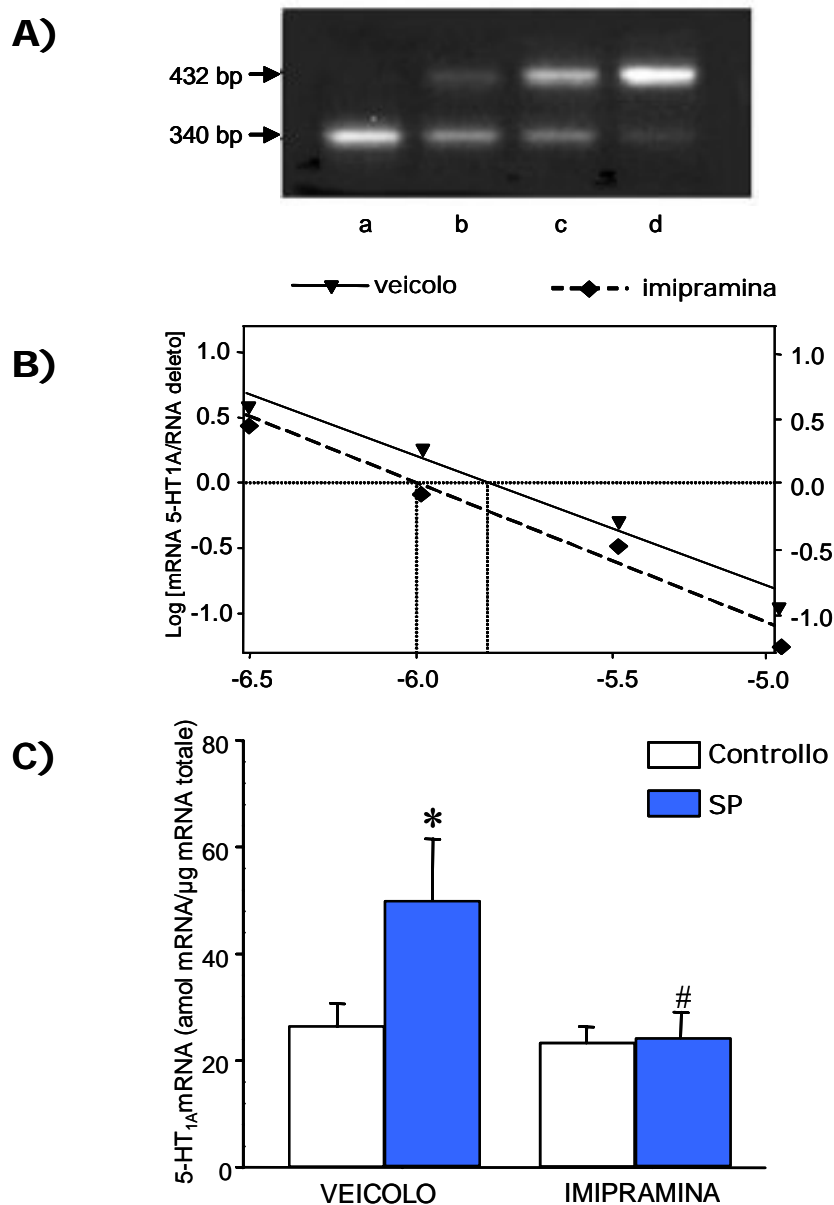


Fig. 4 Dosaggio dell'mRNA del recettore 5-HT_{1A} nella corteccia prefrontale. (A) Esempio di separazione elettroforetica dei prodotti della RT-PCR a,b,c,d rappresentano le diluizioni dell'mRNA delecto sintetico (concentrazione iniziale: 0.72 μg/μl; a: 10⁻⁵; b: 3 x 10⁻⁵; c: 10⁻⁶; d: 3 x 10⁻⁷). (B) Grafico per la quantificazione dei prodotti della PCR: il rapporto logaritmico della quantità (misurazioni di OD) dell'mRNA specifico (432 bp) sulla quantità di RNA sintetico delecto (340 bp) è riportato come una funzione del logaritmo di ogni diluizione seriale dell'RNA sintetico delecto. La retta di intersezione con l'asse delle x fornisce la diluizione equivalente dell'RNA sintetico delecto, e quindi la quantità equivalente dell'mRNA specifico per il recettore 5-HT_{1A} nel ratto. (C) Effetto del trattamento cronico con imipramina (10 mg/kg i.p., 1 volta al giorno, per 21 giorni) (n=5 per ogni gruppo di trattamento). I valori sono espressi come attomoli di mRNA per microgrammo di RNA totale (media ± E.S.) Test t di Student * p<0.05 SP-veicolo vs Controllo-veicolo # p<0.05 SP-imipramina vs SP-veicolo.

Fase II

Effetti dell'agomelatina sulla neurogenesi nel giro dentato (Fig. 5)

Lo Stress Prenatale riduce la neurogenesi nel giro dentato ed il trattamento con agomelatina abolisce questo effetto. L'analisi con l'ANOVA, relativa al numero di cellule che hanno incorporato BrdU, nelle due diverse condizioni (presenza o assenza di SP) e nei due diversi trattamenti (agomelatina e veicolo), rivela la presenza di un effetto interazione condizione-trattamento ($F_{1,28}=3.96$, $p<0.05$); l'analisi con il test di Student dimostra che i ratti SP presentano un numero di cellule BrdU-positive minore rispetto ai controlli ($t_{10}=2.42$; $p<0.05$). Il trattamento cronico con agomelatina inverte l'effetto dello Stress Prenatale, aumenta significativamente il numero di cellule marcate con BrdU nel gruppo SP ($t_{10}=2.76$, $p<0.05$), ma non ha alcun effetto nel gruppo di controllo. E' interessante notare che il trattamento con il farmaco negli animali SP stimola la neurogenesi che risultava diminuita, mentre la lascia immutata negli animali di controllo.

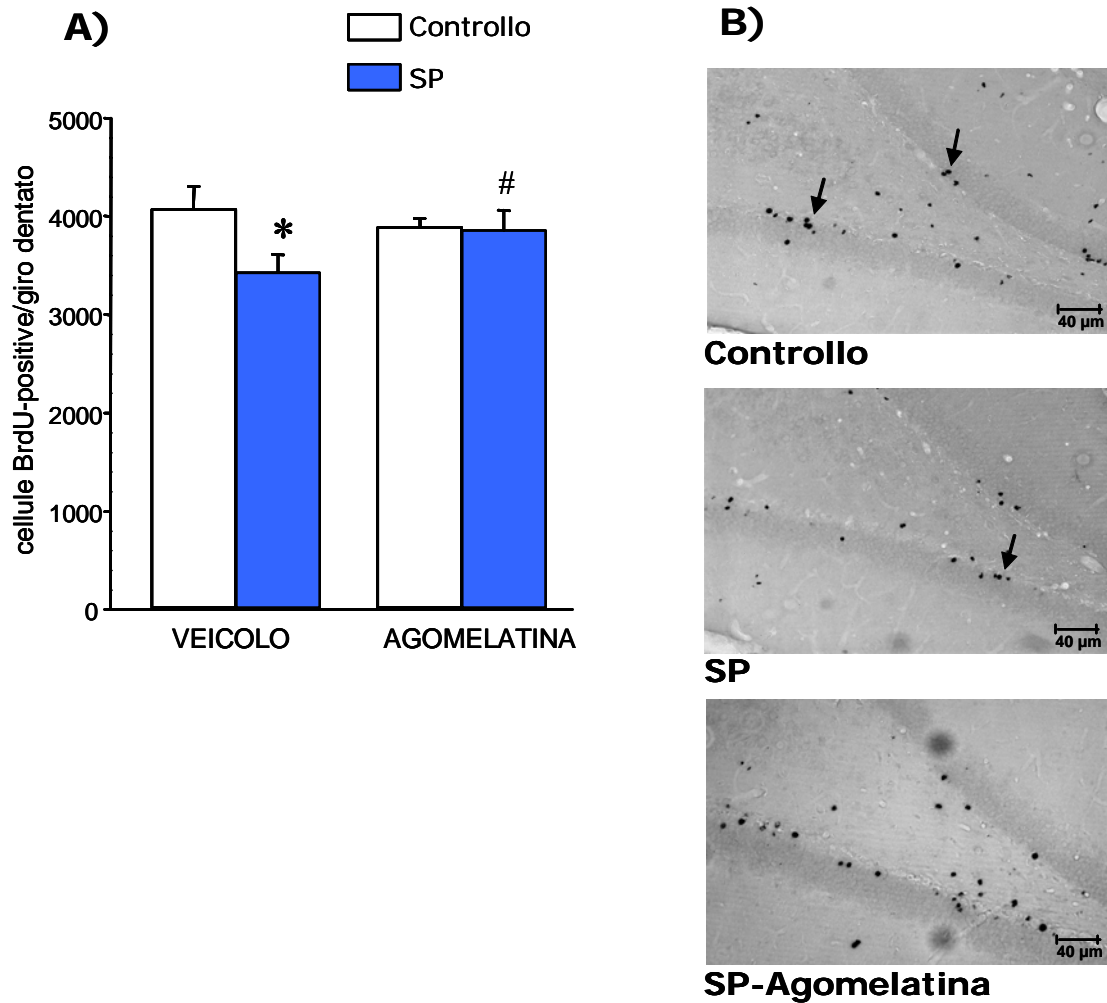


Fig. 5 Effetto del trattamento cronico con agomelatina (40 mg/kg i.p., 1 volta al giorno, per 6 settimane) sulla sopravvivenza delle cellule proliferanti (marcate con BrdU 75 mg/kg i.p., 2 volte al giorno, per 4 giorni) nel giro dentato

A) Conta del numero di cellule BrdU-positivo (media \pm E.S.) nel giro dentato; n=6 per ogni gruppo di trattamento.

Test t di Student

* $p < 0.05$ SP-veicolo vs Controllo-veicolo

$p < 0.05$ SP-agomelatina vs SP-veicolo

B) Foto rappresentativa della immunomarcatura con BrdU nel giro dentato

Effetti dell'agomelatina sul differenziamento cellulare (Fig. 6)

Lo SP e l'agomelatina non modificano il differenziamento delle cellule nel fenotipo neuronale nel giro dentato. La percentuale di cellule

che si sono differenziate in neuroni, rispetto al numero di cellule BrdU-positive, non è diversa nei quattro gruppi sperimentali (79.9% e 80.1% nei controlli non trattati e trattati con agomelatina rispettivamente e 80.9% e 81.7% negli animali SP non trattati e trattati con agomelatina rispettivamente).

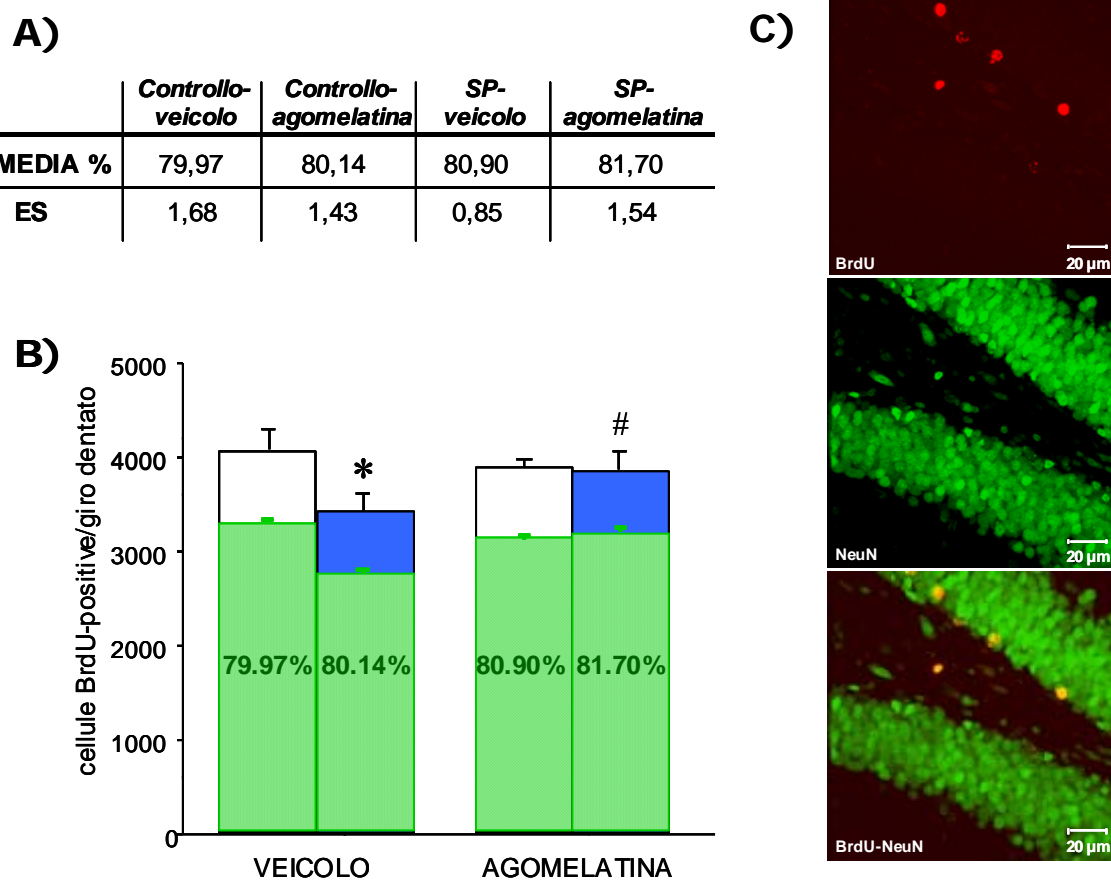


Fig. 6 Effetto del trattamento cronico con agomelatina (40 mg/kg i.p., 1 volta al giorno, per 6 settimane) sul differenziamento neuronale delle cellule sopravvissute (marcate con BrdU 75 mg/kg i.p., 2 volte al giorno, per 4 giorni) nel giro dentato

A) Tabelle riassuntiva che mostra la percentuale delle cellule che esprimono il fenotipo neuronale (media \pm E.S.) rispetto al numero totale di cellule BrdU-positive nel giro dentato; n=6 per ogni gruppo di trattamento.

B) Conta del numero di cellule BrdU-positive (media \pm E.S.) nel giro dentato, n=6 per ogni gruppo di trattamento; in verde sono riportate le percentuali, già riportate in tabella, di cellule che esprimono il fenotipo neuronale.

Test t di Student

* $p < 0.05$ SP-veicolo vs Controllo-veicolo

$p < 0.05$ SP-agomelatina vs SP-veicolo

C) Immagine rappresentativa dell'immunofluorescenza ottenuta al microscopio confocale: in rosso sono rappresentate le cellule BrdU-positive, in verde le cellule NeuN-positive, in arancione la colocalizzazione BrdU-NeuN

Effetti dell'agomelatina sull'espressione del BDNF nell'ippocampo (Fig.7)

L'analisi dell'espressione del BDNF nell'ippocampo con l'ANOVA 2X2 mostra una significativa interazione condizione-trattamento ($F_{1,23}=12.56$, $p<0.001$). Una analisi condotta separatamente sui gruppi rivela un aumento dei livelli di BDNF nell'ippocampo negli animali SP non trattati rispetto ai controlli ($t_{10}=-2.32$; $p<0.05$), e una riduzione significativa (t-test: $t_{10}=-2.26$; $p<0.05$) con un ritorno fino a livelli uguali a quelli dei controlli dopo trattamento con agomelatina. L'antidepressivo ha un effetto significativo anche quando viene somministrato al gruppo di controllo nel quale aumenta significativamente l'espressione del BDNF ($t_{10}=2.92$; $p<0.05$).

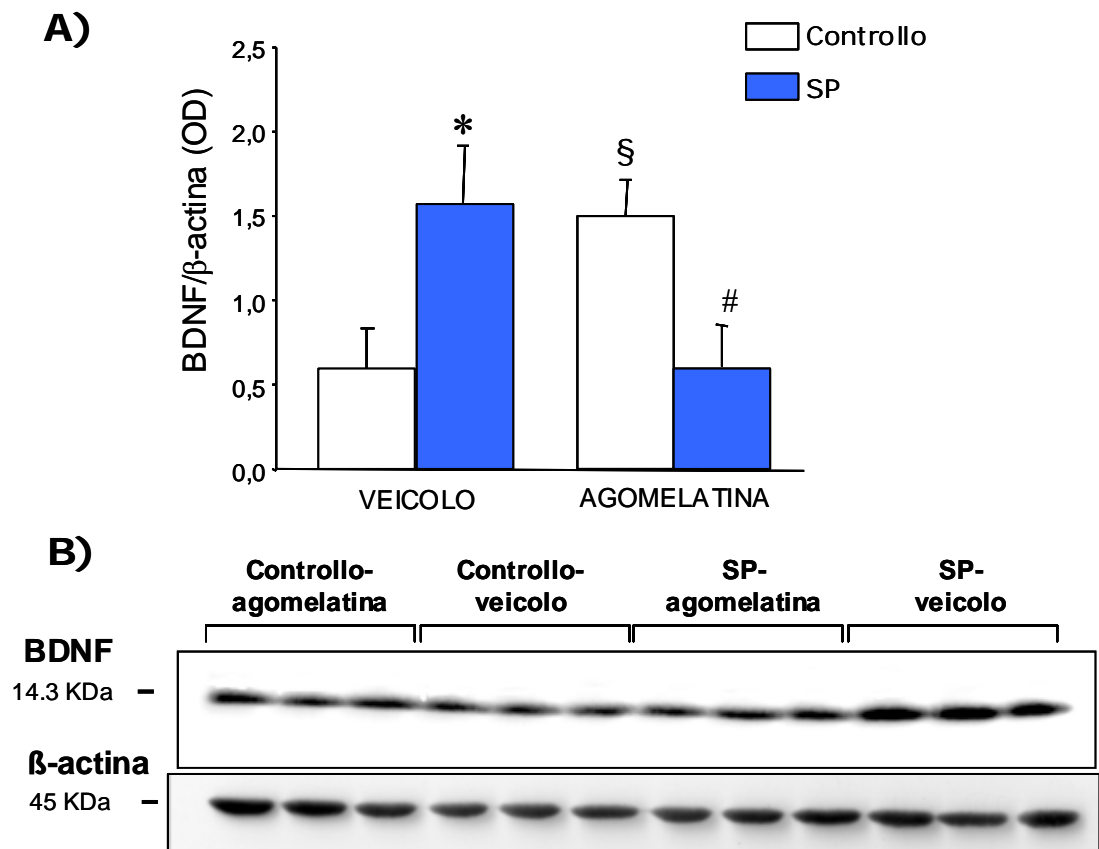


Fig. 7 Effetto del trattamento cronico con agomelatina (40 mg/kg i.p., 1 volta al giorno, per 6 settimane) sull'espressione del BDNF nell'ippocampo (Western Blotting)

A) Valori densitometrici (OD) espressi come rapporto BDNF/ β -actina (media \pm E.S.); n=6 per ogni gruppo di trattamento

Test t di Student

* $p < 0.05$ SP-veicolo vs Controllo-veicolo

$p < 0.05$ SP-agomelatina vs SP-veicolo

§ $p < 0.05$ Controllo-agomelatina vs Controllo-veicolo

B) Lastra rappresentativa

Effetti dell'agomelatina sull'espressione dei recettori mGlu1 (Fig. 8) e mGlu5 (Fig. 9) nell'ippocampo

L'analisi mediante ANOVA rivela un significativo effetto della condizione (presenza o assenza di SP) ($F_{1,23}=11.32$, $p<0.001$) ed una significativa interazione condizione-trattamento ($F_{1,23}=6.34$, $p<0.05$) sull'espressione del recettore mGlu1 (mGluR1). La densità degli mGluR1 non è modificata dallo Stress Prenatale, e il trattamento con agomelatina lascia immutato il numero di questi recettori negli animali SP. Il trattamento cronico con agomelatina riduce invece significativamente l'espressione di tale recettore nei controlli ($t_{10}=-4.42$; $p<0.05$ Controllo-agomelatina vs Controllo-veicolo) (**Fig.8**).

Per quanto riguarda l'espressione del recettore mGlu5 (mGluR5) (**Fig.9**), l'ANOVA rivela una significativa interazione condizione-trattamento ($F_{1,23}=29.74$, $p<0.001$). L'analisi condotta separatamente sui gruppi trattati e non trattati con l'antidepressivo, dimostra che lo Stress Prenatale riduce l'espressione dei recettori mGlu5, ($t_{10}=4.11$; $p<0.05$ SP vs controlli) mentre il trattamento con agomelatina la incrementa in modo significativo ($t_{10}=10.51$; $p<0.01$ SP-veicolo vs SP-agomelatina). L'antidepressivo non ha invece alcun effetto sull'espressione dell'mGluR5 nel gruppo di controllo.

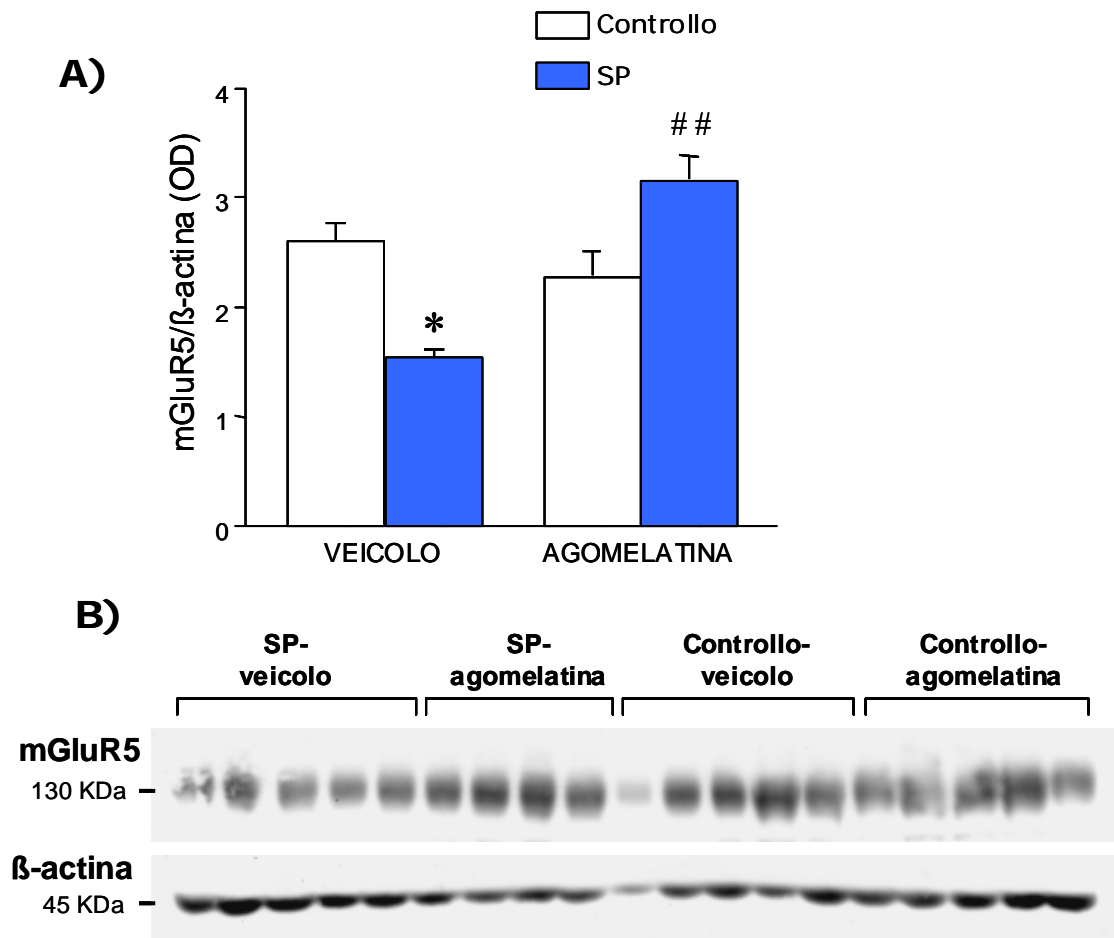


Fig. 8 Effetto del trattamento cronico con agomelatina (40 mg/kg i.p., 1 volta al giorno, per 6 settimane) sull'espressione del recettore mGlu5 nell'ippocampo (Western Blotting)

A) Valori densitometrici (OD) espressi come rapporto mGluR5/β-actina (media ± E.S.); n=6 per ogni gruppo di trattamento

Test t di Student

* p<0.05 SP-veicolo vs Controllo-veicolo

** p<0.001 SP-agomelatina vs SP-veicolo

B) Lastra rappresentativa

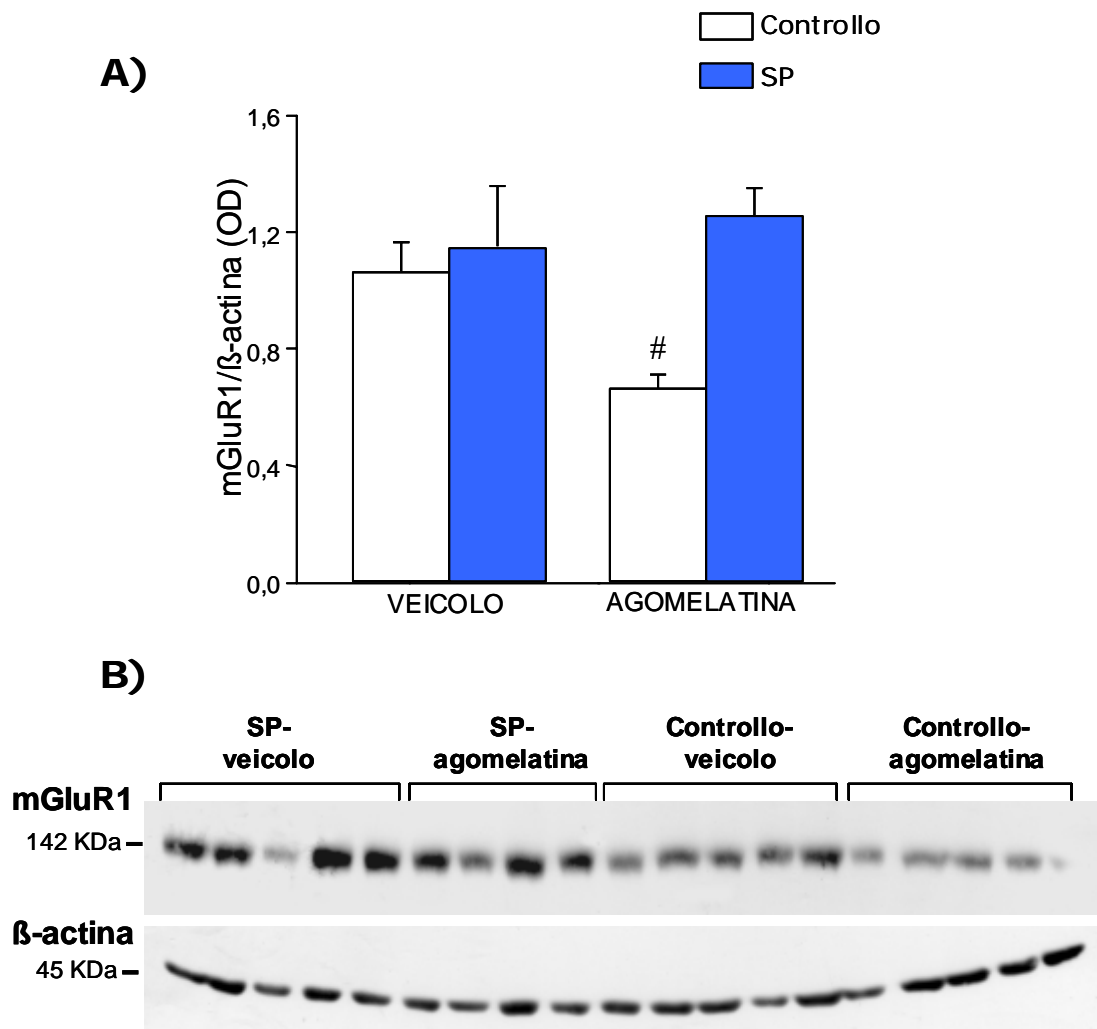


Fig. 9 Effetto del trattamento cronico con agomelatina (40 mg/kg i.p., 1 volta al giorno, per 6 settimane) sull'espressione del recettore mGlu1 nell'ippocampo (Western Blotting)

A) Valori densitometrici (OD) espressi come rapporto mGluR5/β-actina (media ± E.S.); n=6 per ogni gruppo di trattamento
Test t di Student

p<0.05 Controllo-agomelatina vs Controllo-veicolo

B) Lastra rappresentativa

DISCUSSIONE

Il primo obiettivo di questo studio è stato verificare la *validità predittiva* di un modello animale di depressione caratterizzato da una buona *face validity*, il modello di Stress Prenatale. A questo scopo abbiamo trattato per tre settimane animali sottoposti a Stress Prenatale con l'antidepressivo triciclico imipramina, e valutata l'efficacia antidepressiva di tale trattamento sui seguenti parametri: i) la risposta al test del Porsolt; ii) l'espressione dei recettori corticosteroidi ippocampali e dei recettori 5-HT_{1A} corticali come indice, rispettivamente, dell'attività dell'asse IIS e del sistema serotoninergico.

Abbiamo scelto l'imipramina, come farmaco per testare la *validità predittiva* del modello di Stress Prenatale, per due ragioni. La prima è il fatto che questo farmaco rappresenta, ancora oggi, uno dei farmaci più indicati nel trattamento della depressione maggiore anche se come farmaco di seconda scelta in quei pazienti che non rispondono ai farmaci più nuovi come, ad esempio, gli SSRI (ICSI Health Care Guideline, 2004). La seconda è che l'imipramina è un farmaco molto studiato nel corso degli anni, e sul quale esiste un'ampia conoscenza in campo pre-clinico, soprattutto in relazione a studi sulla *predictive validity* di diversi modelli animali di depressione.

Da un'analisi dei risultati del nostro studio si evince che gli animali SP trattati con imipramina presentano, rispetto agli animali SP non trattati, una riduzione del tempo di immobilità nel test del nuoto

forzato e una significativa modifica dell'espressione sia dei recettori 5-HT_{1A} corticali, che dei recettori corticosteroidi ippocampali. Inoltre, è di particolare interesse notare che negli animali non sottoposti a stress durante la vita prenatale, il trattamento con imipramina non modifica i parametri studiati.

Analizziamo ora in maggiore dettaglio i risultati ottenuti per ciascuno dei parametri studiati. Nei ratti SP il tempo di immobilità nel test del nuoto forzato è maggiore rispetto agli animali di Controllo e ciò indica che lo SP favorisce un comportamento passivo. Il trattamento cronico con imipramina riduce significativamente il tempo di immobilità dei ratti SP, ma non influenza quello dei ratti di Controllo. Questi risultati confermano precedenti dati che riportano un aumento dell'immobilità in animali stressati prenatalmente (Alonso et al., 1991; Frye and Wawrzycki, 2003), ma anche una riduzione del tempo di immobilità dei ratti SP in seguito al trattamento cronico con un antidepressivo atipico, la tianeptina (Morley-Fletcher et al., 2003).

Inoltre, il nostro studio evidenzia, per la prima volta, che lo Stress Prenatale induce una *up-regulation* dell'mRNA dei recettori 5-HT_{1A} nella corteccia. Al contrario, lo SP riduce l'espressione dei recettori corticosteroidi nell'ippocampo come già riportato in precedenti lavori (Maccari et al., 1995; Barbanzages et al., 1996). Questi risultati assumono un particolare interesse, in quanto è ormai largamente riconosciuto che le alterazioni del sistema serotoninergico cerebrale e dell'asse HHS rappresentano le disfunzioni biologiche che più si

riscontrano nei pazienti affetti da depressione maggiore (Coppen et al., 1982; Meltzer, 1990; Feldman, 1997; Drevets et al., 1997; Sargent et al., 2000; Attar-Levy et al., 1999; Mintun et al., 2004; Holsboer, 2003), e che questi due importanti sistemi biologici si influenzano reciprocamente sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche (de Kloet et al., 1986; Meijer and de Kloet, 1994)

Il trattamento con l'imipramina riduce l'espressione dell'mRNA per i recettori serotoninergici 5-HT_{1A} corticali ed aumenta la densità dei recettori corticosteroidi nell'ippocampo degli animali SP riportando entrambi i valori, all'incirca, a quelli degli animali di controllo non sottoposti a stress. La "normalizzazione" di entrambi i parametri, indotta dal trattamento con imipramina, ben si accorda con alcuni risultati sperimentali sull'uomo che dimostrano che il trattamento con antidepressivi normalizza temporaneamente l'iperattività dell'asse IIS spesso presente nei soggetti affetti da depressione maggiore (Seckl and Fink, 1992; Reul et al., 1993; Holsboer and Barden, 1996). E' stato anche riportato che, nel ratto, la "normalizzazione" dell'attività dell'asse IIS si osserva solamente dopo un trattamento cronico con antidepressivi che agiscono attraverso il sistema serotoninergico (Semont et al., 2000) e, più specificatamente, mediante i recettori 5-HT_{1A} (Srinivas et al., 2001).

Il fatto che l'imipramina determini una *down-regulation* dei recettori 5-HT_{1A} nella corteccia solamente negli animali SP, e non negli animali di controllo, è una conferma della teoria che i farmaci

antidepressivi risultano efficaci solamente quando il target su cui agiscono è alterato (Wilson et al., 2002; Bonne et al., 1999). In questo senso quindi, il modello dello Stress Prenatale può essere considerato un buon modello per lo screening di farmaci antidepressivi.

I nostri risultati relativi allo Stress Prenatale coincidono con i dati riportati utilizzando un modello animale genetico di depressione, il Flinder Sensitive Line (FSL, Overstreet et al., 1996), che mostrano una più alta densità di recettori 5-HT_{1A} nella corteccia prefrontale, ed anche un maggior tempo di immobilità nel test del nuoto forzato. Inoltre, il trattamento cronico di questi animali con antidepressivi riconduce ai valori di controllo sia il tempo di immobilità nel test del nuoto forzato (Overstreet et al., 1995), che l'attività del sistema serotoninergico (Zangen et al., 1997).

Pertanto, la prima conclusione che possiamo trarre dal nostro studio è che il modello di Stress Prenatale possiede dei buoni requisiti di validità predittiva nello studio di farmaci antidepressivi. Tale modello ha anche una peculiarità che lo distingue dalla maggior parte dei modelli per lo studio della depressione, ed è il fatto che le alterazioni comportamentali e neuroendocrine, che caratterizzano gli animali SP, permangono per tutto l'arco della vita dando al modello un connotato di cronicità infatti, il profilo tipico dei ratti SP si osserva già a partire dagli stadi precoci dello sviluppo ed è presente anche nell'invecchiamento. Ciò permette di utilizzare questo modello per lo screening di nuove molecole a potenziale effetto antidepressivo da impiegare in età diverse della vita

(adolescenza, invecchiamento), caratterizzate da profili fisiopatologici differenti che potrebbero influenzare l'effetto del farmaco.

D'altro canto dobbiamo fare un'altra considerazione: il modello più popolare e facilmente riproducibile per lo studio di nuovi farmaci antidepressivi, il test del nuoto forzato, è però anche ampiamente criticato. Le critiche derivano dall'interpretazione relativa al comportamento dell'animale, in questa situazione sperimentale, che viene valutato come il tempo che l'animale passa in immobilità durante l'esposizione acuta ad uno stress incontrollabile, consistente nell'immersione in un cilindro pieno di acqua da cui l'animale non può uscire. La controversia è proprio sulle deduzioni che si fanno su questa passività dell'animale, sulla sua rinuncia a nuotare. L'immobilità può essere interpretata antropomorficamente come uno stato emozionale di "disperazione", il passaggio da un iniziale comportamento attivo di nuoto ad uno passivo, ma anche come una risposta adattativa nella ricerca dell'animale di "risparmiare energia". Dal momento che i farmaci antidepressivi riducono il tempo di immobilità, un'altra critica si baserebbe sul fatto che per testare un farmaco con questo modello potrebbe modificare il comportamento dell'animale ed aumentare l'attività, non tanto grazie ad una azione antidepressiva, ma piuttosto grazie ad un effetto sulla emotività e questo potrebbe condurre a conclusioni non corrette sulla possibile efficacia del farmaco per il trattamento della depressione.

Da qui l'interesse nell'individuare un parametro la cui misurazione non dia adito ad inferenze antropomorfiche. Naturalmente è sempre difficile interpretare un comportamento animale e poi trasferire tale interpretazione all'uomo, perciò poter affiancare ad un test comportamentale, come quello del nuoto forzato, anche una misurazione di una componente neuroanatomica sarebbe certamente vantaggiosa per lo screening di nuove molecole ad attività antidepressiva. Da questo punto di vista la neurogenesi, fenomeno sempre più studiato e di indubbia rilevanza nella fisiopatologia del sistema nervoso centrale, target per nuovi farmaci antidepressivi, può allo stesso tempo costituire un ulteriore parametro per valutare l'attività antidepressiva di nuove molecole.

E' noto, infatti che gli antidepressivi tradizionali stimolano la neurogenesi nell'animale di laboratorio (Santarelli et al., 2003; Malberg et al., 2000), e che il diminuito volume dell'ippocampo nei pazienti depressi potrebbe derivare da una riduzione della neurogenesi (Bremner et al., 2000; MacQueen et al., 2003; Duman, 2004). Quindi, la capacità di una molecola di indurre la neurogenesi, in animali in cui è presente una ridotta proliferazione cellulare, può costituire una importante evidenza preclinica di attività antidepressiva. Ciò naturalmente non esclude la possibilità di affiancare a questa nuova metodica di indagine, misurazioni effettuate su parametri comportamentali.

Questo interessante approccio sperimentale lo abbiamo applicato allo studio di una molecola di recente acquisizione ad effetto

antidepressivo, l'agomelatina, utilizzando il nostro modello animale di SP, che, come precedentemente detto, è caratterizzato da una permanente riduzione della neurogenesi.

Per quanto riguarda le notizie farmacologiche sulla agomelatina, recenti evidenze mostrano che tale farmaco è efficace come antidepressivo in vari modelli animali di depressione. Per esempio, nel modello di stress cronico moderato (CMS) nel ratto, il trattamento cronico con agomelatina produce sul consumo di zucchero gli stessi effetti dell'imipramina e della fluoxetina (Papp et al., 2003). Nel modello del nuoto forzato nel ratto, l'agomelatina produce effetti sul tempo di immobilità paragonabili a quelli dell'imipramina (Bourin et al., 2004). Studi preliminari indicano la sua efficacia anche nel modello del *learned helplessness* (Bertaina-Anglade et al., 2002). L'agomelatina ha una efficacia antidepressiva paragonabile a quella degli antidepressivi attualmente in uso, ma un meccanismo di azione diverso. Infatti, l'agomelatina è agonista specifico dei recettori MT₁ e MT₂ della melatonina (Ying et al., 1996) e antagonista selettivo dei recettori 5-HT_{2C} della serotonina (Millan et al., 2003). Anche se, come agonista, l'agomelatina può mimare gli effetti della melatonina su diversi sistemi (Ying et al., 1996; Martinet et al., 1996), in realtà non conosciamo ancora le implicazioni della melatonina e dei suoi recettori nella depressione. Esistono solo alcune indicazioni indirette: la somministrazione cronica di agomelatina nel ratto è in grado di risincronizzare un ritmo circadiano alterato (Van Reeth et al., 1997),

ritmo che, come noto, è spesso modificato in soggetti affetti da depressione (Rosenwasser and Wirz-Justice, 1997). Inoltre, sono stati riscontrati minori livelli di melatonina in pazienti con depressione maggiore (Szymanska et al., 2001; Tuunainen et al., 2002) ed il trattamento con antidepressivi ha dimostrato correggere tali livelli (Szymanska et al., 2001). E' possibile che la sua azione sui recettori 5-HT_{2C} sia alla base del suo potenziale ruolo antidepressivo. Ciò è rafforzato dal fatto che alcuni farmaci antidepressivi, come mianserina, mirtazapina e amitriptilina sono anche antagonisti del recettore 5-HT_{2C} (Jenck et al., 1994; Millan et al., 2000) e che una somministrazione a lungo termine di SSRI induce una *down-regulation* di questi recettori a livello post-sinaptico (Bristow et al., 2000).

C'è grande interesse per questa nuova molecola anche per il fatto che, come è noto, i farmaci antidepressivi tradizionali hanno numerose limitazioni per i loro effetti collaterali e una latenza nella loro azione.

Per quanto riguarda i risultati relativi all'effetto del trattamento cronico con l'agomelatina sulla neurogenesi negli animali SP essi mostrano, in accordo con i dati ottenuti da Lemaire e collaboratori (2000), che lo Stress Prenatale riduce la neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo 18 giorni dall'ultima iniezione di BrdU. Questo intervallo di tempo è indispensabile per poter valutare il numero delle cellule proliferanti che sopravvivono, poiché tutte le cellule proliferanti che non completano la loro differenziazione muoiono entro una settimana dalla loro generazione (Hastings and Gould, 1999; Dayer et al., 2003),

mentre quelle che sopravvivono iniziano ad integrarsi nello strato di cellule granulari del giro dentato (GCL) 4-10 giorni dopo la loro generazione. Fra tutte le cellule che sopravvivono, il 70-75% circa si differenzia in neuroni, e solo una bassa percentuale (10%) si differenzia in glia (Steiner et al., 2004). Dal nostro studio è emerso anche che lo SP induce una riduzione delle cellule neo-formate, ma non ha alcuna influenza sulla loro differenziazione: infatti, la percentuale di cellule neo-formate che esprime il marcatore neuronale NeuN, non risulta modificata. Inoltre, da dati in corso di elaborazione nel nostro laboratorio, sembrerebbe che lo SP non abbia alcuna influenza sulla differenziazione del fenotipo gliale, identificabile mediante il marcatore *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), così come riportato dallo studio di Lemaire (Lemaire et al., 2000).

Il trattamento con l'antidepressivo agomelatina ripristina, cioè riporta ai livelli fisiologici che si osservano nel gruppo di Controllo, i valori di neurogenesi ridotti dallo SP. Ciò suggerisce, da un lato quindi, che la neurogenesi può essere utilizzata come indice valido nello screening di nuove molecole a potenziale azione antidepressiva, e, dall'altro, mette in luce la proprietà di questo nuovo farmaco, l'agomelatina nell'uso cronico, di aumentare la neurogenesi, come altri antidepressivi, imipramina e fluoxetina (Santarelli et al., 2003; Malberg et al., 2000). Questo dato sperimentale ha riscontro clinico in alcuni studi che riportano il ripristino del volume dell'ippocampo in pazienti

depressi trattati con antidepressivi, ed ipotizzano che la neurogenesi svolga un ruolo determinante in questo effetto (Sheline et al., 2003).

La somministrazione cronica di agomelatina induce un aumento significativo dei livelli di espressione di BDNF nell'ippocampo negli animali di Controllo. Ciò conferma i dati riportati in letteratura che dimostrano che un trattamento cronico con farmaci antidepressivi aumenta il BDNF in diverse strutture limbiche (Okamoto et al., 2003). Per quanto riguarda i dati sugli effetti dello Stress Prenatale sui livelli di espressione del BDNF nell'ippocampo, innanzitutto abbiamo osservato che lo Stress Prenatale sovraregola significativamente l'espressione del BDNF nell'ippocampo, e che il trattamento cronico con agomelatina, riduce i livelli di questa neurotrofina, riportandoli ai valori degli animali di controllo, non sottoposti a stress nel periodo prenatale. Questi risultati sono in netto contrasto con i dati di letteratura relativi a differenti modelli animali di depressione. E' stato dimostrato infatti che nei modelli del nuoto forzato e del *learned helplessness* (Russo-Neustadt et al., 1999) esiste una ridotta espressione del BDNF nell'ippocampo; inoltre, il trattamento con antidepressivi induce un aumento dei livelli di questa neurotrofina, riportandoli approssimativamente ai valori riscontrati negli animali di Controllo (Nibuya et al., 1995, 1996). Ma c'è anche un'altra evidenza sperimentale, e cioè che l'infusione intracerebroventricolare del BDNF, nel modello del *learned helplessness*, produce un effetto antidepressivo (Shirayama et al., 2002).

Dal momento che le osservazioni sperimentali di questo nostro studio contrastano con i dati riportati precedentemente, è stato necessario da parte nostra fare alcune riflessioni sul significato del modello animale da noi utilizzato anche in relazione, come vedremo successivamente, ai nostri risultati sui recettori metabotropici per il glutammato che appaiono essere difficilmente comprensibili.

Quali sono le differenze del nostro modello di depressione rispetto agli altri modelli?

Il fatto che i nostri risultati siano diversi dagli altri può invalidare lo Stress Prenatale ai fini di un suo utilizzo come modello di depressione?

Avremmo potuto concludere, per assurdo, che il nostro modello animale di depressione abbia una validità maggiore rispetto agli altri modelli?

Una risposta a tutti questi quesiti è scaturita dal nuovo concetto di *omeostasi*, introdotto da Bruce McEwen e Eliot Stellar (McEwen and Stellar, 1993) agli inizi degli anni '90, e che è stata definita come *stato allostatico* di un organismo. Secondo questa definizione il fenomeno della omeostasi che, come noto, indica il processo mediante il quale tutte le funzioni psico-biologiche di un organismo vengono costantemente mantenute in uno stato di equilibrio, acquista un certo dinamismo. Infatti, *allostasi* sta ad indicare il processo di modifica delle funzioni in risposta a cambiamenti ambientali. La tesi di McEwen è che, quando *l'allostasi* è moderata ha degli effetti benefici che aiutano a

combattere lo stress della vita quotidiana, ma quando è eccessiva e/o prolungata, viene definita come *carico allostatico*, ed ha degli effetti che portano inevitabilmente alla malattia. In un contesto di tal genere, le alterazioni a carico di sistemi endogeni differenti, non devono essere considerate singolarmente, ma dovrebbero essere viste come un *network* di vari sistemi che si bilanciano e si coordinano fra loro. *Allostasi* è quindi l'abilità di raggiungere o conservare la stabilità (*omeostasi*) attraverso dei cambiamenti. I principali mediatori dell'*allostasi* sono gli ormoni dell'asse IIS, le catecolamine e le citochine (per una review, cfr. McEwen and Wingfield, 2003).

Alla luce di queste considerazioni, quindi, gli animali di Controllo del nostro studio, cioè gli animali che non hanno subito lo stress durante la vita prenatale, possono essere considerati come animali che si trovano nella condizione fisiologica di *omeostasi* (intesa come stabilità dei sistemi fisiologici essenziali per la vita), condizione che può essere perturbata a causa di tutti i possibili cambiamenti che avvengono nel corso della vita, ma che ogni volta viene riportata all'equilibrio dal processo dell'*allostasi*. Lo *stato allostatico* di questi animali è, quindi, solo transitorio e non comporta effetti negativi a lungo termine. Al contrario, gli animali che hanno subito lo stress durante il periodo prenatale, sono stati sottoposti ad una imponente perturbazione in una fase molto precoce e quindi vulnerabile del loro sviluppo, perturbazione che ha conseguentemente portato l'organismo ad un *stato allostatico*, caratterizzato dalla permanente alterazione di diversi sistemi. Tra queste

alterazioni rientrano le modifiche a livello dell'asse IIS, del sistema serotonergico, della neurogenesi, delle sostanze neurotrofiche, del sistema degli amminoacidi eccitatori e del comportamento.

In questo contesto, la discrepanza dei nostri risultati sul BDNF rispetto ai dati riportati in letteratura, può essere spiegata in questo modo: è possibile che negli animali SP, l'aumento del BDNF rappresenti uno dei meccanismi di risposta *allostatica* che l'organismo mette in atto nel tentativo di opporsi alla imponente e continuativa perturbazione che lo sta colpendo. Per la verità, anche in un altro modello di depressione, e precisamente nel modello genetico di ratti FSL, è stato riscontrato un aumento del BDNF nell'ippocampo (Angelucci et al., 2000). Questo, ed il nostro modello hanno rispetto agli altri, la peculiarità di presentare, fin dalla nascita, modifiche di diversi sistemi biologici, sia perché gli animali sono per così dire "geneticamente perturbati", sia perché sono sottoposti all'esposizione di elevati livelli di corticosterone durante la vita prenatale. Le perturbazioni genetiche o neuro-ormonali, quando si verificano in una fase così precoce e vulnerabile della vita, potrebbero contribuire all'instaurarsi di una condizione di *stato allostatico* permanente. In questa ottica, anche gli effetti dell'agomelatina sul BDNF negli animali SP, potrebbero suggerire che l'agomelatina dovendo agire su un substrato biologico completamente diverso da quello degli animali di Controllo, antagonizzerebbe l'effetto di aumento della neurotrofina indotto dallo Stress Prenatale, riportandolo ai livelli di una condizione di "normalità".

Per quanto riguarda i nostri risultati sui recettori metabotropici per il glutammato (mGlu), come precedentemente accennato, essi possono essere discussi nell'ottica del *carico allostatico*, tipico degli animali SP e determinato dalla imponente perturbazione da essi subita nel corso della vita prenatale. Il sistema glutammatergico ippocampale di animali sottoposti a Stress Prenatale, infatti, viene influenzato diversamente. L'espressione dell'mGluR1 non subisce alcuna modificazione mentre quella dell'mGluR5 va incontro ad una chiara riduzione che viene poi annullata dal trattamento con l'agomelatina. L'antidepressivo che, come abbiamo visto inverte l'effetto di aumento del BDNF indotto dallo stato di Stress Prenatale, agirebbe allo stesso modo sull'espressione del sistema recettoriale degli mGlu5, stimolato dallo *stato allostatico* indotto dall'evento SP, riportandola ad un livello paragonabile a quello degli animali di Controllo. Dobbiamo anche rilevare che la riduzione di mGluR5 va di pari passo con la riduzione della neurogenesi riscontrata negli animali SP. A questo proposito interessanti dati di un altro autore (Di Giorgi Gerevini et al., 2004), indicano la presenza di questo sottotipo recettoriale in zone di attiva neurogenesi quali la zona subventricolare ed il giro dentato. Comunque, rimane la difficoltà di interpretare il fatto che l'agomelatina, somministrata ad animali di Controllo, riduca l'espressione del sottotipo recettoriale mGlu1 senza modificare il sottotipo mGlu5, anche perché studi riguardanti gli effetti dei farmaci antidepressivi sui recettori mGlu sono solo all'inizio. I pochi dati disponibili sono fondamentalmente in

disaccordo tra loro. Uno studio mostra che il trattamento cronico con imipramina nel ratto, aumenta l'espressione di mGluR5 e di mGluR1 in diverse aree cerebrali (Bajkowska et al., 1999; Smialowska et al., 2002), un altro, di elettrofisiologia, invece, riporta che gli antidepressivi inducono una "iporesponsività" dei neuroni ippocampali in risposta alla stimolazione da parte di agonisti dei recettori metabotropici appartenenti al gruppo I (Pilc et al., 1998). Anche se è necessario approfondire maggiormente gli studi su questo argomento, è indubbio, comunque, che il sistema glutammatergico possa rappresentare un importante target per le terapie antidepressive.

Vorrei concludere la discussione di questo mio studio, sottolineando l'importanza di considerare ogni modifica dei sistemi biologici degli animali stressati prenatalmente da noi presi in considerazione, ed in particolare la ridotta neurogenesi, l'aumento del BDNF, la ridotta espressione dei recettori metabotropici del glutammato, l'alterazione dell'asse HHS e dei recettori corticosteroidi e le modificazioni del comportamento, come espressione di alterazioni di tutti i sistemi biologici coinvolti che, sottoposti a *carico allostatico*, vengono completamente sbilanciati, scoordinati, e non sono più in grado di interagire tra loro in quel concerto di azioni indispensabili al rispetto dell'*omeostasi*. Ogniqualevolta si facciano studi farmacologici legati a patologie complesse e multifattoriali come la depressione va sempre considerato se nel modello animale impiegato si è stabilito un *carico allostatico* permanente.

Vorrei concludere, infine, sottolineando che il nostro studio ha messo in luce la neurogenesi, quale parametro neuroanatomico utilizzabile come indice per lo screening di nuove molecole a potenziale azione antidepressiva, e, l'agomelatina, quale nuovo farmaco antidepressivo capace di agire proprio sulla neurogenesi dell'ippocampo e su alcuni dei fattori in essa implicati (neurotrofine e sistema glutammatergico).

Bibliografia

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* **2000** Apr 15;20(8):2896-903.
- Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine1A receptor gene. *J Biol Chem.* **1990** Apr 5;265(10):5825-32.
- Alonso SJ, Arevalo R, Afonso D, Rodriguez M. Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. *Physiol Behav.* **1991** Sep;50(3):511-7.
- Alpers HS, Himwich HE. The effects of chronic imipramine administration on rat brain levels of serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, norepinephrine and dopamine. *J Pharmacol Exp Ther.* **1972** Mar;180(3):531-8.
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* **1965** Jun;124(3):319-35.
- Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec.* **1963** Apr;145:573-91.
- Amara SG, Kuhar MJ. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci.* **1993**;16:73-93.
- American Psychiatric Association, **1994**. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth ed. American Psychiatric Association, Washington, DC.
- Angelucci F, Aloe L, Vasquez PJ, Mathe AA. Mapping the differences in the brain concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in an animal model of depression. *Neuroreport.* **2000** Apr 27;11(6):1369-73.
- Argyropoulos SV, Wilson SJ. Sleep disturbances in depression and the effects of antidepressants. *Int Rev Psychiatry.* **2005** Aug;17(4):237-45.
- Asberg M, Bertilsson L, Martensson B, Scalia-Tomba GP, Thoren P, Traskman-Bendz L. CSF monoamine metabolites in melancholia. *Acta Psychiatr Scand.* **1984** Mar;69(3):201-19.
- Attar-Levy D, Martinot JL, Blin J, Dao-Castellana MH, Crouzel C, Mazoyer B, Poirier MF, Bourdel MC, Aymard N, Syrota A, Feline A. The cortical serotonin₂ receptors studied with positron-emission

- tomography and [18F]-setoperone during depressive illness and antidepressant treatment with clomipramine. *Biol Psychiatry*. **1999** Jan 15;45(2):180-6.
- Azmitia EC. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull*. **2001** Nov 15;56(5):413-24.
- Bai F, Bergeron M, Nelson DL. Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology*. **2003** Jun;44(8):1013-21.
- Bajkowska M, Branski P, Smialowska M, Pilc A. Effect of chronic antidepressant or electroconvulsive shock treatment on mGluR1a immunoreactivity expression in the rat hippocampus. *Pol J Pharmacol*. **1999** Nov-Dec;51(6):539-41.
- Baldessarini RJ. A plea for integrity of the bipolar disorder concept. *Bipolar Disord*. **2000** Mar;2(1):3-7.
- Baldessarini RJ. Current status of antidepressants: clinical pharmacology and therapy. *J Clin Psychiatry*. **1989** Apr;50(4):117-26.
- Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci*. **1996** Jun 15;16(12):3943-9.
- Barlow SM, Knight AF, Sullivan FM. Delay in postnatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. *Teratology*. **1978** Oct;18(2):211-8.
- Baskys A, Bayazitov I, Fang L, Blaabjerg M, Poulsen FR, Zimmer J. Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology*. **2005**;49 Suppl 1:146-56.
- Bernier PJ, Vinet J, Cossette M, Parent A. Characterization of the subventricular zone of the adult human brain: evidence for the involvement of Bcl-2. *Neurosci Res*. **2000** May;37(1):67-78.
- Bertaina-Anglade V, Mocaer E, Drieu la Rochelle C. Antidepressant-like action of S 20098 (agomelatine) in the learned helplessness test. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2002, 5 (Suppl. 1): 65 (Abstract)
- Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell HC. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol*. **1994** Nov;196:263-81.
- Blier P, de Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci*. **1994** Jul;15(7):220-6.

- Blier P, de Montigny C. Possible serotonergic mechanisms underlying the antidepressant and anti-obsessive-compulsive disorder responses. *Biol Psychiatry*. **1998** Sep 1;44(5):313-23.
- Bonne O, Krausz Y, Aharon Y, Gelfin Y, Chisin R, Lerer B. Clinical doses of fluoxetine and cerebral blood flow in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. **1999** Mar;143(1):24-8.
- Boudouresque F, Guillaume V, Grino M, Strbak V, Chautard T, Conte-Devolx B, Oliver C. Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses. *Neuroendocrinology*. **1988** Oct;48(4):417-22.
- Bourin M, Mocaer E, Porsolt R. Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *J Psychiatry Neurosci*. **2004** Mar;29(2):126-33.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*. **2000** Jan;157(1):115-8.
- Brezun JM, Daszuta A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*. **1999**;89(4):999-1002.
- Bristow LJ, O'Connor D, Watts R, Duxon MS, Hutson PH. Evidence for accelerated desensitisation of 5-HT(2C) receptors following combined treatment with fluoxetine and the 5-HT(1A) receptor antagonist, WAY100,635, in the rat. *Neuropharmacology*. **2000** Apr 27;39(7):1222-36.
- Cairncross KD, Cox B, Forster C, Wren AF. The olfactory bulbectomized rat: a simple model for detecting drugs with antidepressant potential [proceedings] *Br J Pharmacol*. **1977** Nov;61(3):497P.
- Calfa G, Kademian S, Ceschin D, Vega G, Rabinovich GA, Volosin M. Characterization and functional significance of glucocorticoid receptors in patients with major depression: modulation by antidepressant treatment. *Psychoneuroendocrinology*. **2003** Jul;28(5):687-701.
- Cameron HA, Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*. **1994** Jul;61(2):203-9.
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci*. **1995** Jun;15(6):4687-92.
- Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*. **2001** Jul 9;435(4):406-17.

- Casolini P, Cigliana G, Alema GS, Ruggieri V, Angelucci L, Catalani A. Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning in offspring in the early stages of life. *Neuroscience*. **1997** Aug; 79(4):1005-12.
- Casolini P, Kabbaj M, Leprat F, Piazza PV, Rouge-Pont F, Angelucci L, Simon H, Le Moal M, Maccari S. Basal and stress-induced corticosterone secretion is decreased by lesion of mesencephalic dopaminergic neurons. *Brain Res*. **1993** Sep 17; 622(1-2):311-4.
- Cespuglio R, Marinesco S, Baubet V, Bonnet C, el Kafi B. Evidence for a sleep-promoting influence of stress. *Adv Neuroimmunol*. **1995**; 5(2):145-54.
- Cheeta S, Ruigt G, van Proosdij J, Willner P. Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biol Psychiatry*. **1997** Feb 15; 41(4):419-27.
- Cheetham SC, Crompton MR, Czudek C, Horton RW, Katona CL, Reynolds GP. Serotonin concentrations and turnover in brains of depressed suicides. *Brain Res*. **1989** Nov 20; 502(2):332-40.
- Coppen A, Wood K. 5-Hydroxytryptamine in the pathogenesis of affective disorders. *Adv Biochem Psychopharmacol*. **1982**; 34:249-58.
- Cornelius JR, Clark DB, Bukstein OG, Salloum IM. Treatment of co-occurring alcohol, drug, and psychiatric disorders. *Recent Dev Alcohol*. **2005**; 17:349-65.
- D'Aquila PS, Brain P, Willner P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav*. **1994** Nov; 56(5):861-7.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. **2003** Jun 9; 460(4):563-72.
- de Kloet ER, Sybesma H, Reul HM. Selective control by corticosterone of serotonin₁ receptor capacity in raphe-hippocampal system. *Neuroendocrinology*. **1986**; 42(6):513-21.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. **1998** Jun; 19(3):269-301.
- Deminiere JM, Piazza PV, Guegan G, Abrous N, Maccari S, Le Moal M, Simon H. Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self-administration in adult offspring of stressed mothers. *Brain Res*. **1992** Jul 17; 586(1):135-9.

- Di Giorgi Gerevini VD, Caruso A, Cappuccio I, Ricci Vitiani L, Romeo S, Della Rocca C, Gradini R, Melchiorri D, Nicoletti F. The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res.* **2004** May 19;150(1):17-22.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996** Dec 10;93(25):14895-900.
- Doghramji K. Sleep disorders: a selective update. *Hosp Community Psychiatry.* **1989** Jan;40(1):29-40.
- Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry.* **1999** Nov 15;46(10):1375-87.
- Drevets WC, Price JL, Simpson JR Jr, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature.* **1997** Apr 24;386(6627):824-7.
- Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *J Neurosci.* **1999** Oct 1;19(19):8656-64.
- Duman RS. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry.* **2004** Aug 1;56(3):140-5.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* **1998** Nov;4(11):1313-7.
- Falconer EM, Galea LA. Sex differences in cell proliferation, cell death and defensive behavior following acute predator odor stress in adult rats. *Brain Res.* **2003** Jun 13;975(1-2):22-36.
- Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. Affective disorders. In: Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF (Eds), *Principles of Neuropharmacology.* Sinauer, Sunderland, **1997**; pp. 819-861
- Frye CA, Wawrzycki J. Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviours of female and male rats. *Horm Behav.* **2003** Nov;44(4):319-26.
- Gallo V, Pende M, Scherer S, Molne M, Wright P. Expression and regulation of kainate and AMPA receptors in uncommitted and committed neural progenitors. *Neurochem Res.* **1995** May;20(5):549-60.
- Germain A, Nofzinger EA, Kupfer DJ, Buysse DJ. Neurobiology of non-REM sleep in depression: further evidence for hypofrontality

- and thalamic dysregulation. *Am J Psychiatry*. **2004** Oct;161(10):1856-63.
- Gomez-Pinilla F, So V, Kessler JP. Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience*. **1998** Jul;85(1):53-61.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*. **1999c** Mar;2(3):260-5.
- Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci*. **1992** Sep;12(9):3642-50.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*. **1997** Apr 1;17(7):2492-8.
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999a** Apr 27;96(9):5263-7.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*. **1999b** Oct 15;286(5439):548-52.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998** Mar 17;95(6):3168-71.
- Gursky JT, Krahn LE. The effects of antidepressants on sleep: a review. *Harv Rev Psychiatry*. **2000** Dec;8(6):298-306.
- Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*. **1999** Oct 11;413(1):146-54.
- Heine VM, Maslam S, Zareno J, Joels M, Lucassen PJ. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur J Neurosci*. **2004** Jan;19(1):131-44.
- Henn FA, Vollmayr B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biol Psychiatry*. **2004** Aug 1;56(3):146-50.
- Henry C, Guegant G, Cador M, Arnault E, Arsaut J, Le Moal M, Demotes-Mainard J. Prenatal stress in rats facilitates amphetamine-induced sensitization and induces long-lasting changes in dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Brain Res*. **1995** Jul 10;685(1-2):179-86.

- Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, Maccari S. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol.* **1994** Jun;6(3):341-5.
- Heuser I, Bissette G, Dettling M, Schweiger U, Gotthardt U, Schmider J, Lammers CH, Nemeroff CB, Holsboer F. Cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing hormone, vasopressin, and somatostatin in depressed patients and healthy controls: response to amitriptyline treatment. *Depress Anxiety.* **1998**;8(2):71-9.
- Heuser I, Yassouridis A, Holsboer F. The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res.* **1994** Jul-Aug;28(4):341-56.
- Hinde RA, Leighton-Shapiro ME, McGinnis L. Effects of various types of separation experience on rhesus monkeys 5 months later. *J Child Psychol Psychiatry.* **1978** Jul;19(3):199-211.
- Holsboer F, Barden N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev.* **1996** Apr;17(2):187-205.
- Holsboer F, Doerr HG, Gerken A, Muller OA, Sippell WG. Cortisol, 11-deoxycortisol, and ACTH concentrations after dexamethasone in depressed patients and healthy volunteers. *Psychiatry Res.* **1984** Jan;11(1):15-23.
- Holsboer F. Corticotropin-releasing hormone modulators and depression. *Curr Opin Investig Drugs.* **2003** Jan;4(1):46-50.
- Hubain PP, Staner L, Dramaix M, Kerkhofs M, Papadimitriou G, Mendlewicz J, Linkowski P. The dexamethasone suppression test and sleep electroencephalogram in nonbipolar major depressed inpatients: a multivariate analysis. *Biol Psychiatry.* **1998** Feb 1;43(3):220-9.
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol.* **2000** Jul;164(1):45-52.
- Jenck F, Moreau JL, Mutel V, Martin JR. Brain 5-HT_{1C} receptors and antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **1994** May;18(3):563-74.
- Jin K, Xie L, Childs J, Sun Y, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. Cerebral neurogenesis is induced by intranasal administration of growth factors. *Ann Neurol.* **2003** Mar;53(3):405-9.
- Joyce PR, Paykel ES. Predictors of drug response in depression. *Arch Gen Psychiatry.* **1989** Jan;46(1):89-99.

- Kalia M. Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism*. **2005** May;54(5 Suppl 1):24-7.
- Kampf-Sherf O, Zlotogorski Z, Gilboa A, Speedie L, Lereya J, Rosca P, Shavit Y. Neuropsychological functioning in major depression and responsiveness to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. *J Affect Disord*. **2004** Nov 1;82(3):453-9.
- Kant GJ, Pastel RH, Bauman RA, Meininger GR, Maughan KR, Robinson TN 3rd, Wright WL, Covington PS. Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiol Behav*. **1995** Feb;57(2):359-65.
- Kaplan MS. Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. *Ann N Y Acad Sci*. **1985**;457:173-92.
- Kaufman IC, Rosenblum LA. Depression in infant monkeys separated from their mothers. *Science*. **1967** Feb 24;155(765):1030-1.
- Kempermann G, Gage FH. Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res*. **2002** Mar 31;134(1-2):1-12.
- Kennedy SH, Emsley R. Placebo-controlled trial of agomelatine in the treatment of major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. **2005** Oct 21
- Kesslak JP, So V, Choi J, Cotman CW, Gomez-Pinilla F. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav Neurosci*. **1998** Aug;112(4):1012-9.
- Klein DF. Letter: Pathophysiology of depressive syndromes. *Biol Psychiatry*. **1974** Feb;8(1):119-20.
- Koehl M, Barbazanges A, Le Moal M, Maccari S. Prenatal stress induces a phase advance of circadian corticosterone rhythm in adult rats which is prevented by postnatal stress. *Brain Res*. **1997** Jun 13;759(2):317-20.
- Koehl M, Bjiyou Y, Le Moal M, Cador M. Nicotine-induced locomotor activity is increased by preexposure of rats to prenatal stress. *Brain Res*. **2000** Nov 3;882(1-2):196-200.
- Koehl M, Darnaudery M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol*. **1999** Sep 5;40(3):302-15.
- Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001** Apr 10;98(8):4752-7.

- Kovalchuk Y, Hanse E, Kafitz KW, Konnerth A. Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science*. **2002** Mar 1;295(5560):1729-34.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*. **2003** Dec 22;467(4):455-63.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci*. **1997** Aug 1;17(15):5820-9.
- Kupfer DJ and Reynolds CF. In: Paykel ES, editor. Sleep and affective disorders. Handbook of affective disorders, vol. 1 Edinburgh: Churchill Livingstone; **1992** p.311-323
- Le Poul E, Boni C, Hanoun N, Laporte AM, Laaris N, Chauveau J, Hamon M, Lanfumey L. Differential adaptation of brain 5-HT1A and 5-HT1B receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology*. **2000**;39(1):110-22.
- Lee HJ, Kim JW, Yim SV, Kim MJ, Kim SA, Kim YJ, Kim CJ, Chung JH. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Mol Psychiatry*. **2001** Nov;6(6):610, 725-8.
- Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*. **2002** Sep;82(6):1367-75.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000** Sep 26;97(20):11032-7.
- Lesch KP. 5-HT1A receptor responsivity in anxiety disorders and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **1991**;15(6):723-33.
- Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*. **2003** Apr;69(5):341-74. Review.
- Linnarsson S, Willson CA, Ernfors P. Cell death in regenerating populations of neurons in BDNF mutant mice. *Brain Res Mol Brain Res*. **2000** Jan 10;75(1):61-9.

- Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. **1994** May 20;264(5162):1145-8.
- Loo H, Hale A, D'haenen H. Determination of the dose of agomelatine, a melatonergic agonist and selective 5-HT(2C) antagonist, in the treatment of major depressive disorder: a placebo-controlled dose range study. *Int Clin Psychopharmacol*. **2002** Sep;17(5):239-47.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*. **1995** Dec;15(6):1287-98.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. **1951** Nov;193(1):265-75.
- Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol*. **1997** Nov;8(6-7):523-32.
- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev*. **2003** Jan-Mar;27(1-2):119-27.
- Maccari S, Darnaudery M, Van Reeth O. Hormonal and behavioural abnormalities induced by stress *in utero*: an animal model for depression. *Stress*. **2001**: 1-13
- Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci*. **1995** Jan;15(1 Pt 1):110-6.
- MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, Nahmias C, Young LT. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003** Feb 4;100(3):1387-92.
- Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry*. **2000** Jun 15;47(12):1043-9.
- Maes M, Lin A, Bonaccorso S, van Hunsel F, Van Gastel A, Delmeire L, Biondi M, Bosmans E, Kenis G, Scharpe S. Increased 24-hour urinary cortisol excretion in patients with post-traumatic stress disorder and patients with major depression, but not in patients with fibromyalgia. *Acta Psychiatr Scand*. **1998** Oct;98(4):328-35.
- Malberg JE, Duman RS. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine

- treatment. *Neuropsychopharmacology*. **2003** Sep;28(9):1562-71.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. **2000** Dec 15;20(24):9104-10.
- Malberg JE, Schechter LE. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs. *Curr Pharm Des*. **2005**;11(2):145-55.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*. **2001** May;7(5):541-7.
- Mann JJ, Apter A, Bertolote J, Beautrais A, Currier D, Haas A, Hegerl U, Lonnqvist J, Malone K, Marusic A, Mehlum L, Patton G, Phillips M, Rutz W, Rihmer Z, Schmidtke A, Shaffer D, Silverman M, Takahashi Y, Varnik A, Wasserman D, Yip P, Hendin H. Suicide prevention strategies: a systematic review. *JAMA*. **2005** Oct 26;294(16):2064-74.
- Mann JJ, Arango V, Marzuk PM, Theccanat S, Reis DJ. Evidence for the 5-HT hypothesis of suicide. A review of post-mortem studies. *Br J Psychiatry Suppl*. **1989** Dec;(8):7-14.
- Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*. **1999** Apr 19;406(4):449-60.
- Martinet L, Guardiola-Lemaitre B, Mocaer E. Entrainment of circadian rhythms by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. *Pharmacol Biochem Behav*. **1996** Aug;54(4):713-8.
- Matrisciano F, Storto M, Ngomba RT, Cappuccio I, Caricasole A, Scaccianoce S, Rizzo B, Melchiorri D, Nicoletti F. Imipramine treatment up-regulates the expression and function of mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*. **2002** Jun;42(8):1008-15.
- McEwen BS, Cameron H, Chao HM, Gould E, Magarinos AM, Watanabe Y, Woolley CS. Adrenal steroids and plasticity of hippocampal neurons: toward an understanding of underlying cellular and molecular mechanisms. *Cell Mol Neurobiol*. **1993** Aug;13(4):457-82.
- McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med*. **1993** Sep 27;153(18):2093-101.
- McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav*. **2003** Jan;43(1):2-15.

- Meijer OC, de Kloet ER. Corticosterone suppresses the expression of 5-HT1A receptor mRNA in rat dentate gyrus. *Eur J Pharmacol.* **1994** Feb 15;266(3):255-61.
- Meltzer HY. Role of serotonin in depression. *Ann N Y Acad Sci.* **1990**;600:486-99; discussion 499-500. Review
- Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Dekeyne A, Newman-Tancredi A, Pasteau V, Rivet JM, Cussac D. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003** Sep;306(3):954-64.
- Millan MJ, Gobert A, Rivet JM, Adhumeau-Auclair A, Cussac D, Newman-Tancredi A, Dekeyne A, Nicolas JP, Lejeune F. Mirtazapine enhances frontocortical dopaminergic and corticolimbic adrenergic, but not serotonergic, transmission by blockade of alpha₂-adrenergic and serotonin_{2C} receptors: a comparison with citalopram. *Eur J Neurosci.* **2000** Mar;12(3):1079-95.
- Miller GW, Gainetdinov RR, Levey AI, Caron MG. Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends Pharmacol Sci.* **1999** Oct;20(10):424-9.
- Mintun MA, Sheline YI, Moerlein SM, Vlassenko AG, Huang Y, Snyder AZ. Decreased hippocampal 5-HT_{2A} receptor binding in major depressive disorder: in vivo measurement with [18F]altanserin positron emission tomography. *Biol Psychiatry.* **2004** Feb 1;55(3):217-24.
- Mirescu C, Peters JD, Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci.* **2004** Aug;7(8):841-6.
- Moreau JL, Scherschlicht R, Jenck F, Martin JR. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol.* **1995** Nov;6(7):682-687.
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Koehl M, Casolini P, Van Reeth O, Maccari S. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Res.* **2003** Nov 7;989(2):246-51.
- Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K, Kamei K, Takigawa M, Takahashi K. Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *Am J Physiol.* **1997** Nov;273(5 Pt 2):R1669-75.
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W. Elevated concentrations of CSF

- corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*. **1984** Dec 14;226(4680):1342-4.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. **1995** Nov;15(11):7539-47.
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci*. **1996** Apr 1;16(7):2365-72.
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol*. **1989**; 18: 311-18.
- Okamoto H, Shino Y, Hashimoto K, Kumakiri C, Shimizu E, Shirasawa H, Iyo M. Dynamic changes in AP-1 transcription factor DNA binding activity in rat brain following administration of antidepressant amitriptyline and brain-derived neurotrophic factor. *Neuropharmacology*. **2003** Aug;45(2):251-9.
- Ormerod BK, Falconer EM, Galea LA. N-methyl-D-aspartate receptor activity and estradiol: separate regulation of cell proliferation in the dentate gyrus of adult female meadow vole. *J Endocrinol*. **2003** Nov;179(2):155-63.
- Overstreet DH, Friedman E, Mathe AA, Yadid G. The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. **2005**;29(4-5):739-59.
- Overstreet DH, Pucilowski O, Rezvani AH, Janowsky DS. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. **1995** Sep;121(1):27-37.
- Overstreet DH, Rezvani AH, Knapp DJ, Crews FT, Janowsky DS. Further selection of rat lines differing in 5-HT-1A receptor sensitivity: behavioral and functional correlates. *Psychiatr Genet*. **1996**;6(3):107-17.
- Palucha A, Tatarczynska E, Branski P, Szewczyk B, Wieronska JM, Klak K, Chojnacka-Wojcik E, Nowak G, Pilc A. Group III mGlu receptor agonists produce anxiolytic- and antidepressant-like effects after central administration in rats. *Neuropharmacology*. **2004** Feb;46(2):151-9.
- Papp M, Gruca P, Boyer PA, Mocaer E. Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology*. **2003** Apr;28(4):694-703.

- Park HJ, Lim S, Lee HS, Lee HJ, Yoo YM, Lee HJ, Kim SA, Yin CS, Seo JC, Chung JH. Acupuncture enhances cell proliferation in dentate gyrus of maternally-separated rats. *Neurosci Lett*. **2002** Feb 22;319(3):153-6.
- Paul IA, Skolnick P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann N Y Acad Sci*. **2003** Nov;1003:250-72.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Compact Third Edition. San Diego, CA: Academic Press. **1997**
- Paykel ES. Continuation and maintenance therapy in depression. *Br Med Bull*. **2001**;57:145-59.
- Peters DA. Maternal stress increases fetal brain and neonatal cerebral cortex 5-hydroxytryptamine synthesis in rats: a possible mechanism by which stress influences brain development. *Pharmacol Biochem Behav*. **1990** Apr;35(4):943-7.
- Peters DA. Prenatal stress: effect on development of rat brain serotonergic neurons. *Pharmacol Biochem Behav*. **1986** May;24(5):1377-82.
- Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. **2003** Feb;17(4):879-86.
- Piggins HD, Loudon A. Circadian biology: clocks within clocks. *Curr Biol*. **2005** Jun 21;15(12):R455-7.
- Pilc A, Branski P, Palucha A, Tokarski K, Bijak M. Antidepressant treatment influences group I of glutamate metabotropic receptors in slices from hippocampal CA1 region. *Eur J Pharmacol*. **1998** May 15;349(1):83-7.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. **1978** Feb 15;47(4):379-91.
- Privat A, Leblond CP. The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. *J Comp Neurol*. **1972** Nov;146(3):277-302.
- Quitkin FM, McGrath PJ, Stewart JW, Ocepek-Welikson K, Taylor BP, Nunes E, Deliyannides D, Agosti V, Donovan SJ, Petkova E, Klein DF. Chronological milestones to guide drug change. When should clinicians switch antidepressants? *Arch Gen Psychiatry*. **1996** Sep;53(9):785-92.
- Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*. **1985** Dec;117(6):2505-11.

- Reul JM, Stec I, Soder M, Holsboer F. Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology*. **1993** Jul;133(1):312-20.
- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER. Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology*. **1987** May;45(5):407-12.
- Rodriguez JJ, Montaron MF, Petry KG, Arousseau C, Marinelli M, Premier S, Rougon G, Le Moal M, Abrous DN. Complex regulation of the expression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. **1998** Sep;10(9):2994-3006.
- Rosenwasser A and Wirz-Justice A. Circadian rhythms and depression: clinical and experimental model. Redfern PH and Lemmer B [125], 457-486. **1997**. Springer: Berlin. *Physiology and pharmacology of biological rhythms*.
- Rouillon F. Anxiety with depression: a treatment need. *Eur Neuropsychopharmacol*. **1999** Jul;9 Suppl 3:S87-92.
- Rubin RT, Poland RE, Lesser IM, Martin DJ, Blodgett AL, Winston RA. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. III. Cortisol secretion in relation to diagnosis and symptom patterns. *Psychol Med*. **1987** Aug;17(3):609-19.
- Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology*. **1999** Nov;21(5):679-82.
- Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castren E. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci*. **2003** Jan 1;23(1):349-57.
- 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.
- Sapolsky RM. Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? *Biol Psychiatry*. **2004** Aug 1;56(3):137-9.

- Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry*. **2000** Oct 15;48(8):755-65.
- Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ. Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry*. **2000** Feb;57(2):174-80.
- Schaaf MJ, Hoetelmans RW, de Kloet ER, Vreugdenhil E. Corticosterone regulates expression of BDNF and trkB but not NT-3 and trkC mRNA in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*. **1997** May 15;48(4):334-41.
- Scully JL, Otten U. Glucocorticoids, neurotrophins and neurodegeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **1995** May;52(5):391-401.
- Seligman ME, Beagley G. Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. **1975** Feb;88(2):534-41.
- Semont A, Fache M, Hery F, Faudon M, Youssef F, Hery M. Regulation of central corticosteroid receptors following short-term activation of serotonin transmission by 5-hydroxy-L-tryptophan or fluoxetine. *J Neuroendocrinol*. **2000** Aug;12(8):736-44.
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*. **2003** Aug;160(8):1516-8.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*. **2002** Apr 15;22(8):3251-61.
- Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature*. **1992** Oct 8;359(6395):557-8.
- Smialowska M, Szewczyk B, Branski P, Wieronska JM, Palucha A, Bajkowska M, Pilc A. Effect of chronic imipramine or electroconvulsive shock on the expression of mGluR1a and mGluR5a immunoreactivity in rat brain hippocampus. *Neuropharmacology*. **2002** Jun;42(8):1016-23.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*. **1995** Mar;15(3 Pt 1):1768-77.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. **2002** May 2;417(6884):39-44.

- Spencer RL, Kim PJ, Kalman BA, Cole MA Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor dependent regulation of the HPA axis activity. *Endocrinology* **1998** 139:2718–2726.
- Srinivas BN, Subhash MN, Vinod KY. Cortical 5-HT(1A) receptor downregulation by antidepressants in rat brain. *Neurochem Int.* **2001** Jun; 38(7):573-9.
- Stahl SM. Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord.* **1998** Dec; 51(3):215-35.
- Stahl SM. Mixed anxiety and depression: clinical implications. *J Clin Psychiatry.* **1993** Jan; 54 Suppl:33-8.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia.* **2004** Apr 1; 46(1):41-52.
- Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1972** Jun; 69(6):1583-6.
- Strohle A, Holsboer F. Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry.* **2003** Nov; 36 Suppl 3:S207-14.
- Sullivan LE, Fiellin DA, O'Connor PG. The prevalence and impact of alcohol problems in major depression: a systematic review. *Am J Med.* **2005** Apr; 118(4):330-41.
- Szymanska A, Rabe-Jablonska J, Karasek M. Diurnal profile of melatonin concentrations in patients with major depression: relationship to the clinical manifestation and antidepressant treatment. *Neuro Endocrinol Lett.* **2001** Jun; 22(3):192-8.
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol.* **2001** Sep 3; 437(4):496-504.
- Turek FW and Van Reeth O. Circadian rhythms. Fregly MJ and Blatteis CM [4], 1329-1359. **1995**. Oxford, Oxford University Press. *Handbook of physiology.*
- Tuunainen A, Kripke DF, Elliott JA, Assmus JD, Rex KM, Klauber MR, Langer RD. Depression and endogenous melatonin in postmenopausal women. *J Affect Disord.* **2002** May; 69(1-3):149-58.
- Vallee M, Maccari S, Dellu F, Simon H, Le Moal M, Mayo W. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related

- glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci.* **1999** Aug;11(8):2906-16.
- Vallee M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci.* **1997** Apr 1;17(7):2626-36.
- Van Reeth O, Koehl M, Weibel L, Lemoal M, Maccari S. Effects of prenatal stress on circadian synchronization in adult rats. *J Sleep Res.* **1998** 7:287
- Van Reeth O, Olivares E, Zhang Y, Zee PC, Mocaer E, DeFrance R, Turek FW. Comparative effects of a melatonin agonist on the circadian system in mice and Syrian hamsters. *Brain Res.* **1997** Jul 11;762(1-2):185-94.
- Van Reeth O, Turek FW. Stimulated activity mediates phase shifts in the hamster circadian clock induced by dark pulses or benzodiazepines. *Nature.* **1989** May 4;339(6219):49-51.
- Walsh BT, Seidman SN, Sysko R, Gould M. Placebo response in studies of major depression: variable, substantial, and growing. *JAMA.* **2002** Apr 10;287(14):1840-7.
- Weber B, Lewicka S, Deuschle M, Colla M, Vecsei P, Heuser I. Increased diurnal plasma concentrations of cortisone in depressed patients. *J Clin Endocrinol Metab.* **2000** Mar;85(3):1133-6.
- Webster MJ, Knable MB, O'Grady J, Orthmann J, Weickert CS. Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry.* **2002**;7(9):985-94, 924.
- Weibel L, Maccari S, Van Reeth O. Circadian clock functioning is linked to acute stress reactivity in rats. *J Biol Rhythms.* **2002** Oct;17(5):438-46.
- West AP. Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **1990**;14(6):863-77.
- White PC, Mune T, Agarwal AK. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev.* **1997** Feb;18(1):135-56.
- Willner P. Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci.* **1991** Apr;12(4):131-6.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* **1997** Dec;134(4):319-29.

- Wilson SJ, Bailey JE, Alford C, Weinstein A, Nutt DJ. Effects of 5 weeks of administration of fluoxetine and dothiepin in normal volunteers on sleep, daytime sedation, psychomotor performance and mood. *J Psychopharmacol.* **2002** Dec;16(4):321-31.
- World Health Organisation, 1992. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, **1989** Revision. World Health Organisation, Geneva.
- Yadid G, Nakash R, Deri I, Tamar G, Kinor N, Gispan I, Zangen A. Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model. *Prog Neurobiol.* **2000** Nov;62(4):353-78.
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR. Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci.* **2002** Mar 1;22(5):1532-40.
- Ying SW, Rusak B, Delagrange P, Mocaer E, Renard P, Guardiola-Lemaitre B. Melatonin analogues as agonists and antagonists in the circadian system and other brain areas. *Eur J Pharmacol.* **1996** Jan 18;296(1):33-42.
- Zangen A, Overstreet DH, Yadid G. High serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in limbic brain regions in a rat model of depression: normalization by chronic antidepressant treatment. *J Neurochem.* **1997** Dec;69(6):2477-83.
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci.* **1998** Jul;11(4):234-45.
- Zobel AW, Nickel T, Sonntag A, Uhr M, Holsboer F, Ising M. Cortisol response in the combined dexamethasone/CRH test as predictor of relapse in patients with remitted depression. a prospective study. *J Psychiatr Res.* **2001** Mar-Apr;35(2):83-94.