



*Università degli Studi di Cagliari*

**DOTTORATO DI RICERCA**

Corso di Dottorato in Neuroscienze

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche

Ciclo XXV

**POSSIBILE RUOLO DEI RECETTORI PPAR $\alpha$  IN MODELLI  
ANIMALI DI ANSIA E DEPRESSIONE**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

BIO/14-FARMACOLOGIA

Presentata da: Francesca Cadeddu

Coordinatore Dottorato Prof. Sanna Enrico

Tutor/Relatore Prof. Fratta Walter

Esame finale anno accademico 2011 – 2012

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<i>pag. 6</i>
<i>1. Recettori dei proliferatori dei perossisomi (PPAR) ed i loro agonisti endogeni</i>	<i>pag. 7</i>
<i>1.1 I recettori peroxisome proliferator-activated (PPAR) e meccanismi d'azione</i>	<i>pag. 7</i>
<i>1.2 Etanolamidi degli acidi grassi (FAE): sintesi e catabolismo</i>	<i>pag. 10</i>
<i>1.3 Funzionalità biologiche di OEA e PEA legate all'attivazione dei PPAR<math>\alpha</math></i>	<i>pag. 14</i>
<i>1.4 PPAR<math>\alpha</math> e sistema endocannabinoide</i>	<i>pag. 17</i>
<i>2. Ansia e Depressione</i>	<i>pag. 19</i>
<i>2.1 Neurobiologia dell'ansia</i>	<i>pag. 19</i>
<i>2.2 Neurobiologia della depressione</i>	<i>pag. 21</i>
<i>3. Modelli animali per lo studio dell'ansia e della depressione</i>	<i>pag. 23</i>
<i>3.1 Modelli animali d'ansia</i>	<i>pag. 24</i>
<i>3.2 Modelli animali di depressione</i>	<i>pag. 25</i>

4. Implicazioni del sistema endocannabinoide nell'ansia e nella depressione	<i>pag. 27</i>
4.1 <i>Il sistema endocannabinoide (ECBs)</i>	<i>pag. 27</i>
4.2 <i>ECBs ed ansia</i>	<i>pag. 29</i>
4.3 <i>ECBs e depressione</i>	<i>pag. 31</i>
<b>OBIETTIVI</b>	<i>pag. 34</i>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<i>pag. 36</i>
1.1 <i>Animali</i>	<i>pag. 36</i>
1.2 <i>Farmaci utilizzati nei test comportamentali</i>	<i>pag. 36</i>
1.3 <i>Test comportamentali</i>	<i>pag. 37</i>
-1.3.1 <i>Test dell'attività motoria: apparato e procedura</i>	<i>pag. 37</i>
-1.3.2 <i>Tail flick test: apparato e procedura</i>	<i>pag. 38</i>
-1.3.3 <i>Elevated plus maze: apparato e procedura</i>	<i>pag. 39</i>
-1.3.4 <i>Test del nuoto forzato: apparato e procedura</i>	<i>pag. 41</i>
1.4 <i>Immunoistochimica</i>	<i>pag. 43</i>
-1.4.1 <i>Farmaci, preparazione del campione, procedura ed analisi</i>	<i>pag. 43</i>
1.5 <i>Analisi statistica</i>	<i>pag. 44</i>

<b>RISULTATI</b>	<i>pag. 46</i>
<i>Test dell'attività motoria</i>	<i>pag. 46</i>
<i>-1.1.1 Valutazione del trattamento acuto con l' agonista PPAR<math>\alpha</math>, OEA, nel test dell'attività motoria</i>	<i>pag. 46</i>
<i>-1.1.2 Valutazione del trattamento acuto con l' agonista PPAR<math>\alpha</math>, PEA, nel test dell'attività motoria</i>	<i>pag. 49</i>
<i>-1.1.3 Effetti dell'antagonista PPAR<math>\alpha</math>, MK886, e dell'antagonista/agonista inverso dei recettori cannabinoidi CB1, SR141617A (SR) o rimonabant, nel test dell'attività motoria</i>	<i>pag. 52</i>
<i>Analgesia</i>	<i>pag. 53</i>
<i>-1.2.1 Valutazione del trattamento acuto con gli agonisti PPAR<math>\alpha</math>, OEA e PEA, nel test di analgesia "tail flick"</i>	<i>pag. 53</i>
<i>1.3 Ansia</i>	<i>pag. 58</i>
<i>1.3.1 Valutazione del trattamento acuto con gli agonisti PPAR<math>\alpha</math>, OEA e PEA, nel test comportamentale di ansia "elevated plus maze"</i>	<i>pag. 58</i>

1.3.2 Valutazione del trattamento sub-cronico con gli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, nel test di ansia "elevated plus maze"	pag. 61
1.4 Depressione	pag. 62
-1.4.1 Effetto del trattamento sub-cronico degli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, nel test comportamentale di depressione del "nuoto forzato"	pag. 62
-1.4.2 Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR $\alpha$ , MK886 e dell'antagonista dei recettori cannabinoidi CB, SR141617A, sull'attività antidepressiva degli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, nel test comportamentale del "nuoto forzato"	pag. 67
1.5 Valutazione dei livelli di GAD67 e MAP2 in ippocampo dopo trattamento con gli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, in animali sottoposti al test comportamentale di depressione del "nuoto forzato"	pag. 75
-1.5.1 Effetto del trattamento di OEA e PEA sui livelli di GAD67 in ippocampo	pag. 75
-1.5.2 Effetto del trattamento di OEA e PEA sui livelli di MAP2 in ippocampo	pag. 78
1.6 Implicazione dei recettori nicotinici $\alpha 7$ nAChR nei meccanismi antidepressivi mediati dai recettori PPAR $\alpha$	pag. 79
1.6. 1 Test dell'attività motoria	pag. 79

<i>-1.6.1. 1 Valutazione del trattamento acuto con l'agonista <math>\alpha 7</math> nAChR, PNU282987, nel test dell'attività motoria</i>	<i>pag. 79</i>
<i>1.6. 2 Effetto del trattamento sub-cronico dell'agonista <math>\alpha 7</math> nAChR, PNU282987, nel test comportamentale di depressione del "nuoto forzato"</i>	<i>pag. 80</i>
<i>1.6.3 Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR<math>\alpha</math>, MK886, sull'attività antidepressiva dell'agonista <math>\alpha 7</math> nAChR, PNU282987, nel test comportamentale del "nuoto forzato"</i>	<i>pag. 83</i>
<b>DISCUSSIONE</b>	<i>pag. 86</i>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<i>pag. 96</i>

## INTRODUZIONE

I “recettori dei proliferatori dei perossisomi” o PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) sono fattori di trascrizione nucleari appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari (Desvergne *et al.* 1999; Esciva *et al.* 1998; Francis *et al.* 2003). L’attivazione dei recettori nucleari viene innescata dal legame con ligandi costituiti da piccole molecole lipofile inclusi ormoni, acidi grassi ed i loro prodotti metabolici (Desvergne *et al.* 1999). In particolare, i PPAR vengono attivati da ligandi definiti “proliferatori dei perossisomi” (Reddy *et al.* 1986), composti chimici capaci di indurre la proliferazione di perossisomi, in fegato di topo e di ratto. Il loro aumento causando iperplasia ed ipertrofia degli epatociti, comporta un incremento della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi (Stienstra *et al.* 2007).

La scoperta dei PPAR (Isserman *et al.* 1990) fu fondamentale per la comprensione delle risposte biologiche determinate dai proliferatori di perossisomi. Il recettore, attivato dal legame con il suo specifico ligando, forma un eterodimero con un altro recettore nucleare, il “recettore X per i retinoidi” o RXR (Retinoid X Receptor), andandosi a legare a specifiche sequenze sul DNA denominate PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element) che si trovano su geni bersaglio (Pistis e Melis 2010). E’ stato scoperto che anche un gran numero di proteine accessorie, definite coattivatori e corepressori, può legarsi ai recettori nucleari in modo ligando-dipendente: tali proteine, una volta legate, influiscono sul processo di trascrizione, rimodellando la struttura della cromatina e/o agendo da molecole adattatrici che legano il recettore nucleare al complesso trascrizionale (Yu e Reddy 2007).

## **1. Recettori dei proliferatori dei perossisomi (PPAR) ed i loro agonisti endogeni**

### **1.1 I recettori dei proliferatori dei perossisomi (PPAR) e meccanismi d'azione**

I recettori attivati da proliferatori dei perossisomi (PPAR) appartengono alla superfamiglia dei recettori ormonali nucleari (NHR) insieme ai recettori steroidei, tiroidei e retinoidi (Isserman *et al.* 1990). I PPAR sono composti da quattro domini:

-(A/B) il dominio NH 2-terminale ospita un dominio di attivazione trascrizionale ligando-indipendente (AF-1) che è attivo in ogni tipo cellulare;

-(C) regione altamente conservata che presenta un sito di legame per il DNA (DBD: DNA Binding Domain) che consiste in due motivi "zinc fingers" disposti perpendicolarmente fra loro;

-(D) la regione è un'ansa flessibile che permette la corretta disposizione del DBD dopo attivazione del recettore dovuta al legame col ligando;

-(E/F) questo dominio permette il legame con il ligando (LBD: Ligand Binding Domain) e consente la dimerizzazione dei PPAR con i recettori retinoidi X (RXR) e l'associazione con modulatori della trascrizione (coattivatori o corepressori).

La proprietà dei PPAR di legare ligandi endogeni è stata acquisita nel corso dell'evoluzione metazoica, infatti sono presenti in tutti i phyla che derivano filogeneticamente da quell'era. I PPAR esistono in tre isoforme, PPAR alfa ( $\alpha$ ), beta/delta ( $\beta/\delta$ ) e gamma ( $\gamma$ ), che sono espresse sia nel sistema nervoso centrale che in quello periferico (Moreno *et al.* 2004; Cimini *et al.* 2005) ed in molti altri tessuti.

- I PPAR $\alpha$  sono coinvolti nella regolazione del metabolismo e catabolismo degli acidi grassi ( $\beta$ -ossidazione) e nei processi antinfiammatori (Stienstra *et al.* 2007).

I ligandi endogeni di questi recettori sono costituiti da lipidi endogeni ma anche da lipidi presenti nella dieta alimentare e dai loro metaboliti. I ligandi sintetici dei PPAR $\alpha$ , come i fibrati, sono usati clinicamente nel trattamento dell'iperdislipidemia (Linton e Fazio 2000). Altri agonisti sintetici dei PPAR $\alpha$  sono il GW7647 e il WY14643. Nei roditori i PPAR $\alpha$  sono altamente espressi in fegato, reni, cuore, muscoli scheletrici, intestino, surrene e pancreas. Nell'uomo i PPAR $\alpha$  sono espressi in fegato, cuore, reni, intestino crasso e muscoli scheletrici (tutti tessuti coinvolti nei processi catabolici degli acidi grassi). I PPAR $\alpha$  inoltre sono presenti nei monociti, nell'endotelio vascolare e nei miociti (Chinetti *et al.* 1998).

- I PPAR $\beta/\delta$  svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'ossidazione degli acidi grassi soprattutto nel tessuto muscolare (Barish *et al.* 2006). Questi recettori sono target degli acidi grassi LDL-derivati ed eicosanoidi e delle prostaglandine A1. Nei roditori, i PPAR $\beta/\delta$  sono espressi in modo ubiquitario, come anche nell'essere umano dove però sono maggiormente espressi nel tratto digestivo e nella placenta.
- I PPAR $\gamma$  sono suddivisi in tre sottotipi: i PPAR $\gamma$ 1, ubiquitari; i PPAR $\gamma$ 2 espressi soprattutto nel tessuto adiposo; i PPAR $\gamma$ 3 nei macrofagi (Auboeuf *et al.* 1997). I PPAR $\gamma$  sono coinvolti nella regolazione del differenziamento degli adipociti e del loro accumulo; sensibilità all'insulina (Lieve *et al.* 2006; Stienstra *et al.* 2007); capacità di ridurre i livelli di glucosio nel sangue, grazie al loro coinvolgimento nel metabolismo dei carboidrati; infiammazione. I ligandi naturali dei PPAR $\gamma$  sono gli eicosanoidi mentre quelli sintetici sono i

tiazolidindioni (TZD) utilizzati nel trattamento clinico del diabete di tipo 2 per incrementare la sensibilità all'insulina. Nei roditori, i PPAR $\gamma$  sono espressi nel tessuto adiposo e, in modo minore, nella mucosa intestinale, retina, muscoli scheletrici ed organi linfatici. Nell'uomo, i PPAR $\gamma$  sono altamente espressi nel tessuto adiposo e, in minor misura, in muscoli scheletrici, cuore e fegato (Heneka *et al.* 2007).

Tutte le isoforme dei PPAR, sebbene siano differenti per funzionalità e distribuzione, condividono la medesima struttura e meccanismi d'azione molecolare (Ferre 2004).

Meccanismo d'azione genomico. L'attivazione dei PPAR regola principalmente l'attivazione della trascrizione di geni bersaglio (Berger e Moller 2002). Una volta che il ligando si lega al sito di legame dei PPAR hanno luogo cambiamenti conformazionali che portano alla dissociazione dei complessi co-repressori. Successivamente, i PPAR formano eterodimeri con i RXR, e questi legano specifiche regioni del DNA, gli elementi di risposta dei proliferatori dei perossisomi o Peroxisome Proliferator Response Elements (PPRE), per incrementare o decrementare la trascrizione di geni target (Bardot *et al.* 1993). L'attivazione dei PPAR regola l'espressione genica anche in modo indipendente dal sito di legame con il DNA. Infatti, i PPAR, possono esplicare le loro funzioni, oltre che attraverso il meccanismo ligando-sito di legame, anche attraverso l'azione di diverse proteine chinasi (Zhang *et al.* 1996; Camp e Tafuri 1997; Hsi *et al.* 2001; Chan *et al.* 2001). La funzionalità dei PPAR può essere modulata da un'ampia gamma di complessi proteici co-attivatori e co-repressori (Yu e Reddy 2007).

Meccanismo d'azione non genomico. Oltre al meccanismo d'azione genomico, i PPAR possono agire con meccanismo non-genomico (Gardner *et al.* 2005; Melis *et al.* 2008;

Ropero *et al.* 2009). Infatti, i PPAR esplicano i loro effetti con estrema rapidità, all'interno di un ristretto arco di tempo (2-5 min) (Ropero *et al.* 2009) e tramite attivazione di tirosin-chinasi (Melis *et al.* 2008). La oleoiletanolamide (OEA) e la palmitoiletanolamide (PEA) (Fig. B) sono agonisti endogeni dei PPAR $\alpha$  (Fu *et al.* 2003; Lo Verme *et al.* 2005a, b). In particolare, OEA attiva i PPAR $\alpha$  con una concentrazione dell'effetto massimale al 50% (EC<sub>50</sub>) di 120 nM e i PPAR $\beta/\delta$  con una EC<sub>50</sub> di 1.1  $\mu$ M, mentre non ha alcun effetto sui PPAR $\gamma$  (Fu *et al.* 2003; Pistis e Melis 2010). PEA, rispetto ad OEA, mostra un'affinità di legame più bassa nei confronti dei PPAR $\alpha$  (3  $\mu$ M) e non mostra attività sui PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  (Bouaboula *et al.* 2005; Lo Verme *et al.* 2005a, b). L'anandamide (AEA) (Fig. B) viene considerata un agonista putativa dei PPAR $\alpha$ , anche se questa ipotesi è supportata al momento esclusivamente da studi *in vitro*, in cellule transfettate (Sun e Bennet 2007).

### **1.2 Etanolamidi degli acidi grassi (FAE): sintesi e catabolismo**

Le etanolamidi degli acidi grassi (FAE) sono importanti molecole lipidiche di segnale ampiamente distribuite in piante, invertebrati e mammiferi (Lambert e Di Marzo 1999; Lambert e Muccioli 2007). Alla classe biochimica delle FAE afferiscono l'endocannabinoido arachidonoiletanolamide o anandamide (AEA), e composti non-cannabinoidi quali l'oleoiletanolamide (OEA) e la palmitoiletanolamide (PEA). OEA e PEA rappresentano i ligandi endogeni dell'isoforma  $\alpha$  dei recettori PPAR $\alpha$  e sono generati da un precursore dei fosfolipidi di membrana quando le cellule vengono stimulate dall'incremento di Ca<sup>2+</sup> intracellulare, agenti depolarizzanti,

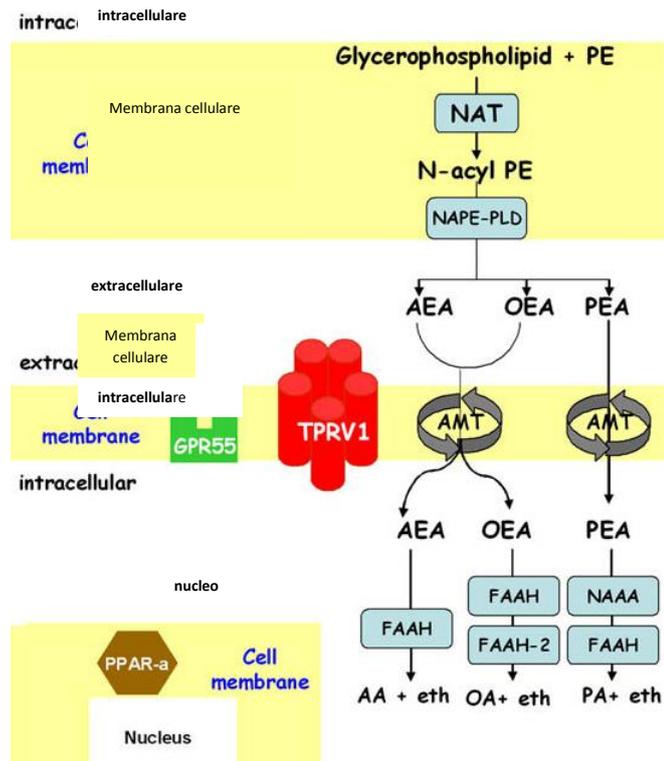
neurotrasmettitori ed ormoni (Di Marzo *et al.* 1994; Cadas *et al.* 1997; Schuel *et al.* 2002).

La sintesi delle FAE (Fig. A), nei mammiferi, avviene "on-demand" all'interno del doppio strato lipidico (Cadas *et al.* 1996) attraverso attività enzimatiche. Il processo ha luogo nei fosfolipidi di membrana dove gli acidi grassi e le fosfatidiletanolamine (PE), tramite N-aciltransferasi (NAT), enzima  $Ca^{2+}$ /cAMP-dipendente, formano il precursore delle FAE, l'N-acil fosfatidiletanolamina (NAPE). La formazione di NAPE può avvenire tramite N-acilazione inter o intramolecolare di PE, PC, liso-PC o cardiolipina (Schmid 2000). Attraverso l'azione di N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasi D (NAPE-PLD) viene prodotta l'OEA. Analogamente, PEA è formato dalla scissione del NAPE grazie all'attività di NAPE-PLD. Un meccanismo alternativo per la sintesi di PEA consiste nell'idrolisi di NAPE in N-palmitoil-liso PE (liso-NAPE) tramite l'azione di fosfolipasi A2 (PLA2), e successiva scissione di liso-NAPE in PEA da parte di una lisofosfolipasi D (liso-PLD) (Natarajan *et al.* 1984; Lo Verme *et al.* 2005a, b). È stato riportato inoltre che la formazione di OEA e PEA (nonché AEA) è collegata all'attivazione dei recettori N-Metil-D-aspartato (NMDA) per il glutammato e quelli colinergici (Hampson *et al.* 1998; Stella e Piomelli 2001). In particolare, l'attivazione dei recettori nicotinici per l'acetilcolina  $\alpha 7$  nAChR, aumenta la produzione di AEA mentre l'attivazione dei recettori muscarinici aumenterebbe la produzione di OEA e PEA (Stella e Piomelli 2001). Questi dati suggeriscono la possibilità che OEA e PEA possano essere modulatori endogeni della trasmissione acetilcolinergica attraverso il blocco dei recettori nicotinici *via* PPAR $\alpha$ , e che l'acetilcolina e le FAE, regolino reciprocamente le loro attività (Melis *et al.* 2008).

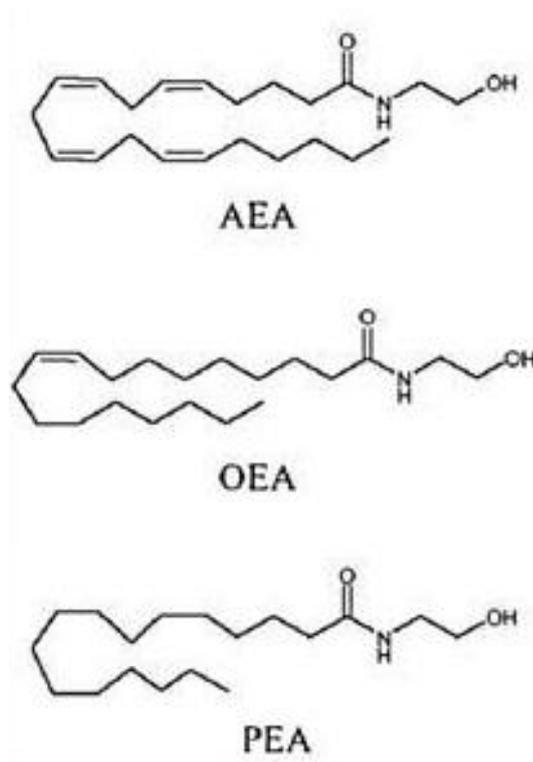
Il catabolismo delle FAE (Fig. A) avviene tramite rapida azione di enzimi specifici. OEA è substrato di due diverse idrolasi: amido idrolasi degli acidi grassi (FAAH) e proteina N-acilsfingosina aminoidrolase-simile (proteina ASAH-simile) (Sun *et al.* 2006). FAAH è una serina idrolasi legata alla membrana intracellulare (Desarnaud *et al.* 1995; Hillard *et al.* 1995; Ueda *et al.* 1995; Cravatt *et al.* 1996; Bracey *et al.* 2002) presente in tutti i tessuti dei mammiferi, ed è un enzima specifico per il catabolismo delle amidi degli acidi grassi e principalmente responsabile della degradazione di OEA mentre proteina ASAH-simile è una amidasi più ubiquitaria e meno specifica (Thabuis *et al.* 2008). Anche PEA è catabolizzata da due enzimi: FAAH e *PEA-preferring acid amidase* (PAA). Quest'ultimo è in grado di riconoscere tutte le FAE ma ha maggiore affinità per PEA (Ueda *et al.* 2001). FAAH è particolarmente espressa nel cervello e nel fegato (Lichtman *et al.* 2002; Cravatt *et al.* 2004; Patel *et al.* 2005), mentre PAA è presente principalmente in intestino, milza e polmoni (Ueda *et al.* 2001).

FAAH è quindi il principale enzima catabolico sia delle etanolamidi non-cannabinoidi OEA e PEA, sia dell'etanolamide cannabinoide AEA. È stato scoperto un gene che codifica per una seconda FAAH (denominato FAAH-2) nel genoma di diversi primati, marsupiali, in alcuni vertebrati, ma non nel topo e nel ratto. FAAH-1 e FAAH-2 idrolizzano OEA in modo equivalente, mentre FAAH-2 mostra un'attività molto inferiore nei confronti di AEA e PEA (Wei *et al.* 2006).

Sintesi e catabolismo di OEA avvengono all'interno delle strutture cerebrali, ma anche perifericamente in enterociti, tessuto adiposo e  $\beta$ -cellule del pancreas.



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



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

### **1.3 Funzionalità biologiche di OEA e PEA legate all'attivazione dei PPAR $\alpha$**

OEA and PEA sono molecole lipidiche attive che svolgono diverse funzioni biologiche all'interno di sistemi omeostatici sia nel cervello che in periferia. I principali ambiti in cui sono coinvolte entrambe le molecole sono: infiammazione ed analgesia, neuroprotezione, comportamento nutritivo e funzioni cognitive.

*Infiammazione ed analgesia.* Sia OEA che PEA possiedono proprietà analgesiche ed antinfiammatorie (Suardiaz et al. 2007; Lo Verme et al. 2005a). In particolare, PEA è una potente molecola antinfiammatoria che agisce probabilmente sia con meccanismo genomico che non-genomico attraverso l'attivazione di canali K<sup>+</sup> ad ampia conduttanza

Ca<sup>2+</sup>-attivati (Conti *et al.* 2002; Lo Verme *et al.* 2005a). PEA, rispetto a OEA, esercita potenti effetti analgesici come dimostrato in diversi modelli animali di dolore indotti con formalina (Calignano *et al.* 1998; Jaggar *et al.* 1998), solfato di magnesio (Calignano *et al.* 2001), carragenina (Conti *et al.* 2002), fattore di crescita nervoso (Farquhar-Smith e Rice 2003) e trementina (Jaggar *et al.* 1998; Farquhar-Smith e Rice 2001); ha effetti benefici anche su modelli animali di dolore neuropatico (Helyes *et al.* 2003). Si ipotizza che PEA prima regoli la nocicezione, in modo rapido attraverso le sue proprietà analgesiche ed, in secondo luogo, con azione antinfiammatoria (Calignano *et al.* 1998). PEA, viene utilizzata in commercio come antinfiammatorio ed analgesico (Petrosino *et al.* 2010).

Neuroprotezione. I ligandi PPAR $\alpha$  sono considerati agenti neuro-protettivi sia per le loro proprietà antiinfiammatorie sia per la loro capacità di promuovere la crescita e differenziazione neuronale (Bento-Abreu e Tabernerero 2007; Charalampopoulos *et al.* 2008) anche grazie alla loro capacità di stimolare la produzione di neurosteroidi (Sasso *et al.* 2010). Per questi motivi, OEA e PEA sono potenzialmente implicate in meccanismi di riparazione cerebrale in seguito ad insulti di varia natura. I livelli delle FAE infatti risultano aumentati nei modelli animali di ischemia cerebrale: OEA e PEA hanno effetti anche sulla protezione vascolare (Franklin *et al.* 2003; Bouchard *et al.* 2003; Sheerin *et al.* 2004; Ho *et al.* 2008). E' noto che in condizioni patofisiologiche, come l'infiammazione e l'infarto, aumentano i livelli di FAE, presumibilmente come meccanismo di protezione dell'organismo (Natarajan *et al.* 1986; Schäbitz *et al.* 2002; Melis *et al.* 2006; Sun *et al.* 2006; Schomacher *et al.* 2008). È stato dimostrato che OEA parzialmente protegge i neuroni dopaminergici negro-striatali in un modello animale di

Parkinson, mediante attivazione dei PPAR $\alpha$  (Esposito *et al.* 2012). Inoltre, in un modello di Parkinson in primati non-umani, si è visto che la somministrazione orale di un inibitore della FAAH (aumentando i livelli dei suoi tre substrati OEA, PEA e AEA) provoca un effetto positivo sull'iperattività indotta da L-DOPA, ma senza compromettere la sua azione terapeutica antiparkinsoniana né il suo metabolismo (Galan-Rodriguez *et al.* 2009; Johnston *et al.* 2011). Recenti studi hanno dimostrato l'effetto neuro-protettivo di PEA, con meccanismo PPAR $\alpha$ -mediato, in un modello animale di Alzheimer (D'Agostino *et al.* 2012; Scuderi *et al.* 2012). Agonisti endogeni e sintetici PPAR $\alpha$  (PEA e fenofibrati) esercitano anche effetti anti-epilettici (Lambert *et al.* 2001; Sheerin *et al.* 2004)

Metabolismo lipidico e comportamento nutritivo. L'inibizione della FAAH provoca un incremento, sia nel cervello che nei tessuti periferici, dei livelli delle FAE, in particolare di OEA e PEA (Fegley *et al.* 2005; Richardson *et al.* 2007). Esperimenti di tipo farmacologico e molecolare hanno dimostrato che OEA agisce come messaggero locale, nell'intestino, in risposta all'ingestione di diete ricche in grassi (Fu *et al.* 2003). In particolare, OEA è definita una molecola anoressizzante in quanto, attraverso l'attivazione dei PPAR $\alpha$ , provoca la trascrizione di geni coinvolti nella lipolisi e ossidazione degli acidi grassi (Guzmán *et al.* 2004). Attraverso l'attivazione di fibre nervose sensoriali periferiche, OEA sarebbe in grado di attivare regioni cerebrali (nucleo del tratto solitario, nucleo paraventricolare ed ipotalamo) coinvolte nel controllo del comportamento nutritivo nei roditori (Rodriguez de Fonseca *et al.* 2001; Fu *et al.* 2003, 2005; Gaetani *et al.* 2003). Come l'OEA, anche la PEA è in grado di inibire l'assunzione di cibo (Rodriguez de Fonseca *et al.* 2001) nonché la motilità

gastrointestinale (Capasso *et al.* 2001). Gli agonisti sintetici dei PPAR $\alpha$ , i fibrati, vengono utilizzati in clinica nel trattamento delle dislipidemie (Steiner 2007).

*Funzioni cognitive.* I PPAR $\alpha$  sono altamente espressi in ippocampo ed amigdala e quindi si pensa possano essere coinvolti nei processi di apprendimento e memoria (Moreno *et al.* 2004; Cimini *et al.* 2005). Lo studio di Mazzola e colleghi (2009) ha dimostrato che l'inibizione di FAAH, tramite URB597, ha l'effetto di consolidare la memoria con meccanismo PPAR $\alpha$ -mediato. Un altro studio ha dimostrato che OEA è coinvolta nei processi di consolidazione della memoria attraverso l'attivazione di strutture cerebrali grazie a segnali provenienti dalla periferia, in particolare attraverso le fibre del sistema autonomo (nervo vago) e stimolando la trasmissione noradrenergica nell'amigdala basolaterale (BLA) (Campolongo *et al.* 2009). PEA, in un recente studio di Yu e colleghi (2011) ha mostrato proprietà antidepressivo-simili, ad alte dosi, in modelli di depressione su topo, in linea con l'ampia distribuzione dei PPAR $\alpha$  in ippocampo, area cerebrale principalmente coinvolta nella patologia e target dei farmaci antidepressivi.

#### **1.4 PPAR $\alpha$ e sistema endocannabinoide**

OEA e PEA competono, insieme ad AEA, per il sito di legame con la FAAH, l'enzima responsabile del loro catabolismo. In questo modo aumentano i livelli di AEA potenziandone gli effetti: questo effetto è noto col nome di "effetto entourage". Inoltre queste due molecole sono in grado di potenziare gli effetti di AEA anche attraverso l'azione dei recettori vanilloidi di tipo 1 (TRPV1) *in vivo* (Mechoulam *et al.* 1997; De Petrocellis *et al.* 2001; Smart *et al.* 2002; Ho *et al.* 2008).

Un importante numero di evidenze scientifiche mette in relazione sistema endocannabinoide e PPAR $\alpha$  in quanto agiscono su campi d'azione comuni come ad esempio infiammazione ed analgesia, neuro-protezione, comportamento nutritivo e funzioni cognitive.

OEA e PEA si pensa vengano sintetizzate e metabolizzate attraverso meccanismi simili a quelli dell'endocannabinoide AEA (Alexander e Kendall 2007), anche se non mostrano alcuna affinità di legame per i recettori cannabinoidi (Lambert e Di Marzo 1999; Ryberg *et al.* 2005). Diversi studi hanno ipotizzato che OEA e PEA esercitino i loro effetti non solo *via* PPAR ma anche attraverso altri target come i recettori orfani accoppiati a proteine G, GPR119 (attivato da OEA) e GPR55 (attivato da PEA e, con minore potenza, anche da AEA e OEA) (Overton *et al.* 2006; Godlewski *et al.* 2009; Borrelli *et al.* 2009), entrambi proposti come nuovi recettori cannabinoidi (Brown 2007; Izzo e Sharkey 2010; McHugh *et al.* 2010).

Nonostante i ligandi PPAR non abbiano affinità di legame per i recettori cannabinoidi, invece i cannabinoidi endogeni e sintetici hanno affinità di legame per i PPAR. È stato infatti dimostrato che il metabolita del 2-arachidonilglicerolo (2-AG), acido 15-idrossieicosatetraenoico gliceril estere (15-HETE-G) è in grado di aumentare l'attività trascrizionale dei PPAR $\alpha$  in un range di concentrazione dell'ordine di micromoli, svelando che i cannabinoidi, o i loro derivati, possono interagire con i recettori nucleari (Kozak *et al.* 2002). In seguito è stato dimostrato che diversi cannabinoidi hanno affinità di legame per i PPAR $\alpha$ : AEA, noladin etere, virodamina, nonché l'agonista sintetico dei recettori cannabinoidi di tipo 1, WIN55212-2 (Sun *et al.* 2006). Quest'ultimo, tra tutti i ligandi PPAR $\alpha$ , è il composto che mostra la più alta affinità di

legame (Sun *et al.* 2007). Resta da definire se tale composto condivide insieme ad OEA e PEA oltre al sito di legame anche alcuni dei loro effetti.

Ad oggi, sono stati descritti tre possibili meccanismi di interazione tra endocannabinoidi e PPAR:

-una interazione diretta: i cannabinoidi, inclusi l'acido anandamico (Liu *et al.* 2003), AEA (Bouaboula *et al.* 2005; Gasperi *et al.* 2007), noladin etere, virodamina e WIN55212-2 (Sun *et al.* 2006) si legano ai PPAR;

-una interazione indiretta: diversi metaboliti bioattivi degli endocannabinoidi, come acidi grassi, etanolamine e diversi metaboliti di ciclossigenasi (COX) e lipossigenasi (LOX) si legano ai PPAR; in particolare, il metabolita del 2-AG, il 15-HETE-G è un ligando che attiva specificatamente i PPAR $\alpha$ ;

-una interazione enzimatica: ipoteticamente, il legame recettore cannabinoide-endocannabinoide a livello della superficie della membrana cellulare potrebbe innescare una cascata enzimatica intracellulare in grado di attivare indirettamente i PPAR.

## **2. Ansia e Depressione**

### **2.1 Neurobiologia dell'ansia**

L'ansia è una risposta di allarme che anticipa un comportamento di difesa o attacco, connessa ad una situazione di pericolo o di stress acuto che si manifesta con aumento della vigilanza, della frequenza cardiaca, del respiro e del tono muscolare (Haller *et al.* 2001; Mineka e Ohman 2002; Viveros *et al.* 2005). Tale risposta fisiologica ed adattativa fa parte di un comportamento conservativo che ha permesso agli esseri

viventi di perpetuare la specie. L'ansia può diventare patologica e secondo il Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-IV) viene categorizzata in sei categorie principali: fobie, disturbo di panico, disturbo d'ansia generalizzato, disturbo ossessivo-compulsivo, disturbo post-traumatico da stress e disturbo acuto da stress. In certi casi, l'ansia può anche risultare una delle componenti principali delle malattie depressive. Nell'uomo le principali manifestazioni dell'ansia consistono in effetti somatici e autonomi (tachicardia, sudorazione, agitazione, disturbi gastrointestinali, disturbi del sonno e crisi di pianto (Rang, Dale e Ritter 1998). I meccanismi che sottendono all'ansia sono regolati dal cervello. Il talamo svolge una funzione di collegamento tra i sistemi sensoriali e le aree sensoriali primarie della corteccia cerebrale, che proiettano l'input sensoriale alle aree adiacenti associative, per l'elaborazione integrata dello stimolo. Le aree associative corticali inviano quindi proiezioni a varie strutture cerebrali coinvolte nelle risposte affettive, comportamentali e somatiche, come amigdala, corteccia entorinale, corteccia orbito frontale e il giro del cingolo. Una differente decodificazione corticale del fattore stressogeno, influenzata dal contesto e dalle caratteristiche del singolo individuo, attiverà quindi la risposta emozionale a livello del lobo limbico e, da questa area, l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) (Charney 2003). L'iperattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e quindi del rilascio di glucocorticoidi, interferiscono con la capacità dell'organismo di rispondere in modo equilibrato e proporzionato allo stress (Rang, Dale e Ritter 1998). Oltre al sistema ipotalamo-ipofisi-surreni, assumono una notevole importanza i sistemi di trasmissione neuronale GABAergico, noradrenergico e serotoninergico. Una diminuzione del tono GABAergico impedisce l'inibizione del

rilascio di molti mediatori ad azione ansiogena (dopamina, glutammato, colecistochinina, il fattore di rilascio della corticotropina e molti altri). Mentre è stata osservata l'accelerazione del rilascio di noradrenalina e serotonina, nella corteccia frontale, amigdala ed ippocampo, in risposta a stress e paura (Millan 2003). L'evoluzione delle tecniche di biologia molecolare, ha inoltre consentito di evidenziare modificazioni nell'espressione dei fattori di crescita neuronali, in particolare del fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF), in corso di disturbi dell'umore e d'ansia (Martinowich *et al.* 2007).

Si evince che le alterazioni dei meccanismi che regolano l'umore, la risposta allo stress e la paura, provocando un disequilibrio neuronale, siano alla base della neurobiologia dell'ansia.

## ***2.2 Neurobiologia della depressione***

La depressione è un disturbo dell'umore grave e complesso che condiziona la vita di chi ne è affetto giacché altera la sfera emozionale, motivazionale, le funzioni cognitive, ma anche l'equilibrio dei sistemi neurourovegetativo, immunitario e infiammatorio dell'organismo. Il DSM-IV definisce i criteri per categorizzare tale patologia la cui sintomatologia deve comprendere: umore depresso o irritabile, anedonia, aumento o perdita di peso rilevante (variazione > 5% in un mese), insonnia o ipersonnia, agitazione o il ritardo psicomotorio, fatica o perdita di energia, sentimenti di auto svalutazione e senso di colpa eccessivo, diminuzione delle capacità di attenzione e concentrazione, pensieri ricorrenti di morte o di suicidio. In particolare, umore depresso e anedonia sono i sintomi essenziali per riconoscere e diagnosticare un

episodio depressivo (American Psychiatric Association 2000). La depressione è considerata una malattia psichiatrica eterogenea giacché ogni paziente sviluppa in modo molto soggettivo la sintomatologia del disturbo. Nel 75% dei casi, il decorso della malattia è ricorrente, progressivo e ciclico (Frank e Thase 1999). Sfortunatamente, molti pazienti non raggiungono la remissione completa, soprattutto per scarsa compliance e prematura fine del trattamento. La complessità e la varietà dei sintomi, comporta un ampio spettro di fenotipi depressi, e quindi notevoli difficoltà nella classificazione del disturbo. Studi pre-clinici e clinici, hanno contribuito negli ultimi 50 anni a fornire una visione-modello sulla patofisiologia della depressione. La prima ipotesi che cercò di spiegare la neurobiologia della depressione è stata l'ipotesi monoaminergica, secondo la quale, la patologia è dovuta al decremento della trasmissione delle monoamine (Schildkraut 1965). Ad oggi è noto che l'ampia varietà sintomatologica della depressione riflette non solo il coinvolgimento di diversi sistemi neurotrasmettitoriali, ma anche di molteplici percorsi biochimici, fattori neurotrofici e aree cerebrali.

Evidenze scientifiche hanno dimostrato una relazione tra depressione e aumentati livelli di citochine proinfiammatorie, disregolazione dell'asse HPA e quindi della produzione di glucocorticoidi, alterazioni funzionali e strutturali delle strutture corticali e subcorticali, nonché la suscettibilità genica (Ambrogini *et al.* 2002; Nestler *et al.* 2002a, b; Duman e Monteggia 2006; Chourbaji *et al.* 2006; Palazidou *et al.* 2012). Tra le strutture cerebrali proposte come substrati neurali della depressione (sia primaria che secondaria) vi sono l'amigdala, la corteccia prefrontale, la corteccia del giro del cingolo, l'ippocampo, che svolgono uno specifico ruolo nella regolazione dell'umore. In

particolare, sul piano neuropsicologico e psicopatologico, la disfunzione dell'ippocampo si correla al disturbo depressivo per il ruolo di questa struttura nel consolidare e rievocare i ricordi e nell'elaborare risposte affettive adeguate al contesto ambientale. Modificazioni funzionali e strutturali a carico di corteccia prefrontale ed ippocampo, si pensa siano causate da anomalie nei processi di neuroplasticità (Palazidou *et al.* 2012). Grazie a recenti studi di neuroimmagine è stato possibile elaborare un modello neuroanatomico della depressione in cui sono coinvolte 3 grandi aree. L'area dorsale (corteccia prefrontale-giro cingolato-striato) deputata a processi attentivi ed esecutivi; l'area ventrale (corteccia paralimbica-ipotalamo-tronco encefalico) che media le funzioni vegetative ed endocrine; l'area del cingolo rostrale che connette area dorsale e ventrale.

E' stato ipotizzato che un'ipoattività delle strutture dell'area dorsale ed un'iperattività dell'area ventrale, producono lo stato depressivo (Meyberg 2003).

### ***3. Modelli animali per lo studio dell'ansia e della depressione***

I modelli animali sono una rappresentazione sperimentale creata, per condizionamento ambientale, farmacologicamente, chirurgicamente o geneticamente, per cercare di simulare una patologia umana e studiarne l'eziologia, la patofisiologia e la risposta a trattamenti farmacologici. La validità di un modello animale si basa su tre criteri di validità: predittiva, d'aspetto e del costrutto (Nestler e Hyman 2010).

La *validità predittiva*, o farmacologica, si verifica quando un modello risponde ai trattamenti in modo da predire gli effetti che gli stessi trattamenti avrebbero sull'uomo.

La *validità d'aspetto* indica se il modello racchiude in le caratteristiche fondamentali anatomiche, biochimiche, neuropatologiche e comportamentali di un disturbo umano.

La *validità di costruito*, o eziologica, si riferisce al modo in cui è costruito il modello. In una condizione ideale il modello deve ricreare nell'animale i medesimi processi eziologici che portano allo sviluppo della patologia dell'uomo.

Lo studio del profilo farmacologico di una molecola richiede test comportamentali indotti da condizionamento ambientale semplici per una caratterizzazione iniziale prima di procedere con test pre-clinici e clinici complessi e dispendiosi.

### **3.1 Modelli animali di ansia**

I modelli animali d'ansia indotti da condizionamento ambientale si basano sull'assunto che i farmaci con proprietà ansiolitica debbano disinibire un comportamento che si presume sia soppresso dalla paura delle conseguenze che potrebbero seguire. Un test piuttosto semplice è quello dell' "open-field" in cui viene valutata l'attività motoria spontanea dell'animale durante il suo comportamento esploratorio all'interno di uno spazio sconosciuto, un'arena, in cui è libero di muoversi (Blumstein e Crawley 1983). Tuttavia l'attività esploratoria in questo test potrebbe essere modulata, oltre che da farmaci con proprietà ansiolitiche, anche da farmaci stimolanti per cui la valutazione comportamentale potrebbe essere imprecisa e poco attendibile.

I test di emersione sono test sofisticati e largamente utilizzati nelle neuroscienze comportamentali. In questo tipo di paradigma vengono misurati il numero di attraversamenti da una zona ritenuta sicura ad una ritenuta pericolosa, come nel test “light e dark box” in cui l’animale ha la possibilità di passare da uno scompartimento illuminato a quello buio (Crawley *et al.* 1984). Tuttavia i farmaci stimolanti potrebbero alterare l’attività motoria anche in questo saggio (Carey e Fry 1988).

Il test di emersione più utilizzato per lo studio del profilo farmacologico di molecole potenzialmente ansiolitiche è l’ “elevated plus maze”, apparato sollevato dal suolo, composto da due corridoi, uno aperto ed uno chiuso, disposti in croce, che formano dei bracci. Il tempo trascorso nei bracci aperti è il parametro che aumenta per effetto di farmaci ansiolitici. Farmaci stimolanti e antidepressivi invece non alterano tale comportamento; per questo motivo, e per la sua buona validità predittiva l’elevated plus maze è considerato un buon modello per la valutazione dell’ansia (Pellow *et al.* 1985, 1986).

### **3.2 Modelli animali di depressione**

I modelli animali di depressione indotti da condizionamento ambientale si basano sulla valutazione quantitativa del cosiddetto “comportamento di disperazione e sfiducia acquisita” ossia della risposta negativa che segue all’eccitazione da stress, ritenuta equivalente dello scoraggiamento profondo di alcuni stati depressivi umani.

Il test del nuoto forzato è il modello più utilizzato per valutare l’efficacia di farmaci antidepressivi, grazie alla sua buona validità predittiva. Il test si effettua in due fasi: la

fase di training serve per indurre il comportamento di disperazione, alla quale segue, dopo 24 ore, eseguendo la medesima procedura, la fase di test. Questo modello si basa sull'osservazione dell'animale che, posto in un cilindro pieno d'acqua, inizialmente si muove concitatamente per cercare una fuga e poi, una volta rassegnato all'impossibilità di fuga, si lascia galleggiare immobile. L'immobilità è interpretata come disperazione e rinuncia della ricerca di una via di fuga. I farmaci antidepressivi hanno la capacità di ridurre tale comportamento (Porsolt *et al.* 1977). Il modello della learned helplessness, o sfiducia acquisita, è concettualmente simile al test del nuoto forzato. L'animale, nella fase di induzione dello stress, viene posto in un apparato in cui riceve, dalla griglia del pavimento, scosse elettriche associate all'impossibilità di fuga in modo da sviluppare un deficit nel comportamento di evitamento. Quando l'animale, in una seconda fase del test, riceve le scosse ma in associazione gli viene data la possibilità di scappare, compirà quindi meno fughe rispetto al gruppo di controllo. I farmaci antidepressivi migliorano la performance degli animali stressati in questo paradigma (Seligman e Maier 1967).

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

#### **4. Implicazioni del sistema endocannabinoide nell'ansia e nella depressione**

##### **4.1 Il sistema endocannabinoide (ECBs)**

Il sistema endocannabinoide agisce sia nel sistema nervoso centrale che nei tessuti periferici, in qualità di sistema modulatore, attraverso, principalmente, due tipi di recettori cannabinoidi (CB<sub>r</sub>) (Howlett 2002). Il recettore cannabinoidi di tipo 1 (CB<sub>1r</sub>) è espresso in modo ubiquitario in tutte le aree cerebrali (Herkenham *et al.* 1991; Tsou *et al.* 1998; Moldrichand e Wenger 2000) ma anche in tipi cellulari e tessuti periferici quali cellule immunitarie, adipociti e tessuto vascolare (Parolaro 1999; Hillard 2000). Il recettore cannabinoidi di tipo 2 (CB<sub>2r</sub>) si trova principalmente nelle cellule periferiche del sistema immunitario, come i macrofagi (Munro *et al.* 1993; Parolaro 1999) ma anche nel cervello soprattutto nelle cellule perivascolari della microglia (Nunez *et al.* 2004) e, in modo limitato, anche nei neuroni (Van Sickle *et al.* 2005; Gong *et al.* 2006). I CB<sub>r</sub> afferiscono alla classe dei recettori composti da 7 domini transmembrana e accoppiati a proteine G<sub>i/o</sub> che inibiscono l'azione dell'adenilato ciclasi, attivano i canali al K<sup>+</sup> ed inibiscono i canali al Ca<sup>2+</sup> voltaggio-dipendenti (Felder e Glass 1998; Howlett e Mukhopadhyay 2000; Piomelli 2003).

I ligandi endogeni convenzionali dei CB<sub>r</sub>, AEA (Devane *et al.* 1992) e il 2-arachidonilglicerolo (2-AG) (Sugiura *et al.* 1995), sono stati identificati circa 20 anni fa ed in seguito nuovi endocannabinoidi, inclusi virodamina (Porter *et al.* 2002), noladin etere (Hanus *et al.* 2001) e N-acil dopamina (Bisogno *et al.* 2000) sono stati scoperti ed inclusi in questa classe di neuromodulatori.

La sintesi degli eCbs avviene nelle cellule post-sinaptiche in seguito a segnali eccitatori, in risposta a stimoli fisiologici o patologici, attraverso un meccanismo chiamato "on demand", che rappresenta la peculiarità di questa classe di neuromodulatori; una volta rilasciati nella sinapsi, gli eCbs attivano i loro recettori a livello pre-sinaptico, con modalità retrograda, inibendo il rilascio di neurotrasmettitori quali glutammato, GABA, acetilcolina, serotonina e noradrenalina (Schlicker e Kathmann 2001; Ohno-Shosaku *et al.* 2001; Wilson *et al.* 2001; Freund *et al.* 2003). L'AEA che il 2-AG derivano, rispettivamente, dalla coniugazione tra acido arachidonico ed etanolamide o glicerolo (Rodriguez de Fonseca *et al.* 2005). AEA viene sintetizzata dalla fosfatidiletanolamide, che, in presenza di  $Ca^{2+}$  e cAMP (Cadas *et al.* 1997; Piomelli 2003), viene convertita in N-arachidonoilfosfatidil-etanolamina (NAPE), dall'enzima N-aciltransferasi. La scissione di NAPE in AEA avviene attraverso l'azione di una specifica fosfolipasi, la fosfolipasi D (NAPE-PLD), che appartiene alla sottofamiglia delle zinco-metalloproteasi, della superfamiglia delle  $\beta$  idrolasi (Okamoto *et al.* 2004). La biosintesi di 2-AG è mediata dalla fosfolipasi C (PLC) o dalla fosfolipasi D (PLD), che portano alla formazione di diacilglicerolo che viene di seguito convertito a 2-AG dalla diacilglicerolipasi (DAG) (Hillard 2000; Sugiura e Waku 2002). Gli eCbs sono catabolizzati da specifici enzimi, come la amido idrolasi degli acidi grassi (FAAH), che idrolizza AEA in etanolamine e acido arachidonico, e la monoacilglicerolipasi (MAGL) che metabolizza il 2-AG in glicerolo e acido arachidonico (Ahn *et al.* 2008). Sono stati identificati processi alternativi per la degradazione di 2-AG sia tramite azione della alfa-beta-idrolasi dominio 6 (ABHD6) che inattivata specificatamente il 2-AG a livello centrale (Marrs *et al.*

2010) sia tramite ciclossigenasi 2 (COX-2), che ossida il 2-AG formando prostaglandine (Kozak *et al.* 2002; Kim e Alger 2004).

AEA, che ha struttura e caratteristiche chimiche simili a quelle del delta-9-tetraidrocannabinolo (THC) (Ryan *et al.* 1997; Seltzman *et al.* 1997), ha affinità più alta per i CB1r ( $K_i$ :  $89 \pm 10 \text{ nM}$ ) che per i CB2r ( $K_i$ :  $371 \pm 102 \text{ nM}$ ) (Reggio 2002) ma anche per i TRPV1 (Ross 2003). Il 2-AG ha affinità di legame per entrambe CB1/CB2r ( $K_i$ :  $2.4 \mu\text{M}$ ) (Basavarajappa 2007). Questi due eCbs sono ampiamente localizzati nel sistema nervoso centrale, soprattutto in cellule staminali cerebrali, medulla, sistema limbico e striato (Sugiura *et al.* 2002). I CBr sono coinvolti nello sviluppo cerebrale in quanto regolano la differenziazione cellulare (Rueda *et al.* 2002). Questi recettori, evidentemente per la loro importanza in questa funzione, sono stati preservati durante l'evoluzione: uomo, ratto e topo condividono il 97% di identità delle sequenze aminoacidi che costituiscono i CBr (Rodriguez de Fonseca *et al.* 2005). Si può dunque affermare che il ECBs, con i suoi recettori e ligandi endogeni, gioca un ruolo fondamentale nella fisiologia cellulare e di interi sistemi. Alterazioni del ECBs infatti sono fortemente connesse a condizioni patofisiologiche quali: obesità, deficit dell'attenzione, schizofrenia, depressione e disturbi neurodegenerativi (Kano *et al.* 2009; Fernandez-Ruiz 2009).

#### **4.2 ECB ed ansia**

Le nozioni sul ruolo del ECBs sull'ansia derivano dall'esperienza dell'uomo, dell'uso ricreazionale della *cannabis*. Il profilo bifasico dei cannabinoidi sull'ansia spiega come a basse dosi, i cannabinoidi producono effetti ansiolitici, mentre ad alte dosi inducono

effetti ansiogeni (Onaivi *et al.* 1990). In particolare bassi dosaggi degli agonisti dei CBR, nabilone, CP 55,940, HU4210 e THC, inducono effetti ansiolitici in elevated plus maze e light-dark box (Onaivi *et al.* 1990; Marco *et al.* 2004; Rodriguez de Fonseca *et al.* 1996; Berrendero e Maldonado 2002). Al contrario, alte dosi di THC inducono effetti ansiogeni nel test dell' elevated plus maze (Onaivi *et al.* 1990). Tali effetti contrastanti potrebbero essere dovuti al coinvolgimento di diverse proteine G, G<sub>i</sub> e G<sub>s</sub>, accoppiate ai CBr, implicate rispettivamente in effetti inibitori o stimolanti (Viveros *et al.* 2005). La modulazione indiretta del ECBs, attraverso il blocco farmacologico della FAAH tramite somministrazione del suo inibitore URB597 ha effetto ansiolitico in diversi saggi comportamentali. Peraltro tale effetto è accompagnato da un incremento dei livelli di AEA nel cervello (Kathuria *et al.* 2003). La localizzazione anatomica dei CB1r nella corteccia prefrontale, l'ippocampo, il nucleo accumbens, l'amigdala e nella sostanza grigia periacquedottale, supporta l'ipotesi che il ECBs sia coinvolto nella regolazione degli stati emozionali tra cui l'ansia (Pistis *et al.* 2004; Viveros *et al.* 2005).

Inoltre è noto che i cannabinoidi modulano il rilascio di numerosi neurotrasmettitori coinvolti nell'ansia (Millan 2003). In particolare, nelle strutture corticolimbiche, inibiscono il rilascio di noradrenalina, dopamina, serotonina e neuropeptidi ansiogeni (colecistochinina e fattore di rilascio della corticotropina) (Schicker e Kathman 2001; Rodriguez de Fonseca *et al.* 1997) mentre modulano l'attività GABAergica in ippocampo, amigdala e corteccia frontale (Marsicano *et al.* 2002)

L'alterazione delle trasmissioni neurotrasmettitoriali a livello di ippocampo, amigdala e corteccia prefrontale si pensa sia alla base dei disturbi ansiosi (Lopez *et al.* 1999; Gorman *et al.* 2000).

### **4.3 ECBs e depressione**

A favore dell'ipotesi, secondo la quale il ECBs possa avere un ruolo nell'eziopatogenesi della depressione, esistono diverse evidenze scientifiche.

Dato l'effetto bifasico dei cannabinoidi, l'abuso di *cannabis* è associato con un maggior rischio di insorgenza di disturbi dell'umore (Rubino e Parolaro 2008), mentre un suo uso moderato, a bassi dosaggi sembra avere effetti benefici sui sintomi depressivi (Bambico e Gobbi 2008). In particolare, sia studi pre-clinici che clinici hanno dimostrato che uno stato depressivo-simile corrisponde un basso livello di eCbs (Rodriguez-Gaztelumendi *et al.* 2009; Hill *et al.* 2009) nelle aree corticolimbiche ed in ippocampo (Patel *et al.* 2005, 2009; Bortolato *et al.* 2007; Rademacher *et al.* 2008; Hill *et al.* 2009, 2010). Studi pre-clinici condotti su roditori hanno dimostrato che la soppressione dei CB1 provoca un fenotipo depresso-simile: ridotta anedonia (Sanchis-Segura *et al.* 2004), ansia (Haller *et al.* 2002, 2004; Mikics *et al.* 2009), disturbi nel controllo delle memorie avverse (Marsicano *et al.* 2002; Kamprath *et al.* 2006; Plendl e Wotjak 2010), disturbi dell'attività sessuale e del comportamento nutritivo (Gorzalka *et al.* 2010). La modulazione diretta dei CB1r attraverso i loro agonisti, ed indiretta attraverso inibitori della FAAH, non solo aumenta i livelli di AEA, ma aumenta anche l'attività di firing sia dei neuroni 5-HT-ergici nel DR sia dei neuroni NE-ergici nel LC (Gobbi *et al.* 2005; Palazzo *et al.* 2006; Mendiguren e Pineda 2006; Bambico *et al.* 2009b, 2010). Inoltre, l'attivazione dei CB1r aumenta l'espressione di BDNF nell'ippocampo (Derkinderen *et al.* 2003) ed inibisce l'ipersecrezione di glucocorticoidi (Hill *et al.* 2010), avendo come effetto positivo la proliferazione delle cellule ippocampali (Aguado *et al.* 2005),

modificazioni neuro plastiche comunemente osservate durante trattamento con antidepressivi. Dal punto di vista comportamentale, l'inibizione della ricaptazione/metabolismo degli eCbs, produce cambiamenti comportamentali comparabili a quelli indotti dagli effetti degli antidepressivi in diversi modelli animali di depressione quali (Rutkowska e Jachimczuk 2004; Gobbi *et al.* 2005; Hill e Gorzalka 2005; Jiang *et al.* 2005; Hill *et al.* 2007; McLaughlin *et al.* 2007; Bortolato *et al.* 2007; Rademacher e Hillard 2007; Adamczyk *et al.* 2008; Bambico *et al.* 2009a, 2010; Morrish *et al.* 2009; El-Alfy *et al.* 2010). A supporto, alterazioni dell'attività dei CB1r provocano un'iperattività dell'asse HPA, inibiscono la neurogenesi e l'espressione di neurotrofine nell'ippocampo (Dubreucq *et al.* 2010). In supporto, anche dati provenienti da studi di elettrofisiologia indicano che il deficit dell'attività degli eCbs indotto da stress inibisce il rilascio di neurotrasmettitori nello striato e nell'ipotalamo (Wamsteeker *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010).

Molti studi hanno preso in esame gli effetti dei trattamenti cronici con antidepressivi sul ECBS ed i risultati ottenuti sono ampiamente controversi e poco chiari. L'antidepressivo tranilcipromina (Is-MAO) aumenta l'affinità di legame CB1r/eCbs nella corteccia prefrontale e ippocampo, ma riduce i livelli di AEA sia in queste strutture che nell'ipotalamo (Hill *et al.* 2009). Il trattamento cronico con disipramina (triciclico) provoca un incremento dei CB1r in ippocampo e ipotalamo, mentre il trattamento cronico con imipramina (triciclico) provoca un aumento di tali recettori in amigdala e un loro decremento in ipotalamo, mesencefalo e striato ventrale (Hill *et al.* 2008). Entrambe però non hanno alcun effetto sui livelli di eCbs. Il trattamento con antidepressivi triciclici sopprime l'attivazione dell'asse HPA stress-indotta (Hill *et al.*

2007) e aumenta sia l'appetito che il peso corporeo (Gobshtis *et al.* 2007); questi effetti vengono revertiti in seguito a trattamento con antagonisti dei CB1r. Questi dati indicano, che il trattamento con i triciclici, aumentando l'attività dei CB1r in ipotalamo, modifica l'attività del ECBs (Hill *et al.* 2007) ed i suoi effetti sulla soppressione dell'attività dell'asse HPA e sul peso corporeo.

Studi pre-clinici riportano che il trattamento con fluoxetina (SSRI) aumenta l'affinità di legame/signalling CB1r nelle regioni della corteccia frontale (Hill *et al.* 2009; Mato *et al.* 2010); per contro, è stato anche dimostrato che il trattamento con citalopram (SSRI) diminuisce l'attività dei CB1r in ippocampo e nucleo paraventricolare (Hesketh *et al.* 2008). La terapia elettroconvulsiva aumenta l'attività dei CB1r in amigdala ma lo riduce, diminuendo anche i livelli di AEA, in corteccia prefrontale (Hill *et al.* 2007). La procedura di privazione del sonno provoca un incremento di 2-AG (Chen e Bazan 2005) e di AEA in ippocampo nell'uomo (Vaughn *et al.* 2010).

Tutte le classi di antidepressivi (ad eccezione di citalopram ed imipramina) aumentano l'attività degli eCbs nelle regioni limbiche subcorticali.

## OBIETTIVI

È noto che le etanolamidi degli acidi grassi, agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, sono coinvolte nella modulazione di alcuni processi fisiologici (metabolici, cardiovascolari ed immunitari) che vengono colpiti dagli insulti di tipo stressogeno (Mackie e Stella 2006; Matias *et al.* 2006, 2007; Fu *et al.* 2003; Lo Verme *et al.* 2005). In letteratura i dati provenienti da uno studio clinico dimostrano che i livelli ematici di OEA e PEA, subiscono un decremento in associazione a stress (Hill *et al.* 2009). A supporto di tale evidenza solo uno studio pre-clinico descrive che la PEA produce un effetto antidepressivo-simile nel modello del nuoto forzato nel topo (Yu *et al.* 2011). Considerando la scarsità di prove scientifiche sul diretto coinvolgimento di OEA e PEA e dei recettori PPAR $\alpha$  in patologie correlate allo stress, in questa tesi è stato studiato (con approccio di tipo comportamentale ed immunohistochimico): il possibile ruolo di tali molecole in ansia e depressione attraverso i test “elevated plus maze” e “nuoto forzato”, rispettivamente, ed il possibile coinvolgimento del sistema endocannabinoide e nicotinico sugli eventuali effetti di OEA e PEA, PPAR $\alpha$ -mediati, nei suddetti test, in ratti maschi adulti del ceppo Sprague Dawley. La specificità del possibile meccanismo PPAR $\alpha$ -mediato è stata investigata tramite pretrattamento con l’antagonista specifico PPAR $\alpha$ , l’ MK866; il potenziale coinvolgimento del sistema endocannabinoide con l’utilizzo dell’antagonista/agonista inverso dei CB1r, il rimonabant e l’interazione PPAR $\alpha$ -sistema nicotinico tramite trattamento con l’agonista dei recettori nicotinici  $\alpha 7$  nAChR, PNU282987. Preliminarmente a tali esperimenti è stato caratterizzato il profilo farmacologico comportamentale delle due molecole in studio tramite test di attività

motoria ed analgesia, in modo da selezionare le dosi che non inducano effetti aspecifici nel comportamento animale.

## **MATERIALI E METODI**

### ***1.1 Animali***

Per il presente studio sono stati utilizzati ratti maschi adulti del ceppo Sprague Dawley (Harlan, Italia), del peso di 280 gr al momento della sperimentazione. Gli animali sono stati stabulati quattro per gabbia e mantenuti ad un regolare ciclo luce/buio di 12h, in condizioni ambientali di temperatura ed umidità standard ( $T= 21\pm 2$  °C;  $U= 60\%$ ) con disponibilità *ad libitum* di acqua e cibo.

I test comportamentali sono stati condotti durante il periodo di luce in ambienti con luce attenuata (30 lux) in modo da riprodurre le condizioni ambientali standard della stanza di stabulazione. Gli animali, prima di ogni test, sono stati sottoposti ad abituamento (1h) delle condizioni ambientali delle stanze di sperimentazione.

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

### ***1.2 Farmaci utilizzati nei test comportamentali***

Le soluzioni di farmaci sono state preparate prima di ogni test e somministrate intraperitonealmente (i.p).

OEA (Tocris, UK): 2.5, 5, 7.5, 10 mg/kg, disciolta in 5% Tween 80 e 95% soluzione salina, somministrata 10 minuti prima dei test.

PEA (Ascent Scientific, UK): 1, 2, 3.75, 7.5, 15 mg/kg disciolta in 5% Tween 80 e 95% soluzione salina, somministrata 10 minuti prima dei test.

MK886 (Tocris, UK): 1 mg/kg disciolta in 10% Tween 80, 20% DMSO e 70% acqua distillata, somministrata 1h prima dei test.

Rimonabant (SR 171416A) (Sanofi Aventis): 1 mg/kg disciolta in 3 gocce di Tween 80 e 95% soluzione salina, somministrata 30 minuti prima dei test.

PNU 282987 (Tocris, UK): 3 mg/kg disciolta in soluzione salina, somministrata 30 minuti prima dei test.

Morfina cloridrato (Carlo Sessa, Italia): 5mg/kg disciolta in soluzione salina, utilizzata come farmaco di riferimento negli esperimenti di analgesia, somministrata 1h prima dei test.

Amitriptilina (Roche, UK): 15 mg/kg disciolta in soluzione salina, utilizzata come farmaco di riferimento negli esperimenti sulla depressione, somministrata 1h prima del test.

### **1.3 Test comportamentali**

#### **- 1.3.1 Test dell'attività motoria: apparato e procedura**

Il test dell'attività motoria è stato condotto seguendo il protocollo di Spano *et al.* 2012. Gli animali sono stati randomizzati in gruppi (n=6 per gruppo sperimentale) e testati individualmente in gabbie operanti tramite l'apparecchio Digiscan Animal Activity Analyser (OmnitechElectronics, Columbus, USA). Ogni gabbia (42 ×30 × 60 cm) è dotata di due set di 16 fotocellule localizzate nei quattro lati della gabbia, ad una distanza di 2.5 cm l'una dall'altra che emettono raggi infrarossi in senso orizzontale e verticale (4 e 12 cm dal pavimento della gabbia). Ogni animale, in seguito a trattamento, veniva posizionato all'interno della gabbia e da quel momento aveva inizio il test.

Sono stati valutati i seguenti parametri:

-*distanza percorsa*: distanza orizzontale totale percorsa dall'animale, misurata in centimetri (cm);

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

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

Tutti i parametri sono stati registrati per un periodo complessivo di 60 minuti immediatamente dopo aver posto gli animali nelle gabbie sperimentali. In particolare, sono stati valutati come curva temporale (valori raccolti ad intervalli di 10 minuti) e come dati cumulativi (media della somma dei valori valutati ogni 10 minuti, per animale, per gruppo, all'interno dell'intera sessione). Tra una sessione e la successiva le pareti dell'apparato venivano pulite con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in modo da limitare ogni possibile traccia olfattiva.

Sono stati testati i seguenti farmaci:

OEA (2.5, 5, 7.5, 10 mg/kg); PEA (2, 3.75, 7.5, 15 mg/kg); PNU 282987 (3 mg/kg); MK886 (1 mg/kg); rimonabant (1 mg/kg).

### - **1.3.2 Tail flick test: apparato e procedura**

Per lo studio degli effetti antinocicettivi dei farmaci testati, è stato condotto il tail flick test attraverso un apparato specifico in grado di emanare una sorgente luminosa irradiante calore. L'intensità di temperatura dello stimolo è stata impostata a 55°C ed il

cut-off a 10 secondi in modo da prevenire danni cutanei all'animale. La procedura inizia col posizionamento della coda dell'animale a 3-5 cm dalla sorgente di calore, la quale è associata ad un sensore a raggi infrarossi ed un timer che vengono attivati dall'operatore. Quando l'animale compie il movimento di "flick" con la coda, (movimento orizzontale per spostare la coda dallo stimolo doloroso) il timer si ferma ed automaticamente l'apparato fornisce la misura della latenza (sec) al movimento di "flick" della coda. Seguendo il protocollo di Bannon e Malmberg (2007), con minime modificazioni, il test è stato condotto a 15, 30, 45, 60 e 75 minuti dopo la somministrazione dei farmaci. Gli animali (n =6 per gruppo) sono stati randomizzati nei diversi gruppi sperimentali in seguito alla valutazione della latenza di base allo stimolo di calore. Sono stati analizzati i seguenti parametri:

- MPE, ovvero percentuale del massimo effetto possibile del farmaco misurata in percentuale (%).

%MPE è stato calcolato con la seguente formula:  $(\text{latenza test} - \text{latenza di base}) / (\text{limite massimo di tempo} - \text{latenza di base})$ . Tra una sessione e la successiva le pareti dell'apparato venivano pulite con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in modo da limitare gli impulsi olfattivi.

- **1.3.3 Elevated plus maze: apparato e procedura**

L' elevated plus maze è un test comportamentale detto "di emersione" e si basa sulla naturale avversione dei roditori per gli spazi aperti e sulla risposta comportamentale del movimento dell'animale negli spazi chiusi o aperti (comportamento noto come tigmotassi), all'interno dell'apparato. L'apparato è composto da due bracci chiusi sul

perimetro da pareti scure (50 cm x 10 cm x 40 cm) e due aperti (50 cm x 10 cm), e si estendono in direzione opposta da una piattaforma centrale comune (10 cm x 10 cm) ed è sollevato 50 cm dal pavimento mediante un piedistallo centrale. Una volta che l'animale veniva posizionato nella zona centrale dell'apparato, con il capo rivolto verso un braccio aperto, veniva osservato per 5 minuti, da una stanza esterna di monitoraggio, tramite videocamere digitali e rispettivo software (Anymaze Software, Stoelting). Gli animali (n=6 per gruppo) sono stati randomizzati nei gruppi sperimentali e testati individualmente. Sono state considerate entrate nei bracci tutte le volte in cui l'animale attraversava il bordo del braccio (in entrata o uscita) con il 90% del suo corpo. Tra una sessione e la successiva l'apparato veniva pulito con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in modo da eliminare ogni possibile traccia olfattiva.

Nell'elevated plus maze il comportamento naturale dell'animale si traduce con una riduzione dei movimenti e con la preferenza a permanere nei bracci chiusi (Pellow *et al.* 1985, Treit *et al.* 1990, Rodgers *et al.* 1997, Carobrez *et al.* 2005). L'ansia accentua questo comportamento mentre, una riduzione dello stato ansioso, si riscontra con l'aumento sia del tempo speso dall'animale nei bracci aperti sia del numero di entrate nei bracci aperti. Il numero totale di entrate nei bracci e il numero di entrate nei bracci chiusi sono un indice di attività motoria spontanea (Hogg *et al.* 1996). Sono stati valutati:

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

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

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

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

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

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

L'effetto di OEA e PEA (5 mg/kg e 2 mg/kg, rispettivamente) è stato valutato sia in seguito a trattamento acuto che sub-cronico (OEA 2.5 e 5 mg/kg; PEA 1 e 2 mg/kg). Mentre per il trattamento in acuto i farmaci sono stati somministrati 10 minuti prima del test, per quanto riguarda il sub-cronico OEA e PEA sono state somministrate 24h, 4h e 10 minuti prima del test.

- **1.3.4 Test del nuoto forzato: apparato e procedura**

Il test è stato condotto utilizzando cilindri trasparenti in plexiglas (20 cm diametro × 40 cm altezza) contenenti 40 cm di acqua (in modo che ci fosse una distanza di 13 cm circa tra la punta della coda dell'animale ed il fondo del cilindro) ad una temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ : gli animali, nell'apparato sono costretti a nuotare senza via di fuga. Gli animali (N=8 per gruppo) sono stati randomizzati nei gruppi sperimentali.

L'esperimento si svolge in due fasi: training e test. La fase di training, della durata di 15 minuti (giorno 1) si svolge 24h prima del test. Subito dopo l'animale viene accuratamente asciugato dall'operatore e riceve la prima somministrazione di farmaco e riposto nella stanza di stabulazione. Gli animali ricevono la seconda somministrazione di farmaco (giorno 2) 4h prima del test e la terza poco prima del test, in base ai tempi di somministrazione dei farmaci. Il test che viene condotto nelle medesime condizioni della fase di training, consiste nell'osservare per 5 minuti gli animali, da una stanza esterna tramite sistema di videocamere digitali e rispettivo software (Anymaze Software, Stoelting). Nel test del nuoto forzato, i roditori, che sono forzati a nuotare in uno spazio ristretto e senza via di fuga, dopo un iniziale periodo di ipermotilità, assumono una postura immobile, e si muovono solo per mantenere il capo fuori dall'acqua per risparmiare energie. Il significato della postura di "immobilità o galleggiamento" indica un comportamento di rassegnazione in una situazione di forte stress, anche noto come "comportamento di disperazione". La procedura del test del nuoto forzato è ampiamente descritta in letteratura (Porsolt *et al.* 1977, 1978; Detke *et al.* 1996; Rénéric *et al.* 1998) ed in particolare in questa tesi è stato utilizzato il protocollo descritto da Castagné e colleghi (2011).

Sono stati valutati i seguenti parametri:

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

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

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

#### **1.4 Immunoistochimica**

##### **- 1.4.1 Farmaci, preparazione del campione, procedura ed analisi**

L'analisi immunoistochimica è stata condotta su cervelli di animali trattati sub-cronicamente con OEA (2.5 mg/kg), PEA (1 mg/kg) e veicolo sottoposti al test di depressione del nuoto forzato, e animali naïve, che cioè non hanno svolto il test comportamentale né subito alcun trattamento farmacologico. Subito dopo la sessione sperimentale gli animali sono stati anestetizzati con Equitesin (pentobarbitale 9.72 mg/kg, cloralio idrato 44.4 mg/ml, glicol propilene 44%), e perfusi per via transcardiaca con un tampone salino fosfato [PBS (0.1 M, pH 7.4)] ed in seguito con paraformaldeide al 4% in PBS 0.1 M. I cervelli, una volta rimossi dal cranio, sono stati post-fissati nella stessa soluzione di paraformaldeide per 24h a 4°C e poi immersi in soluzione antigelo a -20 °C fino al momento del loro utilizzo. In accordo con l'atlante Paxinos e Watson (1986), i cervelli sono stati tagliati con la metodica free-floating in sezioni coronali (30 mm) tramite vibratomo (Vibratome Leica VT 1000S) a livello dell'ippocampo; le sezioni sono state posizionate in vetrini per microscopia gelatinizzati e trattate con una soluzione specifica per bloccare le perossidasi endogene (Dako, Denmark) per 30 minuti a temperatura ambiente. A seguire, l'incubazione per 24h in anticorpo primario a 4°C (monoclonale mouse anti-rat GAD67, diluizione 1:1000 in PBS 0.1M con 0,1% TritonX, Chemicon, Temecula, CA o monoclonale rabbit anti-rat MAP2, diluizione 1:200 in PBS 0.1M con 0,1% TritonX, Sigma). Dopo l'incubazione le sezioni sono state lavate

con PBS 0.1 M ed incubate in anticorpo secondario biotinilato anti-mouse o anti-rabbit, rispettivamente (diluizione 1:200), a temperatura ambiente per 1 ora e 30 minuti. Dopo incubazione nel complesso avidina-biotina (Vector Elite, Burlingame, CA, U.S.A.) è stata indotta una reazione visibile trattando le sezioni con 0.04% diaminobenzidina (DAB, Dako, Glostrup Denmark), 2.5% nickel solfato e 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, disciolti in sodio acetato 0.1 M. Le sezioni sono state disidratate con crescenti concentrazioni di etanolo, pulite in xylene e sigillate con coprivetrini. Le sezioni dei controlli negativi sono state ottenute utilizzando il suddetto protocollo ma senza il trattamento con anticorpo primario. Per valutare l'efficienza della reazione immunostochimica della proteina decarbossilasi dell'acido glutammico, isoforma 67 kDa, (GAD67) e della proteina associata a microtubuli-tipo 2 (MAP2) in ippocampo, sono state analizzate tre sezioni per ogni animale, tramite microscopio Nikon Eclipse 90i e macchina fotografica NikonDXM 1200F con ingrandimenti a 5x e 20x. Le immagini sono state analizzate tramite NIH Image Processing and Analysis software (ImageJ; NIH, Bethesda, MD, USA). In tutte le sezioni è stata analizzata la medesima area di ippocampo. Il segnale di fondo è stato identificato, per ogni sessione, con una piccola area vicina a quella studiata. Le analisi sono state condotte dall'operatore in cieco. Questi esperimenti sono stati da me condotti nei laboratori del Prof. Javier Fernández-Ruiz e sotto la supervisione della Prof. ssa Sagredo Onintza, presso la Università Complutense di Madrid.

### **1.5 Analisi statistica**

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

L'analisi dei dati del test dell'attività motoria e del test per l'analgesia, è stata effettuata tramite ANOVA a due vie (studio dell'interazione Trattamento x Tempo). In caso di significatività statistica è stato applicato il Bonferroni post hoc test per le comparazioni multiple. Per l'elevated plus maze i dati sono stati analizzati tramite Unpaired t Student test, per la valutazione delle differenze tra i gruppi.

I dati del test del nuoto forzato e dell'immunoistochimica sono stati analizzati tramite ANOVA ad una via (studio del fattore trattamento tra i gruppi) e post hoc test di Newman Keuls.

La significatività statistica è stata impostata per  $P < 0.05$ . Le analisi sono state condotte con l'utilizzo di GraphPad Prism versione 5.

## RISULTATI

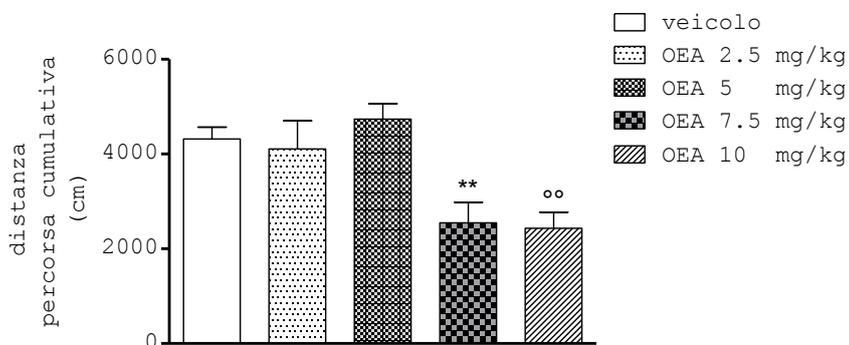
### 1.1 Test dell'attività motoria

- **1.1.1 Valutazione del trattamento acuto con l' agonista PPAR $\alpha$ , OEA, nel test dell'attività motoria**

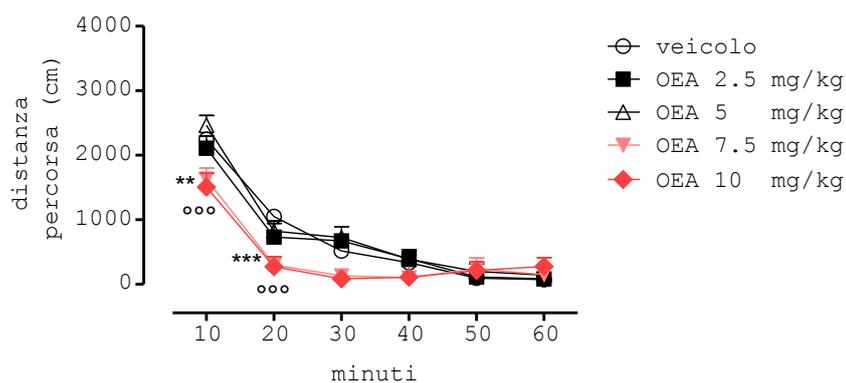
Nelle Fig. 1 e 2 (a, b) è raffigurata l'analisi dell'attività motoria presente negli animali dopo la somministrazione acuta di dosi crescenti dell'agonista PPAR $\alpha$ , OEA (2.5, 5, 7.5 e 10 mg/kg) e del corrispondente veicolo.

Considerando sia la distanza percorsa che l'attività verticale cumulativa, entrambe valutate per un periodo complessivo di 60 minuti, osserviamo che gli animali trattati con le dosi alte del farmaco (7.5 e 10 mg/kg) mostrano una significativa diminuzione di entrambi i parametri rispetto agli animali trattati con il solo veicolo [ANOVA ad una via: ( $F_{4, 29}=8,372$ ;  $P=0,0003$  e  $F_{4, 29}=26,78$ ;  $P<0.0001$  rispettivamente)] (Fig. 1a e 2a). Dall'analisi della curva temporale (valori di attività motoria raccolti ad intervalli di 10 minuti per un periodo complessivo di 60 minuti), riportata nelle Fig. 2a e 2b, è stato rilevato che la diminuzione significativa è evidente nei primi 20 e 30 minuti del test [ANOVA a due vie: Trattamento ( $F_{4,150}=11.15$ ;  $P<0.0001$  e  $F_{4,150}=16.36$ ;  $P<0.0001$  rispettivamente); Tempo ( $F_{5,150}=147.53$ ;  $P<0.0001$  e  $F_{5,150}=39.89$ ;  $P<0.0001$  rispettivamente); Interazione Trattamento x Tempo ( $F_{20,150}=2.62$ ;  $P=0.0007$  e  $F_{25,150}=2.68$ ;  $P<0.0001$  rispettivamente)]. Per quanto riguarda l'attività al centro e ai margini della gabbia sperimentale, non è stata trovata alcuna differenza significativa tra gli animali trattati con le diverse dosi di OEA ed il corrispondente veicolo (Tab. 1).

a

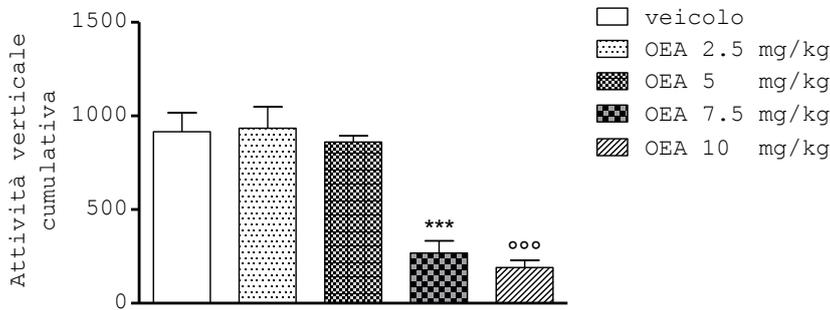


b

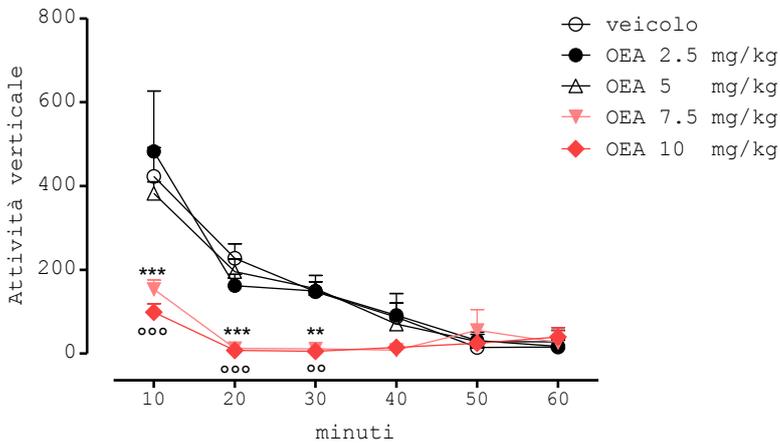


**Fig. 1. Effetti dell'agonista PPAR $\alpha$ , OEA, sulla distanza percorsa nel test dell'attività motoria.** Il grafico rappresenta gli effetti di crescenti dosi di OEA sulla distanza percorsa, nel test dell'attività motoria nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA  $\pm$  SEM (n=6 animali per gruppo). **Fig. 1a:** \*\* P<0.01 OEA 7.5 mg/kg vs veicolo; °° P<0.01 OEA 10 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Newman Keuls. **Fig. 1b:** \*\*\* P<0.001 OEA 7.5 mg/kg vs veicolo; \*\* P<0.01 OEA 7.5 mg/kg vs veicolo; °°° P<0.001 OEA 7.5 e 10 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Bonferroni.

a



b



**Fig. 2. Effetti dell'agonista PPAR $\alpha$ , OEA, sull'attività verticale nel test dell'attività motoria.** Il grafico rappresenta gli effetti di crescenti dosi di OEA sull'attività verticale nel test dell'attività motoria nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA  $\pm$  SEM (n=6 animali per gruppo). **Fig. 2a:** \*\*\* P<0.001 OEA 7.5 mg/kg vs veicolo; °°° P<0.001 OEA 10 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Newman Keuls. **Fig. 2b:** \*\*\* P<0.001 OEA 7.5 mg/kg vs veicolo; \*\* P<0.01 OEA 7.5 mg/kg vs veicolo; °°° P<0.001 OEA 10 mg/kg vs veicolo; °° P<0.01 OEA 10 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Bonferroni.

**Tab. 1. Effetti di crescenti dosi dell'agonista PPAR $\alpha$ , OEA, sull'attività al centro e ai margini nel test dell'attività motoria**

	<b>attività al centro</b>	<b>attività ai margini</b>
veicolo	270 $\pm$ 68	3228 $\pm$ 63
OEA 2.5 mg/kg	196 $\pm$ 70	3077 $\pm$ 60
OEA 5 mg/kg	178 $\pm$ 26	3240 $\pm$ 44
OEA 7.5 mg/kg	171 $\pm$ 20	3102 $\pm$ 175
OEA 10 mg/kg	116 $\pm$ 18	3403 $\pm$ 60

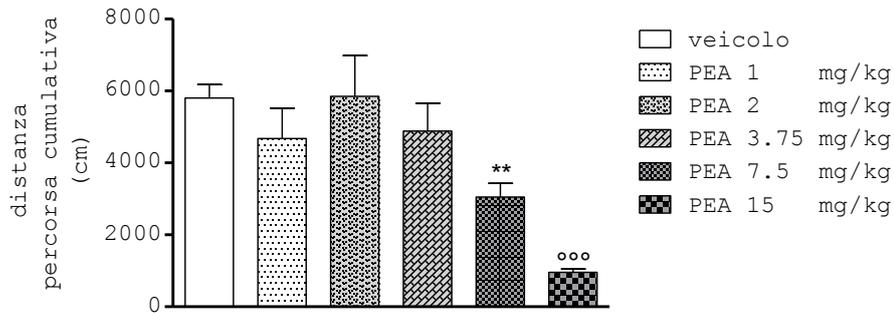
*I valori sono espressi come MEDIA  $\pm$  SEM (n=6 animali per gruppo)*

- **1.1.2 Valutazione del trattamento acuto con l' agonista PPAR $\alpha$ , PEA, nel test dell'attività motoria**

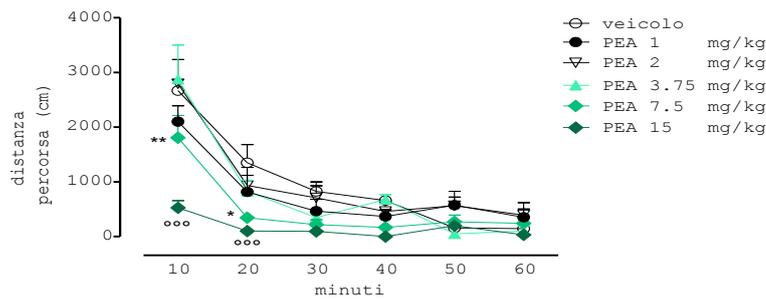
Le Fig. 3 e 4 (a, b) mostrano gli effetti delle crescenti dosi di PEA (1, 2, 3.75, 7.5, 15 mg/kg) rispetto al gruppo di controllo trattato con veicolo nel test dell'attività motoria. Come per OEA, l'analisi ha rivelato che le alte dosi di PEA (7.5 e 15 mg/kg) riducono sia la distanza percorsa che l'attività verticale cumulativa, entrambe valutate per un periodo complessivo di 60 minuti, in modo statisticamente significativo [ANOVA ad una via: ( $F_{5, 24}=7,853$ ;  $P=0.0004$ ) e ( $F_{5,24}= 0.0014$ ;  $P=0.1817$ , NS) rispettivamente]. Dall'analisi della curva temporale (valori raccolti ad intervalli di 10 minuti) è possibile rilevare che la diminuzione avviene nei primi 20 minuti del test [ANOVA a due vie: Trattamento ( $F_{5,108}=12.93$ ;  $P<0.0001$  e  $F_{5,108}=9.03$ ;  $P<0.0001$  rispettivamente); Tempo ( $F_{5,108}=67.96$ ;  $P<0.0001$  e  $F_{5,108}=27. 61$ ;  $P<0.0001$  rispettivamente); Interazione Trattamento x Tempo ( $F_{25,108}=2.68$ ;  $P<0.0001$  e  $F_{25,108}=1.70$ ;  $P=0.0252$  rispettivamente)]. Per quanto riguarda l'attività al centro e ai margini della gabbia

sperimentale, non è stata trovata alcuna differenza significativa tra gli animali trattati con le diverse dosi di PEA ed il corrispondente veicolo (Tab. 2)

a

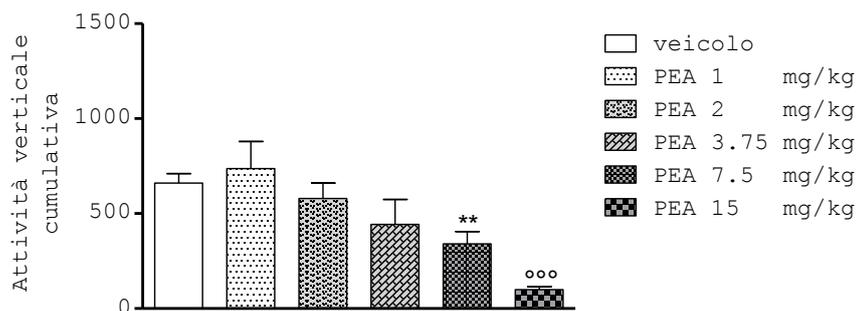


b

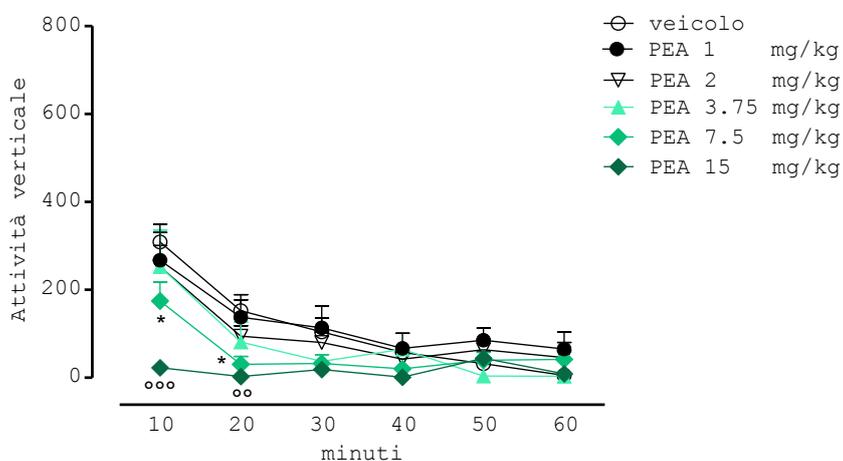


**Fig. 3. Effetti dell'agonista PPAR $\alpha$ , PEA, sulla distanza percorsa nel test dell'attività motoria.** Il grafico rappresenta gli effetti di crescenti dosi di PEA sulla distanza percorsa, nel test dell'attività motoria nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA  $\pm$  SEM (n=4 animali per gruppo). **Fig. 4a:** \*\* P<0.01 PEA 7.5 mg/kg vs veicolo; \*\*\* P<0.001 PEA 15 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Newman Keuls. **Fig. 4b:** \*\* P<0.01 PEA 7.5 mg/kg vs veicolo; \* P<0.05 PEA 7.5 mg/kg vs veicolo; \*\*\* P<0.001 PEA 15 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Bonferroni.

a



b



**Fig. 4. Effetti dell'agonista PPAR $\alpha$ , PEA, sull'attività verticale nel test dell'attività motoria.** Il grafico rappresenta gli effetti di crescenti dosi di PEA sull'attività verticale nel test dell'attività motoria nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA  $\pm$  SEM (n=4 animali per gruppo). **Fig. 5a:** \*\* P<0.01 PEA 7.5 mg/kg vs veicolo; °°° P<0.001 PEA 15 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Newman Keuls. **Fig. 5b:** \* P<0.05 PEA 7.5 mg/kg vs veicolo; °°° P<0.001 PEA 15 mg/kg vs veicolo; °° P<0.01 PEA 15 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Bonferroni.

**Tab. 2. Effetti di crescenti dosi dell'agonista PPAR $\alpha$ , PEA, sull'attività al centro e ai margini nel test dell'attività motoria.**

	<b>attività al centro</b>	<b>attività ai margini</b>
veicolo	275 $\pm$ 29	3323 $\pm$ 29
PEA 1 mg/kg	690 $\pm$ 295	2909 $\pm$ 296
PEA 2 mg/kg	358 $\pm$ 120	3225 $\pm$ 124
PEA 3.75 mg/kg	251 $\pm$ 16	3377 $\pm$ 41
PEA 7.5 mg/kg	383 $\pm$ 99	3283 $\pm$ 67
PEA 15 mg/kg	172 $\pm$ 81	3427 $\pm$ 80

*I valori sono espressi come MEDIA  $\pm$  SEM (n=4 animali per gruppo)*

- **1.1.3 Effetti dell'antagonista PPAR $\alpha$ , MK886, e dell'antagonista/agonista inverso dei recettori cannabinoidi CB1, SR141716A (SR) o rimonabant, nel test dell'attività motoria**

I risultati riportati in Tab. 3 mostrano l'effetto dell'antagonista specifico PPAR $\alpha$ , MK886 1 mg/kg, e del rimonabant, antagonista/agonista inverso dei recettori CB1, rispetto al corrispondente gruppo trattato con veicolo (gruppo controllo) nel test dell'attività motoria. La somministrazione di ciascun farmaco alle dosi indicate nella tabella non ha indotto alcun effetto significativo (P= NS) né sulla distanza percorsa, né sull'attività verticale come in quella al centro ed ai margini.

**Tab. 3. Effetti dell'antagonista PPAR $\alpha$ , MK886, e dell'antagonista/agonista inverso dei recettori cannabinoidi CB1, SR141716A, nel test dell'attività motoria.**

	distanza percorsa	attività verticale	attività al centro	attività ai margini
veicolo	5026 $\pm$ 776	770 $\pm$ 198	397 $\pm$ 131	3202 $\pm$ 131
MK886 1 mg/kg	5142 $\pm$ 1142	568 $\pm$ 141	278 $\pm$ 143	3322 $\pm$ 143
	distanza percorsa	attività verticale	attività al centro	attività ai margini
veicolo	4352 $\pm$ 471	2892 $\pm$ 180	370 $\pm$ 98	3230 $\pm$ 98
rimonabant 1 mg/kg	3564 $\pm$ 1081	2252 $\pm$ 397	199 $\pm$ 78	3401 $\pm$ 78

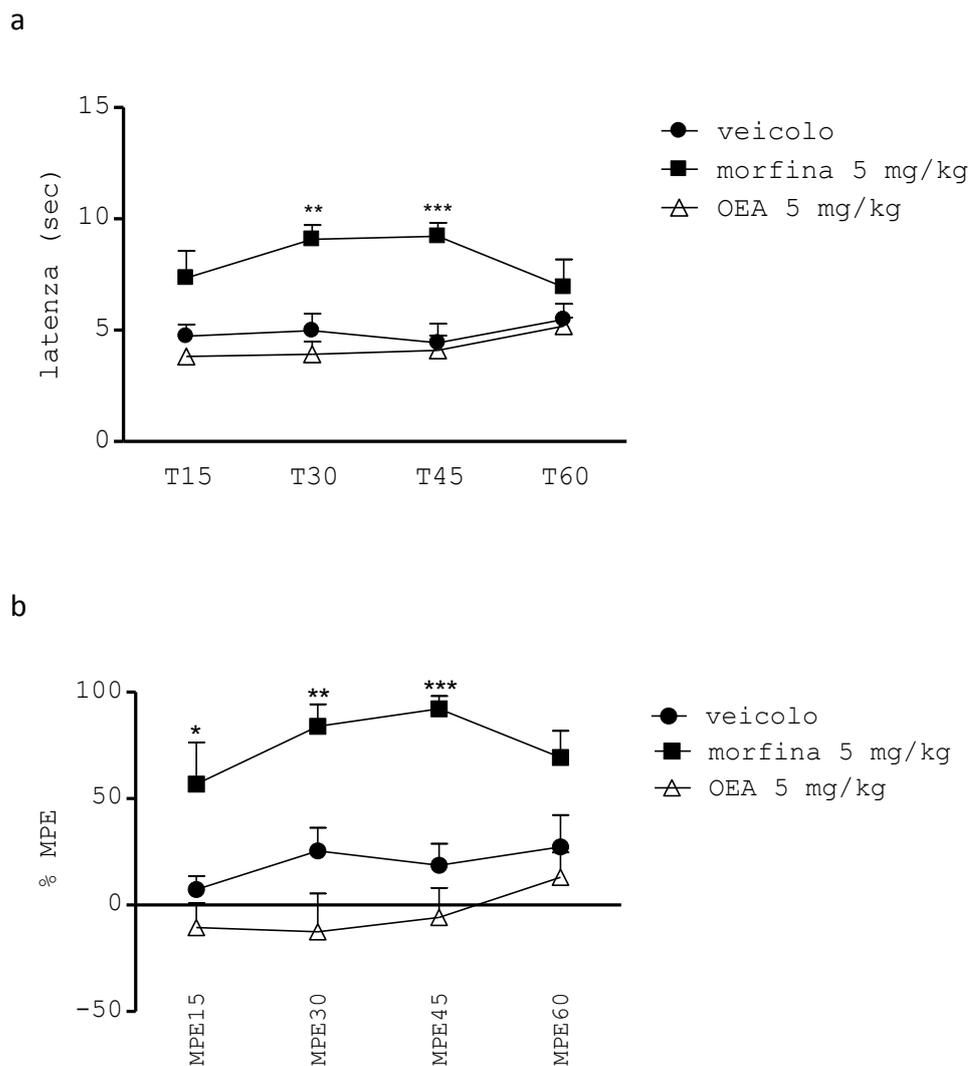
*I valori sono espressi come MEDIA  $\pm$  SEM (n=4 animali per gruppo)*

## 1.2 Analgesia

- **1.2.1 Valutazione del trattamento acuto con gli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, nel test di analgesia "tail flick"**

La somministrazione dell'agonista oppioide morfina (farmaco di riferimento) alla dose di 5 mg/kg i.p, ha indotto un effetto analgesico statisticamente significativo (espresso come latenza e come MPE) che raggiunge un valore compreso tra 7.5 e 9.6 sec ed il 56% ed il 96% (Fig. 5) nei 60 minuti di osservazione. In comparazione l'agonista PPAR $\alpha$ , OEA, alla dose somministrata (5 mg/kg, i.p) 10 minuti prima dell'inizio del test non induce alcun effetto analgesico o iperalgesico, infatti sia il valore di latenza alla risposta sia il valore di MPE non si discostano dal valore basale durante tutti i 60 minuti

d'osservazione. Anche gli animali trattati con il veicolo non hanno riportato modificazioni significative nella loro risposta comportamentale allo stimolo nocicettivo. L'ANOVA a due vie sulla latenza (Fig. 5a) ha rivelato un effetto significativo del fattore Trattamento ( $F_{2, 60} = 30,82$ ;  $P < 0,0001$ ), ma non del fattore Tempo ( $F_{3,60} = 0,54$ ;  $P = \text{NS}$ ) né dell' interazione Trattamento x Tempo ( $F_{6,60} = 1,48$ ;  $P = \text{NS}$ ). Ugualmente l'ANOVA a due vie per MPE (Fig. 5b) ha rivelato un effetto significativo del fattore Trattamento ( $F_{2, 60} = 40,89$ ;  $P < 0,0001$ ), ma non del fattore Tempo ( $F_{3,60} = 1,35$ ;  $P = \text{NS}$ ) né dell' interazione Trattamento x Tempo ( $F_{6,60} = 0,75$ ;  $P = \text{NS}$ ).

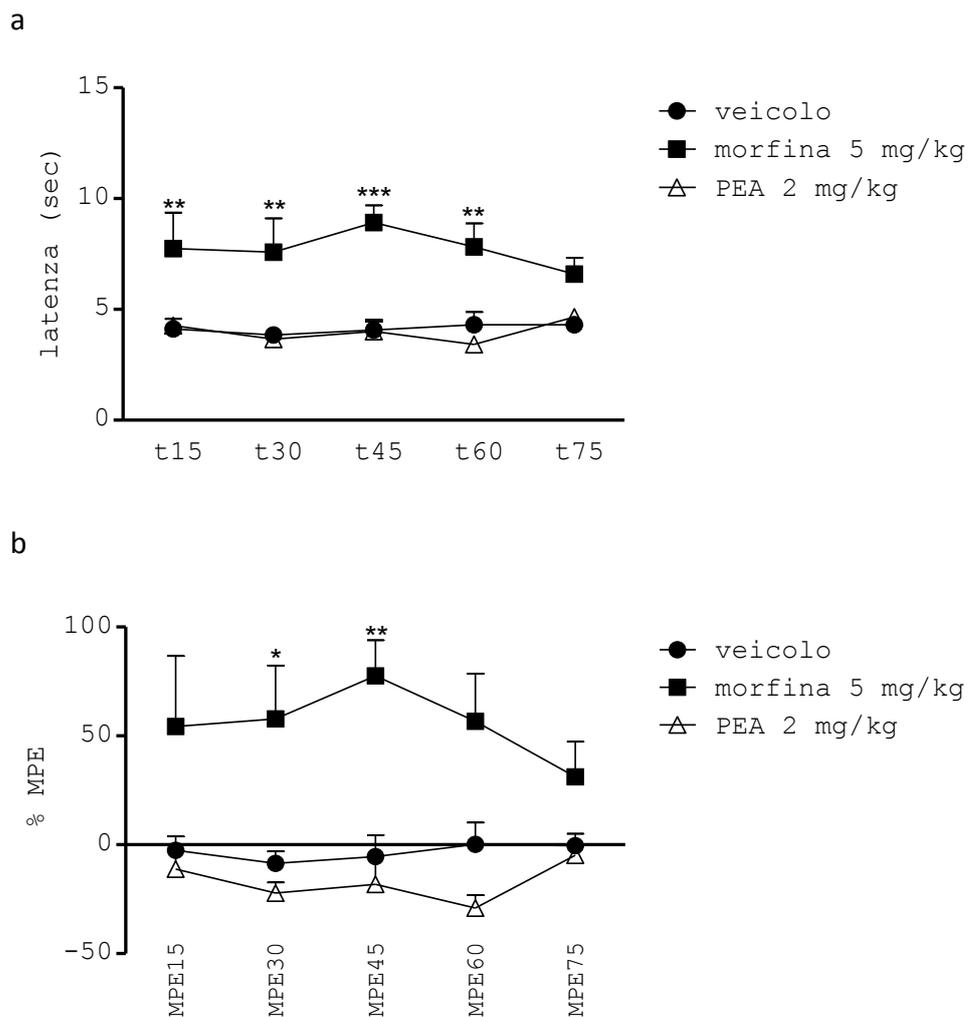


**Fig. 5. Effetto del trattamento acuto con l'agonista PPAR $\alpha$ , OEA, sulla risposta nocicettiva nel tail flick test.** I grafici rappresentano l'effetto di OEA 5 mg/kg sulla latenza (in alto) in risposta allo stimolo dolorifico termico e sulla percentuale del massimo effetto possibile, %MPE, (in basso) nel tail flick test nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=6 animale per gruppo). **(Fig. 5a):** \*\*\* P<0.001 morfina 5 mg/kg vs veicolo; \*\* P< 0.01 morfina 5 mg/kg vs veicolo; **(Fig. 5b):** \*\*\* P<0.001 morfina 5 mg/kg vs veicolo; \*\* P<0.01 morfina 5 mg/kg vs veicolo; \* P<0.05 morfina 5 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Bonferroni.

La figura (Fig. 6) riporta i dati ottenuti sulla risposta nocicettiva nel tail flick test in animali trattati con l'agonista PPAR $\alpha$ , PEA (2 mg/kg, i.p), con la morfina (5 mg/kg, i.p), o con il veicolo. Anche in questo esperimento la morfina ha chiaramente indotto un

effetto analgesico significativo con una curva nel tempo del tutto assimilabile a quella dell'esperimento precedente. Come riportato nel grafico anche il secondo agonista PPAR $\alpha$  valutato, ovvero la PEA, alle dosi testate, non ha modificato la risposta nocicettiva dell'animale nel test di analgesia utilizzato.

Per quanto riguarda la latenza (Fig. 6a) l'ANOVA a due vie ha rivelato un effetto significativo legato fattore Trattamento ( $F_{2, 75} = 34,27$ ;  $P < 0,0001$ ), ma non del fattore Tempo ( $F_{4, 75} = 0,23$ ;  $P = \text{NS}$ ) né dell' interazione Trattamento x Tempo ( $F_{8, 75} = 0,75$ ;  $P = \text{NS}$ ). L'ANOVA a due vie relativa al MPE (Fig. 6b) ha rivelato un effetto significativo del fattore Trattamento ( $F_{2, 60} = 40,89$ ;  $P < 0,0001$ ), ma non del fattore Tempo ( $F_{3, 60} = 1,35$ ;  $P = \text{NS}$ ) né dell' interazione Trattamento x Tempo ( $F_{6, 60} = 0,75$ ;  $P = \text{NS}$ ).

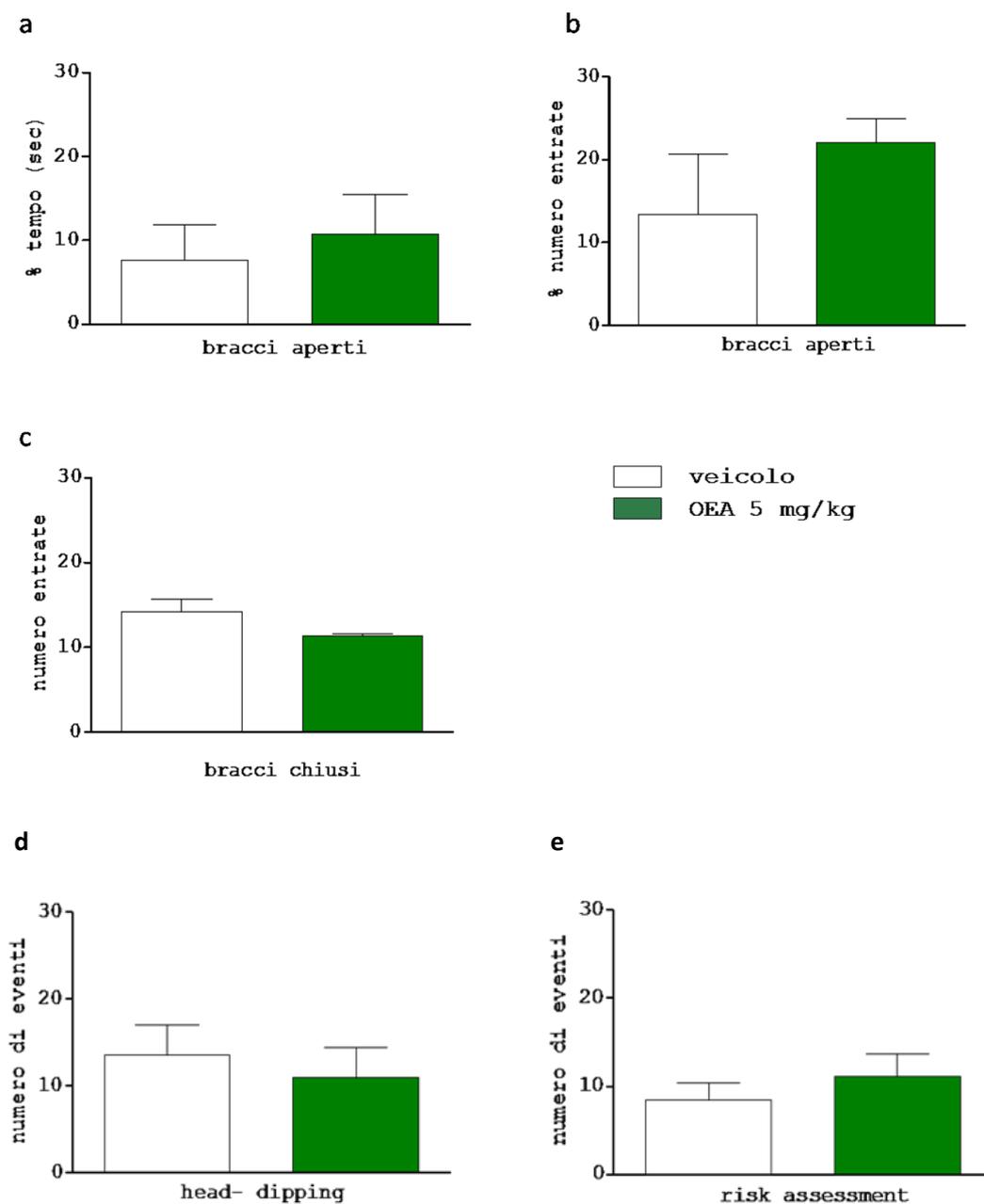


**Fig. 6. Effetto del trattamento acuto con l'agonista PPAR $\alpha$ , PEA, sulla risposta nocicettiva nel tail flick test.** I grafici rappresentano l'effetto di PEA 2 mg/kg sulla latenza (in alto) in risposta allo stimolo dolorifico termico e sulla percentuale del massimo effetto possibile, %MPE, (in basso) nel tail flick test nel ratto. In particolare per la latenza (**Fig. 6a**): \*\*\*  $P < 0.001$  morfina 5 mg/kg vs veicolo; \*\*  $P < 0.01$  morfina 5 mg/kg vs veicolo; - e riguardo %MPE (**Fig. 6b**): \*\*  $P < 0.01$  morfina 5 mg/kg vs veicolo; \*  $P < 0.05$  morfina 5 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Bonferroni.

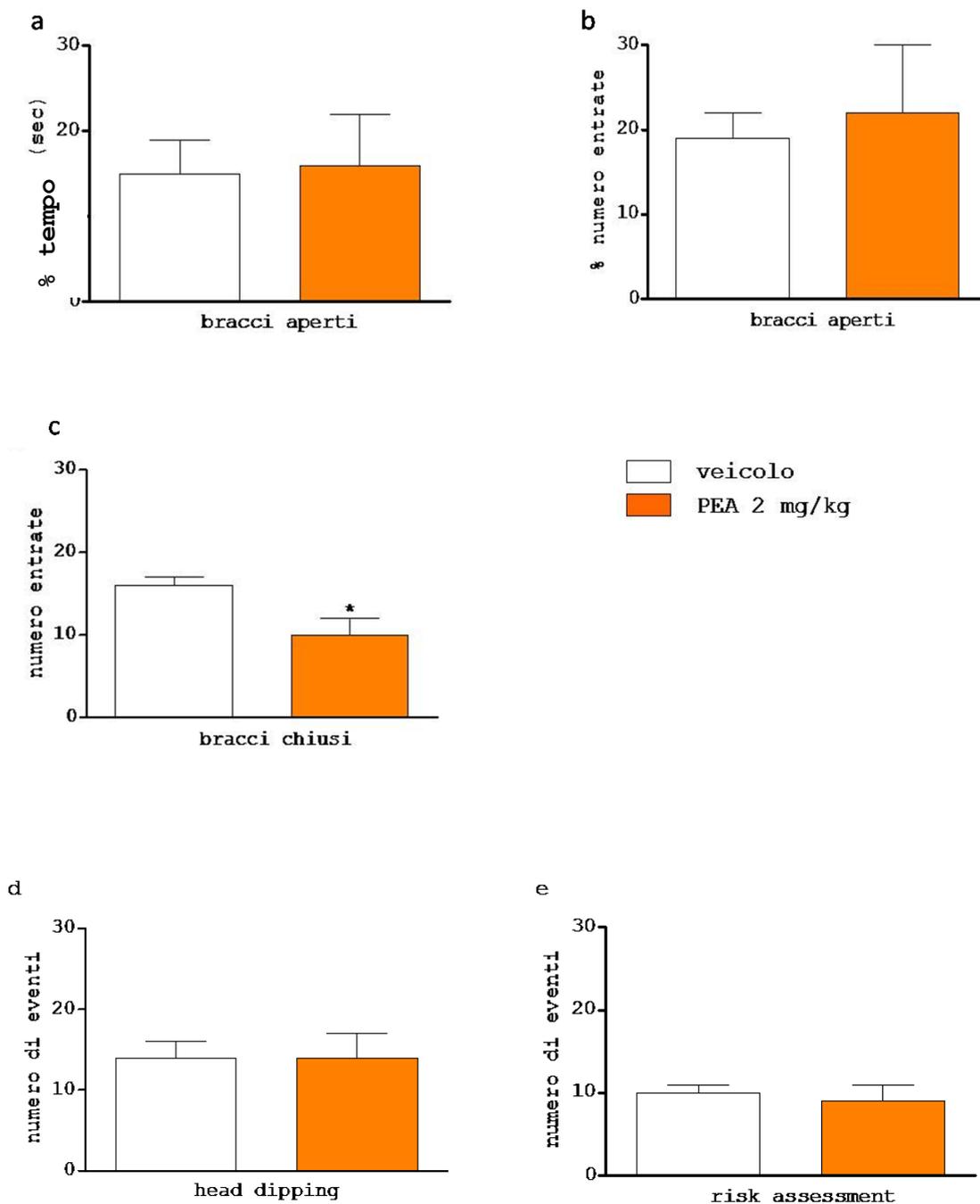
### 1.3 Ansia

- **1.3.1 Valutazione del trattamento acuto con gli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, nel test comportamentale di ansia “elevated plus maze”**

I grafici (Fig. 7 e Fig. 8) rappresentano gli effetti del trattamento acuto con 5 mg/kg di OEA e 2 mg/kg di PEA, rispettivamente, nel comportamento dell'animale nel test d'ansia “elevated plus maze”. Come è possibile notare dai grafici sotto riportati sia l'OEA che la PEA alle dosi utilizzate non inducono effetti ansiogeni o ansiolitici, infatti non modificano nessuno dei parametri valutati, né dei parametri classici (% numero entrate nei bracci aperti, % di tempo nei bracci e numero di entrate nei bracci chiusi aperti) né dei parametri etologici (head dipping e risk-assessment). L'unico dato significativo (Fig. 8b) riguarda l'effetto della somministrazione della PEA 2 mg/kg sul numero di entrate nei bracci chiusi che risulta essere significativamente inferiore al numero di entrate degli animali di controllo trattati con veicolo ( $P < 0.05$ ). Tale dato preso singolarmente non risulta essere sufficiente per indicare un cambiamento nello stato emotivo degli animali trattati con il farmaco.



**Fig. 7.** Effetto del trattamento acuto con l'agonista PPAR $\alpha$ , OEA, nell' test comportamentale d'ansia elevated plus maze. I grafici riportano gli effetti dell' OEA 5 mg/kg nell'elevated plus maze nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=6 animali per gruppo). **Fig. 7a.** Percentuale (%) di tempo trascorso nei bracci aperti. **Fig. 7b.** % Numero di entrate nei bracci aperti. **Fig. 7c.** Numero di entrate nei bracci chiusi. **Fig. 7d.** Numero di head-dipping. **Fig. 7e.** Numero di risk-assessment



**Fig. 8.** Effetto del trattamento acuto con l' agonista PPAR $\alpha$ , PEA, nel test comportamentale d'ansia elevated plus maze. I grafici rappresentano gli effetti di PEA 2 mg/kg sull' elevated plus maze nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=6 animali per gruppo). **Fig. 8a.** Percentuale (%) tempo trascorso nei bracci aperti. **Fig. 8b.** % numero di entrate nei bracci aperti. **Fig. 8c.** Numero di entrate nei bracci chiusi. **Fig. 8d.** Numero di head-dipping. **Fig. 8e.** Numero di risk-assessment. \* P>0.005 PEA 2 mg/kg vs veicolo; t Student test.

- **1.3.2 Valutazione del trattamento sub-cronico con gli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, nel test di ansia “elevated plus maze”**

La tabella 4 rappresenta i valori ottenuti in seguito a trattamento sub-cronico con OEA (2.5 e 5 mg/kg) e PEA (1 e 2 mg/kg) nel comportamento dell’animale nel test d’ansia “elevated plus maze”. I risultati dimostrano che entrambe le molecole, alle dosi testate in sub-cronico, non inducono effetti ansiogeni o ansiolitici, non modificando né i parametri classici né quelli etologici confermando i dati, precedentemente ottenuti con la somministrazione in acuto di OEA e PEA nel medesimo test sperimentale.

**Tab. 4. Effetto del trattamento sub-cronico con gli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA (2.5 e 5 mg/kg) e PEA (1 e 2 mg/kg), nel test comportamentale d’ansia “elevated plus maze”**

	<b>% tempo bracci aperto</b>	<b>% entrate bracci aperti</b>	<b>n° entrate bracci chiusi</b>	<b>n° head-dipping</b>	<b>n° risk-assessment</b>
veicolo	5,8 ± 2,7	9,2 ± 4,3	15,7 ± 0,8	8,9 ± 1,16	3,3 ± 0,87
OEA 2.5 mg/kg	7,1 ± 2,7	17,1 ± 3,5	9,4 ± 0,7	11,2 ± 1,71	1,4 ± 0,40
OEA 5 mg/kg	10,4 ± 2,1	19,9 ± 3,8	9,2 ± 1,8	8 ± 1,32	3,3 ± 0,88
PEA 1 mg/kg	5,9 ± 1,8	12,6 ± 4,0	13,2 ± 2,1	7,5 ± 1,26	3,5 ± 0,92
PEA 2 mg/kg	3,8 ± 1,7	8,4 ± 3,2	10,7 ± 1,7	6 ± 1,46	3,5 ± 1,02

*I valori sono espressi come MEDIA±SEM (n=6 animali per gruppo)*

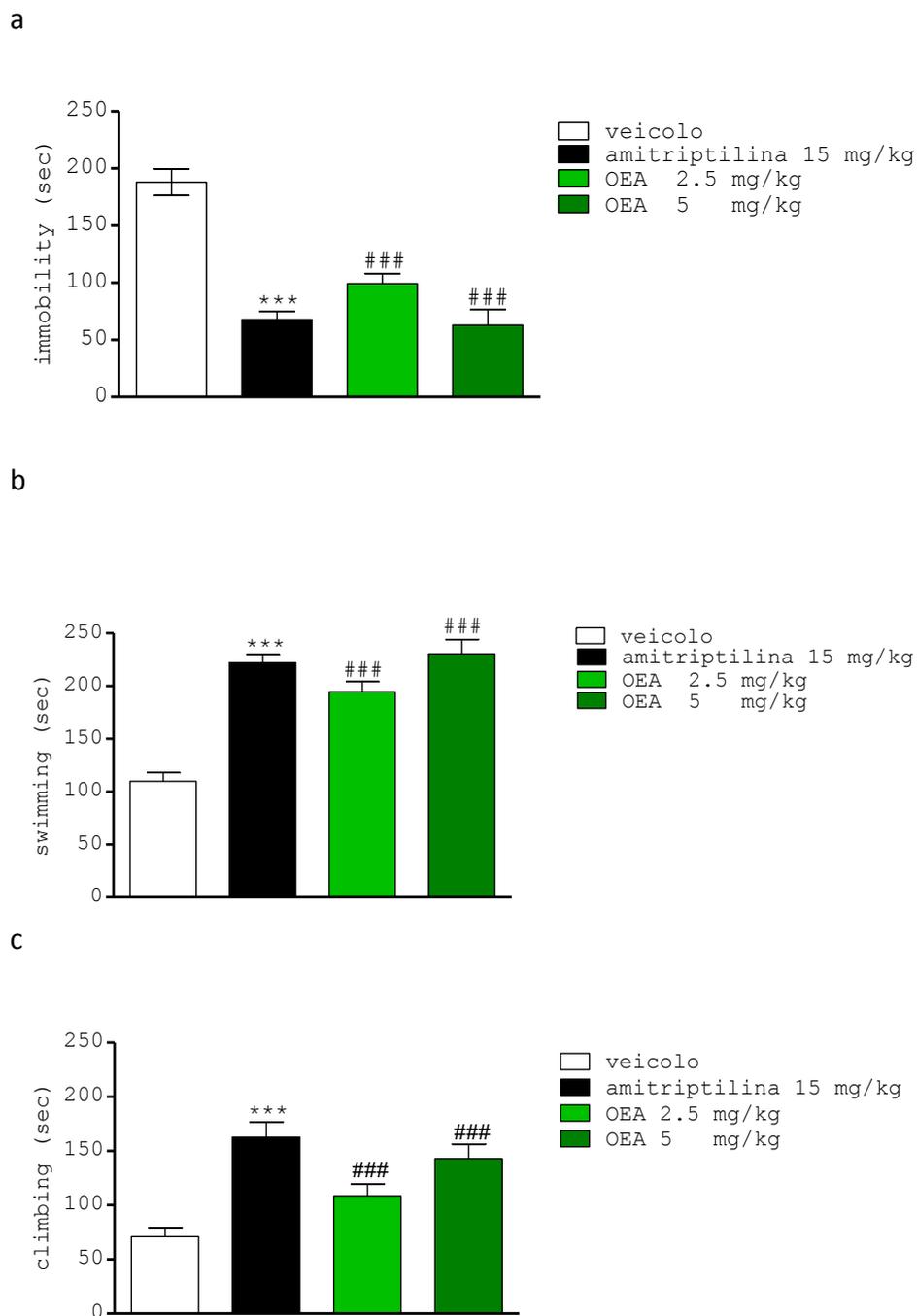
## 1.4 DEPRESSIONE

### - **1.4.1 Effetto del trattamento sub-cronico degli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, nel test comportamentale di depressione del “nuoto forzato”**

Il farmaco triciclico amitriptilina (15 mg/kg) (colonna nera), utilizzato in questo test come standard di riferimento, somministrato in regime sub-cronico ha determinato, rispetto all'animale trattato con veicolo (colonna bianca), un classico effetto antidepressivo, con una diminuzione del tempo totale di mobilità dell'animale, immobility (tempo trascorso dall'animale nel fluttuare nell'acqua esercitando un numero limitato di movimenti con le zampe anteriori, al fine di mantenere il capo fuori dalla superficie dell'acqua) nei 5 minuti di test (Fig.9a) (-64% vs veicolo;  $t=8.872$ ,  $df=10$ ;  $P<0.0001$ ) ed un incremento, in modo inversamente proporzionale, del tempo di swimming (il tempo trascorso dall'animale nel compiere movimenti con le quattro zampe in modo da rimanere a galla) (Fig. 9b) (+102% vs veicolo;  $t=9,914$ ,  $df=10$ ;  $P<0.0001$ ) ed di climbing (il tempo trascorso dall'animale nel compiere movimenti verticali lungo le pareti del cilindro per cercare una via di fuga) (Fig. 9c) (+129% vs veicolo;  $t=5.688$   $df=10$ ;  $P=0,0002$ ).

Nella stessa figura sono riportati i dati riguardanti la somministrazione di due diverse dosi di OEA (2.5 mg/kg e 5 mg/kg) (colonne verdi) a due gruppi di animali differenti nella stessa sessione sperimentale. Analizzando gli stessi parametri comportamentali valutati per il farmaco di riferimento è possibile notare che le due dosi di OEA utilizzate

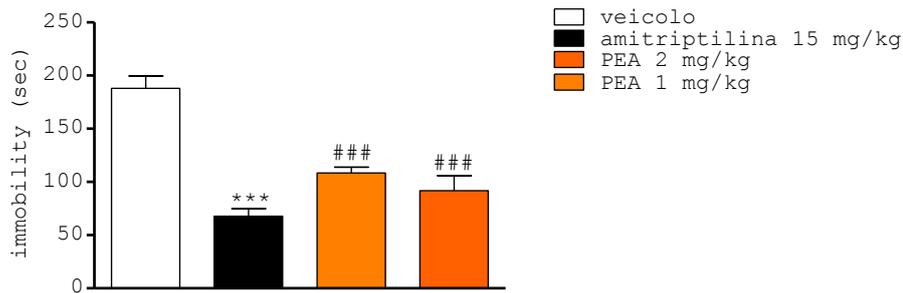
inducono una diminuzione dell'immobility (-48% e -67%, rispettivamente vs veicolo) ed un aumento dello swimming (+77% e +110% rispettivamente, vs veicolo) e del climbing (+55% e +101% rispettivamente, vs veicolo) paragonabili a quelli dell'amitriptilina. L'analisi dei dati mediante l'ANOVA ad una via, indica un effetto statisticamente significativo del Trattamento sull'immobility ( $F_{3,20}=29,74$ ;  $P<0.0001$ ), sullo swimming ( $F_{3,20}= 30,32$ ;  $P<0.0001$ ) e sul climbing ( $F_{3,20}= 11,67$ ;  $P=0.0001$ ). In particolare il post hoc test di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo su immobility: \*\*\*  $P<0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ###  $P<0.001$  OEA 2.5 e 5 mg/kg vs veicolo - swimming: \*\*\*  $P<0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ###  $P<0.001$  OEA 2.5 e 5 mg/kg vs veicolo - e climbing: \*\*\*  $P<0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ###  $P<0.001$  OEA 5 mg/kg vs veicolo; #  $P<0.05$  OEA 2.5 mg/kg vs veicolo.



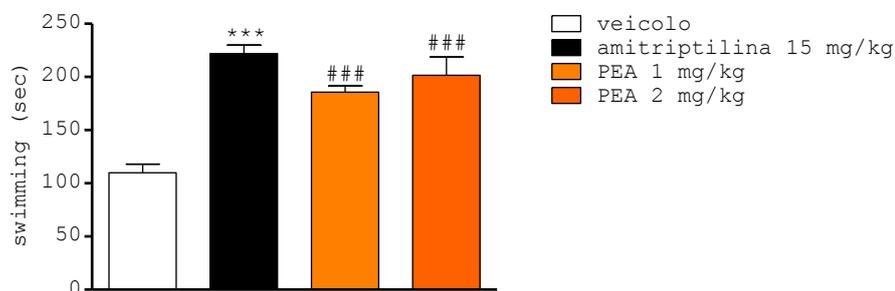
**Fig. 9. Effetti del trattamento sub-cronico con l' agonista PPAR $\alpha$ , OEA, nel test di depressione del nuoto forzato.** I grafici mostrano gli effetti dell'amitriptilina (15 mg/kg), dell'agonista PPAR $\alpha$ , OEA (2.5 e 5 mg/kg) e del veicolo nel test del nuoto forzato, nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=6 animali per gruppo). In particolare la figura mostra **(a)** immobility: \*\*\* P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ### P<0.001 OEA 2.5 e 5 mg/kg vs veicolo – **(b)** swimming: \*\*\* P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ### P<0.001 OEA 2.5 e 5 mg/kg vs veicolo – e **(c)** climbing: \*\*\* P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ### P<0.001 OEA 2.5 e 5 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Newman Keuls.

La figura (Fig. 10) mostra gli effetti della somministrazione di due dosi di PEA (1 e 2 mg/kg) (colonne arancioni), rispetto al gruppo di controllo trattato con veicolo (colonna bianca), nella medesima sessione del test del nuoto forzato. I risultati mostrano che entrambe le dosi di PEA (1 e 2 mg/kg) inducono un decremento dell'immobility (Fig. 10a) (-43% e -52%, rispettivamente vs veicolo) e, in modo inversamente proporzionale, un incremento di swimming (Fig. 10b) (+69% e +83%, rispettivamente vs veicolo) e climbing (Fig. 10c) (+2% e +71%, rispettivamente vs veicolo). L'ANOVA a una via, ha rivelato un effetto statisticamente significativo del Trattamento all'interno dei gruppi sperimentali sull'immobility ( $F_{3,23}= 26,19$ ;  $P<0.0001$ ), sullo swimming ( $F_{3,23}= 26,19$ ;  $P<0.0001$ ) e sul climbing ( $F_{3,23}= 12,74$ ;  $P<0.0001$ ). In particolare il post hoc test di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo su immobility: \*\*\*  $P<0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ###  $P<0.001$  PEA 1 and 2 mg/kg vs veicolo- swimming: \*\*\*  $P<0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ###  $P<0.001$  PEA 1 and 2 mg/kg vs veicolo – e climbing: \*\*\*  $P<0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; #  $P<0.05$  PEA 2 mg/kg vs veicolo. L'amitriptilina, come nella sessione del test in cui sono stati studiati gli effetti di OEA, ha indotto i medesimi effetti antidepressivi (colonna nera) rispetto al gruppo di controllo trattato con solo veicolo (colonna bianca).

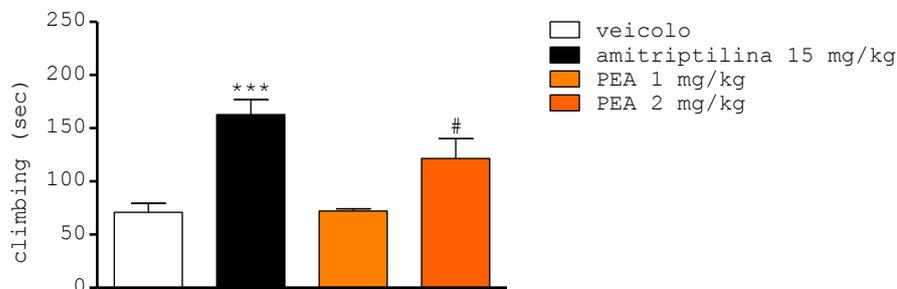
a



b



c



**Fig. 10. Effetti del trattamento sub-cronico con l' agonista PPAR $\alpha$ , PEA, nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.** I grafici mostrano gli effetti dell'amitriptilina (15 mg/kg), dell'agonista PPAR $\alpha$ , PEA (1 e 2 mg/kg) e del veicolo nel test del nuoto forzato, nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=6 animali per gruppo). In particolare la figura mostra **(a)** immobility: \*\*\* P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ### P<0.001 PEA 1 e 2 mg/kg vs veicolo - **(b)** swimming: \*\*\* P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ### P<0.001 PEA 1 e 2 mg/kg vs veicolo - e **(c)** climbing:\*\*\* P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; # P<0.05 PEA2 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Newman Keuls.

- **1.4.2 Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR $\alpha$ , MK886 e dell'antagonista dei recettori cannabinoidi CB, SR141617A, sull'attività antidepressiva degli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, nel test comportamentale del "nuoto forzato"**

La somministrazione i.p dell'antagonista PPAR $\alpha$ , MK886 (1 mg/kg), non determina modificazioni comportamentali negli animali sottoposti al test di depressione, infatti tutti gli animali presentano tempi di immobility, swimming e climbing del tutto simili a quelli del gruppo di ratti trattati con il veicolo.

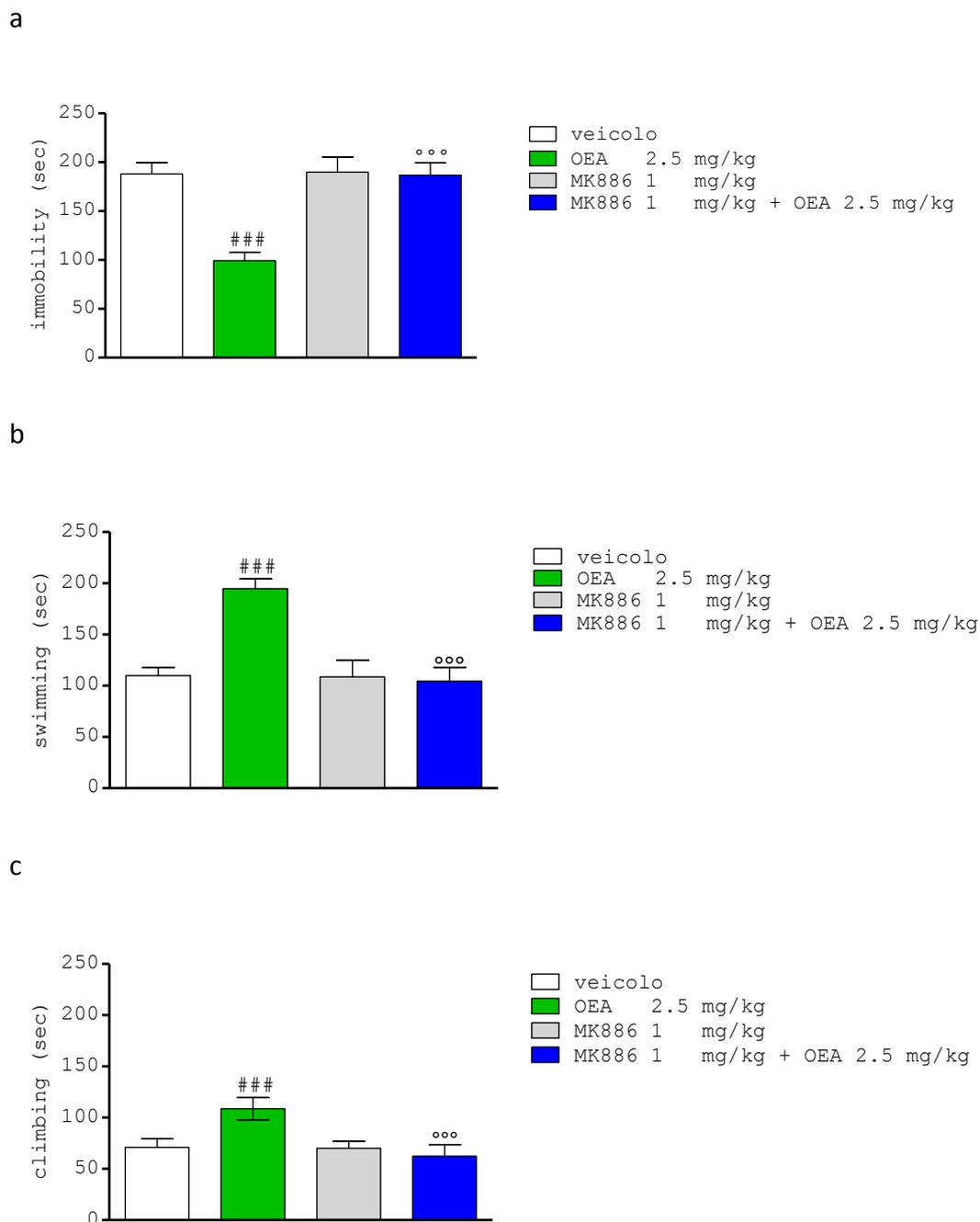
Come è possibile osservare nel grafico (Fig. 11) il trattamento con 2.5 mg/kg dell'agonista PPAR $\alpha$  (colonna verde) ha determinato un marcato effetto antidepressivo confermando i dati precedentemente riportati. Infatti gli animali mostrano una significativa riduzione del tempo di immobility ed un contemporaneo aumento dello swimming e del climbing.

Il pretrattamento con l'antagonista PPAR $\alpha$ , MK886 (1 mg/kg), 50 minuti prima dell'OEA reverte completamente l'effetto antidepressivo indotto da quest'ultima, infatti il gruppo di animali trattati con la combinazione dei due farmaci, agonista ed antagonista, presentano un comportamento con valori di immobility, swimming e climbing del tutto simili a quello degli animali che hanno ricevuto in trattamento il solo veicolo.

L'ANOVA a una via mostra un effetto significativo del Trattamento all'interno dei gruppi sperimentali su immobility (Fig. 11a) ( $F_{3, 20} = 13,05$ ;  $P < 0.0001$ ), swimming (Fig. 11b) ( $F_{3, 20} = 12,62$ ;  $P < 0.0001$ ) e climbing (Fig. 11c) ( $F_{3, 20} = 20,92$ ;  $P < 0.0001$ ). In

particolare il post hoc test di Newman Keuls riporta un effetto statisticamente significativo sull'immobility: ### $P < 0.001$  OEA 2.5 mg/kg vs veicolo ed MK886 1 mg/kg  
°°°  $P < 0.001$  MK886 1 mg/kg + OEA 2.5 mg/kg vs OEA 2.5 mg/kg; – swimming: °°°  
 $P < 0.001$  MK886 1 mg/kg + OEA 2.5 mg/kg vs OEA 2.5 mg/kg; ###  $P < 0.001$  OEA 2.5  
mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg- e climbing: °°°  $P < 0.001$  MK886 1 mg/kg + OEA 2.5  
mg/kg vs OEA 2.5 mg/kg; ###  $P < 0.001$  OEA 2.5 mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg.

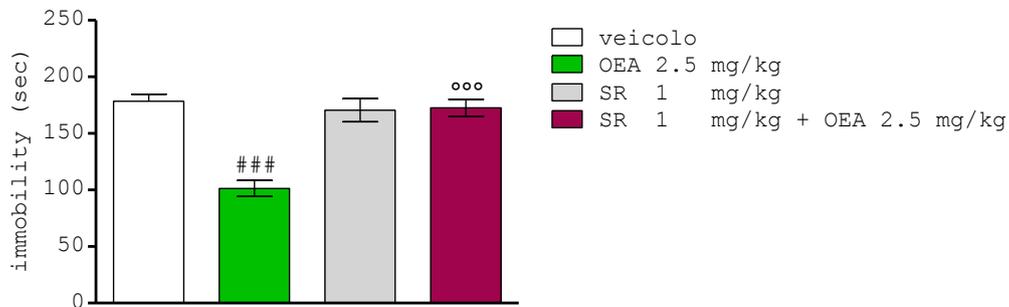
E' stato valutato anche l'effetto del trattamento con l'antagonista/agonista inverso  
CB1, SR141617A, o rimonabant (1 mg/kg), da solo e in combinazione con l' OEA 2.5  
mg/kg (Fig. 12). Anche il rimonabant, come lo MK886, non induce effetti di *per se* nel  
test del nuoto forzato mentre antagonizza completamente gli effetti antidepressivi  
dell'agonista PPAR $\alpha$ , OEA 2.5 mg/kg. Dall'analisi dell'ANOVA a una via si evince un  
effetto significativo del Trattamento all'interno dei gruppi sperimentali su immobility  
(Fig. 12a) ( $F_{3,28} = 21,00$ ;  $P < 0.0001$ ) e swimming (Fig. 12b) ( $F_{3,28} = 19,30$ ;  $P < 0.0001$ ), ma  
non sul climbing (Fig. 12c) ( $F_{3,28} = 0,5931$ ;  $P = 0,6247$ , NS). In particolare il post hoc test  
di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo sull'immobility:  
### $P < 0.001$  OEA 2.5 mg/kg vs veicolo e SR 1 mg/kg; °°°  $P < 0.001$  SR 1 mg/kg + OEA 2.5  
mg/kg vs OEA 2.5 mg/kg – e sullo swimming: °°°  $P < 0.001$  SR 1 mg/kg + OEA 2.5 mg/kg  
vs OEA 2.5 mg/kg; ###  $P < 0.001$  OEA 2.5 mg/kg vs veicolo e SR 1 mg/kg.



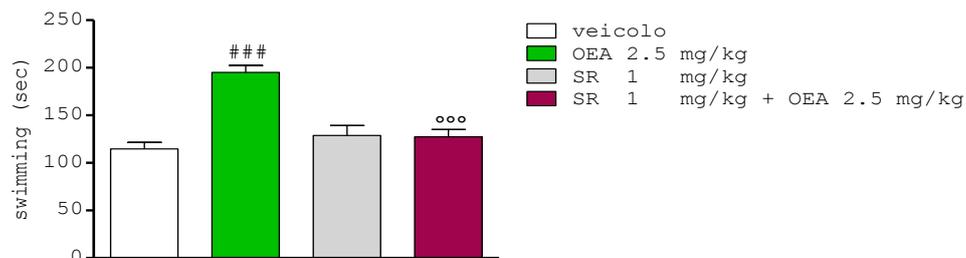
**Fig. 11. Effetto dell'antagonista specifico PPAR $\alpha$ , MK886, sull'effetto di OEA 2.5 mg/kg nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.** I grafici mostrano gli effetti di OEA, dell'antagonista PPAR $\alpha$ , MK886 (1 mg/kg) e della sua combinazione con OEA rispetto al gruppo trattato con veicolo nel test. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=6 animali per gruppo). In particolare la figura mostra **(a)** immobility: ### P<0.001 OEA 2.5 mg/kg vs veicolo ed MK886 1 mg/kg; ooo P<0.001 MK886 1 mg/kg + OEA 2.5 mg/kg vs OEA 2.5 mg/kg – **(b)** swimming:### P<0.001 OEA 2.5 mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg; ooo P<0.001 MK886 1 mg/kg + OEA 2.5 mg/kg vs OEA 2.5 mg/kg; – e **(c)** climbing: ### P<0.001 OEA 2.5 mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg; ooo

$P < 0.001$  MK886 1 mg/kg + OEA 2.5 mg/kg vs OEA 2.5 mg/kg; post hoc test di Newman Keuls.

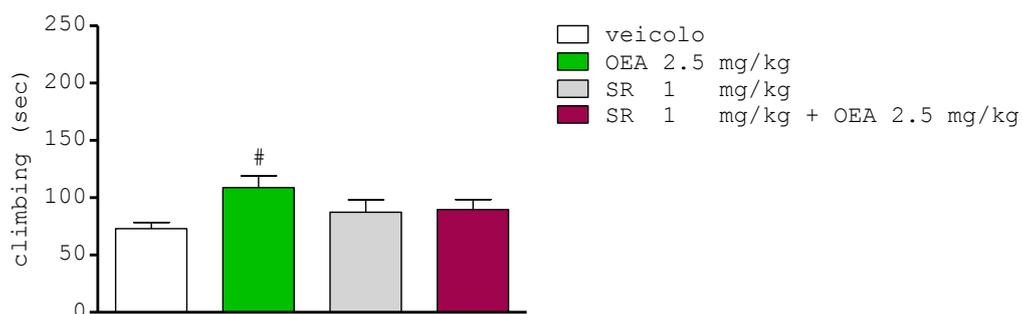
a



b



c



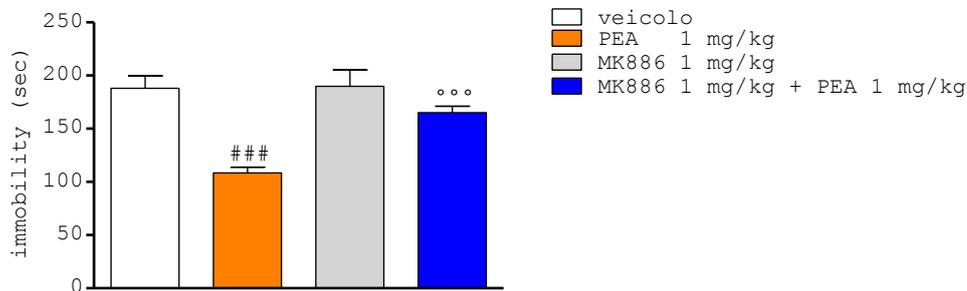
**Fig. 12. Effetto dell'antagonista cannabinoide CB1, SR141617A, sull'effetto di OEA 2.5 mg/kg nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.** I grafici mostrano gli effetti di OEA, di SR 1 mg/kg, sia solo che in combinazione con OEA rispetto al veicolo nel test. I valori sono espressi come MEDIA±SEM (n=8 animali per gruppo). In particolare la figura mostra l'effetto di OEA e la sua combinazione con SR su immobility

**(a):** ###  $P < 0.001$  OEA 2.5 mg/kg vs veicolo e SR 1 mg/kg; °°°  $P < 0.001$  SR 1 mg/kg + OEA 2.5 mg/kg vs OEA 2.5 mg/kg; – e swimming **(Fig. 12b):** ###  $P < 0.001$  OEA 2.5 mg/kg vs veicolo e SR 1 mg/kg; °°°  $P < 0.001$  SR 1 mg/kg + OEA 2.5 mg/kg vs OEA 2.5 mg/kg; post hoc test di Newman Keuls.

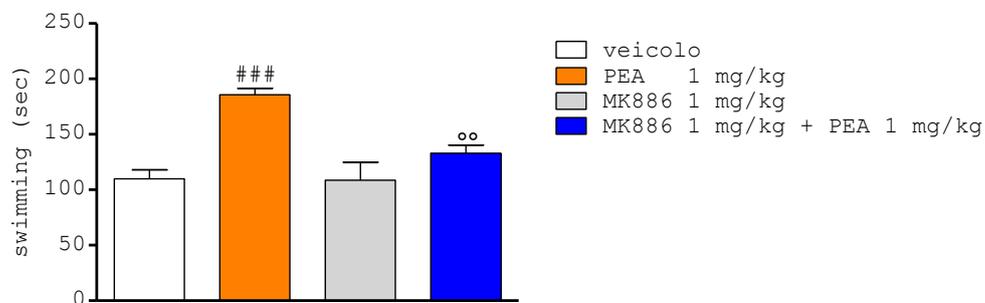
I grafici in Fig. 13 mostrano i risultati dell'esperimento in cui si è valutato l'effetto della somministrazione del antagonista PPAR $\alpha$ , MK866, in combinazione all'altro agonista PPAR $\alpha$  oggetto dello studio, la PEA (1 mg/kg i.p), somministrata come precedentemente riportato in regime sub-cronico. Lo MK866, come nell'esperimento in combinazione con l'OEA, antagonizza totalmente l'effetto antidepressivo della PEA (1 mg/kg, i.p). Infatti il gruppo di animali trattati con la combinazione dei due farmaci presentano tempi di immobility, swimming e climbing paragonabili a quello degli animali trattati con il solo veicolo. Il gruppo di animali trattati con il solo antagonista non presenta modificazioni comportamentali significative in nessuno dei parametri analizzato, i tempi infatti sono tutti uguali a quelli degli animali di controllo (veicoli). L'ANOVA a una via, ha rivelato un effetto significativo del Trattamento all'interno dei gruppi sperimentali su immobility (Fig. 13a) ( $F_{3,20} = 13,05$ ;  $P < 0.0001$ ) e swimming (Fig. 13b) ( $F_{3,20} = 12,50$ ;  $P < 0.0001$ ) ma non sul climbing (Fig. 13c) ( $F_{3,20} = 0,3599$ ;  $P = 0,7826$ , NS). In particolare il post hoc test di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo su immobility: °°°  $P < 0.001$  MK886 1 mg/kg + PEA 1 mg/kg vs. PEA 1 mg/kg; ###  $P < 0.001$  PEA 1 mg/kg vs. veicolo e MK886 1 mg/kg – e swimming: ###  $P < 0.001$  PEA 1 mg/kg vs. veicolo e MK886 1 mg/kg; °°°  $P < 0.001$  MK886 1 mg/kg + PEA 1 mg/kg vs. PEA 1 mg/kg.

Con la medesima procedura, è stato testato anche l'effetto dell'antagonista/agonista inverso CB1, rimonabant 1 mg/kg, da solo e in combinazione con PEA 1 mg/kg nel test del nuoto forzato (Fig. 14). Anche il rimonabant 1 mg/kg, come MK886, di *per se* non induce effetti nel test del nuoto forzato, mentre in combinazione con la PEA 1 mg/kg è in grado di revertirne completamente gli effetti antidepressivi riportando i valori di immobility, swimming e climbing ai valori dei veicoli. L'ANOVA a una via, ha rivelato un effetto significativo del Trattamento all'interno dei gruppi sperimentali su immobility (Fig. 14a) ( $F_{3,28}=10,16$ ;  $P<0.0001$ ) swimming (Fig. 14b) ( $F_{3,28} = 9,827$ ;  $P<0.0001$ ) ma non sul climbing (Fig. 14c) ( $F_{3,28} = 2,802$ ;  $P = 0,0581$ , NS). In particolare il post hoc test di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo su immobility: ###  $P<0.001$  PEA 1 mg/kg vs veicolo e SR 1 mg/kg °°  $P<0.01$  SR 1 mg/kg + PEA 1 mg/kg vs PEA 1 mg/kg;- e swimming: ###  $P<0.001$  PEA 1 mg/kg vs veicolo; ##  $P<0.01$  PEA 1mg/kg vs SR 1 mg/kg°°°  $P<0.001$  SR 1mg/kg + PEA 1 mg/kg vs PEA 1 mg/kg.

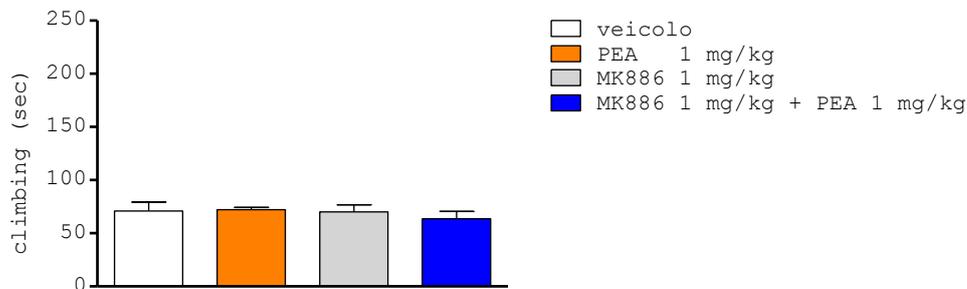
a



b



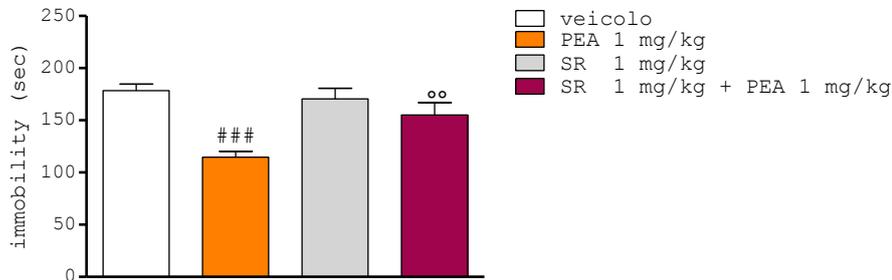
c



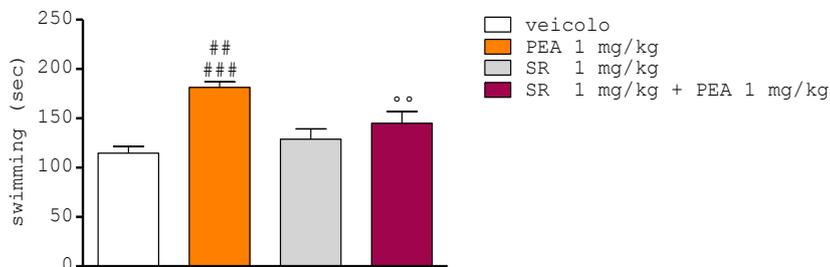
**Fig. 13. Effetto dell'antagonista specifico PPAR $\alpha$ , MK886, sull'effetto di PEA 1 mg/kg nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.** I grafici mostrano gli effetti di PEA, di MK886 1 mg/kg, sia solo che in combinazione con PEA rispetto al gruppo di controllo (veicolo), nel test del nuoto forzato nel ratto. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=6 animali per gruppo). In particolare la figura mostra l'effetto di PEA e la sua combinazione con MK886 sull'immobilità (a): ### P<0.001 PEA 1 mg/kg vs veicolo ed MK886 1 mg/kg °°° P<0.001 MK886 1 mg/kg + PEA 1 mg/kg vs PEA 1

mg/kg;– e swimming **(b)**: ###  $P < 0.001$  PEA 1 mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg; °°  $P < 0.01$  MK886 1 mg/kg + PEA 1 mg/kg vs PEA 1 mg/kg; post hoc test di Newman Keuls.

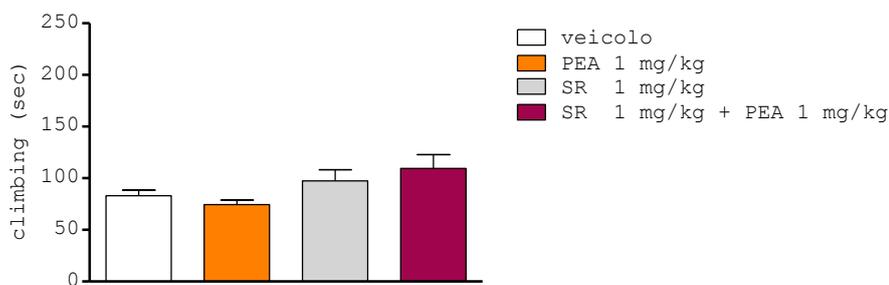
a



b



c



**Fig. 14. Effetto dell'antagonista cannabinoide CB1, SR141617A, sull'effetto di PEA 1 mg/kg nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.** I grafici mostrano gli effetti di PEA e di SR 1 mg/kg, sia solo che in combinazione con PEA rispetto veicolo nel test. I valori sono espressi come MEDIA±SEM (n=8 animali per gruppo). In particolare la figura mostra (dall'alto) l'effetto di PEA e la sua combinazione con SR su immobilità **(a)**: ###  $P < 0.001$  PEA 1 mg/kg vs veicolo e SR 1 mg/kg; °°  $P < 0.001$  SR 1 mg/kg + PEA 1 mg/kg vs PEA 1 mg/kg;– e swimming **(b)**: ###  $P < 0.001$  PEA 1 mg/kg vs

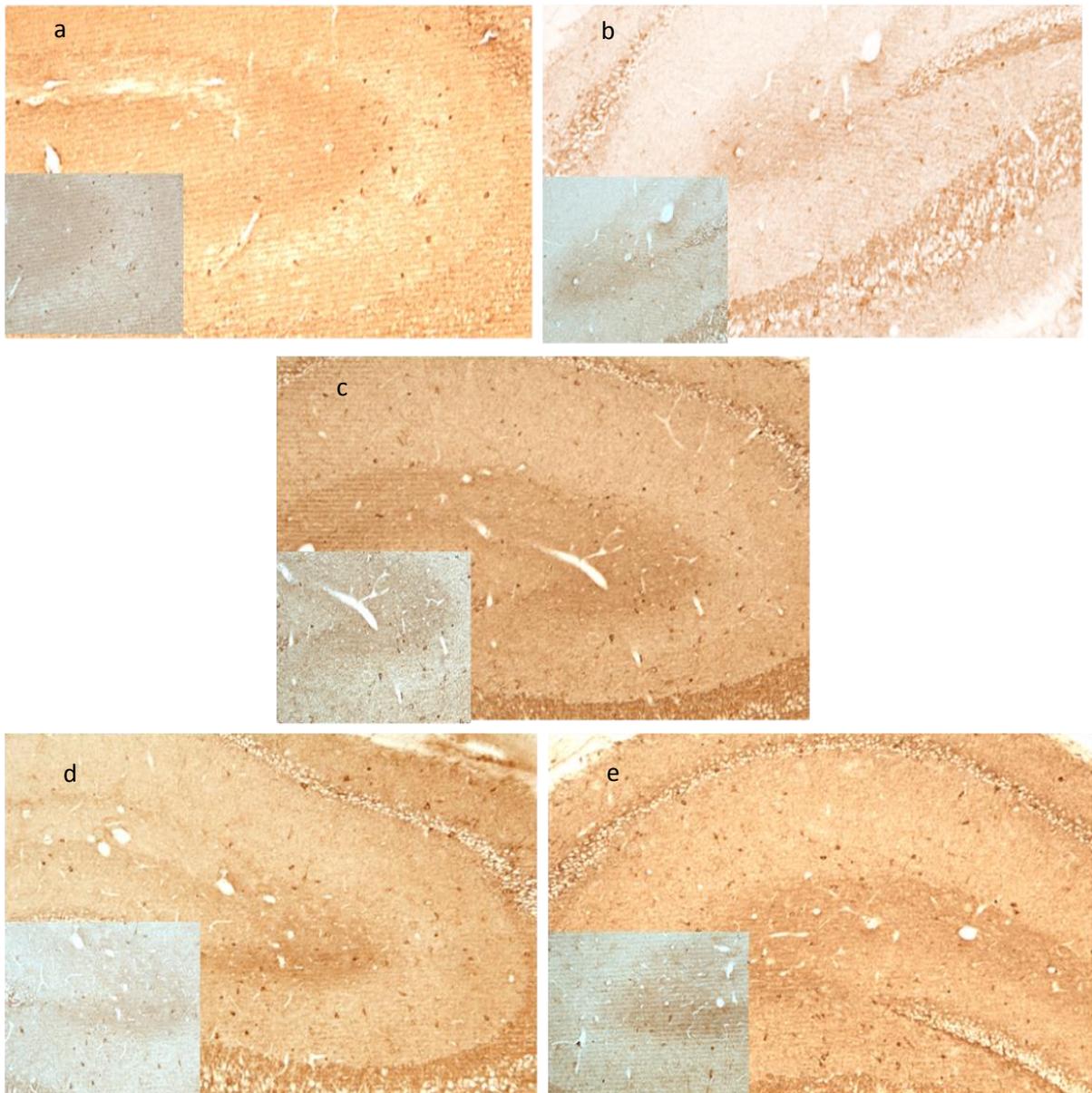
veicolo; ##  $P < 0.01$  PEA 1 mg/kg vs SR 1 mg/kg; °°  $P < 0.01$  SR 1 mg/kg + PEA 1 mg/kg vs PEA 1 mg/kg; post hoc test di Newman Keuls.

### **1.5 Valutazione dei livelli di GAD67 e MAP2 in ippocampo dopo trattamento con gli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, in animali sottoposti al test comportamentale di depressione del “nuoto forzato”**

#### **- 1.5.1 Effetto del trattamento di OEA e PEA sui livelli di GAD67 in ippocampo**

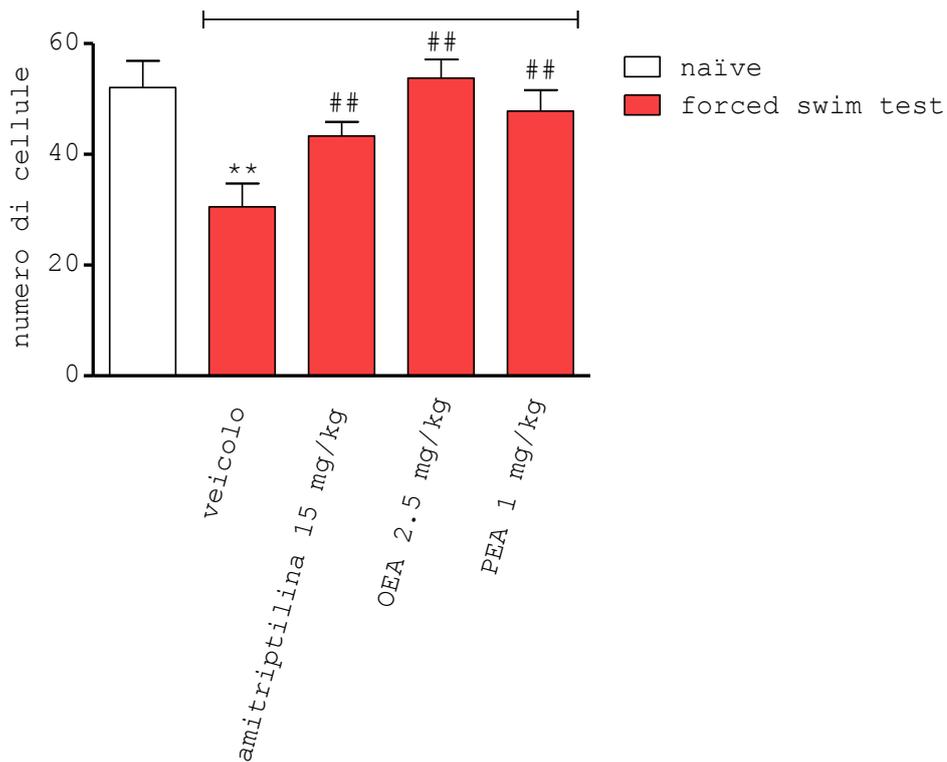
Le immagini (Fig. 15) rappresentano la localizzazione immunoistochimica in ippocampo della proteina decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD), in particolare dell'isoforma 67-kDa (GAD67), marcatore dei neuroni GABAergici (Kaufman *et al.* 1991). La Fig. 16 mostra la quantificazione statistica dei livelli di GAD67 nei diversi gruppi sperimentali: naïve, controllo, OEA 2.5 mg/kg e PEA 1 mg/kg. L'ANOVA ad una via ha rivelato un effetto statisticamente significativo del Trattamento tra i gruppi ( $F_{4, 18} = 6,516; P = 0,002$ ). Il gruppo naïve è composto da animali che non hanno svolto il test del nuoto forzato e rappresenta i livelli basali di GAD67 nelle sottoregioni ippocampali CA1 e CA3 in cui è presente un'ampia marcatura di GAD67 (Fig. 15a). Nel gruppo di animali che hanno condotto il test comportamentale e trattati con veicolo il livello di GAD67 in CA1 e CA3 è risultato in forte decremento (-58%) rispetto al gruppo naïve (Fig. 15b). I dati di questa tesi mostrano che il trattamento con amitriptilina 15 mg/kg, nei ratti sottoposti al test del nuoto forzato, è stato in grado di incrementare i livelli di GAD67 in CA1 e CA3 (Fig. 15c). Nei gruppi di animali sottoposti al test e trattati con OEA 2.5 mg/kg e

PEA 1 mg/kg, i livelli di GAD67 hanno subito un notevole incremento rispetto al gruppo naïve (+19% e 10%, rispettivamente) (Fig. 15d e Fig. 15e).



**Fig. 15.** Effetto del trattamento degli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, sui livelli di GAD67 in ippocampo in animali sottoposti al test comportamentale di depressione del nuoto forzato. Le immagini mostrano l'analisi immunoistochimica di GAD67 in ippocampo nel ratto. **Fig. 15a:** livelli basali di GAD67 nel gruppo naïve. **Fig. 15b:** decremento dei livelli di GAD67 nei ratti trattati con veicolo sottoposti al test. **Fig. 15c:** incremento dei livelli di GAD67 in ratti trattati con amitriptilina 15 mg/kg sottoposti al test. **Fig. 15d:** incremento dei livelli di GAD67 in ratti trattati con OEA 2.5 mg/kg sottoposti al test.

**Fig. 15e:** incremento dei livelli di GAD67 in ratti trattati con PEA 1 mg/kg sottoposti al test.



**Fig. 16. Quantificazione dei livelli di GAD67 in ippocampo in seguito a trattamento con gli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA.** Il grafico rappresenta il numero di cellule marcate con GAD67 nei diversi gruppi sperimentali. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=5 animali per gruppo). \*\* P<0.01 test + veicolo vs naïve; ## P<0.01 test + amitriptilina 15 mg/kg, test + OEA 2.5 mg/kg e test + PEA 1 mg/kg vs test + veicolo; post hoc test di Newman Keuls.

- **1.5.2 Effetto del trattamento di OEA e PEA sui livelli di MAP2 in ippocampo**

Nella Fig. 17a sono riportate le immagini relative ai livelli di MAP2 nella sottoregione CA1 dell'ippocampo degli animali naïve che rappresentano i livelli basali di tale proteina in quella regione cerebrale.

Come è osservabile ad occhio nudo (Fig. 17b) la lunghezza dei filamenti di MAP2 negli animali trattati con veicoli e sottoposti al test di depressione risulta notevolmente ridotta se comparata a quella degli animali naïve che non sono stati sottoposti a nessun test comportamentale (Fig.17a). Il trattamento con amitriptilina 15 mg/kg (Fig. 17c), e con i due agonisti PPAR $\alpha$  OEA (2.5 mg/kg, Fig. 17d) e PEA (1 mg/kg, Fig. 17e) induce un ripristino della lunghezza dei filamenti di MAP2 a livelli paragonabili a quelli degli animali naïve.



**Fig. 17. Effetto del trattamento degli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, sui livelli di MAP2 in ippocampo.** Le immagini mostrano l'analisi immunohistochimica di MAP2 in ippocampo nel ratto. **Fig. 17a:** livelli basali di MAP2 nel gruppo naïve. **Fig. 17b:** decremento dei livelli di MAP2 in ratti trattati con veicolo sottoposti al test. **Fig. 17c:** incremento dei livelli di MAP2 in ratti trattati con amitriptilina 15 mg/kg sottoposti al test. **Fig. 17d:** incremento dei livelli di MAP2 in ratti trattati con OEA 2.5 mg/kg sottoposti al test. **Fig. 17e:** incremento dei livelli di MAP2 in ratti trattati con PEA 1 mg/kg sottoposti al test.

## **1.6 Implicazione dei recettori nicotinici $\alpha 7$ nAChR nei meccanismi antidepressivi mediati dai recettori PPAR $\alpha$**

### **1.6.1 Test dell'attività motoria**

- **1.6.1.1 Valutazione del trattamento acuto con l'agonista  $\alpha 7$  nAChR, PNU282987, nel test dell'attività motoria**

La dose di PNU di 3 mg/kg utilizzata negli esperimenti successivi è stata selezionata dalla letteratura (Andreasen *et al.* 2009; Melis *et al.* 2013 in press). Per escludere effetti di ipomotilità o ipermotilità gli animali trattati con l' agonista  $\alpha 7$  nAChR la dose prescelta è stata valutata nel test di attività motoria come precedentemente fatto per tutti gli altri farmaci oggetto dello studio. Nella Tabella 4 è riportata l'osservazione comportamentale degli animali dopo trattamento con PNU durante 60 minuti di osservazione. L' agonista  $\alpha 7$  nAChR non induce alcun effetto sull'attività motoria degli

animali, infatti nessuno dei parametri valutati varia durante tutto il tempo di osservazione.

**Tab. 4. Effetto del trattamento acuto con l'agonista  $\alpha 7$  nAChR, PNU282987, nel test dell'attività motoria**

	distanza percorsa	attività verticale	attività al centro	attività ai margini
veicolo	5026 $\pm$ 775	770 $\pm$ 198	397 $\pm$ 131	3202 $\pm$ 131
PNU 3 mg/kg	5670 $\pm$ 1305	602 $\pm$ 30	412 $\pm$ 220	3162 $\pm$ 210

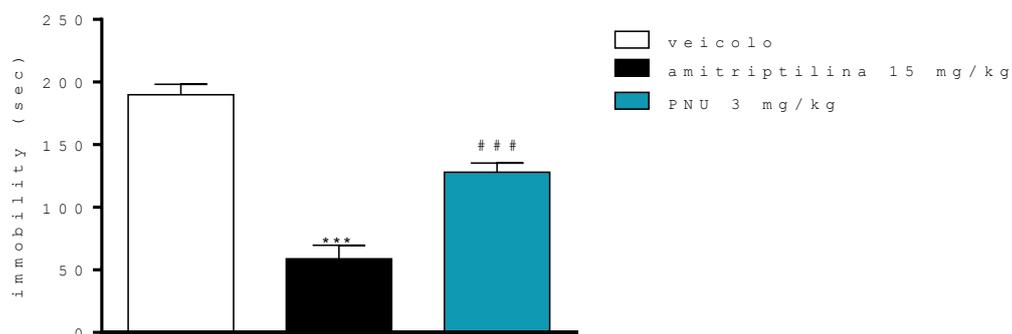
*I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (N=4 animali per gruppo)*

**1.6.2 Effetto del trattamento sub-cronico dell'agonista  $\alpha 7$  nAChR, PNU282987, nel test comportamentale di depressione del "nuoto forzato"**

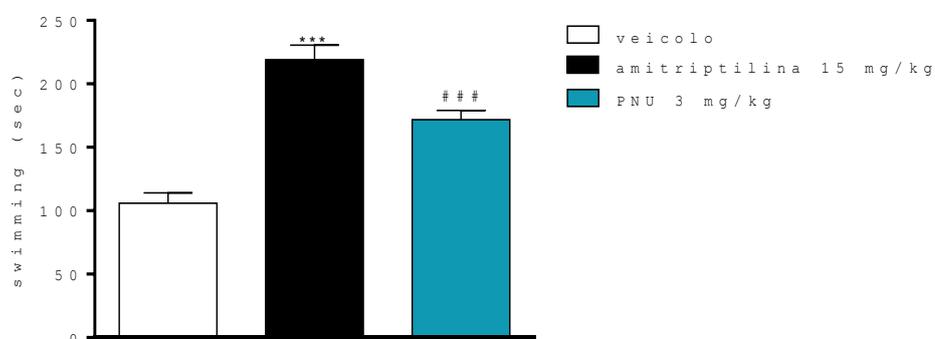
Nella Fig. 18 sono raffigurati i tempi di immobility, swimming e climbing degli animali nel test del nuoto forzato dopo 3 somministrazioni (24h, 4h, 10 minuti prima del test) di PNU (3 mg/kg) in comparazione all'amitriptilina ed al veicolo. Dal grafico è possibile osservare che la dose scelta di PNU induce un effetto antidepressivo come è deducibile dal diminuito tempo di immobility (Fig. 18a) (-32% vs veicolo), aumentato tempo di swimming (Fig. 18b) (+62% vs veicolo) e di climbing (Fig. 18c) (+61% vs veicolo) rispetto

agli animali trattati con il veicolo. L'amitriptilina è stata ripetuta anche in questo esperimento come farmaco di controllo e i risultati ottenuti sono in linea con i precedenti. L'ANOVA a una via, ha rivelato un effetto statisticamente significativo del Trattamento all'interno dei gruppi sperimentali su immobility ( $F_{2, 21} = 54,31$ ;  $P < 0.0001$ ), swimming ( $F_{2,21} = 52,87$ ;  $P < 0.0001$ ) e climbing ( $F_{2,21} = 22,21$ ;  $P < 0.0001$ ). In particolare il post hoc test di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo su immobility: \*\*\*  $P < 0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ###  $P < 0.001$  PNU 3 mg/kg vs veicolo- swimming: \*\*\*  $P < 0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ###  $P < 0.001$  PNU 3 mg/kg vs veicolo- e climbing: \*\*\*  $P < 0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; #  $P < 0.05$  PNU 3 mg/kg vs veicolo.

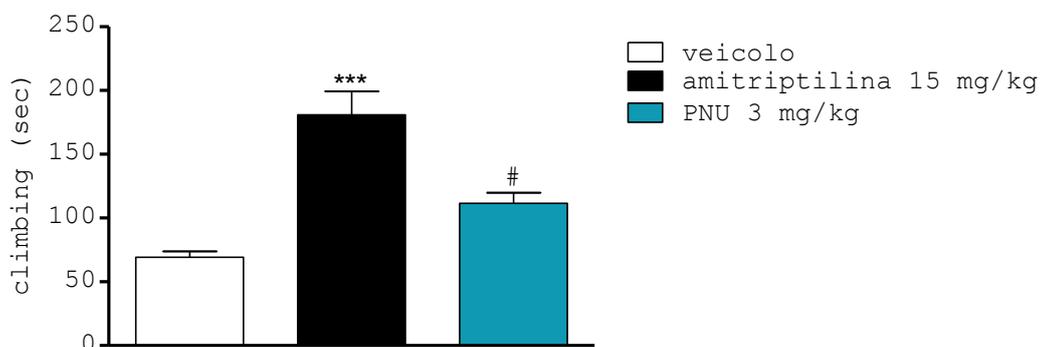
a



b



c



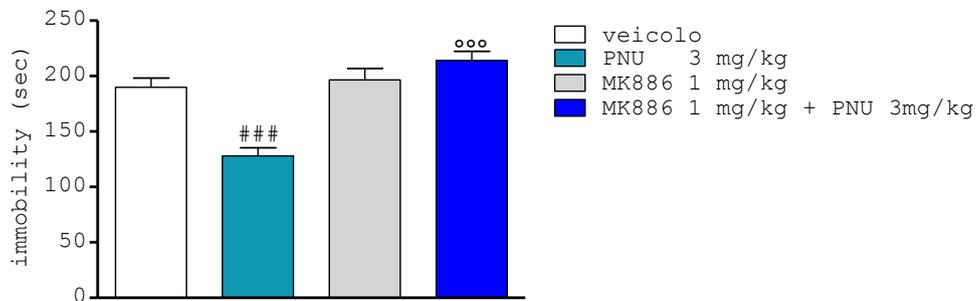
**Fig. 18. Effetti del trattamento sub-cronico con l'agonista,  $\alpha 7$  nAChR, PNU 3 mg/kg, nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato. I grafici mostrano gli effetti dell'agonista  $\alpha 7$  nAChR, PNU, amitriptilina (15 mg/kg) ed il veicolo. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=8 animali per gruppo). In particolare la figura mostra l'effetto di PNU su immobility (a): \*\*\* P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; ### P<0.001 PNU 3 mg/kg vs veicolo- swimming (b): \*\*\* P<0.001 amitriptilina 15 mg/kg vs**

veicolo; ###  $P < 0.001$  PNU 3 mg/kg vs veicolo– e climbing (c): \*\*\*  $P < 0.001$  amitriptilina 15 mg/kg vs veicolo; #  $P < 0.05$  PNU 3 mg/kg vs veicolo; post hoc test di Newman Keuls.

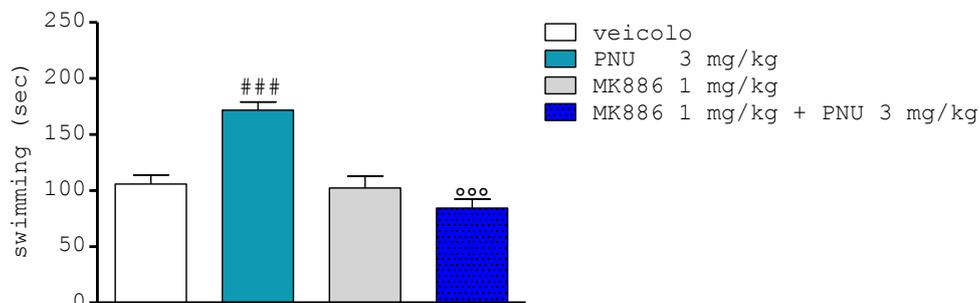
### **1.6.3 Effetto dell'antagonista dei recettori PPAR $\alpha$ , MK886, sull'attività antidepressiva dell'agonista $\alpha 7$ nAChR, PNU282987, nel test comportamentale del "nuoto forzato"**

I grafici in Fig. 19 mostrano gli effetti di PNU 3 mg/kg (precedentemente discussi), dell'antagonista specifico PPAR $\alpha$ , MK886 1 mg/kg, da solo ed in combinazione con l'agonista  $\alpha 7$  nAChR rispetto al veicolo, nel test del nuoto forzato. Lo MK886 1 mg/kg *per se* non ha effetti nel test del nuoto forzato (colonna grigia), infatti i valori riportati sono pressoché identici a quelli degli animali trattati con il veicolo. Lo MK886 quando somministrato agli animali prima del test finale di depressione in combinazione con il PNU si dimostra capace di è revertirne completamente gli effetti antidepressivi, riportando i valori dei parametri analizzati a valori simili a quelli degli animali trattati con il veicolo. L' ANOVA a una via, ha rivelato un effetto significativo del Trattamento all'interno dei gruppi sperimentali su immobilità (Fig. 19a) ( $F_{3,28}=18,85$ ;  $P < 0.0001$ ), swimming (Fig. 19b) ( $F_{3,28} = 19,76$ ;  $P < 0.0001$ ) e climbing (Fig. 19c) ( $F_{3,28} = 16,27$ ;  $P < 0.0001$ ). In particolare il post hoc test di Newman Keuls ha rivelato un effetto statisticamente significativo su immobilità: ###  $P < 0.001$  PNU 3 mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg °°°  $P < 0.001$  MK886 1 mg/kg + PNU 3 mg/kg vs PNU 3 mg/kg;– e swimming: ###  $P < 0.001$  PNU 3 mg/kg vs veicolo; ##  $P < 0.01$  PNU 3 mg/kg vs MK886 1 mg/kg °°°  $P < 0.001$  MK886 1mg/kg + PNU 3 mg/kg vs PNU 3 mg/kg – e climbing: ###  $P < 0.001$  PNU 3 mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg °°°  $P < 0.001$  MK886 1 mg/kg + PNU 3 mg/kg vs PNU 3 mg/kg.

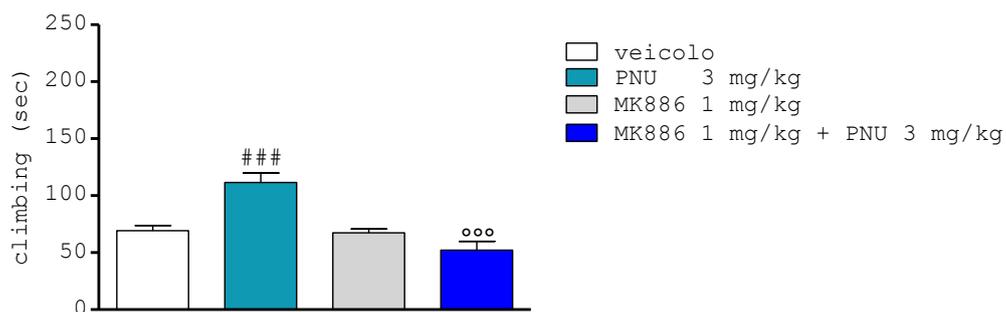
a



b



c



**Fig. 19. Effetto dell'antagonista specifico PPAR $\alpha$ , MK886, sull'effetto di PNU 3 mg/kg nel test comportamentale di depressione del nuoto forzato.** I grafici mostrano gli effetti di PNU, MK886 1 mg/kg, sia solo che in combinazione con PNU, rispetto al veicolo, nel test. I valori sono espressi come MEDIA $\pm$ SEM (n=8 animali per gruppo). In particolare la figura mostra (dall'alto) l'effetto di PNU e la sua combinazione con MK886 su immobility **(a)**: ### P<0.001 PNU 3 mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg; ooo P<0.001 MK886 1 mg/kg + PNU 3 mg/kg vs PNU 3 mg/kg – swimming **(b)**: ### P<0.001

*PNU 3 mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg; °°° P<0.001 MK886 1 mg/kg + PNU 3 mg/kg vs PNU 3 mg/kg – e climbing (c): ### P<0.001 PNU 3 mg/kg vs veicolo e MK886 1 mg/kg; °°° P<0.001 MK886 1 mg/kg + PNU 3 mg/kg vs PNU 3 mg/kg; post hoc test di Newman Keuls.*

## DISCUSSIONE

Il presente studio è stato condotto con lo scopo di caratterizzare il profilo farmacologico degli agonisti PPAR $\alpha$ , OEA e PEA, tramite test comportamentali per la valutazione dei loro effetti su attività motoria, analgesia, ansia e depressione nel ratto. Negli studi condotti da Proulx e colleghi (2005) sugli effetti di OEA nell'attività motoria, è stato osservato un effetto di ipomotilità ad alte dosi nonché una strana postura estesa in avanti. In linea con tali evidenze i risultati ottenuti in questa test indicano che sia OEA che PEA ad alte dosi (7.5 e 10 mg/kg; 7.5 e 15 mg/kg, rispettivamente) riducono l'attività motoria ed inducono la medesima alterazione posturale osservata descritta in letteratura (Proulx *et al.* 2005). È interessante notare come la riduzione dell'attività motoria, insieme ad atassia e cataplessia, siano anche effetti degli agonisti cannabinoidi e dell'etanolamide stearoiletanolamide (Romero *et al.* 2002; Maccarrone *et al.* 2002). Peraltro i risultati ottenuti potrebbero essere in linea con la distribuzione anatomica dei PPAR $\alpha$  nelle regioni cerebrali associate alla motilità, quali sostanza nera compatta e striato (Moreno *et al.* 2004).

In merito all'analgesia, la letteratura scientifica indica che gli effetti di OEA e PEA sono stati studiati su test di analgesia che valutano la risposta comportamentale indotta con un danno tissutale periferico o con infiammazione in corso, o danno provocato a livello dei nervi periferici (dolore neuropatico) (Calignano *et al.* 1998, 2001; Jaggar *et al.* 1998; Lo Verme *et al.* 2005; Malan e Porreca 2005; Wang *et al.* 2005). In questi test l'animale viene sottoposto ad iniezioni, a livello tissutale, di agenti che inducono un'alterazione del sistema nervoso sensoriali (Rosland *et al.* 1990; Coderre e Melzack

1992). In letteratura non esistono invece dati in merito agli effetti di OEA e PEA sull'analgia valutati tramite tail flick test, che invece sono stati valutati in questa tesi. OEA e PEA (5 e 2 mg/kg, rispettivamente) non hanno prodotto alcun effetto analgesico quindi si evince che, alle dosi testate, non agiscono né a livello del sistema nervoso periferico (il comportamento di "flick" della coda rappresenta soprattutto un riflesso spinale di risposta al dolore (Couto *et al.* 2011), né a livello centrale. Il test dell'attività motoria e di analgesia sono stati condotti in modo da escludere le dosi che potessero provocare effetti comportamentali aspecifici nell'animale e poter quindi proseguire, con le dosi selezionate con lo studio degli effetti di OEA e PEA in ansia e depressione. Nei due modelli di disturbi psichiatrici studiati, OEA e PEA hanno esercitato i loro effetti solo nel modello di depressione. I dati mostrano infatti che, sia OEA che PEA (2.5 e 5 mg/kg; 1 e 2 mg/kg, rispettivamente) esercitano effetti antidepressivo-simile in modo dose-dipendente con meccanismo PPAR $\alpha$ -mediato. L'effetto infatti è stato totalmente revertito dal trattamento con l'antagonista specifico dei PPAR $\alpha$ , MK886 (1 mg/kg). Mentre riguardo ad OEA non esistono evidenze scientifiche in merito, è stato invece dimostrato che PEA induce effetto antidepressivo-simile PPAR $\alpha$ -mediato, nel test del nuoto forzato e nel topo (Yu *et al.* 2011).

Diverse sono le evidenze scientifiche che mettono in relazione PPAR e eCBs. Tra queste, diversi studi hanno dimostrato che i cannabinoidi attivano i PPAR in *via diretta* come agonisti (Fu *et al.* 2003; Liu *et al.* 2003; Bouaboula *et al.* 2005; Sun *et al.* 2006; Gasperi *et al.* 2007). È stato dimostrato che i cannabinoidi agirebbero anche in *via indiretta*, attraverso legame dei metaboliti cannabinoidi sui PPAR (Kozak *et al.* 2002). Infine, è stato proposto che gli eCBs, una volta legati ai loro recettori specifici sulla

superficie della membrana cellulare, possano innescare una cascata di segnali intracellulari che potrebbero ipoteticamente attivare i PPAR (O'Sullivan 2007). Per questo motivo nella presente tesi è stata investigata la possibilità di un eventuale implicazione del eCBs nell'effetto antidepressivo-simile di OEA e PEA. Tali effetti sono stati infatti revertiti, oltre che da MK886, anche dall'antagonista/agonista inverso CB1r, rimonabant (1 mg/kg). In accordo con le suddette evidenze è plausibile ipotizzare che rimonabant agisca sui CB1r come antagonista inficiando il tono di eCBs, ed il loro potenziale ruolo di innescare segnali intracellulari necessari all'attivazione dei PPAR. Si può evincere quindi che i risultati ottenuti sottendano a meccanismi diretti, tramite gli agonisti OEA e PEA, ed indiretti tramite azione di eCBs. A tal proposito, nel lavoro di Mazzola e colleghi (2009) è stato dimostrato che URB597, inibitore della FAAH, ha effetto di incrementare la memoria e la sua acquisizione con meccanismo PPAR $\alpha$ -mediato, tramite trattamento con l'agonista PPAR $\alpha$ , WY14643. L'effetto fu antagonizzato sia da MK886 che da rimonabant, suggerendo l'implicazione dei CB1r nell'attività dei PPAR $\alpha$ . Questi dati permettono pertanto di speculare che gli effetti antidepressivi di OEA e PEA dimostrati in questa tesi potrebbero essere dovuti anche alle loro proprietà di potenziare ("effetto entourage") l'effetto degli eCBs come attivatori ipotetici dei PPAR $\alpha$ . In aggiunta a questo ipotetico meccanismo, gli endocannabinoidi, come noto, sono in grado di modulare diversi sistemi neurotrasmettitoriali, tra cui i sistemi dopaminergico, serotoninergico e noradrenergico, come fanno anche i farmaci antidepressivi (in particolare triciclici ed SSRIs) (Banerjee *et al.* 1975; French *et al.* 1997; Steffens e Feuerstein 2004; Muntoni *et al.* 2006; Velenovska e Fisar 2007) e quindi attivare l'asse HPA (Steiner e Wotjak 2008).

Cambiamenti strutturali e funzionali che coinvolgono l'asse amigdala-ippocampo, e la corteccia prefrontale, sono presenti in disturbi dell'umore quali la depressione (Drevets 2001; Manji *et al.* 2001). L'ippocampo svolge un'azione neuro protettiva contro gli insulti dati da stress, mantenendo il tono inibitorio GABAergico; la diminuzione di questo neurotrasmettitore è associata a depressione (Nestler *et al.* 2002b). Questa patologia è caratterizzata anche da decremento di neurogenesi ippocampale e ridotti livelli di BDNF, che in particolare, sono correlate con la quantità di GABA in quest'area. Queste evidenze indicano che la depressione è una patologia legata ad alterazioni dei livelli di GABA sia di BDNF (Tripp *et al.* 2012). Infatti, in base alla più accreditata ipotesi sulla depressione, "l'ipotesi BDNF", un'attività anormale dei fattori neurotrofici provoca anomalie nei neuroni GABAergici. Inoltre, dati pre-clinici e clinici suggeriscono che alterazioni del sistema GABAergico possano contribuire sia alla sintomatologia della depressione, sia alla risposta agli antidepressivi. Anomalie di tipo istologico, morfometrico e neurochimico, nella formazione ippocampale, sono associate con malattie mentali severe quali schizofrenia, disordine bipolare e depressione (Thompson *et al.* 2011). Tali modificazioni sembrano molto prominenti soprattutto nelle sottoregioni ippocampali CA1, CA3, ed il giro dentato, oltre che in corteccia prefrontale e nuclei amigdaloidi (Souza *et al.* 2000; Magariños *et al.* 1995, 1996; Vyas *et al.* 2002, 2003; Radley *et al.* 2004). Sono stati osservati anche anomali livelli della decarbossilasi dell'acido glutammico, isoforma 67KDa, (GAD67) enzima responsabile della sintesi di GABA, nell'ippocampo di individui affetti da disturbi dell'umore severi, ad indicare che le proprietà fondamentali di trasmissione, plasticità

e circuiti ippocampali possono essere compromesse in individui affetti da malattie psichiatriche gravi.

Studi *post-mortem* in cervelli umani di pazienti affetti da disturbi affettivi mostrano una diminuzione nell'espressione di GAD67 (Fatemi *et al.* 2005). Modificazioni dell'immunoistochimica di GAD67 sono state osservate anche in varie regioni della corteccia cerebrale e dell'ippocampo rispetto ai controlli sani (Bielau *et al.* 2007). Indagini neuroanatomiche condotte sia sull'uomo che sugli animali sottolineano un'evidente correlazione tra alterazioni cellulari strutturali e morfologiche ed elevato stress psicologico (Ladurelle *et al.* 2012).

I dati della tesi hanno dimostrato negli animali sottoposti al test del nuoto forzato e trattati con veicolo, un decremento dell'espressione di GAD67 del -58% nelle sottoregioni ippocampali CA1 e CA3, rispetto al gruppo di animali naïve che non hanno svolto il test. Tale risultato è in linea con diversi studi *post mortem*, in ippocampo di pazienti affetti da schizofrenia, disturbo bipolare e depressione, in cui era presente un importante deficit di interneuroni GABAergici. In particolare è stato osservato un forte decremento dell'espressione di GAD67 in diverse aree cerebrali, compreso l'ippocampo (Gilabert-Juan *et al.* 2012). Il trattamento con l'antidepressivo di riferimento, amitriptilina (15 mg/kg) reverte tali valori, aumentandoli anche rispetto ai valori basali. È noto che esiste una correlazione tra deficit di memoria ed apprendimento ed esposizione a stress cronico con conseguenze a livello neuroanatomico e neurocomportamentali insieme (Conrad 2006; Conrad *et al.* 2007). Nel modello di depressione utilizzato nel presente studio, il trattamento con OEA (2.5 mg/kg) e PEA (1 mg/kg) provoca un recupero dell'espressione di GAD67 in ippocampo.

Un importante numero di evidenze scientifiche suggerisce che l'efficacia clinica dei farmaci antidepressivi include fenomeni a lungo termine legati alla plasticità neuronale inclusi neurogenesi e rimodellamento di assoni e dendriti in specifiche aree cerebrali (Warner-Schmidt e Duman 2006; Bessa *et al.* 2009). Il rimodellamento sinaptico è legato a struttura e funzionalità dei microtubuli del citoscheletro che sono fondamentali per la formazione ed il mantenimento di assoni, dendriti e spine dendritiche (Conde e Cáceres 2009; Hoogenraad e Bradke 2009). Quindi, la modulazione della plasticità neuronale e la funzionalità dei microtubuli potrebbero essere alla base del trattamento della depressione (Ladurelle *et al.* 2012). Inoltre è stato dimostrato che il rimodellamento sinaptico in ippocampo e corteccia prefrontale è associato con l'efficacia dei trattamenti antidepressivi nel test del nuoto forzato (Bessa *et al.* 2009).

La proteina associata a microtubuli-tipo 2 (MAP2) appartiene alla famiglia delle proteine associate a microtubuli (MAP) le quali sono particolarmente abbondanti nel cervello dei mammiferi in differenti isoforme generate da splicing alternativo di un singolo gene (Kalcheva *et al.* 1995). L'alto peso molecolare di MAP2 regola assemblaggio, stabilità, dinamicità e spazialità tra microtubuli nonché il rimodellamento di dendriti e spine dendritiche (Yamada *et al.* 1970; Conde e Cáceres 2009). MAP2 è coinvolta peraltro nell'estensione dell'arborizzazione dendritica e ha un importante ruolo nella morfogenesi neuronale. Queste funzioni sono regolate dalla fosforilazione di MAP2 in più siti che rappresentano substrati per diverse famiglie di proteine chinasi (Sánchez *et al.* 2000). Studi pre-clinici e clinici hanno dimostrato che esiste una relazione tra stress psichico e regressione morfologica di dendriti e spine

dendritiche ed in particolare un decremento dei dendriti MAP2-immunoreattivi nella sottoregione CA3 della formazione ippocampale (Soetanto *et al.* 2010).

Dati pre-clinici emergenti indicano che gli effetti dei farmaci antidepressivi modificano positivamente la struttura e funzionalità dei microtubuli del citoscheletro nei neuroni (Ladurelle *et al.* 2012)

In questa tesi è stata studiata la morfologia di MAP2 in ippocampo di animali naïve (che non hanno condotto test comportamentali né hanno subito trattamenti farmacologici) e animali sottoposti al modello di depressione del nuoto forzato trattati con OEA, PEA, l'antidepressivo di riferimento, il tricyclico amitriptilina, e veicolo. Le alterazioni morfologiche osservate supportano i risultati di questa tesi sull'effetto antidepressivo-simile di OEA e PEA nel test del nuoto forzato. In particolare, i risultati mostrano che il test altera la morfologia di MAP2 diminuendo la lunghezza dei filamenti in CA1 nell'ippocampo di ratti trattati con veicolo rispetto al gruppo di animali naïve che non hanno svolto il test. Il trattamento con amitriptilina (15 mg/kg) reverte tale alterazione, in linea con dati presenti in letteratura che riportano tale effetto in seguito a trattamento con antidepressivi inibitori del trasporto delle monoamine (Ladurelle *et al.* 2012). Inoltre, sia OEA (2.5 mg/kg) che PEA (1 mg/kg) aumentano la lunghezza dei filamenti di MAP2. Questi risultati sembrano suggerire quindi che l'effetto antidepressivo-simile di OEA e PEA potrebbe essere legato al rimodellamento strutturale neuronale che è anche connesso all'efficacia dei trattamenti con antidepressivi (Bessa *et al.* 2009).

Studi clinici e preclinici hanno dimostrato che esiste una relazione tra stress psicologico cronico (come ansia e depressione) e regressione delle spine dendritiche ed in

particolare una riduzione nei dendriti immunoreattivi per MAP2 in ippocampo (Soetanto *et al.* 2010).

I risultati descritti in questa tesi suggeriscono che il test del nuoto forzato provoca delle alterazioni della morfologia cellulare, che risulta revertita in seguito a trattamenti antidepressivi. Diversi sono i disturbi mentali in cui sono state riportate modificazioni di MAP2. Per esempio, un'alterata fosforilazione di MAP2, causata da un aumento dei livelli di glutammato e decremento dei livelli di GABA, è stata osservata nell'ippocampo di pazienti schizofrenici (Kerwin 1993; Arnold *et al.* 1995).

Diversi modelli di stress e depressione modificano in ippocampo la proporzione tra le diverse forme di  $\alpha$ -tubuline (Bianchi *et al.* 2003, 2005, 2009; Yang *et al.* 2009), espressione di MAP2 (Bianchi *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006; Yang *et al.* 2009) e altre proteine microtubulari (Piubelli *et al.* 2011a, b, c) e questa potrebbe essere la possibile relazione tra modificazioni indotte da antidepressivi a livello delle formazioni microtubulari e la loro efficacia terapeutica. Nel caso di OEA e PEA, rispetto agli antidepressivi triciclici, provocano l'incremento della produzione di neurosteroidi (Sasso *et al.* 2010), processo legato alla sopravvivenza neuronale, crescita del neurite, neurogenesi e di conseguenza neuroprotezione (Charalampopoulos *et al.* 2008).

Complessivamente i dati di questa tesi sono in accordo con evidenze pre-cliniche e cliniche che sottolineano il coinvolgimento del sistema GABAergico nella patofisiologia della depressione (Spokes *et al.* 1980; Krystal *et al.* 2002). Si ipotizza che OEA e PEA alle dosi testate siano in grado di revertire un ipotetico decremento del tono inibitorio nell'ippocampo. Per questo motivo, è possibile speculare che l'effetto antidepressivo-simile di OEA e PEA possa essere ipoteticamente connesso ad un incremento nel

processo di neurogenesi attivato da produzione/rilascio di BDNF che, come noto, media la suscettività a stimoli stress-correlati.

Data l'implicazione e l'espressione dei nAChR (in particolar modo gli  $\alpha 7$  nAChR) nelle aree cerebrali coinvolte in analgesia, ansia, depressione, e funzioni cognitive (Shoaib *et al.* 2002; Ochoa e Lasalde-Dominicci 2007; Solinas *et al.* 2007; Changeux e Taly 2008) questo studio si è proposto di verificare se gli  $\alpha 7$  nAChR avessero un ruolo nei meccanismi tramite i quali OEA e PEA esercitano i loro effetti antidepressivo-simili.

Esistono evidenze scientifiche sul ruolo specifico dei nAChR nella depressione maggiore (Mineur e Picciotto 2010). Per esempio, la nicotina, agonista di tali recettori, è in grado di migliorare l'umore in pazienti affetti da depressione maggiore non fumatori (McClernon *et al.* 2006), e sia la nicotina che altri agonisti nAChR mostrano proprietà antidepressive in diversi paradigmi sperimentali quali test del nuoto forzato nel ratto e nel topo (Djuric *et al.* 1999; Tizabi *et al.* 1999, 2009; Caldarone *et al.* 2000; Vazquez-Palacios *et al.* 2005; Nowakowska *et al.* 2006; Andreasen e Redrobe 2009), test della sfiducia acquisita nel ratto (Ferguson *et al.* 2000), e stress cronico variato (Pichat *et al.* 2007; Andreasen *et al.* 2012).

Dati scientifici riportano che gli  $\alpha 7$  nAChR mediano il rilascio di 5-HT nicotina-mediato in ippocampo (Tucci *et al.* 2003). È quindi plausibile che la mediazione di tali recettori nell'interazione tra sistema colinergico e serotoninergico sia alla base delle proprietà antidepressive della nicotina e altri agonisti  $\alpha 7$  nAChR.

Testando l'agonista specifico  $\alpha 7$  nAChR, PNU282987 (3 mg/kg) nel test del nuoto forzato è stato riscontrato un effetto antidepressivo-simile che sembra essere mediato dai PPAR $\alpha$ , in quanto revertito completamente da MK886 (1 mg/kg). Il risultato

suggerisce che probabilmente OEA e PEA sono molecole che hanno ruolo di modulatori endogeni degli  $\alpha 7$  nAChR e quindi della trasmissione acetilcolinergica, e che acetilcolina e FAE, regolino reciprocamente le loro attività (Melis *et al.* 2008).

Insieme questi dati mostrano che la modulazione di OEA e PEA nel sistema nervoso centrale potrebbe rappresentare un'interessante prospettiva di indagine sui meccanismi d'azione coinvolti nell'eziopatogenesi della depressione.

## BIBLIOGRAFIA

Adamczyk P, Gołda A, McCreary AC, Filip M, Przegaliński E. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. *J Physiol Pharmacol.* (2008). 59(2):217-28.

Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* (2005). 19(12):1704-6.

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

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

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

Andreasen JT *et al.* Antidepressant-like effects of nicotinic acetylcholine receptor antagonists, but not agonists, in the mouse forced swim and mouse tail suspension tests. *J. Psychopharmacology.* (2009). 23, 797–804.

Andreasen JT, Redrobe JP. Antidepressant-like effects of nicotine and mecamylamine in the mouse forced swim and tail suspension tests: role of strain, test and sex. *Behav Pharmacol.* (2009). 20(3):286-95.

Andreasen JT, Redrobe JP, Nielsen EØ. Combined  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonism and partial serotonin transporter inhibition produce antidepressant-like effects in the mouse forced swim and tail suspension tests: a comparison of SSR180711 and PNU-282987. *Pharmacol Biochem Behav.* (2012). 100(3):624-9.

Arnold SE, Franz BR, Gur RC, Gur RE, Shapiro RM, Moberg PJ, Trojanowski JQ. Smaller neuron size in schizophrenia in hippocampal subfields that mediate cortical-hippocampal interactions. *Am J Psychiatry.* (1995). 152(5):738-48.

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

Bambico FR, Cassano T, Dominguez-Lopez S, Katz N, Walker CD, Piomelli D *et al.* Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and

serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. (2010). 35:2083-2100.

Bambico FR, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Gobbi G. Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models. *Curr Pharm Des*. (2009a). 15(14):1623-46. Review.

Bambico FR, Nguyen NT, Gobbi G. Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors after chronic unpredictable stress. *Eur Neuropsychopharmacol*. (2009b). 19(3):215-28.

Bambico FR, Gobbi G. The cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor and the endocannabinoid anandamide: possible antidepressant targets. *Expert Opin Ther Targets*. (2008). 12(11):1347-66. Review.

Banerjee SP, Snyder SH, Mechoulam R. Cannabinoids: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther*. (1975). 194(1):74-81.

Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. (2007). Chapter 8:Unit 8.9.

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

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

Basavarajappa BS. Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity. *Curr Neuropharmacol*. (2007). 5(2):81-97.

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

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

Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry*. (2009). 14(8):764-73

Bianchi M, Hagan JJ, Heidbreder CA. Neuronal plasticity, stress and depression: involvement of the cytoskeletal microtubular system? *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. (2005). 4(5):597-611. Review.

- Bianchi M, Heidbreder C, Crespi F. Cytoskeletal changes in the hippocampus following restraint stress: role of serotonin and microtubules. *Synapse*. (2003). 49(3):188-94.
- Bianchi M, Shah AJ, Fone KC, Atkins AR, Dawson LA, Heidbreder CA, Hows ME, Hagan JJ, Marsden CA. Fluoxetine administration modulates the cytoskeletal microtubular system in the rat hippocampus. *Synapse*. (2009). 63(4):359-64.
- Bielau H, Steiner J, Mawrin C, Trübner K, Brisch R, Meyer-Lotz G, Brodhun M, Dobrowolny H, Baumann B, Gos T, Bernstein HG, Bogerts B. Dysregulation of GABAergic neurotransmission in mood disorders: a postmortem study. *Ann N Y Acad Sci*. (2007). 1096:157-69.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J*. (2000). 351 Pt 3:817-24.
- Blumstein LK, Crawley JN. Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*. (1983). 18(1):37-40.
- Borrelli F, Aviello G, Romano B, Orlando P, Capasso R, Maiello F, Guadagno F, Petrosino S, Capasso F, Di Marzo V, Izzo AA. Cannabidiol, a safe and non-psychotropic ingredient of the marijuana plant *Cannabis sativa*, is protective in a murine model of colitis. *J Mol Med (Berl)*. (2009). 87(11):1111-21.
- Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry*. (2007). 62(10):1103-10.
- Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol*. (2005). 517(3):174-81.
- Bouchard JF, Lépicier P, Lamontagne D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci*. (2003). 72(16):1859-70.
- Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*. (2002). 298(5599):1793-6.
- Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. (2007). 152(5):567-75. Review.

- Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci.* (1997). 17(4):1226-42.
- Cadas H, Schinelli S, Piomelli D. Membrane localization of N-acyl phosphatidylethanolamine in central neurons: studies with exogenous phospholipases. *J Lipid Mediate Cell Signal.* (1996). 14(1-3):63-70
- Caldarone BJ, Duman CH, Picciotto MR. Fear conditioning and latent inhibition in mice lacking the high affinity subclass of nicotinic acetylcholine receptors in the brain. *Neuropharmacology.* (2000). 39(13):2779-84.
- Calignano A, La Rena G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* (1998). 394(6690):277-81.
- Calignano A, La Rena G, Piomelli D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide. *Eur J Pharmacol.* (2001). 419(2-3):191-8.
- Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* (1997). 272(16), 10811-10816.
- Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* (1997). 272(16):10811-6.
- Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Cuomo V, Astarita G, Fu J, McGaugh JL, Piomelli D. Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2009). 106(19), 8027-8031.
- Capasso R, Izzo AA, Fezza F, Pinto A, Capasso F, Mascolo N, Di Marzo V. Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice. *Br J Pharmacol.* (2001). 134(5):945-50.
- Carey MP and Fry JP. An evaluation of light aversion as a measure of anxiolytic benzodiazepine activity in the mouse. *Eur J Neurosci Suppl.* (1988). 343.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* (2005). 29:1193–205.
- Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci.* (2011). Chapter 8, Unit 8.10A.
- Chan GK, Deckelbaum RA, Bolivar I, Goltzman D, Karaplis AC. PTHrP inhibits adipocyte differentiation by downregulating PPAR gamma activity *via* a MAPK-dependent pathway. *Endocrinology.* (2001). 142(11), 4900-4909.

- Changeux JP, Taly A. Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. *Trends Mol Med.* (2008). 14(3):93-102.
- Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, Gravanis A. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab.* (2008). 19(8):300-7.
- Charney DS. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. *Acta Psychiatr Scand.* (2003). 417(Suppl.):38-50.
- Chen C, Bazan NG. Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2005). (1-4):65-76. Review.
- Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* (1998). 273(40):25573-80.
- Chourbaji S, Urani A, Inta I, Sanchis-Segura C, Brandwein C, Zink M, Schwaninger M, Gass P. IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiol Dis.* (2006). 23(3):587-94.
- Cimini A, Benedetti E, Cristiano L, Sebastiani P, D'Amico MA, D'Angelo B, DiLoreto S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. *Neuroscience.* (2005). 130(2):325-37.
- Coderre TJ, Melzack R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci.* (1992). 12(9):3665-70.
- Conde C, Cáceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci.* (2009). 10(5):319-32. Review.
- Conrad CD. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev.* (2006). 5(1):41-60.
- Conrad CD, McLaughlin KJ, Harman JS, Foltz C, Wiczorek L, Lightner E, Wright RL. Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J Neurosci.* (2007). 27(31):8278-8285.
- Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol.* (2002). 135(1):181-7.

- Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*. (2008). 31;139(3):541-50.
- Couto VM, Vilela FC, Dias DF, Dos Santos MH, Soncini R, Nascimento CG, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of extract of Emilia sonchifolia in mice. *J Ethnopharmacol*. (2011). 134(2):348-53.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. (1996). 384(6604):83-7.
- Cravatt BF, Saghatelian A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH, Lichtman AH. Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2004). 101(29):10821-6.
- Crawley JN, Blumstein LK, Baldino F Jr. Anxiolytic-like properties of fominoben. *Eur J Pharmacol*. (1984). 97(3-4):277-81.
- D'Agostino G, Russo R, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A. Palmitoylethanolamide protects against the amyloid- $\beta$ 25-35-induced learning and memory impairment in mice, an experimental model of Alzheimer disease. *Neuropsychopharmacology*. (2012). 37(7):1784-92.
- Dantzer R, Capuron L, Irwin MR, Miller AH, Ollat H, Perry VH, Rousey S, Yirmiya R. Identification and treatment of symptoms associated with inflammation in medically ill patients. *Psychoneuroendocrinology*. (2008). 33(1):18-29.
- De Novellis V, Luongo L, Guida F, Cristino L, Palazzo E, Russo R, Marabese I, D'Agostino G, Calignano A, Rossi F, Di Marzo V, Maione S. Effects of intra-ventrolateral periaqueductal grey palmitoylethanolamide on thermoceptive threshold and rostral ventromedial medulla cell activity. *Eur J Pharmacol*. (2012). 15;676(1-3):41-50.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V. Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundam Clin Pharmacol*. (2002). 16(4):297-302.
- De Petrocellis L, Davis JB, Di Marzo V. Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors. *FEBS Lett*. (2001). 506(3):253-6
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci*. (2003). 23(6):2371-82.

- Desarnaud F, Cadas H, Piomelli D. Anandamide amido hydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *J Biol Chem.* (1995). 270(11):6030-5.
- Desvergne B, Ijpenberg A, Devchand PR, Wahli W. The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* (1998). 65(1-6):65-74.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* (1999). 20(5),649-688.
- Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res.* (1996). 73(1-2):43-6. Review.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* (1992). 258(5090):1946-9.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. Endocannabinoids Part I: molecular basis of endocannabinoid formation, action and inactivation and development of selective inhibitors. *Expert Opin Ther Targets.* (2001). 5(2):241-65.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* (1994). 372(6507):686-91.
- Di Marzo V, Gobbi G, Szallasi A. Brain TRPV1: a depressing TR(i)P down memory lane? *Trends Pharmacol Sci.* (2008). 29(12):594-600.
- Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders. (American Psychiatric Press, Washington, DC). (2000).
- Djurić VJ, Dunn E, Overstreet DH, Dragomir A, Steiner M. Antidepressant effect of ingested nicotine in female rats of Flinders resistant and sensitive lines. *Physiol Behav.* (1999). 67(4):533-7.
- Drevets DA, Jelinek TA, Freitag NE. *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice. *Infect Immun.* (2001). 69(3):1344-50.
- Dubreucq S, Koehl M, Abrous DN, Marsicano G, Chaouloff F. CB1 receptor deficiency decreases wheel-running activity: consequences on emotional behaviours and hippocampal neurogenesis. *Exp Neurol.* (2010). 224(1):106-13.
- Duvis HE, de Jonge P, Penninx BW, Na BY, Cohen BE, Whooley MA. Depressive symptoms, health behaviors, and subsequent inflammation in patients with coronary

- heart disease: prospective findings from the heart and soul study. *Am J Psychiatry*. (2011). 168(9):913-20.
- Duman CH, Schlesinger L, Kodama M, Russell DS, Duman RS. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*. (2006). 61(5):661-70.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. Molecular psychiatry. Adaptations of receptor-coupled signal transduction pathways underlying stress- and drug-induced neural plasticity. *J Nerv Ment Dis*. (1994). 182(12):692-700. Review.
- Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*. (2006). 15;59(12):1116-27. Review.
- Dunn AJ. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res*. (2006). 6(1-2):52-68.
- Dunn AJ, Swiergiel AH. Effects of acute and chronic stressors and CRF in rat and mouse tests for depression. *Ann N Y Acad Sci*. (2008). 1148:118-26.
- Eisch AJ, Bolaños CA, de Wit J, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, Verhaagen J, Nestler EJ. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry*. (2003). 54(10):994-1005.
- Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2003). 100(23):13632-7.
- El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, Khan I, ElSohly M, Ross S. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav*. (2010). 95(4):434-42.
- Escriva H, Langlois MC, Mendonça RL, Pierce R, Laudet V. Evolution and diversification of the nuclear receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci*. (1998). 15;839:143-6.
- Esposito E, Paterniti I, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea S. GW0742, a high-affinity PPAR- $\delta$  agonist, mediates protection in an organotypic model of spinal cord damage. *Spine (Phila Pa 1976)*. (2012). 37(2):E73-8.
- Fadda P, Pani L, Porcella A, Fratta W. Chronic imipramine, L-sulpiride and mianserin decrease corticotropin releasing factor levels in the rat brain. *Neurosci Lett*. (1995). 192(2):121-3.
- Farquhar-Smith WP, Rice AS. Administration of endocannabinoids prevents afferent hyperalgesia associated with inflammation of the urinary bladder. *Anesthesiology*. (2001). 94(3):507-13

- Fegley D, Gaetani S, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J Pharmacol Exp Ther.* (2005). 313(1):352-8.
- Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (1998). 38:179-200. Review
- Ferguson SM, Brodtkin JD, Lloyd GK, Menzaghi F. Antidepressant-like effects of the subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, SIB-1508Y, in the learned helplessness rat model of depression. *Psychopharmacology (Berl).* (2000). 152(3):295-303.
- Fernández-Ruiz J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br J Pharmacol.* (2009). 156(7):1029-40.
- Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes.* (2004). 53 Suppl 1, S43-50.
- Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol.* (2003). 65:261-311. Review.
- Frank E, Thase ME. Natural history and preventative treatment of recurrent mood disorders. *Annu Rev Med.* (1999). 50:453-68. Review.
- Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci.* (2003). 23(21):7767-75.
- French ED, Dillon K, Wu X. Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport.* (1997). 8(3):649-52.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* (2003). 83(3):1017-66. Review.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F *et al.* Oleoylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature.* (2003). 425:90-93.
- Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology.* (2005). 48(8):1147-53.
- Gaetani S, Kaye WH, Cuomo V, Piomelli D. Role of endocannabinoids and their analogues in obesity and eating disorders. *Eat Weight Disord.* (2008). 13(3):e42-8.

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

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

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

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

Gilabert-Juan J, Castillo-Gomez E, Guirado R, Moltó MD, Nacher J. Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Struct Funct*. (2012). [Epub ahead of print]

Gimeno D, Kivimäki M, Brunner EJ, Elovainio M, De Vogli R, Steptoe A, Kumari M, Lowe GD, Rumley A, Marmot MG, Ferrie JE. Associations of C-reactive protein and interleukin-6 with cognitive symptoms of depression: 12-year follow-up of the Whitehall II study. *Psychol Med*. (2009). 39(3):413-23.

Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M *et al*. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2005). 102:18620-18625

Gobshtis N, Ben-Shabat S, Fride E. Antidepressant-induced undesirable weight gain: prevention with rimonabant without interference with behavioral effectiveness. *Eur J Pharmacol*. (2007). 554(2-3):155-63.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. (2006). 1071(1):10-23.

Gorzalka BB, Hill MN, Chang SC. Male-female differences in the effects of cannabinoids on sexual behavior and gonadal hormone function. *Horm Behav*. (2010). 58(1):91-9. Review.

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

- Hagan MM, Havel PJ, Seeley RJ, Woods SC, Ekhtor NN, Baker DG, Hill KK, Wortman MD, Miller AH, Gingerich RL, Geraciotti TD. Cerebrospinal fluid and plasma leptin measurements: covariability with dopamine and cortisol in fasting humans. *J Clin Endocrinol Metab.* (1999). 84(10):3579-85.
- Haller J, Leveleki C, Halász J, Baranyi J, Makara GB. The effect of glucocorticoids on the anxiolytic efficacy of buspirone. *Psychopharmacology (Berl).* (2001). 157(4):3884394.
- Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci.* (2002). 16(7):1395-8.
- Haller J, Varga B, Ledent C, Freund TF. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol.* (2004). 15(4):299-304.
- Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem.* (1998). 70(2):671-6.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2001). 98(7):3662-5.
- Helyes Z, Németh J, Thán M, Bölcskei K, Pintér E, Szolcsányi J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci.* (2003). 73(18):2345-53.
- Heneka MT, Landreth GE, Hüll M. Drug insight: effects mediated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in CNS disorders. *Nat Clin Pract Neurol.* (2007). 3(9):496-504. Review.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* (1991). 11(2):563-83.
- Hesketh SA, Brennan AK, Jessop DS, Finn DP. Effects of chronic treatment with citalopram on cannabinoid and opioid receptor-mediated G-protein coupling indiscrete rat brain regions. *Psychopharmacology (Berl).* (2008). 198(1):29-36.
- Hill MN, Carrier EJ, McLaughlin RJ, Morrish AC, Meier SE, Hillard CJ, Gorzalka BB. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem.* (2008). 106(6):2322-36.

- Hill MN, Hillard CJ, Bambico FR, Patel S, Gorzalka BB, Gobbi G. The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressants. *Trends Pharmacol Sci.* (2009). 30(9):484-93. Review.
- Hill MN, Karacabeyli ES, Gorzalka BB. Estrogen recruits the endocannabinoid system to modulate emotionality. *Psychoneuroendocrinology.* (2007). 32(4):350-7.
- Hill MN, Miller GE, Carrier EJ, Gorzalka BB, Hillard CJ. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology.* (2009). 34(8):1257-62.
- Hill MN, Titterness AK, Morrish AC, Carrier EJ, Lee TT, Gil-Mohapel J, Gorzalka BB, Hillard CJ, Christie BR. Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus.* (2010). 20(4):513-23.
- Hillard CJ. Endocannabinoids and vascular function. *J Pharmacol Exp Ther.* (2000). 294(1):27-32. Review.
- Hillard CJ, Edgemond WS, Campbell WB. Characterization of ligand binding to the cannabinoid receptor of rat brain membranes using a novel method: application to anandamide. *J Neurochem.* (1995). 64(2):677-83
- Ho WS, Barrett DA, Randall MD. 'Entourage' effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.* (2008). 155(6):837-46.
- Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* (1996). 54:21-30.
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2002). 68-69:619-31. Review.
- Howlett AC, Mukhopadhyay S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids.* (2000). 108(1-2):53-70. Review.
- Hoogenraad CC, Bradke F. Control of neuronal polarity and plasticity-are naissance for microtubules? *Trends Cell Biol.* (2009). 19(12):669-76.
- Hsi LC, Wilson L, Nixon J, Eling TE. 15-lipoxygenase-1 metabolites down-regulate peroxisome proliferator-activated receptor gamma *via* the MAPK signaling pathway. *J Biol. Chem.* (2001). 276(37), 34545-34552.
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* (1990). 347(6294):645-50.

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

Iwata M, Shirayama Y, Ishida H, Kawahara R. Hippocampal synapsin I, growth-associated protein-43, and microtubule-associated protein-2 immunoreactivity in learned helplessness rats and antidepressant-treated rats. *Neuroscience.* (2006). 141(3):1301-13.

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

Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest.* (2005). 115(11):3104-16.

Johnston TH, Huot P, Fox SH, Wakefield JD, Sykes KA, Bartolini WP, Milne GT, Pearson JP, Brotchie JM. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition reduces L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced hyperactivity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned non-human primate model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* (2011). 336(2):423-30.

Jonsson KO, Vandevorode S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ. Effects of homologues and analogues of Palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol.* (2001). 133: 1263–1275.

Kalcheva N, Albala J, O'Guin K, Rubino H, Garner C, Shafit-Zagardo B. Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1995). 92(24):10894-8.

Kamprath K, Marsicano G, Tang J, Monory K, Bisogno T, Di Marzo V, Lutz B, Wotjak CT. Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *J Neurosci.* (2006). 26(25):6677-86.

Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* (2009). 89(1):309-80.

Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res.* (2005). 20;136(1-2):29-37.

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

Kerwin R. Adverse reaction reporting and new antipsychotics. *Lancet*. (1993). 342(8885):1440.

Kim J, Alger BE. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci*. (2004). 7(7):697-8.

Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, DuBois RN, Brash AR, Marnett LJ. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J. Biol. Chem*. (2002). 277(26), 23278-23286.

Krystal JH, Sanacora G, Blumberg H, Anand A, Charney DS, Marek G, Epperson CN, Goddard A, Mason GF. Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Mol Psychiatry*. (2002). 7 Suppl1:S71-80. Review

Ladurelle N, Gabriel C, Viggiano A, Mocaër E, Baulieu EE, Bianchi M. Agomelatine (S20098) modulates the expression of cytoskeletal microtubular proteins, synaptic markers and BDNF in the rat hippocampus, amygdala and PFC. *Psychopharmacology (Berl)*. (2012). 221(3):493-509.

Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem*. (1999). 6: 757–773.

Lambert DM, Muccioli GG. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines in the control of appetite and energy metabolism: emergence of new molecular players. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. (2007). 10(6):735-44. Review.

Lambert DM, Vandevoorde S, Diependaele G, Govaerts SJ, Robert AR. Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. *Epilepsia*. (2001). 42(3):321-7.

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

Linton MF, Fazio S. Re-emergence of fibrates in the management of dyslipidemia and cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep*. (2000). 2(1):29-35. Review

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

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

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

Maccarrone M, Cartoni A, Parolaro D, Margonelli A, Massi P, Bari M, Battista N and Finazzi-Agro A. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide within the mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci.* (2002). 21: 126–140.

Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* (2006). 8, E298—R306.

Magariños AM, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate treeshrews. *J Neurosci.* (1996). 16(10):3534-40.

Magariños AM and McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: comparison of stressors. *Neuroscience.* (1995).69 (1):83–88.

Malan TP Jr, Porreca F. Lipid mediators regulating pain sensitivity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2005). 77(1-4):123-30. Review.

Mameli-Engvall M, Evrard A, Pons S, Maskos U, Svensson TH, Changeux JP *et al.* Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron.* (2006). 50:911-921.

Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med.* (2001). 7(5):541-7. Review.

Marco EM, Perez Alvarez L, Borcel E, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E *et al.* Involvement of the 5HT<sub>1A</sub> receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. *Behav Pharmacol.* (2004). 15:21427.

Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, Thomazeau A, Lin YH, Coy J, Bodor AL, Muccioli GG, Hu SS, Woodruff G, Fung S, Lafourcade M, Alexander JP, Long JZ, LiW, Xu C, Möller T, Mackie K, Manzoni OJ, Cravatt BF, Stella N. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci.* (2010). 13(8):951-7.

Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature.* (2002).418(6897):530-4.

Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci.* (2007). 10(9):1089-93. Review.

- Mascia P, Pistis M, Justinova Z, Panlilio LV, Luchicchi A, Lecca S *et al.* Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biol Psychiatry*. (2011). 69:633-641.
- Matthews K, Christmas D, Swan J, Sorrell E. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. *Neurosci Biobehav Rev*. (2005). 29(4-5):503-13. Review.
- Matias I, Bisogno T, Di Marzo V. Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int. J. Obes*. (2006). 30 (Suppl. 1), S7—S12.
- Matias I, Gonthier MP, Petrosino S, Docimo L, Capasso R, Hoareau L, Monteleone L, Roche R, Izzo AA, Di Marzo V. Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells. *Br. J. Pharmacol*. (2007). 152, 676—690.
- Mayberg HS. Positron emission tomography imaging in depression: a neural systems perspective. *Neuroimaging Clin N Am*. (2003). 13(4):805-15. Review.
- Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwalb JM, Kennedy SH. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*. (2005). 3;45(5):651-60.
- Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, Drago F, Cadet JL, Goldberg SR, Yasar S. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn. Mem*. (2009). 16(5), 332-337.
- McClernon FJ, Hiott FB, Westman EC, Rose JE, Levin ED. Transdermal nicotine attenuates depression symptoms in nonsmokers: a double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)*. (2006). 189(1):125-33.
- McHugh D, Hu SS, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, Bradshaw HB. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci*. (2010). 11:44.
- McLaughlin RJ, Hill MN, Morrish AC, Gorzalka BB. Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect. *Behav Pharmacol*. (2007). 18(5-6):431-8.
- Mechoulam R, Ben Shabat S, Hanus L, Fride E, Vogel Z, Bayewitch M, Sulcova AE. Endogenous cannabinoid ligands-chemical and biological studies. *J Lipid Mediat Cell Signal*. (1996). 14(1-3):45-9. Review.
- Melis M, Carta S, Fattore L, Tolu S, Yasar S, Goldberg SR *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha modulate dopamine cell activity through nicotinic receptors. *Biol Psychiatry*. (2010). 68:256-264.

Melis M, Pillolla G, Bisogno T, Minassi A, Petrosino S, Perra S, Muntoni AL, Lutz B, Gessa GL, Marsicano G, Di Marzo V, Pistis M. Protective activation of the endocannabinoid system during ischemia in dopamine neurons. *Neurobiol Dis.* (2006). 24(1):15-27.

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

Melis M, Scheggi S, Gianfranca Carta, Camilla Madeddu, Lecca S, Luchicchi A, Cadeddu F, Frau R, Fattore L, Fadda P, Ennas MG, Castelli MP, Fratta W, Schilström B, Banni S, DeMontis M, Pistis M. Peroxisome proliferator-activated receptors- $\alpha$  regulate cholinergic driven activity of midbrain dopamine neurons via a novel mechanism involving  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* (2013). [IN PRESS]

Mendiguren A, Pineda J. Systemic effect of cannabinoids on the spontaneous firing rate of locus coeruleus neurons in rats. *Eur J Pharmacol.* (2006). 534(1-3):83-8.

Mikics E, Vas J, Aliczki M, Halasz J, Haller J. Interactions between the anxiogenic effects of CB1 gene disruption and 5-HT<sub>3</sub> neurotransmission. *Behav Pharmacol.* (2009). 20(3):265-72.

Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology.* (2003). 70:83–244.

Mineka S and Ohman A. Phobias and preparedness: the selective, automatic and encapsulate nature of fear. *Biol Psychiatry.* (2002). 52(10):927-937.

Mineur YS, Brunzell DH, Grady SR, Lindstrom JM, McIntosh JM, Marks MJ, *et al.* Localized low-level re-expression of high-affinity mesolimbic nicotinic acetylcholine receptors restores nicotine-induced locomotion but not place conditioning. *Genes Brain Behav.* (2009). 8:257-266.

Mineur YS, Einstein EB, Seymour PA, Coe JW, O'Neill B T, Rollema H *et al.*  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor partial agonists with low intrinsic efficacy have antidepressant-like properties. *Behav Pharmacol.* (2011). 22:291-299.

Mineur YS, Picciotto MR. Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis. *Trends Pharmacol Sci.* (2010). 31:580-586.

Moldrich G, Wenger T. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides.* (2000). 21(11):1735-42.

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

- Morrish AC, Hill MN, Riebe CJ, Gorzalka BB. Protracted cannabinoid administration elicits antidepressant behavioral responses in rats: role of gender and noradrenergic transmission. *Physiol Behav.* (2009). 98(1-2):118-24.
- Moser PC. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology (Berl).* (1989). 99(1):48-53
- Müller N. COX-2 inhibitors as antidepressants and antipsychotics: clinical evidence. *Curr Opin Investig Drugs.* (2010). 11(1):31-42. Review.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* (1993). 365(6441):61-5.
- Muntoni AL, Pillolla G, Melis M, Perra S, Gessa GL, Pistis M. Cannabinoids modulate spontaneous neuronal activity and evoked inhibition of locus coeruleus noradrenergic neurons. *Eur J Neurosci.* (2006). 23(9):2385-94.
- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* (1997). 349(9063):1436-42.
- Natarajan V, Schmid PC, Reddy PV, Schmid HH. Catabolism of N-acyl ethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *J Neurochem.* (1984). 42(6):1613-9.
- Navarro M, Fernandez-Ruiz JJ, de Miguel R, Hernandez ML, Cebeira M, Ramos JA. An acute dose of delta 9-tetrahydrocannabinol affects behavioral and neurochemical indices of mesolimbic dopaminergic activity. *Behav Brain Res.* (1993). 57(1):374-46.
- Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol.* (2005). 40(1):2-14. Review.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron.* (2002b). 28;34(1):13-25. Review.
- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Bunney WE Jr, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry.* (2002a). 15;52(6):503-28. Review.
- Nestler E and Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience.* (2010). 13, 1161–1169
- Nowakowska E, Kus K, Florek E, Czubak A, Jodynys-Liebert J. The influence of tobacco smoke and nicotine on antidepressant and memory-improving effects of venlafaxine. *Hum Exp Toxicol.* (2006). 25(4):199-209.

Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolón RM, Romero J. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse*. (2004). 53(4):208-13.

Ochoa EL, Lasalde-Dominicci J. Cognitive deficits in schizophrenia: focus on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and smoking. *Cell Mol Neurobiol*. (2007). 27(5):609-39. Review.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*. (2001). 29(3):729-38.

Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*. (2004). 279(7):5298-305

Onaivi ES, Green MR, Martin BR. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther*. (1990). 253(3):100241009.

O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*. (2007). 152(5):576-82. Review.

Overstreet DH. The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. (1993). 17(1):51-68. Review.

Overstreet DH, Janowsky DS, Gillin JC, Shiromani PJ, Sutin EL. Stress-induced immobility in rats with cholinergic supersensitivity. *Biol Psychiatry*. (1986). 21(7):657-64.

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

Palazzo E, de Novellis V, Petrosino S, Marabese I, Vita D, Giordano C, Di Marzo V, Mangoni GS, Rossi F, Maione S. Neuropathic pain and the endocannabinoid system in the dorsal raphe: pharmacological treatment and interactions with the serotonergic system. *Eur J Neurosci*. (2006). 24(7):2011-20

Parolaro D. Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. *Life Sci*. (1999). 65(6-7):637-44. Review.

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

- Petrosino S, Iuvone T, Di Marzo V. N-palmitoyl-ethanolamine: Biochemistry and new therapeutic opportunities. *Biochimie*. (2010). 92(6):724-7.
- Pellow S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: are exploratory models of anxiety in rodent valid? *Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology*. (1986). 8:557-565.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. (1985). 14:149-67.
- Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Goldman AL, Verchinski BA, Chen G, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR. Evidence of biologic epistasis between BDNF and SLC6A4 and implications for depression. *Mol Psychiatry*. (2008). 13(7):709-16
- Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*. (2002). 13(9):1097-106. Review.
- Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM *et al*. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. (1998). 391:173-177.
- Pichat P, Bergis OE, Terranova JP, Urani A, Duarte C, Santucci V, Gueudet C, Voltz C, Steinberg R, Stemmelin J, Oury-Donat F, Avenet P, Griebel G, Scatton B. SSR180711, a novel selective alpha7 nicotinic receptor partial agonist: (II) efficacy in experimental models predictive of activity against cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. (2007). 32(1):17-34.
- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*. (2003). 4(11):873-84. Review.
- Pistis M, Melis M. From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr Med Chem*. (2010). 17(14):1450-67. Review.
- Pistis M, Perra S, Pillola G, Melis M, Gessa GL, Muntoni AL. Cannabinoids modulate neuronal firing in the rat basolateral amygdala: evidence for CB1 and non CB1 mediated actions. *Neuropharmacology*. (2004). 46:1154-125.
- Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. (2008). 33(1):88-109. Review.
- Piubelli C, Carboni L, Becchi S, Mathé AA, Domenici E. Regulation of cytoskeleton machinery, neurogenesis and energy metabolism pathways in a rat gene-environment model of depression revealed by proteomic analysis. *Neuroscience*. (2011). 176:349-80.

Piubelli C, Vighini M, Mathé AA, Domenici E, Carboni L. Escitalopram modulates neuron-remodelling proteins in a rat gene-environment interaction model of depression as revealed by proteomics. Part I: genetic background. *Int J Neuropsychopharmacol.* (2011). 14(6):796-833

Piubelli C, Vighini M, Mathé AA, Domenici E, Carboni L. Escitalopram affects cytoskeleton and synaptic plasticity pathways in a rat gene-environment interaction model of depression as revealed by proteomics. Part II: environmental challenge. *Int J Neuropsychopharmacol.* (2011). 14(6):834-55.

Plendl W, Wotjak CT. Dissociation of within- and between-session extinction of conditioned fear. *J Neurosci.* (2010).30(14):4990-8.

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

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* (2002). 301(3):1020-4.

Proulx K, Cota D, Castañeda TR, Tschöp MH, D'Alessio DA, Tso P, Woods SC, Seeley RJ. Mechanisms of oleoylethanolamide-induced changes in feeding behavior and motor activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2005). 289(3):R729-37.

Rademacher DJ, Hillard CJ. Interactions between endocannabinoids and stress-induced decreased sensitivity to natural reward. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (2007). 31(3):633-41.

Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrahan A, Hillard CJ. Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology.* (2008). 54(1):108-16.

Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience.* (2004). 125(1):1-6.

Raison CL, Woolwine BJ, Demetrashvili MF, Borisov AS, Weinreib R, Staab JP, Zajecka JM, Bruno CJ, Henderson MA, Reinus JF, Evans DL, Asnis GM, Miller AH. Paroxetine for prevention of depressive symptoms induced by interferon-alpha and ribavirin for hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* (2007). 25(10):1163-74.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. FARMACOLOGIA prima edizione. (1998).

- Reddy JK, Goel SK, Nemali MR, Carrino JJ, Laffler TG, Reddy MK, Sperbeck SJ, Osumi T, Hashimoto T, Lalwani ND *et al.* Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1986). 83(6):1747-51.
- Reggio PH. Endocannabinoid structure-activity relationships for interaction at the cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* (2002).66(2-3):143-60. Review.
- Rénéric JP, Lucki I. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl).* (1998). 136(2):190-7.
- Richardson D, Ortori CA, Chapman V, Kendall DA, Barrett DA. Quantitative profiling of endocannabinoids and related compounds in rat brain using liquid chromatography-tandem electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (2007). 360(2),216-226.
- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* (1997). 30(3):289-304. Review.
- Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol.* (2005). 40(1):2-14. Review.
- Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J *et al.* An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* (2001). 414:209-212.
- Rodríguez de Fonseca F, Rubio P, Menzaghi F, Merlo-Pich E, Rivier J, Koob GF, Navarro M. Corticotropin releasing factor (CRF) antagonist [D-Phe<sup>12</sup>,Nle<sup>21,38</sup>,C alpha MeLeu<sup>37</sup>] CRF attenuates the acute actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU4210 on defensive-withdrawal behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* (1996). 276(1):564-64.
- Rodríguez-Gaztelumendi A, Rojo ML, Pazos A, Díaz A. Altered CB receptor-signaling in prefrontal cortex from an animal model of depression is reversed by chronic fluoxetine. *J Neurochem.* (2009). 108(6):1423-33.
- Romero J, Lastres-Becker I, de Miguel R, Berrendero F, Ramos JA and Fernandez-Ruiz J. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol Ther.* (2002). 95: 137–152. Review.
- Ropero AB, Juan-Pico P, Rafacho A, Fuentes E, Bermudez-Silva FJ, Roche E, Quesada I, de Fonseca FR, Nadal A. Rapid non-genomic regulation of Ca<sup>2+</sup> signals and insulin

secretion by PPAR alpha ligands in mouse pancreatic islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* (2009). 200(2), 127-138.

Rosland JH, Tjølsen A, Maehle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain.* (1990). 42(2):235-42

Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.* (2003). 140(5):790-801. Review.

Rubino T, Parolaro D. Long lasting consequences of cannabis exposure in adolescence. *Mol Cell Endocrinol.* (2008). 286(1-2 Suppl 1):S108-13. Review.

Rueda D, Navarro B, Martinez-Serrano A, Guzman M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J Biol Chem.* (2002). 277(48):46645-50.

Rutkowska M, Jachimczuk O. Antidepressant-like properties of ACEA(arachidonyl-2-chloroethylamide), the selective agonist of CB1 receptors. *Acta Pol Pharm.* (2004). 61(2):165-7.

Ryan WJ, Banner WK, Wiley JL, Martin BR, Razdan RK. Potent anandamide analogs: the effect of changing the length and branching of the end pentyl chain. *J Med Chem.* (1997). 40(22):3617-25.

Ryberg E, Vu HK, Larsson N, Groblewski T, Hjorth S, Elebring T, Sjogren S, Greasley PJ. Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1receptor. *FEBS Lett.* (2005). 579(1), 259-264.

Sanchis-Segura C, Cline BH, Marsicano G, Lutz B, Spanagel R. Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice. *Psychopharmacology (Berl).* (2004). 176(2):223-32

Sánchez C, Pérez M, Avila J. GSK3beta-mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2C (MAP2C) prevents microtubule bundling. *Eur J Cell Biol.* (2000). 79(4):252-60

Sasso O, Moreno-Sanz G, Martucci C, Realini N, Dionisi M, Mengatto L, Duranti A, Tarozzo G, Tarzia G, Mor M, Bertorelli R, Reggiani A, Piomelli D. Antinociceptive effects of the N-acylethanolamine acid amidase inhibitor ARN077 in rodent pain models. *Pain.* (2012). [Epub ahead of print]

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

- Schäbitz WR, Giuffrida A, Berger C, Aschoff A, Schwaninger M, Schwab S, Piomelli D. Release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke: a microdialysis study. *Stroke*. (2002). 33(8):2112-4.
- Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. (1965). 122(5):509-22. Review.
- Schlaepfer TE, Cohen MX, Frick C, Kosel M, Brodesser D, Axmacher N, Joe AY, Kreft M, Lenartz D, Sturm V. Deep brain stimulation to reward circuitry alleviates anhedonia in refractory major depression. *Neuropsychopharmacology*. (2008). 33(2):368-77.
- Schlicker E, Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci*. (2001). 22(11):565-72. Review.
- Schmid HH. Pathways and mechanisms of N-acylethanolamine biosynthesis: can anandamide be generated selectively? *Chem Phys Lipids*. (2000). 108(1-2):71-87. Review.
- Schomacher M, Müller HD, Sommer C, Schwab S, Schäbitz WR. Endocannabinoids mediate neuroprotection after transient focal cerebral ischemia. *Brain Res*. (2008). 1240:213-20.
- Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, Giuffrida A. N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem Phys Lipids*. (2002). 121(1-2):211-27. Review.
- Scuderi C, Valenza M, Stecca C, Esposito G, Carratù MR, Steardo L. Palmitoylethanolamide exerts neuroprotective effects in mixed neuroglial cultures and organotypic hippocampal slices via peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *J Neuroinflammation*. (2012). 9:49.
- Seltzman HH, Fleming DN, Thomas BF, Gilliam AF, McCallion DS, Pertwee RG, Compton DR, Martin BR. Synthesis and pharmacological comparison of dimethylheptyl and pentyl analogs of anandamide. *J Med Chem*. (1997). 40(22):3626-34.
- Sheerin AH, Zhang X, Saucier DM, Corcoran ME. Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia*. (2004). 45(10):1184-8.
- Shoaib M, Gommans J, Morley A, Stoleran IP, Grailhe R, Changeux JP. The role of nicotinic receptor beta-2 subunits in nicotine discrimination and conditioned taste aversion. *Neuropharmacology*. (2002). 42(4):530-9.
- Smart D, Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Fowler CJ. 'Entourage' effects of N-acyl ethanolamines at human vanilloid receptors. Comparison of effects upon anandamide-induced vanilloid receptor activation and upon anandamide metabolism. *Br J Pharmacol*. (2002). 136(3):452-8.

- Soetanto A, Wilson RS, Talbot K, Un A, Schneider JA, Sobiesk M, Kelly J, Leurgans S, Bennett DA, Arnold SE. Association of anxiety and depression with microtubule-associated protein 2- and synaptopodin-immunolabeled dendrite and spine densities in hippocampal CA3 of older humans. *Arch Gen Psychiatry*. (2010). 67(5):448-57.
- Solinas M, Scherma M, Fattore L, Stroik J, Wertheim C, Tanda G, Fratta W, Goldberg SR. Nicotinic alpha 7 receptors as a new target for treatment of cannabis abuse. *J Neurosci*. (2007). 27(21):5615-20.
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. (2000). 97(2):253–266.
- Spano MS, Fattore L, Cadeddu F, Fratta W, Fadda P. Chronic cannabinoid exposure reduces phencyclidine-induced schizophrenia-like positive symptoms in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*. (2012). 225(3):531-42.
- Spokes EG., Garrett NJ, Rossor MN, Iversen LL. Distribution of GABA in post-473 mortem brain tissue from control, psychotic and Huntington's chorea subjects. *Journal of the Neurological Sciences*. (1980). 303–313. 475
- Steffens M, Feuerstein TJ. Receptor-independent depression of DA and 5-HT uptake by cannabinoids in rat neocortex--involvement of Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase. *Neurochem Int*. (2004). 44(7):529-38.
- Steiner G. Atherosclerosis in type 2 diabetes: a role for fibrate therapy? *Diab Vasc Dis Res*. (2007). 4 (4): 368–74.
- Steiner MA, Wotjak CT. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Brain Res*. (2008). 170:397-432. Review.
- Stella N, Piomelli D. Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol*. (2001). 425:189-196.
- Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res*. (2007). 2007:95974.
- Suardíaz M, Estivill-Torrús G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F. Analgesic properties of oleylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain*. (2007). 15;133(1-3):99-110.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. (2002). 66(2-3):173-92. Review.

- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* (1995). 215(1):89-97.
- Sugiura T, Waku K. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem.* (2002). 132(1):7-12. Review.
- Sun Y, Alexander SP, Kendall DA, Bennett AJ. Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem Soc Trans.* (2006). 34(Pt 6):1095-7.
- Sun Y, Bennett A. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res.* (2007). 2007:23513.
- Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I *et al.* Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J.* (2004). 380:749-756.
- Thabuis C, Tissot-Favre D, Bezelgues JB, Martin JC, Cruz-Hernandez C, Dionisi F, Destailats F. Biological functions and metabolism of oleoylethanolamide. *Lipids.* (2008). 43(10):887-94. Review.
- Thase ME. Treatment of recurrent depression: an alternate viewpoint. *CNS Drugs.* (2003). 17(15):1119-22. Review.
- Thompson Ray M, Weickert CS, Wyatt, Webster JB. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. *Psychiatry Neurosci.* (2011). 36(3):195-203.
- Tizabi Y, Getachew B, Rezvani AH, Hauser SR, Overstreet DH. Antidepressant-like effects of nicotine and reduced nicotinic receptor binding in the Fawn-Hooded rat, an animal model of co-morbid depression and alcoholism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (2009). 33(3):398-402.
- Tizabi Y, Overstreet DH, Rezvani AH, Louis VA, Clark E Jr, Janowsky DS, Kling MA. Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl).* (1999). 142(2):193-9.
- Tripp A, Oh H, Guilloux JP, Martinowich K, Lewis DA, Sibille E. Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. *Am J Psychiatry.* (2012). 169(11):1194-202.
- Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* (1993). 44:463-9.

- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. (1998). 83(2):393-411.
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem*. (1995). 270(40):23823-7.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brain stem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. (2005). 310(5746):329-32.
- Vaughn LK, Denning G, Stuhr KL, de Wit H, Hill MN, Hillard CJ. Endocannabinoid signalling: has it got rhythm? *Br J Pharmacol*. (2010). 160(3):530-43. Review
- Vázquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H, Velázquez-Moctezuma J. Antidepressant effects of nicotine and fluoxetine in an animal model of depression induced by neonatal treatment with clomipramine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. (2005). 29(1):39-46.
- Velenovská M, Fisar Z. Effect of cannabinoids on platelet serotonin uptake. *Addict Biol*. (2007). 12(2):158-66.
- Vyas A, Bernal S, Chattarji S. Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Res*. (2003). 965(1-2):290-294.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. (2002). 22(15):6810-6818.
- Wamsteeker JI, Kuzmiski JB, Bains JS. Repeated stress impairs endocannabinoid signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*. (2010). 30(33):11188-96.
- Wang W, Sun D, Pan B, Roberts CJ, Sun X, Hillard CJ, Liu QS. Deficiency in endocannabinoid signaling in the nucleus accumbens induced by chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology*. (2010). 35(11):2249-61.
- Wang X, Miyares RL, Ahern GP. Oleoylethanolamide excites vagal sensory neurons, induces visceral pain and reduces short-term food intake in mice via capsaicin receptor TRPV1. *J Physiol*. (2005). 564(Pt 2):541-7.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS. VEGF as a potential target for therapeutic intervention in depression. *Curr Opin Pharmacol*. (2008). 8(1):14-9. Review.

Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem.* (2006). 281(48):36569-78.

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

Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron.* (2001). 31(3):453-62.

Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK. Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1970). 66(4):1206-12.

Yang C, Wang G, Wang H, Liu Z, Wang X. Cytoskeletal alterations in rat hippocampus following chronic unpredictable mild stress and re-exposure to acute and chronic unpredictable mild stress. *Behav Brain Res.* (2009). 205(2):518-24.

Yu HL, Deng XQ, Li YJ, Li YC, Quan ZS, Sun XY. N-palmitoylethanolamide, an endocannabinoid, exhibits antidepressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice. *Pharmacol Rep.* (2011). 63:834-839.

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

Zhang B, Berger J, Zhou G; Elbrecht A; Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE. Insulin- and mitogen activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* (1996). 271(50), 31771-31774