

Tesis Doctoral

*Potencial del Cannabidiol para la terapia
antidepresiva rápida: evidencias conductuales,
neuroquímicas, moleculares y celulares. Implicación
de los sistemas serotoninérgico y glutamatérgico*



Raquel Linge Méndez

2015

Directores: Álvaro Díaz y Ángel Pazos





Tesis Doctoral

*Potencial del Cannabidiol para la terapia
antidepresiva rápida: evidencias conductuales,
neuroquímicas, moleculares y celulares. Implicación
de los sistemas serotoninérgico y glutamatérgico*

Raquel Linge

2015

Directores: Álvaro Díaz y Ángel Pazos



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Departamento de Fisiología y Farmacología
Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria

D. Álvaro Díaz Martínez, y D. Ángel Pazos Carro, Profesor Titular y Catedrático de Universidad respectivamente, ambos del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN:

Dña. Raquel Linge Méndez ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de tesis doctoral titulado: "Potencial del Cannabidiol para la terapia antidepresiva rápida: evidencias conductuales, neuroquímicas, moleculares y celulares. Implicación de los sistemas serotoninérgico y glutamatérgico".

Consideramos que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado por la interesada, con objeto de poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

En Santander, a 23 de Abril de 2015

A stylized, handwritten signature in blue ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo:

Álvaro Díaz Martínez

A stylized, handwritten signature in blue ink, featuring a large, bold 'A' followed by a series of loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Ángel Pazos Carro

Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el laboratorio de *Bases Neurobiológicas del Mecanismo de Acción de Compuestos que actúan a nivel del Sistema Nervioso Central*, del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria y del Departamento de Fisiología y Farmacología, de la Universidad de Cantabria, bajo la dirección de los Drs. Álvaro Díaz Martínez y Ángel Pazos Carro, entre diciembre 2010 y Abril de 2015.

Este trabajo ha sido financiado por:

- Universidad de Cantabria (UC) puesto que Raquel Linge Méndez ha sido una Investigadora Contratada Predoctoral del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) (CSIC-UC-Sodercan).
- Ministerio de Ciencia (SAF07-61862), y Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-25020), de España.
- Centro de Investigación Biomédica en red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto Carlos III.
- Las colaboraciones científicas del presente trabajo fueron realizadas y cofinanciadas por los laboratorios del:
 - Dr. Patrick Doherty y Dra. Giovanna Lalli en el *Wolfson Centre for Age-related Diseases* del *King's College London University of London* (Londres, Reino Unido).
 - Dr. Albert Adell en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB) (CSIC-IDIBAPS) del Hospital Clínic de Barcelona (Barcelona, España).

A Josefita

*“En la vida no hay cosas que temer
sino cosas que comprender”*

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias de todo corazón a aquellas personas que han estado a mi lado en un momento u otro de esta etapa tan genial de mi vida que ha sido la tesis. Todos vosotros habéis sido fundamentales en mi crecimiento tanto personal como profesional, y habéis sabido rescatarme en los momentos difíciles. Gracias porque habéis conseguido que me lleve el recuerdo más bonito que me podría llevar.

En el ámbito profesional, quiero dar las gracias en primer lugar a mis directores Álvaro y Ángel por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en vuestro grupo. A Álvaro, por enseñarme tantísimas cosas con el máximo cariño y buen humor. Por confiar plenamente en mis capacidades desde el primer día, escuchar mis opiniones, y permitir que me desarrolle como investigadora. A Ángel por lo todo lo que he podido aprender de ti siendo en todo momento un ejemplo de justicia, cercanía y humanidad. Por enseñarme que la mejor manera de dirigir a las personas es haciéndolas sentir bien. Daros las gracias a ambos por lo muchísimo que me habéis enseñado, pero sobre todo por lo valorada que me habéis hecho sentir.

Quisiera dar las gracias a Elena y a Elsa, que en cierto modo también habéis sido mis directoras. Porque no habéis dudado en enseñarme todo lo que estuviera en vuestra mano siempre que ha hecho falta, por los apasionantes debates científicos y especialmente por lo arropada que me he sentido por vuestro cariño todos estos años.

Como no podía ser de otra manera quiero agradecer de todo corazón a mis compis de laboratorio vuestra ayuda, risas, trabajo en cadena, bailoteos mientras pipeteamos y después de pipetear (en marcos de puertas)... Ha sido tan divertido aprender a vuestro lado que hasta recuerdo las crisis con una sonrisa. En primer lugar, quiero dar las gracias a Beita, que además de ser la mejor maestra y compañera en lo profesional, has sido mi gran apoyo día tras día. Por ser mi “gemelilla rubia”, pero sobre todo gracias por darme lo más valioso, tu amistad. A Fuen, mi mentora inagotable, la persona más servicial del mundo y la más cariñosa, eso sí, a tu manera. A Rebe, por tu carácter alegre y tranquilizador, por tus maravillosos consejos y por no perder nunca la paciencia. Gracias porque las tres habéis sido mis pilares y ejemplo a seguir en el laboratorio, además de grandes amigas.

Dar las gracias a todos lo que estuvieron mucho tiempo a mi lado en el labo y que se fueron antes que yo obligándome a echarles de menos. A Vero por las

conversaciones infinitas y reparadoras, y por las noches inolvidables. A Helen por matarme de la risa con tus ocurrencias. A Beatriz por cuidarme tanto con tu cariño y comprensión. A la Madureira por haberme apoyado cuando más lo necesitaba. A Pepi, por tus valiosas enseñanzas de la vida. A Lourdes por tu simpatía y cariño. A Seve, por tu paciencia y sentido del humor. A Alicia, por tu ayuda y amabilidad. Al resto de compañeros, alumnos de prácticas y a los que estuvieron de estancia con nosotros, muchas gracias por el tiempo tan estupendo que compartí con vosotros.

Quiero dar las gracias muy especialmente a las nuevas generaciones que consiguen con su carácter que ir a trabajar resulte tan apetecible. A Emilio por todo el cariño que me has dado y porque siempre me haces sonreír, a Josep por tu bondad e inocencia, a Dalia porque eres un encanto, a Rubén por salvarme la vida constantemente, a Alba y a Paula por vuestra amabilidad e ilusión. Gracias por el buen ambiente que se respira en vuestra compañía.

Durante estos años he tenido la suerte de colaborar con otros grupos donde, además de poder ver la ciencia desde perspectivas diferentes, he encontrado grandes personas. Muchísimas gracias Albert por darme la oportunidad de aprender de tu brillante manera de investigar. Por supuesto, a Laura que con tu pasión por la ciencia y ese súper equipo que formamos, conseguiste rescatar mi motivación cuando andaba escurridiza. Estoy en deuda con la ciencia por haberme regalado una gran amiga. Dar las gracias también a toda la gente del Hospital Clínic, especialmente a Marc, Leti y Jaramillo por vuestra ayuda, y a todos los demás porque me hicisteis sentir como en casa.

I really want to thank D. Patrick Doherty and D. Giovanna Lalli for welcoming me in their lab. For giving me all the facilities to learn from you and for making me feel part of your group. I want to express my gratefulness to my lab mates for all the help, Kasia, Prav, Fiona, Zhou Ya, Rachel...and especially to Martina for being so patient helping me anytime. Of course, I want to thank all the people at Wolfson for being so kind to me and making my stay in London unforgettable, Chris, Sean, Andrew... It's a pleasure having met you all.

También me gustaría dar las gracias a toda gente que he tenido la suerte de conocer en la Facultad de Medicina, donde he encontrado personas maravillosas. En especial, al Departamento de Fisiología y Farmacología, porque siempre os habéis mostrado dispuestos a ayudar; becarios, administrativos, técnicos y profesores, gracias por vuestra infinita amabilidad. Al personal del SEEA donde he pasado largas horas, pero que sin duda fueron mucho más llevaderas gracias a vuestra ayuda. Me gustaría también agradecer a la gente del IBBTEC todo el tiempo

que hemos compartido: la mudanza, los seminarios científicos, las comidas en la mejor compañía... Ha sido muy enriquecedor rodearme de gente como vosotros.

Fuera del ámbito laboral, me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que han sido imprescindibles para sobrevivir a la tesis.

Quisiera dar las gracias muy especialmente a mi familia no biológica, mis amigas. Porque hemos vivido tantas cosas juntas que soy transparente para vosotras y, aún con todos mis defectos, no dejáis de hacerme sentir tan querida. Agradeceros que siempre estéis ahí para reírnos de absolutamente todo, llorar cuando toca y vivir miles de aventurillas para el recuerdo. Laura, ¿qué le voy a decir que no sepa a la uña de mi carne?, gracias por tu gran corazón y entrega incondicional a la amistad, Garazi por tu cariño sin adornos y tu genial honestidad, Azara por hacer el mundo más dulce y por seguir siendo mi *zipi*, Itziar poner un poquito de cordura y por tu subjetividad para estar siempre a mi favor. Gracias porque no existen mejores compañeras de viaje.

Quiero dar las gracias también a esos amigos que han aparecido o reaparecido en mi vida a lo largo de la tesis. Por los grandes momentos que hemos vivido juntos, por todo vuestro apoyo y por las risas interminables, gracias Gorka, Miren, Ekain, Asier... Me siento muy afortunada de contar con vosotros. También a mis compis de salsa con quienes tanto me he divertido y relajado bailando.

Agradecer a los familiares biológicos y políticos todo su cariño, y especialmente a mis abuelos, para quienes siempre seré su Raquelita y nunca entenderán que sea Doctora pero no prescriba.

Y por último, he dejado para el final a quienes sin duda han sido siempre y siguen siendo los pilares más importantes para mí. Me faltan palabras para poder agradecerlos **Amatxu, Aitatu, Idoia y Javi**, vuestro apoyo incondicional. Porque siempre tenéis fe en todo lo que hago, a veces más de la que yo misma tengo, y eso me obliga a intentar todo lo que me propongo. Gracias por creer en mí ciegamente, es el mejor colchón que se puede tener ante cualquier caída. Dar las gracias a mis padres por haberme enseñado lo más importante, los valores que me han convertido en quien soy. Amatu por tu gran corazón y coraje, Aitatu por tu sencillez y serenidad. Dar las gracias a mis hermanos por protegerme siempre y por vuestra complicidad. Idoyita por ser ejemplo de valentía y perseverancia, Javitu por tu nobleza e integridad, porque crecer a vuestro lado es el mejor regalo.

Gracias a los cuatro por vuestro cariño, paciencia, generosidad, sentido del humor... Esta tesis os la debo y os la dedico a vosotros como todo lo demás, y en especial a mi Amatu, por haberme transmitido tu ilusión e inquietud infinitas por aprender.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2-Araquidonilglicerol

4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein

5-HIAA: Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT: Serotonina

5-HTT: Transportador de serotonina

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

AEA: Anandamida

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

Akt: Proteína quinasa B

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AP: Anteroposterior

BDNF: Brain derived neurotrophic factor

BLA: Amígdala basolateral

CBD (50+10): Cannabidiol 50 mg/kg 3 días + 10 mg/kg 11 días

CBD: Cannabidiol

COX: Cicloxigenasa

CREB: cAMP response element-binding protein

CRF: Factor liberador de corticotropina

CUS: Stress crónico impredecible

DA: Dopamina

DG: Giro dentado

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DRN: Núcleos del rafe dorsal

DSM: Manual diagnóstico y estadístico de enfermedades mentales

DV: Dorsoventral

eCB: Endocannabinoide

ECT: Terapia electroconvulsiva

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

FAAH: Fatty acid amide hydrolase

Fig.: Figure

FST: Forced swimming test

GABA: Gamma-aminobutyric acid

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP: Green fluorescent protein

GFP: Green fluorescent protein

GTPγS: Guanosine 5'-O-[gamma-thio] triphosphate

HPA: Eje hipotalámico pituitario adrenal

HPLC: High-performance liquid chromatography

i.p.: Intraperitoneal

IP3: Inositol trifosfato

JNK: c-Jun N-terminal

KO: Knock out

L: Lateral

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MAO: Monoaminoxidasa

MAOI: Inhibidores de la enzima monoamino oxidasa

MAP: Mitogen-activated protein

MHPG: 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol

mPFCx: Corteza prefrontal medial

MRN: Núcleos del rafe medio

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

mTOR: mammalian target of Rapamycin

NE: Noradrenalina

NRIs: Inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina

NSF: Novelty suppressed feeding test

O.D.: Densidad óptica

OBX: Bulbectomía olfatoria bilateral

OFT: Open field Test

p: fosforilado

P2-3: crías de 2-3 días de edad

P70: P70 ribosomal serine/threonine kinase

PFA: Paraformaldehído

PFCx: Corteza prefrontal

PI3K: phosphatidylinositol-3 quinasa

PLC: Fosfolipasa C

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PSD95: Postsynaptic density protein-95

RMS: Corriente migratoria rostral

RNA: Ácido ribonucleico

S.E.M: Error medio estándar

SGZ: Zona subgranular

SNC: Sistema nervioso central

SNRIs: Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina

SSRIs: Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

SVZ: Zona subventricular

TCAs: Antidepresivos tricíclicos

TrkB: Tropomyosin receptor kinase B

TRPV1: Transient receptor potential cation channel subfamily Vanilloid type 1.

vmPFCx: corteza prefrontal ventromedial

Δ 9-THC: 9-delta-tetrahidrocannabinol

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. DEPRESIÓN	3
1.1. Aspectos generales de la enfermedad	3
1.2. Etiología de la depresión	5
1.2.1. Factores genéticos y epigenéticos	6
1.2.2. Hipótesis etiológicas	8
1.2.2.1. Hipótesis monoaminérgica	8
<i>Papel del receptor 5-HT_{1A} en la depresión y los efectos antidepresivos</i>	12
1.2.2.2. Hipótesis neuroendocrina	16
1.2.2.3. Hipótesis neurotrófica-neurogenética	19
1.2.2.4. Hipótesis glutamatérgica	25
1.3. Modelos animales de depresión	29
1.3.1. Modelo de la bulbectomía olfatoria bilateral	29
1.3.1.1. Influencia del aislamiento social sobre el síndrome de la bulbectomía olfatoria	32
1.4. Fármacos antidepresivos	33
2. CANNABINOIDES Y DEPRESIÓN	36
2.1. Sistema Endocannabinoide	36
2.2. El sistema endocannabinoide en la patología depresiva	41
2.2.1. Efectos sobre la depresión de la modulación farmacológica del sistema endocannabinoide	44
2.2.2. Posibles mecanismos bioquímicos subyacentes al efecto antidepresivo de los cannabinoides	45

2.3. Cannabidiol.....	50
2.3.1. Aspectos Farmacocinéticos	50
2.3.1.1. Absorción.....	50
2.3.1.2. Distribución	51
2.3.1.3. Metabolismo y eliminación	51
2.3.2. Interacciones farmacológicas.....	52
2.3.3. Aspectos farmacodinámicos	53
2.3.3.1. Acciones farmacológicas	53
2.3.3.2. Mecanismo de acción	54
2.3.4. Seguridad en pacientes	58
2.3.5. Ensayos clínicos y perspectivas futuras.....	58
2.3.6. Evidencias de la posible eficacia antidepresiva del Cannabidiol	59
 <u>OBJETIVOS</u>.....	63
 OBJETIVOS	65
 <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	67
 1. Animales	69
2. Grupos experimentales	70
3. Tratamientos farmacológicos	70
4. Fármacos y Reactivos	71
5. Modelo de bulbectomía olfatoria bilateral.....	73
6. Estudios conductuales.....	74

Open field test.....	74
Novelty supressed feeding	74
Forced swimming test	75
Sucrose preference test / Sucrose intake test	76
Análisis de datos conductuales	77
7. Microdiálisis cerebral <i>in vivo</i>	77
7.1. Construcción de sondas de microdiálisis	77
7.2. Implantación de las sondas de microdiálisis	78
7.3. Obtención de muestras	79
7.4. Administración de fármacos durante la microdiálisis	80
7.5. Análisis de las muestras de dializado	80
7.6. Comprobación de la posición de las sondas	82
7.7. Análisis de datos de microdiálisis	82
8. Estudios de autorradiografía funcional de receptores en Sistema Nervioso Central	83
8.1. Obtención de secciones cerebrales de tejido para los estudios de autorradiografía funcional.....	83
8.2. Autorradiografía funcional del receptor 5-HT _{1A} : estimulación de la fijación de [³⁵ S]GTPγS por el agonista 5-HT _{1A} 8-OH-DPAT	83
8.3. Autorradiografía funcional del receptor CB ₁ : estimulación de la fijación de [³⁵ S]GTPγS por el agonista CB ₁ WIN552122	84
8.4. Generación de los autorradiogramas	85
8.5. Análisis de los datos de los autorradiogramas.....	85
9. Estudios de hibridación <i>in situ</i> del receptor TrkB y del BDNF	86
9.1. Pretratamiento de los tejidos para la hibridación <i>in situ</i>	86
9.2. Marcado de la sonda.....	86

9.3. Purificación de la sonda	87
9.4. Ensayo de hibridación	87
9.5. Protocolo para el buffer de hibridación de oligonucleótidos	88
9.6. Lavado de los portas	88
9.7. Cuantificación densitométrica y análisis estadístico	89
10. Estudios de expresión de proteínas: Western-Blot.....	89
10.1. Preparación de tejidos.....	89
10.2. Preparación de geles de acrilamida	90
10.3. Electroforesis y transferencia a membrana de las proteínas	90
10.4. Bloqueo y marcaje con anticuerpos.....	91
10.5. Cuantificación densitométrica y análisis estadístico	92
11. Estudios de morfología y migración de neuroblastos en la corriente migratoria rostral	92
11.1. Electroporación postnatal <i>in vivo</i>	92
11.2. Tratamientos farmacológicos	93
11.3. Inmunohistoquímica de GFP en secciones embebidas en gelatina para el estudio morfológico de neuroblastos	94
11.3.1. Inclusión de cerebros en gelatina	94
11.3.2. Inmunohistoquímica de GFP.....	94
11.3.3. Análisis de las imágenes de inmunohistoquímica	95
11.4. Estudios de migración de neuroblastos.....	95
11.4.1. Cultivos de secciones de cerebro	95
11.4.2. <i>Time-lapse imaging</i> en secciones de cerebro mediante microscopía confocal de disco rotatorio	96
11.4.3. Análisis del <i>time-lapse imaging</i> en secciones de cerebro	96

RESULTADOS.....97

A. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL MODELO DE DEPRESIÓN ANIMAL: BULBECTOMÍA OLFATORIA BILATERAL..... 99

Open field test..... 100

Novelty Supressed Feeding 102

Forced Swimming Test..... 103

Sucrose Intake Test 105

B. EFECTOS CONDUCTUALES, NEUROQUÍMICOS, MOLECULARES Y CELULARES DEL CANNABIDIOL 106

Estudios Preliminares para la optimización de la pauta de dosificación del Cannabidiol..... 107

- *Estudio de la administración de cannabidiol 10 mg/kg..... 108*

 Efectos agudos de Cannabidiol 10 mg/kg 108

 Efectos de la administración crónica de Cannabidiol 10 mg/kg 109

- *Administración de Cannabidiol 10 mg/kg con dosis inicial de 50 mg/kg 112*

Efectos farmacológicos del Cannabidiol..... 114

B.1. ESTUDIOS CONDUCTUALES..... 114

Forced swimming test..... 114

Open field test 115

 Efecto agudo de la administración de Cannabidiol 50 mg/kg. 115

 Efecto subagudo-crónico del Cannabidiol (50 - 10 mg/kg)..... 116

Sucrose preference test..... 118

 Efectos sobre el apetito de Cannabidiol 50 mg/kg 119

<i>B.2. ESTUDIO LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN CORTEZA PREFRONTAL TRAS LA ADMINISTARCIÓN DE CANNABIDIOL</i>	<i>121</i>
Efectos agudos del cannabidiol sobre la liberación de serotonina y glutamato	121
Efectos del Cannabidiol tras la administración crónica sobre la liberación de serotonina y glutamato.....	123
 <i>B.3. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT_{1A} Y CB₁ TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON CANNABIDIOL</i>	<i>126</i>
Autorradiografía funcional del receptor serotoninérgico 5-HT _{1A} ..	126
Autorradiografía funcional del receptor cannabinoide CB ₁	128
 <i>B.4. ESTUDIO POR WESTERN BLOT DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR Y PLASTICIDAD NEURONAL .</i>	<i>130</i>
Análisis de marcadores en corteza prefrontal	130
Análisis de marcadores en hipocampo	133
 <i>B.5. ESTUDIO POR HIBRIDACIÓN IN SITU DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA PARA BDNF Y TrkB.....</i>	<i>134</i>
 <i>B.6. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA Y PROCESOS DINÁMICOS DE LA CORRIENTE MIGRATORIA ROSTRAL TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE CANNABIDIOL.....</i>	<i>136</i>
Inmunohistoquímica de GFP.....	136
Análisis de la migración de neuroblastos mediante time-lapse imaging.....	139

C. ESTUDIOS DE FARMACODINAMIA DEL CANNABIDIOL	141
<i>C.1. ESTUDIOS DE ANTAGONISMO FARMACOLÓGICO DE LOS EFECTOS ANTIDEPRESIVOS DEL CBD</i>	<i>142</i>
<i>C.2. ANTAGONISMO FARMACOLÓGICO DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES IN VIVO</i>	<i>145</i>
<u>DISCUSIÓN</u>	151
 A. INFLUENCIA DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE EL SÍNDROME DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA EN RATÓN	153
 B. EFECTOS DE TIPO ANTIDEPRESIVO DEL CANNABIDIOL: ASPECTOS CONDUCTUALES, NEUROQUÍMICOS, MOLECULARES Y CELULARES.....	158
- Efectos conductuales del cannabidiol	158
- Alteraciones de tipo neuroquímico inducidas por el Cannabidiol.....	161
- Consecuencias moleculares del tratamiento con Cannabidiol.....	167
- Acciones celulares inducidas por el Cannabidiol sobre los procesos neurotróficos: morfología y migración de neuroblastos	170
 C. MECANISMO DE ACCIÓN FARMACOLÓGICO DEL CANNABIDIOL	172
- Papel crucial del receptor 5-HT _{1A} en las acciones antidepresivas rápidas del Cannabidiol <i>in vivo</i>	172
- Hipótesis farmacodinámica de los efectos antidepresivos del Cannabidiol	176

CONCLUSIONES179

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS..... 181

BIBLIOGRAFÍA183

BIBLIOGRAFÍA 185

MATERIAL SUPLEMENTARIO.....221

ESTUDIOS IN VITRO DE LA FARMACODONAMIA DEL CANNABIDIOL
MEDIANTE TÉCNICAS DE FIJACIÓN DE RADIOLIGANDOS.....223

ANEXOS233

- *THESIS SUMMARY: Cannabidiol potential for fast-antidepressant therapy: behavioural, neurochemical, molecular and cellular evidences. Implication of serotonergic and glutamatergic systems*
- *PUBLICACIONES*

INTRODUCCIÓN

1. DEPRESIÓN

1.1. Aspectos generales de la enfermedad

Ya en la antigüedad se hizo referencia a la depresión en numerosos tratados médicos, aunque fue en el siglo IV a. de C., cuando el filósofo Hipócrates acuñó el término *melancolía* (bilis negra) para describir esta enfermedad. El término depresión llegaría en el año 1725 de la mano de Sir Richard Blackmore, aunque la definición del cuadro al que representa, ha variado enormemente hasta dar lugar a lo que hoy en día conocemos como tal.

En la actualidad, este trastorno afectivo representa uno de los desórdenes mentales más extendido a nivel mundial y se estima que en los países desarrollados la prevalencia puede llegar a ser del 21% (Cryan et al., 2002), siendo casi dos veces más común en mujeres que en hombres. Se trata de una enfermedad recurrente, y que con frecuencia no se diagnostica y trata de forma correcta, pues sólo el 25% de los enfermos con depresión tiene acceso a un tratamiento adecuado (OMS, 2011). Además, constituye la primera causa de incapacidad laboral y social, constituyendo un verdadero problema para el enfermo y la sociedad. El coste anual de esta patología resulta muy elevado tanto por los tratamientos médicos como por la pérdida de productividad laboral. Un factor de gravedad sobreañadido es el riesgo de suicidio, que se estima en un 15%.

La OMS define la depresión como una enfermedad mental caracterizada por tristeza, pérdida de interés o placer, sentimientos de culpa o baja autoestima, alteraciones del sueño y del apetito, sentimiento de cansancio y baja concentración.

El Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV) establece los criterios diagnósticos y define un episodio de depresión mayor como aquel caracterizado por la presencia de al menos cinco de los síntomas descritos a continuación. Cada uno debe ser evidente diariamente o al menos cada día durante dos

semanas. La severidad es juzgada como leve, moderada o severa, basándose en el grado de incapacidad diaria ocupacional y social.

- 1) Bajo estado de ánimo (tristeza o falta de empatía) durante buena parte o prácticamente todo el día, manifestado por el propio individuo o por sus allegados.
- 2) Disminución del interés o presencia de anhedonia, durante la mayor parte del día o todo el día.
- 3) Insomnio o hipersomnia casi todo el día.
- 4) Agitación o alteración motora durante casi todo el día.
- 5) Fatiga o pérdida de energía durante casi todo el día.
- 6) Sentimientos de inutilidad o culpa excesivos o inapropiados (incluso delirantes), también de forma constante.
- 7) Incapacidad para pensar o concentrarse o indecisión.
- 8) Pensamientos recurrentes de muerte, ideas de auto-lesión con o sin un plan específico o intento de auto-lesión.

La reciente revisión de este Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-V) incluye nuevos tipos de trastornos depresivos (trastorno disruptivo de desregulación emocional, trastorno disfórico premenstrual y trastorno depresivo persistente) pero siguen vigentes estos criterios diagnósticos y el requisito de duración de al menos dos semanas. Además, se proporcionan guías al clínico para evaluar el pensamiento suicida, planes, y la presencia de otros factores de riesgo para destacar la prevención del suicidio en el tratamiento.

Tradicionalmente, y conforme a la diferente sintomatología presentada, se han definido varios subtipos de depresión. No obstante, no existe evidencia alguna de que estos subtipos reflejen algo más que diferentes estados subyacentes de la enfermedad (Nestler et al., 2002). Los diferentes subtipos de depresión son:

- Unipolar: también conocida como depresión mayor. Es la más frecuente y su prevalencia es dos veces mayor en mujeres que en hombres.

- Bipolar: implica la presencia de episodios maníacos (delirio general, euforia, etc.) junto a los depresivos.
- Depresión psicótica: asociada a psicosis, suele ir acompañada de alucinaciones auditivas.
- Distimia: síntomas menores y de buen pronóstico.
- Depresión atípica: forma leve de depresión caracterizada por alteraciones del sueño y del apetito.

Pese a los avances de los últimos 50 años, continúan sin esclarecerse por completo tanto la neurobiología de las alteraciones afectivas como los mecanismos de acción terapéutica de los antidepresivos, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas así como profundizar en el estudio de estos mecanismos de acción.

1.2. Etiología de la depresión

A pesar de muchos años de intensa actividad investigadora y de utilización terapéutica de los fármacos antidepresivos, hoy en día siguen sin conocerse con exactitud las bases etiopatogénicas de la depresión, y cuál es el mecanismo determinante de la eficacia clínica de los antidepresivos. Esto se debe a varias razones, en primer lugar el estudio del cerebro resulta más complejo que el de otros órganos ya que las únicas herramientas de las que disponemos para su investigación son los modelos animales de depresión con las enormes limitaciones que presentan, el empleo de tejidos post-mortem de pacientes deprimidos (diagnóstico psiquiátrico establecido, correcto emparejamiento, presencia o no de fármacos antidepresivos), y las técnicas de neuroimagen *in vivo*, de escasa utilización en este campo. Además, se trata de una enfermedad de origen idiopático y muchas veces su estudio queda limitado a la asociación con diferentes factores de riesgo que podrían desencadenar la enfermedad (ej. exposición sostenida a episodios de estrés), aunque no se ha logrado encontrar ninguna asociación genética potente entre la enfermedad y estos factores de riesgo presentes en el ambiente. Todo ello, ha contribuido a que los hallazgos

biológicos en la enfermedad depresiva sean heterogéneos y a menudo contradictorios.

1.2.1. Factores genéticos y epigenéticos

Se estima que la depresión posee una alta heredabilidad (31-42 %) (Fava and Kendler, 2000; Kendler et al., 2006; Sanders et al., 1999; Sullivan et al., 2000), a pesar de que los estudios genéticos de ligamiento y de asociación no han sido capaces de identificar genes que determinen una susceptibilidad fuerte y consistente a padecer depresión mayor (Krishnan and Nestler, 2008). Esto se debe, en parte, a que se trata de una patología multifactorial donde intervienen diversos genes de riesgo (Lopez-Leon et al., 2008). Puesto que la patología depresiva está fuertemente asociada a déficits de los sistemas monoaminérgicos, aquellos genes que codifican para el transportador de serotonina (5-HTT) (SLC6A4), para la enzima monoamino oxidasa A (MAOA), la triptófano hidroxilasa-2 (TPH2), el receptor de serotonina 5-HT_{1A} y la enzima catecol-O-metil-transferasa (COMT), han sido estudiados en numerosas ocasiones, dando lugar a resultados que sugieren que estos genes modelan el cerebro y determinan la susceptibilidad a la depresión (López-Muñoz, 2011). Se ha demostrado que algunas regiones cerebrales, tales como el hipocampo, la amígdala, el córtex cingulado anterior, y la corteza orbitofrontal, se encuentran bajo la influencia de las variantes génicas relacionadas con la depresión (Price and Drevets, 2010). Cada uno de estos sistemas ofrece una diana biológicamente plausible para la selección potencial de genes y polimorfismos candidatos que afectan tanto a la depresión como a la respuesta a fármacos antidepresivos, haciendo necesaria la identificación de múltiples genes para generar un mapa completo de la variabilidad genética implicada en la patología.

Del mismo modo, los factores no genéticos que son aquellos factores del ambiente que actúan como desencadenantes de la patología, resultan de gran importancia. Entre éstos, podemos encontrar elementos como el estrés, los procesos traumáticos, las infecciones virales (ej. *Borna virus*) y procesos

estocásticos que se dan durante el desarrollo del cerebro (Fava and Kendler, 2000). De entre todos los factores no genéticos, el más importante parece ser el estrés, puesto que es conocido el hecho de que los episodios depresivos a menudo aparecen en el contexto de una situación de estrés.

En este sentido, en los últimos años ha cobrado gran interés también el estudio los aspectos epigenéticos de la depresión, para de este modo, obtener una visión global de cómo afectan tanto los aspectos genéticos como ambientales, al riesgo de padecer depresión o a la respuesta a los fármacos antidepresivos. La epigenética centra en el estudio de las modificaciones en la estructura de la cromatina, que conducen a cambios en la expresión génica y que no están asociados a alteraciones de la secuencia de ADN. Las modificaciones epigenéticas afectan, en última instancia, a los niveles de expresión de proteínas. Las investigaciones recientes señalan que los acontecimientos ambientales pueden inducir cambios epigenéticos, y a través de éstos, contribuir a cambios a largo plazo en los circuitos neuronales y sistemas endocrinos asociados con un riesgo modificado a padecer trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés, como es la depresión mayor. Estos estudios podrían aportar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, al mismo tiempo podrían contribuir a la disección del complejo fenotipo de la patología depresiva (Menke and Binder, 2014).

1.2.2. Hipótesis etiológicas

1.2.2.1. Hipótesis monoaminérgica

Durante muchos años, la principal hipótesis etiológica ha sido la teoría monoaminérgica de la depresión (Coppen, 1967; Schildkraut, 1965) que relaciona esta enfermedad con un déficit en la transmisión serotoninérgica y/o noradrenérgica en el sistema nervioso central (SNC). Las primeras evidencias surgieron en los años 50 tras observarse que el tratamiento con reserpina, fármaco antihipertensivo empleado en aquella época, inducía estados depresivos asociados a la depleción de las vesículas de catecolaminas. Pocos años después se descubrió accidentalmente la eficacia antidepresiva de la imipramina (Kuhn, 1958), un compuesto tricíclico, estructuralmente similar a determinados fármacos antipsicóticos, que supuso el comienzo de la búsqueda de nuevos antidepresivos clínicamente eficaces, entre los que surgieron otros inhibidores no selectivos de la recaptación de monoaminas, inhibidores selectivos o inhibidores de la degradación de monoaminas.

Al mismo tiempo que se desarrollaba una batería de fármacos frente a la depresión, se llevaron a cabo estudios que trataban de identificar déficit significativos en los niveles de monoaminas que actuaran a modo de indicadores en pacientes deprimidos, aunque los resultados obtenidos no fueron concluyentes. Estos estudios consistieron en el análisis de las concentraciones de noradrenalina (NE), serotonina (5-HT) y sus principales metabolitos (MHPG y 5-HIAA, respectivamente) y las enzimas que intervienen en su síntesis en diversos fluidos biológicos (líquido cefalorraquídeo, orina y sangre), así como en tejido cerebral *postmortem*. Sin embargo, y a pesar del elevado número de estudios realizados no se llegó a constatar un patrón de alteración metabólica general para todos los grupos de pacientes depresivos ya que, mientras que algunos investigadores encontraron niveles bajos de dichos metabolitos en muestras procedentes de pacientes deprimidos, otros no detectaron tales modificaciones (Asberg, 1997; Ricci and Wellman, 1990). Sólo la correlación entre niveles bajos de 5-HIAA y conducta suicida parece ser

confirmada por diversos estudios (Asberg et al., 1976; Risch and Nemeroff, 1992). Otro tipo de estudios en los que se inducía la depleción de monoaminas, incluyendo la 5-HT, por la administración de reserpina, la reducción de los niveles de 5-HT tras la administración de inhibidores de la tirosina-hidroxilasa o la supresión de triptófano en la dieta, concluyeron que los pacientes en tratamiento con mejora clínica empeoraban su sintomatología si eran sometidos a depleción de monoaminas (Miller et al., 1996). Por el contrario, ni la depleción de triptófano ni la de monoaminas parecen empeorar la sintomatología de la depresión en individuos que no están sometidos a tratamiento con estos fármacos (Heninger et al., 1996). Estos hallazgos, junto con el hecho de que la supresión de triptófano en la dieta no parecía afectar a individuos sanos deja entrever que los antidepresivos podrían inducir otros cambios adaptativos en el cerebro de sujetos deprimidos más allá del propio incremento del neurotransmisor a nivel sináptico.

La hipótesis de la deficiencia monoaminérgica ha constituido durante años la base del enfoque terapéutico en el tratamiento de la depresión, así como de la investigación en este campo. No obstante, esta hipótesis ha sido cuestionada en repetidas ocasiones. La ausencia de una eficacia inmediata de los tratamientos antidepresivos, que tardan varias semanas en producir su efecto, a pesar de que el incremento de la concentración de monoaminas en la hendidura sináptica se produce en horas (Bel and Artigas, 1992) sigue siendo, a día de hoy, objeto de debate, y es el hallazgo clave para cuestionar que la restauración de los niveles cerebrales de monoaminas sea la causante directa de la mejoría clínica.

Debido a ésta y otras críticas, las investigaciones sobre la hipótesis monoaminérgica de la depresión se desplazaron desde el estudio del estado de los neurotransmisores al estudio sobre el estado de sus receptores. Entre éstos, los receptores noradrenérgicos del subtipo β se han relacionado con frecuencia con los trastornos depresivos. La densidad de este receptor parece estar alterada en la depresión, aunque los estudios existentes en la literatura son contradictorios: se ha observado, por un lado, un incremento de la densidad de

los receptores β -adrenérgicos en suicidas cuando se comparan con controles (Biegon and Israeli, 1988; Mann et al., 1986), mientras que por otro lado esta densidad no parece estar alterada en suicidas con historia de depresión (De Paermentier et al., 1990). Por otra parte, Sulser y otros investigadores hallaron diversos cambios en el sistema noradrenérgico como una desensibilización de los receptores β -adrenérgicos tras el tratamiento crónico con antidepresivos (Sulser et al., 1978; Vetulani et al., 1976). Aunque el bloqueo de la recaptación de aminas es inmediato a la administración del antidepresivo, el periodo de tiempo para que se produzca esta desensibilización coincide con el tiempo necesario para que aparezca la acción terapéutica de los antidepresivos (Sulser et al., 1978; Vetulani et al., 1976), sugiriendo que el bloqueo de la recaptación por sí solo no produce efectos terapéuticos y que es la modificación de la sensibilidad receptorial secundaria al aumento de los niveles de amina lo que media la respuesta clínica. Los receptores α_2 presinápticos también se han involucrado en depresión, de forma que se ha observado un incremento de su densidad y afinidad en cerebros de pacientes suicidas con diagnóstico de depresión (Callado et al., 1998; Meana et al., 1992). El efecto neto de la inhibición de la recaptación y la desensibilización de los receptores α_2 conlleva la *down-regulation* de los receptores β -adrenérgicos, de tal forma que toda la transmisión noradrérgica postsináptica se incrementa.

En relación con estos datos, Mongeau y colaboradores describían que la activación de los heterorreceptores α_2 localizados sobre fibras serotoninérgicas provoca una disminución de la neurotransmisión serotoninérgica en hipocampo, y que estos receptores se encuentran desensibilizados después del tratamiento crónico con fármacos antidepresivos (Mongeau et al., 1993; Mongeau et al., 1994). En base a estos resultados, se ha sugerido que la hipersensibilización de los receptores α_2 localizados en neuronas serotoninérgicas en el cerebro de los pacientes deprimidos, que conduciría a una disminución de la actividad serotoninérgica en áreas de proyección como la corteza y el hipocampo (Mongeau et al., 1997), puede constituir un factor etiológico implicado en el desencadenamiento de los trastornos depresivos. De esta forma, la regulación

de estos receptores por los antidepresivos que inhiben la degradación o la recaptación de NE podría contribuir a la eficacia terapéutica de estos fármacos.

Al igual que en el caso del sistema noradrenérgico, la asunción de una posible implicación de una hipofunción serotoninérgica central en la patogenia de la depresión mayor, surgió a partir de evidencias de distinto tipo. Además de los citados efectos de la depleción de triptófano y catecolaminas en los sujetos deprimidos, también se detectó una reducción en el número de sitios de unión a [3 H]Imipramina de forma similar tanto en plaquetas (Briley et al., 1980; Nemeroff et al., 1988a) como en cerebro *postmortem* (Perry et al., 1983; Stanley et al., 1982) de pacientes deprimidos. Además el empleo de técnicas como la tomografía computerizada por emisión de fotones simples (SPECT), ha permitido detectar una ligera disminución en la densidad del 5-HTT en el cerebro de pacientes con depresión mayor (Malison et al., 1998). Esto podría indicar un déficit en la capacidad de recaptación de la amina, o ser un simple reflejo de una pérdida de actividad de las neuronas serotoninérgicas en estos pacientes.

De igual forma se ha observado un incremento en la densidad de receptores 5-HT₂ tanto en corteza frontal como en plaquetas de pacientes deprimidos (Arango et al., 1990; Arora and Meltzer, 1989; Mann et al., 1986), que podría interpretarse como una respuesta adaptativa a las reducciones de la concentración sináptica de 5-HT propuesta en los trastornos depresivos. Sin embargo, estudios posteriores mediante tomografía de emisión de positrones aportan resultados contradictorios ya que se han descrito tanto incrementos (D'Haenen et al., 1992), como disminuciones (Yatham et al., 1999) así como ausencia de cambios (Meyer et al., 1999). Por otro lado, existen numerosos trabajos en los que la densidad de estos receptores disminuye durante el tratamiento crónico con antidepresivos, principalmente de tipo tricíclico, en el animal de experimentación (Klimek et al., 1994; Peroutka and Snyder, 1980) y en la corteza frontal de pacientes deprimidos (Yatham et al., 1999). A la vista de estos resultados, y de los hallazgos antes descritos en el cerebro de pacientes deprimidos, podría sugerirse que la respuesta terapéutica de buena parte de los fármacos antidepresivos guardaría cierta relación con la desensibilización de

los receptores 5-HT₂. Adicionalmente, el bloqueo 5-HT_{2A/2C} promueve una mejoría de los efectos antidepresivos de los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (SSRI), mientras que la activación de los 5-HT_{2B} parece potenciar la actividad serotoninérgica (Artigas, 2013).

Además de los receptores 5-HT₂, los distintos tipos de receptores serotoninérgicos han sido relacionados con la patogenia de la enfermedad depresiva y con el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos, en mayor o menor grado. Sin duda alguna, el otro subtipo cuya implicación ha adquirido especial relevancia es el 5-HT_{1A}, que será explicada en detalle en el siguiente subapartado. De manera similar a lo que sucede con los receptores presinápticos 5-HT_{1A}, ocurre con los receptores presinápticos 5-HT_{1B}, que parecen jugar un papel perjudicial en los tratamientos antidepresivos, ya que su estimulación excesiva por la 5-HT extracelular tras el bloqueo del 5-HTT reduce la función serotoninérgica.

Considerablemente menor es el conocimiento acerca de la implicación del resto de receptores serotoninérgicos postsinápticos en la etiología de la depresión, aunque su manipulación farmacológica ha dado lugar a interesantes hallazgos. En este sentido, el bloqueo 5-HT₃ da lugar a un aumento de la liberación de 5-HT inducida por el bloqueo de 5-HTT y la activación del 5-HT₄ podría promover efectos antidepresivos por sí misma. Finalmente, el bloqueo de 5-HT₆ y 5-HT₇ parecen también aumentar los efectos de la inhibición 5-HTT (Artigas, 2013).

A pesar de los múltiples estudios centrados en esta hipótesis, siguen existiendo numerosos interrogantes respecto a los mecanismos que subyacen a la enfermedad. Por ello, otras hipótesis etiológicas han surgido a lo largo de las últimas décadas.

Papel del receptor 5-HT_{1A} en la depresión y los efectos antidepresivos

Los receptores 5-HT_{1A} están presentes en áreas límbicas cerebrales en altas densidades, especialmente en hipocampo, septum lateral, áreas corticales (en

particular en corteza prefrontal (PFCx) y entorrinal), hipotálamo, amígdala y médula espinal como heterorreceptores, y también en núcleos del rafe del mesencéfalo (dorsal y medio (MRN) (Gerard et al., 1994; Verge et al., 1986). En los núcleos del rafe, el subtipo 5-HT_{1A} se localiza en los somas y dendritas de las neuronas serotonérgicas donde funciona como un autorreceptor somatodendrítico (Aghajanian et al., 1990). Sin embargo, en áreas terminales, se localiza postsinápticamente y actúa como heterorreceptor (Verge et al., 1986). Este receptor pertenece a la subfamilia de los receptores acoplados a proteínas G_{i/o}, que inducen inhibición de la adenilato ciclasa y subsecuentemente un descenso del AMPc intracelular (Barnes and Sharp, 1999; Pucadyil et al., 2005; Raymond et al., 1999). Adicionalmente, la estimulación de los 5-HT_{1A} conduce a la hiperpolarización neuronal por activación de los canales de K⁺ a través del complejo Gβγ (De Vivo and Maayani, 1986) reduciendo consecuentemente el *firing* de las neuronas serotonérgicas (Sprouse and Aghajanian, 1987); también dan lugar a inhibición de los canales de Ca²⁺ tipo N, así como a la activación de la vía de las MAP quinasas (Fargin et al., 1989; Garnovskaya et al., 1996; van Biesen et al., 1995). Por otro lado la activación de estos receptores promueve la activación del efector phospholipase C (PLC) que finalmente conduce a la activación de la proteína quinasa C (PKC), que cataliza la fosforilación de los receptores alterando su selectividad por las proteínas G y conlleva su desensibilización y reciclaje (Lembo and Albert, 1995). Recientemente, se ha demostrado que los receptores 5-HT_{1A} forman homodímeros (Kobe et al., 2008; Woehler et al., 2009)(Kobe et al., 2008; Woehler et al., 2009) e incluso heterómeros (Borroto-Escuela et al., 2012; Renner et al., 2012), de manera que sus vías de transducción se ven alteradas por dichas interacciones.

Existen múltiples evidencias de la crucial implicación del receptor 5-HT_{1A} en la patología depresiva y farmacodinamia de los antidepresivos (Gordon and Hen, 2004; Parks et al., 1998). En pacientes con depresión mayor, se ha encontrado una alteración de la expresión y funcionalidad de este receptor en los núcleos del rafe, el hipocampo y en varias áreas corticales (Arango et al., 1990; Boldrini

et al., 2008; Drevets et al., 1999; Drevets et al., 2007; Hirvonen et al., 2008; Sargent et al., 2000; Stockmeier et al., 1998). Además, como ya se ha mencionado anteriormente, polimorfismos que afectan a este receptor han sido asociados con la susceptibilidad a padecer depresión y al suicidio (Czesak et al., 2006; Parsey et al., 2006).

Entre los estudios dirigidos a analizar las densidades de este receptor en el cerebro de pacientes deprimidos, la mayoría no han encontrado cambios (Cheetham et al., 1990; Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997), sin embargo unos pocos estudios han encontrado un descenso (Drevets et al., 1999; Sargent et al., 2000) o de forma más llamativa un incremento significativo de la presencia de receptores 5-HT_{1A} en los núcleos del rafe dorsal (DRN), donde se encuentran buena parte de las neuronas serotoninérgicas, y donde estos receptores se comportan como autorreceptores presinápticos (Stockmeier et al., 1998). El interés de este descubrimiento radica en que se ha propuesto que el prolongado período de latencia en la aparición de la mejoría clínica tras un tratamiento antidepressivo, se debe a la necesidad de que estos fármacos induzcan una desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} localizados en el DRN (Artigas et al., 1996; Blier and Bouchard, 1994).

Los fármacos que aumentan la 5-HT sináptica (SSRIs, inhibidores de la MAO (MAOIs),...) provocarían al principio una potenciación de la transmisión serotoninérgica. Rápidamente, por acción de esta 5-HT en áreas más distales como en DRN, la 5-HT activaría los 5-HT_{1A}, descendiendo el *firing* neuronal y por tanto, se evitaría el incremento de 5-HT en áreas de proyección. A la larga, los receptores 5-HT_{1A} se desensibilizarían o disminuiría su expresión, desapareciendo de este modo la señal inhibitoria y permitiendo así el incremento de los niveles de 5-HT sinápticos en áreas de proyección, en presencia de un agente aumentador de la 5-HT (Blier and de Montigny, 1985). El tiempo necesario para que ocurra tanto la primera inhibición como la posterior abolición del *feedback* negativo del sistema serotoninérgico podría explicar por qué los antidepressivos habitualmente necesitan en torno a dos semanas o más para alcanzar una notoria mejoría sintomática.

Dada la relevancia de este receptor en la farmacodinamia de los efectos antidepresivos se postuló que el tratamiento con agonistas del receptor 5-HT_{1A} podría resultar eficaz en el tratamiento de la depresión y la ansiedad, evitando muchos de los efectos adversos causados por los SSRIs (por ejemplo: náuseas, disfunción sexual, desórdenes del sueño). Sin embargo, la efectividad de los agonistas 5HT_{1A} totales y parciales en monoterapia es modesta en el tratamiento de la depresión mayor y se han usado principalmente como agentes potenciadores en combinación con los SSRIs (Pierz and Thase, 2014).

Un aspecto a tener en cuenta acerca del receptor 5HT_{1A} es la heterogenicidad de sus efectos en base a su localización, pudiendo promover incluso desenlaces opuestos. Por un lado, se presenta como autorreceptor presináptico en neuronas serotoninérgicas (descendiendo la liberación de 5-HT), aunque también aparece como heterorreceptor postsináptico en neuronas piramidales e interneuronas, donde debido a su acoplamiento a proteínas Gi/Go (Adayev et al., 2005) produce un efecto inhibitorio sobre la liberación glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) (Amargos-Bosch et al., 2004; Santana et al., 2004). De este modo, participaría en el balance entre estos dos neurotransmisores y su señalización (Llado-Pelfort et al., 2012). Cabe destacar, que las proyecciones piramidales e interneuronas afectan también al *firing* del rafe, repercutiendo finalmente en la liberación de 5-HT en áreas postsinápticas. Por otro lado, este receptor colocaliza con heterorreceptores serotoninérgicos de tipo excitatorio (principalmente 5-HT_{2A}), en muchas áreas cerebrales implicadas en respuestas de miedo, ansiedad, pánico, etc... (PFCx, hipocampo, amígdala...). Ya que los receptores 5-HT_{2A} también ejercen un papel fundamental en el control de la liberación de neurotransmisores, aunque en este caso de manera favorable (Celada et al., 2004), se ha sugerido la importancia del balance entre estos dos receptores en las diferentes áreas cerebrales (Beique et al., 2004) y en la posible utilidad de estimular los receptores 5-HT_{1A} en determinadas poblaciones neuronales frente a otras (Albert et al., 2014). De hecho, la estimulación 5-HT_{1A} postsináptica en circuitos corticolímbicos resulta beneficiosa para la acción antidepresiva (Artigas, 2013).

1.2.2.2. Hipótesis neuroendocrina

El eje hipotálamo-pituitario-adrenal comienza en el hipotálamo donde el núcleo paraventricular secreta factor liberador de corticotropina (CRF) que a su vez estimula la síntesis y liberación de ACTH por parte de la glándula pituitaria (hipófisis). La ACTH secretada estimula la corteza adrenal que finalmente liberará cortisol (el glucocorticoide más abundante). El cortisol a su vez ejercerá un *feedback* negativo sobre la secreción de CRF y ACTH (Herman and Cullinan, 1997).

El eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA) no sólo regula funciones periféricas como metabolismo e inmunidad sino que también actúa a nivel cerebral modulando procesos cognitivos y emocionales, especialmente el miedo y la ansiedad, de tal forma que en mamíferos la respuesta endocrina al estrés está mediada por la actividad de este eje y su mal funcionamiento podría ser importante en estados de depresión y ansiedad.

Bajo condiciones de estrés la actividad del eje HPA viene determinada por la secreción de CRF del hipotálamo que, a su vez, estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) de la glándula pituitaria y ésta, finalmente estimula la secreción de los glucocorticoides de la corteza adrenal. La funcionalidad de eje HPA es críticamente dependiente de mecanismos de retroalimentación negativa de los que son responsables los glucocorticoides. La alteración de este mecanismo de *feedback* junto con un incremento de los niveles de CRF, determinan un estado de hiperactividad del eje HPA que ha sido implicado en depresión, sugiriéndose que la normalización del eje podría ser un paso necesario para que los síntomas de la depresión remitan de forma estable (Pariente and Lightman, 2008).

El incremento en los niveles de glucocorticoides por estrés, podría ser el desencadenante de un episodio depresivo (Hammen, 2005). De hecho, el 81% de los pacientes con depresión suele experimentar un gran estrés antes del

primer episodio de depresión (Parker et al., 2003) y el 51% de los pacientes con depresión también muestra un episodio previo de ansiedad (Kessler et al., 1996). Pacientes con síndrome de Cushing, enfermedad hormonal que cursa con concentraciones anormalmente altas de glucocorticoides, presentan cuadros depresivos (McEwen, 2007) y una incidencia inusualmente alta de depresión (Sonino and Fava, 2002).

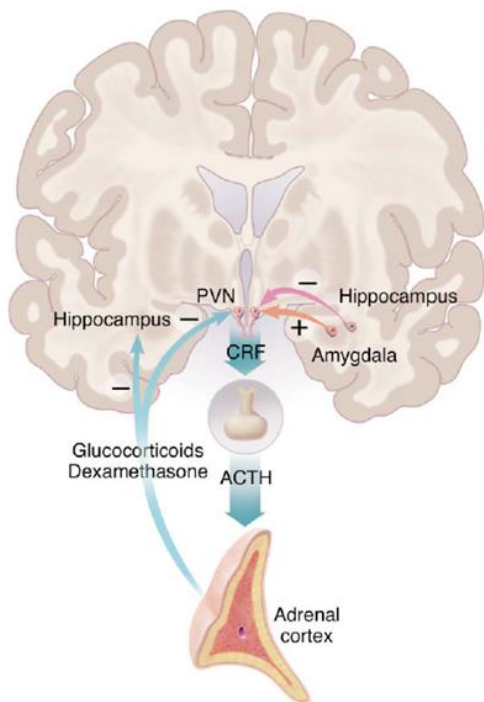


Imagen 1: Esquema del eje hipotálamo-hipofisiario-corteza adrenal (Nestler et al., 2002).

Existe un gran número de estudios con pacientes deprimidos en los que se han encontrado evidencias de la hiperactividad del eje HPA. En estos pacientes existe un incremento en los niveles de CRF en líquido cefalorraquídeo (Nemeroff et al., 1984), y en el número de neuronas secretoras de CRF en áreas límbicas (Raadsheer et al., 1994), lo que indica que estas neuronas están hiperactivas en la enfermedad depresiva. Además tienen incrementados los niveles de cortisol en saliva, plasma y orina, e incrementado el tamaño (así como la actividad) de las glándulas pituitaria y adrenal (Nemeroff and Vale, 2005). Por otro lado, tras el test de supresión de cortisol por dexametasona, el descenso en los niveles plasmáticos de cortisol es menos acusado y se observa durante un período de tiempo mucho menor en sujetos deprimidos que en individuos sanos, donde se produce una potente disminución de estos niveles

durante más de 24 horas (Holsboer et al., 1982). Todo esto apoya la idea de que la retroalimentación negativa mediada por los glucocorticoides está dañada en la. Además, se ha descrito que la densidad de receptores para CRF aparece disminuida en la corteza frontal de sujetos deprimidos, probablemente debido a la hipersecreción de CRF (Nemeroff et al., 1988b). Por todo esto, este péptido ha ido cobrando importancia en la patogénesis de la depresión y otros desórdenes relacionados con el estrés (Holsboer, 2000). La observación de que los antidepresivos modifican la actividad de este eje apoya el posible papel del CRF en depresión (Bjartmar et al., 2000). La administración de desipramina a voluntarios sanos está asociada con una reducción de los niveles de CRF en el líquido cefalorraquídeo (Veith et al., 1993). Hallazgos similares se han obtenido en pacientes deprimidos tratados con fluoxetina o terapia electroconvulsiva (ECT) (De Bellis et al., 1993; Nemeroff et al., 1991). Por tanto, estos datos apoyan el potencial efecto antidepresivo de fármacos que reducen directamente la actividad y funcionalidad del CRF (Arborelius et al., 1999; Ising and Holsboer, 2007).

Finalmente, se ha postulado que esta mayor actividad del eje HPA en los trastornos depresivos, con el consiguiente incremento de la secreción de glucocorticoides, puede ser responsable del descenso de la proliferación celular (Haynes et al., 2004; Sapolsky, 2000; Wong and Herbert, 2006). De hecho, un modelo animal de depresión ampliamente utilizado y consistente en la administración crónica de corticoides (Krishnan and Nestler, 2008), presenta déficits en la proliferación celular y en los procesos de neurogénesis hipocampal. De acuerdo con esto, animales con déficit de receptores para glucocorticoides presentan una alteración en el mecanismo de *feedback* y son más susceptibles al comportamiento depresivo inducido por estrés (Ridder et al., 2005) 2005). Además, la administración exógena de glucocorticoides produce un descenso en la proliferación y neurogénesis (Haynes et al., 2004; Sapolsky, 2000; Wong and Herbert, 2006), un fenómeno que puede ser parcialmente revertido una vez que los niveles de cortisol disminuyen (Starkman et al., 1999).

1.2.2.3. Hipótesis neurotrófica-neurogenética

Una hipótesis más reciente acerca de la etiología de la depresión se basa en que el estrés, tanto agudo como crónico (posiblemente relacionado con un incremento en la secreción de corticosterona), disminuye la proliferación celular y la neurogénesis y que este efecto es revertido por los antidepresivos (Warner-Schmidt and Duman, 2006). En cerebro adulto la neurogénesis se limita a dos regiones: la zona subventricular (SVZ), que delinea los ventrículos laterales y cuyos neuroblastos migran a través de la corriente migratoria rostral (RMS); y la zona subgranular del hipocampo (SGZ).

Según esta nueva teoría la depresión podría, al menos en parte, deberse a un descenso en la capacidad de las células madre neurales presentes en el hipocampo para generar nuevas neuronas (Duman et al., 2000; Jacobs et al., 2000; Kempermann and Kronenberg, 2003) y se basa en dos tipos de observaciones. Por una parte en los análisis morfométricos y morfológicos del hipocampo de pacientes deprimidos, en los que con frecuencia se han descrito descensos del volumen hipocampal (Campbell et al., 2004; Videbech and Ravnkilde, 2004) que parecen restaurarse parcialmente en las fases de remisión de la enfermedad o tras el tratamiento con antidepresivos (Malberg and Duman, 2003; Sheline et al., 2003). Esto sugiere que la depresión podría estar asociada a la pérdida celular hipocampal y atrofia, en cuyo caso, tratamientos antidepresivos adecuados podrían contrarrestar este efecto, aunque también existen estudios que no encuentran estas alteraciones en el cerebro de pacientes (Boldrini et al., 2009). Por otra parte, múltiples trabajos han demostrado que los fármacos antidepresivos (Czeh et al., 2001; Malberg et al., 2000) y la ECT (Scott and Boddy, 2000), estimulan la proliferación de células hipocampales. Se ha llegado a sugerir que la latencia característica en el comienzo del efecto de los fármacos antidepresivos se correlacionaría con los aumentos significativos en el número de nuevas neuronas que se observa en el hipocampo (Malberg et al., 2000), y con el posible período de maduración de las nuevas neuronas creadas.

A medida que el conocimiento al respecto avanza, van cobrando gran relevancia no sólo los eventos neurogenéticos, sino también los procesos de sinaptogénesis e integración funcional de las nuevas neuronas (Duman et al., 1999; Kempermann and Kronenberg, 2003). Déficits en los procesos “pattern separation and completion” que toman parte en la integración de la información emocional, llevados a cabo por las nuevas neuronas adultas en las diferentes regiones del hipocampo (estableciendo conexiones con otras áreas implicadas en funciones cognitivas y emocionales como son la PFCx y la amígdala), parecen jugar un papel fundamental en el desarrollo de conductas ansioso-depresivas (Leal et al., 2014) y también en los efectos ansiolíticos/antidepresivos de los fármacos que favorecen la neurogénesis. Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido esclarecer por completo si los déficits neuroplásticos y neurogenéticos son causa o consecuencia de la patología depresiva, del mismo modo que se desconoce si el incremento de la neurogénesis promovida por los antidepresivos posee una relación directa o indirecta con la mejoría conductual (Miller and Hen, 2015).

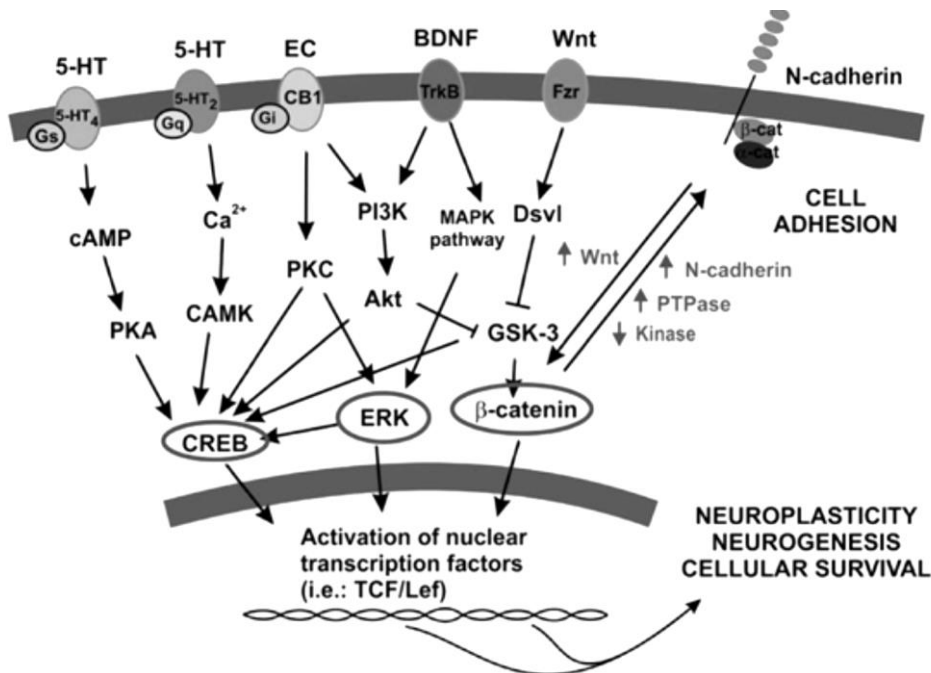


Imagen 2: Activación de diferentes vías de señalización intracelular tras la administración de fármacos antidepresivos (Vidal et al., 2011).

En lo que se refiere al mecanismo por el cual los antidepresivos inducen neurogénesis/sinaptogénesis, se han identificado varias vías intracelulares que participan en la regulación de la plasticidad celular y que se modulan por la administración crónica de antidepresivos (Pilar-Cuellar et al., 2013; Vidal et al., 2011). Las vías finales dependientes de CREB, la inhibición de mecanismos apoptóticos y la estimulación de la vía Wnt- β -catenina son algunas de ellas (D'Sa et al., 2005; Mostany et al., 2008).

Una de las hipótesis más convincentes se centra en que los antidepresivos conducen a un incremento de los niveles de factores neurotróficos como el BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Malberg, 2004; Russo-Neustadt and Chen, 2005; Vaidya and Duman, 2001). Los factores neurotróficos son una familia proteica implicada en la supervivencia neuronal, siendo el BDNF uno de los más estudiados por su relación directa con la depresión y por su amplia distribución en el cerebro adulto. Está implicado en plasticidad y promueve señales de supervivencia (Duman and Monteggia, 2006; Monteggia et al., 2004). El BDNF está presente tanto en el SNC como en sistema periférico, y en pacientes deprimidos y bipolares se han descrito niveles anormalmente bajos de BDNF en plasma (Cunha et al., 2006). Una mutación en la posición 66 del gen que codifica para la proteína de BDNF reduce la secreción de ésta, lo que se ha relacionado con una mayor susceptibilidad a sufrir enfermedades neuropsiquiátricas (Chen et al., 2004; Egan et al., 2003; Monteggia et al., 2007). La administración crónica de antidepresivos produce un aumento de la proteína y niveles de expresión de mRNA de BDNF (Nibuya et al., 1995; Russo-Neustadt and Chen, 2005) y de la expresión de TrkB, su receptor (Duman and Monteggia, 2006; Nestler et al., 2002), y además revierten el descenso de BDNF inducido por estrés. La administración crónica con antidepresivos incrementa la vía de AMPc (D'Sa et al., 2005), activando sucesivamente el factor de transcripción CREB (Blendy, 2006), que consecuentemente induce la expresión del gen que codifica para BDNF. El aumento en BDNF coincide con la evolución temporal del tratamiento antidepresivo, lo que indicaría una posible relación entre la concentración de este factor y la respuesta antidepresiva (Russo-Neustadt and

Chen, 2005). Además, el BDNF presenta acción antidepresiva específica de región (Krishnan and Nestler, 2008). De modo que la administración directa de BDNF en el hipocampo de ratón produce un efecto antidepresivo (Shirayama et al., 2002), mientras que en el núcleo accumbens-área tegmental ventral tiene un efecto pro-depresivo, siendo en este caso antidepresivo su bloqueo (Berton et al., 2006). Estas diferencias pueden explicarse por la distribución desigual de BDNF en las diferentes regiones del cerebro y también por la diferente participación de estas áreas en la fisiopatología de la enfermedad.

Recientemente otra de estas vías de señalización implicada en plasticidad ha cobrado gran relevancia en lo que se refiere a los efectos antidepresivos de instauración rápida. Se trata de la vía de mTOR (mamalian target of Rapamycin), una proteína implicada en el control del crecimiento, la proliferación y la plasticidad sináptica mediante la síntesis de proteínas (Hay and Sonenberg, 2004). En las neuronas, mTOR se localiza a nivel sináptico donde modula la síntesis de proteínas, resultando fundamental en distintos procesos de plasticidad sináptica, incluida la LTP (*long term potentiation*) (Cammalleri et al., 2003; Tang et al., 2002). La producción de IP3 como resultado de la activación de distintos receptores, da lugar a la activación de Akt mediante fosforilación, que se une a la membrana plasmática por la cara interna de la misma, desde donde regula señales de supervivencia celular. Y esta Akt activada será la responsable de la activación de mTOR. mTOR es la región catalítica de dos complejos proteicos, el 1 (mTORC1) y el 2 (mTORC2). El extremo C-terminal de mTOR contiene elementos muy importantes en la función de mTOR, entre los que destaca el dominio catalítico quinasa. Dentro de este dominio hay una pequeña región llamada dominio represor que tiene una función de auto-fosforilación, con lugares conservados de fosforilación. El mTORC1 está formado por mTOR, la proteína reguladora LST8 y la proteína RAPTOR (*Regulatory Associated Protein of mTOR*). Ésta última actúa como una proteína de andamiaje (*scaffolding protein*) cuya función es unirse a mTOR y facilitar la llegada al lugar catalítico de los sustratos (Hoeffler and Klann, 2010; Kim and Sabatini, 2004). Se trata de una proteína sensible a rapamicina, pues

compite con ésta por el lugar de unión a mTOR. Los productos más importantes sobre los que actúa mTORC1 son p70S6K (*Ribosomal S6 Kinase 1*) y 4EBP1 (*Eukaryotic Initiator Factor 4E Binding Protein 1*). El mTORC2, por su parte, está formado por mTOR, LST8, proteína insensible a rapamicina llamada RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) y mSin1, una proteína cuya delección es embriológicamente letal (Jacinto et al., 2006). Aunque el papel del complejo 2 se conoce menos, se sabe que puede activar directamente a Akt mediante fosforilación (Sarbasov et al., 2005).

La función de mTOR está influenciada por los receptores NMDA y AMPA, BDNF y receptores dopaminérgicos y metabotrópicos de glutamato, que son vitales para los procesos de plasticidad sináptica LTP y LTD (*long term depression*). Así, mTOR actúa como un integrador de señales, dando forma a la gran cantidad de señales inhibitoras y excitadoras generadas por la actividad sináptica (Hoeffer and Klann, 2010).

Se ha demostrado que la vía de mTOR media los efectos antidepresivos rápidos de la ketamina dependientes del receptor de glutamato AMPA en animales y seres humanos (Hashimoto, 2011; Li et al., 2010). Así pues, en ratas estresadas, se encontró un descenso de la señalización por la ruta PI3K-Akt-mTOR en la PFCx, y además, la inhibición de la calcineurina (fosfatasa implicada en la regulación de la neurotransmisión, estructura y plasticidad neuronal, y excitabilidad) indujo conductas de tipo depresivo (Zhu et al., 2011) junto con un descenso en la actividad de la vía mTOR (Yu et al., 2013). Este efecto fue revertido mediante la activación de la vía de mTOR por la activación NMDA y también con la administración crónica de venlafaxina (Yu et al., 2013). En muestras de individuos *postmortem* de sujetos deprimidos, existe un descenso de la expresión de mTOR, así como de otros elementos “downstream” de esta vía, como son P70S6K o eIF4B y su forma fosforilada, lo que conlleva un descenso de la traslación proteica (Jernigan et al., 2011). La administración subcrónica de rapamicina en roedores provocó efectos antidepresivos (Cleary et al., 2008), así como la administración aguda de antagonistas de receptores NMDA como ketamina, Ro-256981 y MK-801 (Jernigan et al., 2011; Li et al.,

2010) o antagonistas de receptores metabotrópicos de glutamato tipo II (mGlu_{2/3}) (Dwyer et al., 2012; Maeng et al., 2008), cuyos efectos antidepresivos rápidos están mediados por la activación de la vía de mTOR. La ketamina activa rápidamente esta vía induciendo incrementos de la sinaptogénesis, incluyendo densidad y función de espinas sinápticas en PFCx en ratas (Li et al., 2010) e incremento en la expresión hipocámpal de BDNF. Además el bloqueo de la señalización mTOR con rapamicina bloquea por completo la sinaptogénesis inducida por ketamina y las respuestas conductuales antidepresivas en modelos animales de depresión (Li et al., 2010; Yu et al., 2013). Otras estrategias de eficacia antidepresiva como la ECT (Elfving and Wegener, 2012) o la estimulación cerebral profunda (DBS) (datos no publicados) activan la vía de mTOR. Por todo ello, la modulación de la vía de mTOR podría resultar de gran utilidad para el tratamiento de los desórdenes afectivos.

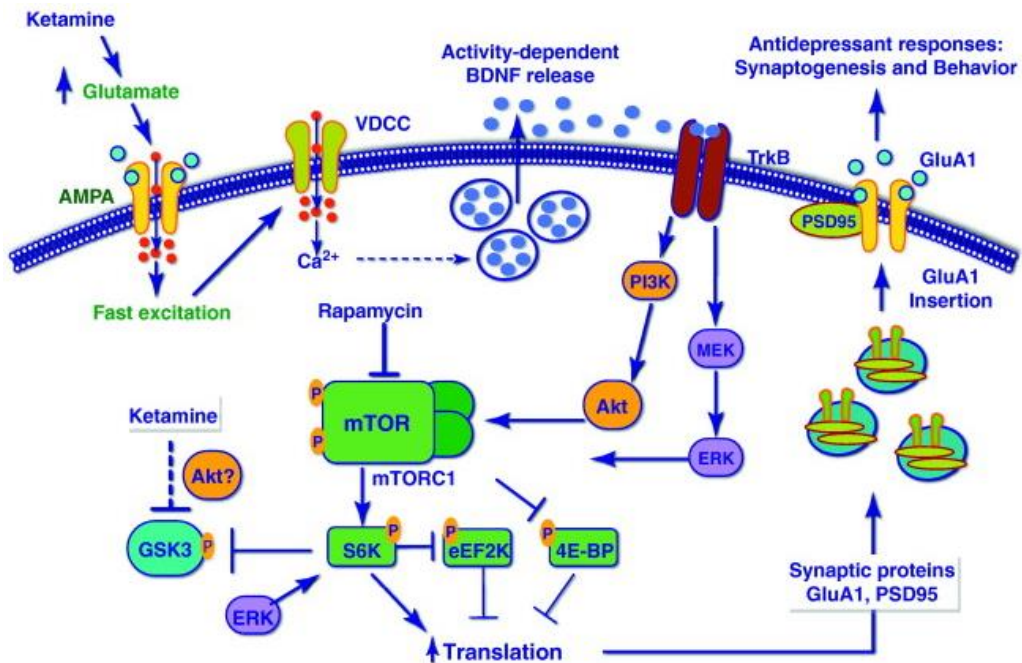


Imagen 3: La ketamina estimula mTOR y la sinaptogénesis. Mecanismos de neurotransmisión y señalización intracelular (Duman et al., 2012).

1.2.2.4. Hipótesis glutamatérgica

Las limitaciones de la teoría monoaminérgica llevaron a postular la posible implicación de otros sistemas de neurotransmisión en el origen de la depresión. Uno de los resultados más consistentes y aceptados en depresión es la reducción glial en cerebros de pacientes deprimidos (Gosselin et al., 2009; Miguel-Hidalgo et al., 2000; Ongur et al., 1998; Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007). Diferentes estudios muestran pérdida de células gliales y alteración de la morfología glial (Ongur et al., 1998), así como reducción de la densidad glial en áreas tan importantes en depresión como son amígdala (Bowley et al., 2002), PFCx (Cotter et al., 2001a; Cotter et al., 2001b), PFCx-dorsolateral y orbitofrontal (Cotter et al., 2002). De hecho, la lesión glial en corteza prefrontal medial (mPFCx) origina en animales un cuadro depresivo (Banasr and Duman, 2008).

Las funciones principales de la glía son: a) regulación de la concentración sináptica de glutamato, b) metabolismo y homeostasis cerebral, c) liberación de factores tróficos en el desarrollo, y d) mantenimiento de las redes sinápticas. Atendiendo a estas funciones, la relación glutamato-glía parece crucial en la fisiopatología de la depresión.

Un estudio en pacientes deprimidos mostró concentraciones elevadas de glutamato y bajas de GABA en pacientes con depresión no medicados (Sanacora et al., 2004). Además, se ha descrito una disminución de la recaptación de glutamato en corteza, estriado e hipocampo (Almeida et al., 2010) y una reducción de la expresión de vGluT1 y de los transportadores de Glutamato, EAAT2 (glial) y EAAT4 (neuronal) (Zink et al., 2010).

De acuerdo a esto, las alteraciones gliales descritas en pacientes con depresión provocarían una reducción en la recaptación de glutamato y por tanto, su concentración extracelular sería muy elevada. Esto provocaría daño neuronal como consecuencia del efecto neurotóxico. Este glutamato extrasináptico tendría dos consecuencias: a) un *feedback* negativo sobre el glutamato presináptico al unirse a los autoreceptores mGlu_{2/3}, resultando en una reducción

del glutamato sináptico (Kugaya and Sanacora, 2005; Sanacora et al., 2004); y b) un exceso de activación de receptores NMDA extrasinápticos, lo que desencadena una serie de cambios moleculares que llevan a una reducción de los niveles de BDNF y provocan regresión dendrítica y activación de ciclos apoptóticos (Autry et al., 2011; Hardingham and Bading, 2002; Hardingham et al., 2002).

Tal y como se explicará a continuación, esta nueva hipótesis no es independiente de las anteriores, sino que está íntimamente relacionada con la hipótesis neurotrófica-neuroplástica de la depresión en concreto. Esto se debe a que gran parte de las evidencias que la sustentan, se centran en las alteraciones sobre la plasticidad sináptica directamente asociadas a modificaciones de la señalización glutamatérgica, bien en condiciones patológicas, como aquellas inducidas por los tratamientos antidepresivos de acción rápida.

Los sorprendentes resultados de la ketamina como antidepresivo (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006), han originado toda una serie de estudios clínicos y preclínicos orientados a dilucidar el papel del glutamato en la depresión. La característica más importante de los fármacos que actúan sobre el sistema glutamatérgico es la rapidez con la que aparecen los efectos antidepresivos. Así, mientras que con un fármaco tan usado en depresión como la fluoxetina el inicio del efecto terapéutico se sitúa entre las 3 y 6 semanas (Posternak and Zimmerman, 2005); el efecto antidepresivo de la ketamina, un antagonista no competitivo NMDA, aparece 2 horas después de su administración y además con una única dosis se consigue un efecto antidepresivo que dura entre una y dos semanas (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006) .

En animales de experimentación, la administración aguda de ketamina provoca: a) aumento de la actividad de neuronas piramidales y liberación de glutamato; y b) reducción de la activación de neuronas GABAérgicas tanto en corteza como en hipocampo (Adams and Moghaddam, 2001; Chowdhury et al., 2012; Lopez-Gil et al., 2007; Lorrain et al., 2003; Stone et al., 2012).

De acuerdo con estos resultados, el efecto antidepresivo parece ser el resultado de la reversión de la depresión sináptica glutamatérgica responsable de la enfermedad. Así, la ketamina bloquearía el exceso de activación de los receptores NMDA extrasinápticos, ocasionado por la incapacidad de la glía para retirar el glutamato del espacio extrasináptico; y de manera indirecta, produciría una activación de los receptores AMPA sinápticos. Esta activación sería la responsable del efecto antidepresivo, pues el bloqueo de estos receptores mediante la administración sistémica del antagonista NBQX, impide la aparición efecto terapéutico (Maeng et al., 2008). Este mismo mecanismo de acción parece ser el responsable de los efectos antidepresivos de los antagonistas del receptor mGlu_{2/3} (Chaki et al., 2004; Karasawa et al., 2005; Witkin et al., 2007). El bloqueo del receptor presináptico metabotrópico impediría el *feedback* negativo que el glutamato extrasináptico en exceso ejerce sobre la sinapsis, aumentando así la disponibilidad de glutamato sináptico y por consiguiente, la activación de receptores AMPA. De manera que el bloqueo farmacológico mediante NBQX impedirá el efecto antidepresivo (Karasawa et al., 2005; Palucha-Poniewiera et al., 2010). Por otro lado, la administración de ampakinas, potenciadores de receptores AMPA, produce también un efecto antidepresivo rápido (Li et al., 2001; Quirk and Nisenbaum, 2002), e incluso la administración sistémica de AMPA, un agonista directo de estos receptores, produce efecto antidepresivo en el FST y reducción de la anhedonia (Akinfiresoye and Tizabi, 2013). Por todas estas razones, parece evidente el papel de los receptores AMPA en el mecanismo rápido del tratamiento antidepresivo.

Por otro lado, los fármacos glutamatérgicos favorecen la plasticidad sináptica, de manera que la administración aguda de ketamina rápidamente activa la vía de señalización de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) en la PFCx (Li et al., 2010). De hecho, la ketamina produce un aumento en la expresión de proteínas fundamentales tanto a nivel postsináptico (PSD95 y GluA1) como presináptico (sinapsina I) (Li et al., 2010). El bloqueo de esta vía mediante la administración de rapamicina, impide el efecto antidepresivo de la ketamina, evitando la formación de nuevas sinapsis y espinas dendríticas (Li et al., 2010).

Además, el bloqueo de la vía mTOR interrumpe el efecto antidepresivo de los antagonistas mGlu_{2/3} (Koike et al., 2011).

Adicionalmente, la administración crónica de estos fármacos produce aumento de la concentración de BDNF y de la expresión de su receptor (Duman and Monteggia, 2006; Nestler et al., 2002). Una única dosis de ketamina es suficiente para disminuir la inmovilidad en el FST y además, producir un incremento significativo de la concentración de BDNF en el hipocampo (Li et al., 2010; Yang et al., 2013). Es más, el efecto antidepresivo rápido de la ketamina requiere de BDNF y de la consecuente activación de TrkB, pues este efecto desaparece en ratones *knock out* (KO) inducibles de BDNF y en KO condicionales para TrkB. Además, es el aumento de BDNF dendrítico el responsable de los efectos comportamentales que tiene la ketamina (Autry et al., 2011). Igualmente, un estudio reciente ha demostrado la relación directa entre receptores AMPA-mTOR-BDNF, de manera que la administración de AMPA, producirá un aumento de la fosforilación de mTOR y un aumento de la expresión de BDNF (Akinfiresoye and Tizabi, 2013). Esta vía BDNF/mTOR será responsable de la mayor presencia de GluA1-AMPA en la membrana celular, que es clave en los procesos de memoria y aprendizaje, así como en la plasticidad sináptica (Slipczuk et al., 2009).

Sin embargo, a pesar de esta celeridad en el mecanismo de acción, los antagonistas NMDA no están exentos de efectos adversos y su gran inconveniente son los efectos psicotomiméticos que producen. De hecho, en pacientes, el efecto antidepresivo no aparece hasta que los efectos psicotogénicos y euforizantes desaparecen (Krystal et al., 2013). Para tratar de paliar este grave inconveniente, surgen los antagonistas selectivos de la subunidad GluN2B, que tienen efecto antidepresivo rápido tanto en pacientes (Preskorn et al., 2008) como en animales de experimentación (Li et al., 2010).

Una fuerte actividad investigadora a nivel preclínico y clínico está siendo llevada a cabo con el fin de llegar a introducir fármacos de tipo glutamatérgico en la práctica clínica, aunque actualmente aún no se han aprobado.

1.3. Modelos animales de depresión

El estudio de enfermedades psiquiátricas requiere del uso de animales de experimentación para la evaluación de los efectos biológicos de futuros fármacos de manera previa a su aplicación en ensayos clínicos. Para ello, se utilizan tanto tests conductuales como modelos animales que permiten, en mayor o menor medida, remedar las manifestaciones de tipo depresivo y/o ansioso que presentan los pacientes deprimidos. Los test de cribado antidepresivo son una herramienta útil para seleccionar fármacos con potencial antidepresivo. Aunque no reproducen la sintomatología de la enfermedad, permiten mediante la medida de un comportamiento, determinar el posible efecto antidepresivo de un compuesto. Estos test pueden estar basados en la medida de la “desesperación” del animal (ej.: *Forced swimming test*, FST), en la medida de la ansiedad (ej.: *Open field test*, OFT), o en la medida de la recompensa (ej.: *sucrose preference test*). También disponemos de distintos modelos animales basados en la manipulación quirúrgica (bulbectomía olfatoria bilateral (OBX) en roedores), la exposición a situaciones de estrés prenatal (deprivación materna) o postnatal (estrés impredecible crónico (CUS) o la indefensión aprendida), administración de fármacos depleccionantes de los niveles de monoaminas (reserpina) o de corticosterona, así como modelos resultantes de la ingeniería genética (KO/sobre-expresión constitutivos o inducibles de distintos receptores o proteínas de interés). En el presente trabajo se ha utilizado el modelo de OBX en el ratón.

1.3.1. Modelo de la bulbectomía olfatoria bilateral

Este es un modelo de depresión, inducido quirúrgicamente, que cursa con ansiedad comórbida (Wang et al., 2007) y que presenta una gran validez aparente y predictiva (Wilner 1991, TIPS). La extracción bilateral de los bulbos olfatorios origina un complejo cuadro de alteraciones comportamentales, neuroquímicas, neuroendocrinas y anatómicas, muchas de las cuales están presentes en pacientes deprimidos (por ejemplo anhedonia, ensanchamiento

de los ventrículos laterales, etc...) (Leonard, 1984). La extracción de los bulbos olfatorios produce una interrupción de la comunicación entre dichos bulbos y áreas tan relevantes para la depresión como el sistema límbico o la PFCx. La reorganización de estos circuitos será el responsable del fenotipo característico de los ratones OBX, que cursa con hiperactividad en el OFT, anhedonia y alteraciones en la memoria y el aprendizaje (Kelly et al., 1997).

Se trata de un modelo que guarda numerosas coincidencias (validez aparente) con los hallazgos en pacientes deprimidos. De este modo, se ha descrito ensanchamiento ventricular, así como pérdida de funcionalidad en diferentes regiones corticales, hipocampo, amígdala y núcleo caudado (Lumia et al., 1992). Además, la lesión de los bulbos provoca degeneración en áreas íntimamente relacionadas con depresión como son amígdala e hipocampo (Wrynn et al., 2000). Respecto a las alteraciones neuroquímicas descritas en el modelo, destaca mayoritariamente el síndrome serotoninérgico (Jancsar and Leonard, 1984), pues las alteraciones más consistentes han sido encontradas para este neurotransmisor. Así, las ratas OBX presentan una concentración basal de 5-HT más baja en determinadas áreas cerebrales y además, la síntesis de este neurotransmisor se encuentra alterada (Jancsar and Leonard, 1984; Redmond et al., 1997; van der Stelt et al., 2005). Por otra parte, el sistema endocannabinoide (eCB) y en concreto el receptor CB₁, presenta modificaciones fundamentales en este modelo de depresión, siendo algunas de estas modificaciones revertidas por los tratamientos antidepresivos eficaces (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2009). También se ha descrito un desequilibrio entre neurotransmisores excitadores e inhibitorios, así como una alteración en el metabolismo del glutamato (van Riezen and Leonard, 1990).

Cabe señalar que en el modelo de la OBX aparecen alteraciones de la expresión de determinados marcadores de plasticidad neuronal, implicados en diferentes vías de señalización celular que han sido relacionados con la patología depresiva y también con la eficacia de los antidepresivos. Entre ellos destacan por ejemplo el BDNF, pCREB/CREB, pERK/ERK, pAKT/AKT, β -catenina (Han et al., 2009; Hetman et al., 1999; Moriguchi et al., 2006; Mostany et al., 2008;

Popoli et al., 2000; Tiraboschi et al., 2004). Sin embargo, existe escasa información acerca del estado de la vía de mTOR en el modelo OBX, la cual ha como ya se ha explicado en el apartado anterior, ha cobrado gran relevancia en los últimos tiempos dada su implicación en los efectos de los antidepresivos de acción rápida (Cryan and O'Leary, 2010; Li et al., 2010).

El aspecto de mayor relevancia de la OBX, y por el cual se seleccionó para este trabajo, es que se trata de un modelo con alto valor predictivo para la búsqueda de fármacos antidepresivos (Cryan and Mombereau, 2004). Además, es uno de los pocos modelos animales que sólo responde a tratamientos crónicos con antidepresivos, tal como sucede en pacientes deprimidos (van Riezen and Leonard, 1990). Los animales OBX presentan un cuadro comportamental característico, que cursa con hiperactividad en OFT en condiciones aversivas, y aumento de la ambulación total y los alzamientos, aunque un descenso en la actividad central relativa. Además, son animales con alteración del comportamiento social (Romeas et al., 2009), así como con marcada anhedonia (Carlsen et al., 1982). La reversión de dichas características comportamentales constituye un indicador de eficacia antidepresiva.

En este trabajo se utilizó el modelo de la OBX en ratón. Aunque la mayoría de los estudios en este modelo de depresión han sido realizados en ratas, también existe un número considerable de trabajos que analizan el síndrome de la OBX en ratones (Jarosik et al., 2007; Mucignat-Caretta et al., 2006; Roche et al., 2012; Zueger et al., 2005), siendo este también un modelo validado para la evaluación de antidepresivos. La gran mayoría de los efectos de la OBX son comparables entre ambas especies (síndrome comportamental y déficits cognitivos), aunque existen algunas diferencias interespecie que han de ser tomadas en cuenta previa extrapolación de los resultados (Hendriksen et al., 2012). En concreto estas diferencias suelen ser relativas al curso temporal de la aparición de las alteraciones propias del fenotipo y en el modo de respuesta a los tratamientos antidepresivos. Otros factores, tales como la cepa de rata o ratón, las condiciones de estabulación (individual o en grupo) y/o el enriquecimiento ambiental pueden afectar (Hendriksen et al., 2015).

1.3.1.1. Influencia del aislamiento social sobre el síndrome de la bulbectomía olfatoria

Como ya se ha mencionado anteriormente, el entorno resulta de fundamental relevancia en el desarrollo de la patología depresiva. Así pues, en el caso de los modelos animales de depresión el entorno social juega un papel crucial sobre el estado emocional de los animales. Por ello, las condiciones de estabulación son fundamentales para la determinación del fenotipo conductual del modelo utilizado (Heidbreder et al., 2000; Lapid et al., 2003), de tal modo que, una variación en estas condiciones podría incluso dar lugar a la transformación del modelo en otro diferente. Previamente ha sido descrito que el aislamiento social en roedores promueve una serie de alteraciones conductuales, neuroquímicas y cambio anatómicos cerebrales (Heidbreder et al., 2000; Valzelli, 1973; Voikar et al., 2005). Interfiere con el desarrollo del sistema límbico que está implicado en la regulación de las conductas emocionales y la formación del aprendizaje y la memoria (Gresack et al., 2010). Todas estas alteraciones pueden relacionarse con los síntomas y fisiopatología de pacientes con trastornos como la depresión, la esquizofrenia, el trastorno de déficit de atención por hiperactividad y la ansiedad (Fone and Porkess, 2008; Koike et al., 2009; Naert et al., 2011).

En este sentido, en algunos modelos animales como el aislamiento social post-destete en ratones se han descrito ansiedad, las conductas depresivas, hiperactividad, agresividad, interacción social anormal y daño cognitivo (Ibi et al., 2008; Naert et al., 2011; Voikar et al., 2005).

En la presente tesis se estudió la influencia del aislamiento social sobre la respuesta conductual de los ratones OBX en algunos test habitualmente utilizados para la evaluación de los estados depresivo-ansiosos, a fin de optimizar las condiciones para la detección de los efectos antidepresivos y con ello determinar si la combinación de ambos resulta en una mejoría, o por el contrario, en un empeoramiento de la utilidad que presentan por separado.

1.4. Fármacos antidepresivos

El tratamiento de los distintos tipos de depresión incluye una amplia gama de fármacos desarrollados a partir de la década de 1950. En esa década se puso de manifiesto que la iproniazida, fármaco pensado inicialmente como tuberculostático, inhibía la enzima monoaminoxidasa (MAO) y elevaba el estado de ánimo. Poco después se descubrió que la imipramina, un compuesto tricíclico concebido como neuroléptico, poseía eficacia antidepresiva. Estos fármacos fueron los primeros representantes de dos grandes grupos de antidepresivos: los antidepresivos tricíclicos (TCAs), que bloquean en mayor o menor grado la recaptación de 5-HT y NE (como la imipramina o la amitriptilina) y los inhibidores de la MAO (MAOIs) (como la iproniazida o la fenelzina).

La eficacia antidepresiva de los TCA, que fueron los antidepresivos más utilizados hasta los 90, está basada en su capacidad para modular en mayor o menor medida la transmisión sináptica de 5-HT y NE. En particular, la clomipramina, que inhibe directamente la recaptación de 5-HT y de NE a través de su metabolito, ha sido un antidepresivo efectivo pero no selectivo de la recaptación de 5-HT en la patología de la depresión. Sin embargo, mientras que estos fármacos no selectivos son antidepresivos eficaces, su empleo se ha visto limitado por los efectos adversos anticolinérgicos y cardiovasculares. Los MAOIs poseen potencial como hipertensivos y capacidad para interactuar con otros fármacos, por lo que no son muy utilizados. La pobre tolerabilidad y el riesgo asociado con estos antidepresivos han conducido a la búsqueda de fármacos más selectivos.

Aunque inicialmente el interés en el desarrollo de antidepresivos se centró en el sistema noradrenérgico, las investigaciones no tardaron en dirigirse hacia el sistema serotoninérgico en base a las distintas evidencias experimentales sobre su implicación en la patología y tratamiento de la depresión. Por ello, en los años 80 se introdujeron los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (SSRIs), que han dominado el tratamiento de la depresión en los últimos tiempos. Puesto que los SSRIs presentan poca o ninguna afinidad por los

receptores α -adrenérgicos, muscarínicos, colinérgicos o hitaminérgicos, carecen de los efectos adversos típicamente asociados a los TCAs. Los ISRS, como fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina y citalopram pueden considerarse un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista químico con efectos terapéuticos muy próximos a los de los TCAs y, aunque se han empleado para el tratamiento de desórdenes afectivos, están asociados a un comienzo de la acción antidepresiva relativamente lento, y su eficacia clínica en depresión no es clara en todos los casos. Los estudios desarrollados para obtener nuevos antidepresivos llevan a la aparición de los inhibidores selectivos de la recaptación de NE (NRIs), siendo el más común la reboxetina que presenta escasa afinidad por otros receptores, por lo que produce escasos efectos secundarios.

Evidencias convincentes apoyan la implicación de ambos sistemas, serotoninérgico y noradrenérgico, en la etiología de la depresión, lo que ha conducido a la reciente introducción de un nuevo tipo de antidepresivos conocidos como inhibidores de la recaptación de 5-HT y NE (SRNIs). Esta clase de fármacos comparte esta acción fundamental con los del grupo de tricíclicos, pero se distinguen de ellos en que afectan de manera muy diferente a otros receptores, y por ello, sus efectos secundarios son muy distintos. Están representados por la venlafaxina, la duloxetina y el milnazipram. La venlafaxina es un inhibidor algo más potente de la recaptación de 5-HT que de la NE y carece virtualmente de afinidad sobre los receptores muscarínicos o α_1 -adrenérgicos, lo que determinará una ausencia de efectos secundarios anticolinérgicos o hipotensores.

Existe otro tipo de fármacos antidepresivos como el iprindol, mianserina o mirtazapina que carecen, en principio, de propiedades bloqueantes de la recaptación de aminas y cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo de distintos subtipos de receptores adrenérgicos y/o serotoninérgicos (Flórez, 2008).

En los últimos tiempos, se busca cada vez más la combinación de diferentes fármacos y mecanismos de acción. Han surgido también los inhibidores dobles

de la recaptación de dopamina (DA) y NE, e incluso, los inhibidores triples de la recaptación de 5-HT, DA y NE. Estos fármacos tienen la ventaja de que abordan el tratamiento de la enfermedad desde una perspectiva multicausal, además, permiten controlar otros síntomas subyacentes de la enfermedad y potencian el efecto de la inhibición de la recaptación de la 5-HT (Millan, 2009).

En la actualidad, la segunda generación de antidepresivos, los SRI tanto de 5-HT (SSRI) como de NA (SNRI), siguen siendo los antidepresivos más prescritos. El principal problema de estos fármacos que actúan sobre los sistemas monoaminérgicos, como ya se ha mencionado, es la tardía aparición del efecto antidepresivo y que un elevado número de pacientes no responden a esta medicación.

2. CANNABINOIDES Y DEPRESIÓN

El sistema de señalización eCB ha emergido en los últimos 20 años como un mecanismo de extrema importancia para la regulación de la plasticidad sináptica a corto y largo plazo. Este sistema juega un papel particularmente importante en los procesos de recompensa, miedo, extinción de la memoria, y estrés. Dado que todos estos procesos se encuentran alterados en la depresión mayor, un mejor entendimiento del sistema eCB resultaría de gran ayuda para un mejor conocimiento de la biología de la depresión. Gran número de evidencias clínicas muestran que, una pérdida de funcionalidad del sistema eCB resulta en alteraciones fenotípicas que asemejan los síntomas de la patología depresiva en seres humanos, mientras que las manipulaciones que conducen a la facilitación del sistema eCB, producen efectos antidepresivos en modelos de depresión. El estudio de polimorfismos genéticos en pacientes reflejó que, las diferencias genéticas en el sistema eCB podrían conferir resistencia o vulnerabilidad a padecer depresión. Todas estas evidencias experimentales y clínicas aportan solidez a la hipótesis de que los compuestos y otras manipulaciones que potencian la transmisión eCB podrían ser tratamientos efectivos para la depresión e incluso para otros trastornos de tipo psiquiátrico.

2.1. Sistema Endocannabinoide

A lo largo de la historia, la planta del *Cannabis sativa* ha sido utilizada con fines recreativos y por sus propiedades terapéuticas durante más de 4000 años. Fue en el año 1960, cuando se identificó y aisló por primera vez su principal componente psicotrópico, el delta 9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Mechoulam and Gaoni, 1965), de entre los más de 400 diferentes compuestos que contiene, de los cuales 100 son compuestos terpenofenólicos y considerados cannabinoides (Elsohly and Slade, 2005). A raíz de este descubrimiento se sintetizaron nuevos compuestos cannabimiméticos y tuvo lugar el inicio de una fuerte actividad investigadora en torno a esta familia de compuestos con fines

terapéuticos. Más de dos décadas fueron necesarias hasta que se identificaron los 2 receptores de cannabinoides acoplados a proteínas G que son la principal diana de este compuesto en el cerebro (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993), y se describió lo que hoy se conoce como el sistema endocannabinoide, un nuevo sistema de neurotransmisión que presenta diferencias fundamentales frente a los sistemas clásicos de neurotransmisión. Este sistema engloba los receptores cannabinoides, ligandos endógenos o endocannabinoides (eCB) y proteínas para su síntesis e inactivación, pero posee la peculiaridad de comportarse principalmente como un sistema modulador de la actividad de otros sistemas. El sistema eCB afecta principalmente a la comunicación sináptica neuronal, y por ello incide en un importante número de funciones biológicas, entre ellas, la ingesta de alimentos, la ansiedad, el aprendizaje y la memoria, la reproducción, el metabolismo, crecimiento y desarrollo, mediante numerosas acciones en todo el sistema nervioso.

Los eCBs son derivados del ácido araquidónico que se forman mediante la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana. Los principales son N-araquidoniletanolamida (Anandamide, AEA), que también se conoce como N-aciletanolamina (Devane et al., 1992), endovaniloides (Starowicz et al., 2007) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Sugiura et al., 1995). A diferencia de otros neurotransmisores no se almacenan en vesículas de secreción sino que se sintetizan “a demanda” en la neurona post-sináptica mediante remodelación de precursores lipídicos de membrana, y éstos activan los receptores cannabinoides que actúan como mensajeros retrógrados (Ahn et al., 2008). La AEA se forma presinápticamente y viaja a través de la hendidura sináptica para activar los receptores postsinápticos (Castillo et al., 2012). Se elimina del espacio extracelular mediante recaptación celular y degradación enzimática. La hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH), limita la actividad biológica de la AEA mediante su hidrólisis a ácido araquidónico y etanolamina, mientras que el 2-AG se metaboliza en las neuronas postsinápticas por la FAAH o en las neuronas presinápticas por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Ahn et al., 2008).

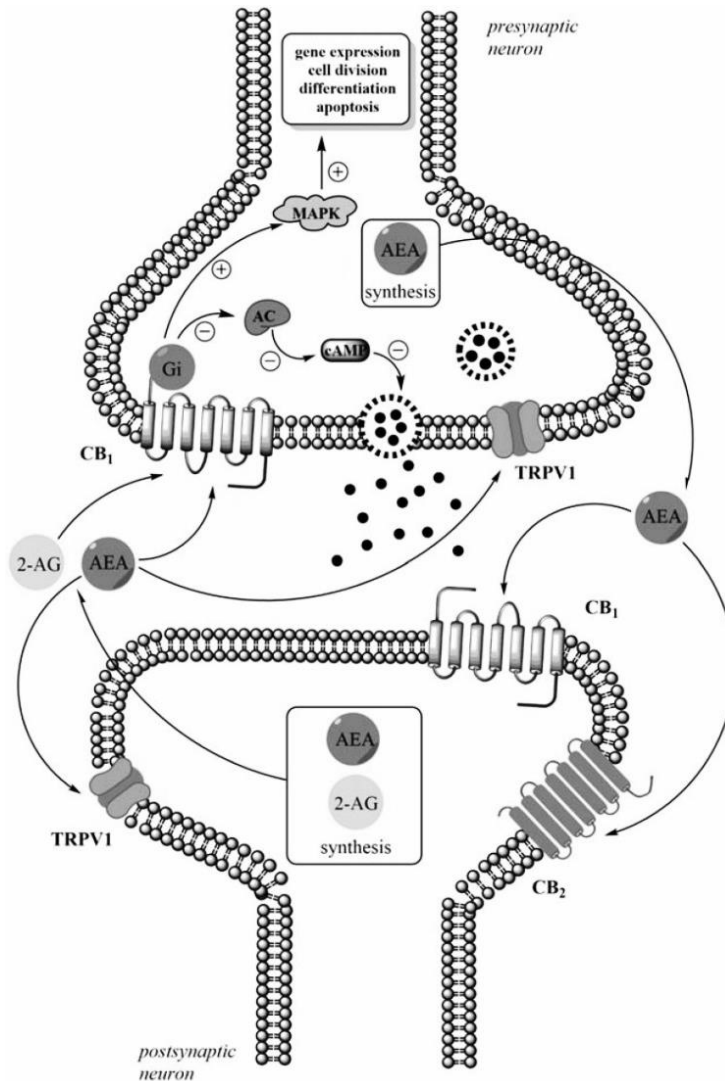


Imagen 4: Representación de la acción de los eCBS sobre los receptores cannabinoides. El 2-AG se sintetiza en los compartimentos dendríticos postsinápticos, mientras que la AEA puede sintetizarse tanto pre- como post-sinápticamente. Los eCBS se liberan al medio extracelular y actúan como mensajeros retrógrados. La activación de los receptores CB₁ se asocia a la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa dependiente de Gi, que da lugar a un descenso de la producción de AMPc, y modula de este modo la liberación de neurotransmisores. A través de las proteínas G, la activación de los receptores CB₁ activan la vía de las MAP quinasas, afectando de este modo a la expresión génica intracelular, a la división celular, diferenciación y apoptosis (Smaga et al., 2014).

Los receptores principales del sistema eCB son los CB₁ y CB₂. Se trata de receptores metabotrópicos con un dominio extracelular de unión a ligando (amino-terminal), 7 dominios transmembrana y un dominio intracelular (carboxi-terminal) que se encarga de la activación de las proteínas G heterotriméricas, generalmente Gi (19) (Howlett et al., 2002) aunque también ha sido encontrado el acoplamiento a proteínas Gs estimuladoras y Gq (Abadji et al., 1999; Hampson et al., 2000b; Lauckner et al., 2005). Tras la estimulación del receptor cannabinoide, se produce la activación de las proteínas G y con ello la inhibición de la adenilato ciclasa, lo cual conduce a una reducción de la concentración de AMPc intracelular. En el caso de los CB₁, también da lugar a la regulación de canales iónicos. Al mismo tiempo se estimula la vía de las mitogen activated protein kinase (MAPK) en concreto las quinasas reguladas por señal extracelular (ERK), aunque también las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Rueda et al., 2000) y la quinasa p38 (Paradisi et al., 2008). Adicionalmente el receptor CB₁ puede activar la phosphatidylinositol-3 quinasa (PI3K) (Galve-Roperh et al., 2002). Todo ello da lugar a cambios en la expresión génica, división celular, diferenciación y apoptosis celular.

Los receptores CB₁ son los más abundantes en el SNC. A nivel celular, los receptores CB₁ se localizan sobre todo en poblaciones neuronales como elementos presinápticos (Tsou et al., 1998). Se expresan principalmente en interneuronas inhibitorias (GABAérgicas) (Tsou et al., 1999) y en neuronas piramidales excitatorias (glutamatérgicas) (Brown et al., 2003), aunque también aparecen en neuronas peptidérgicas (opioides), serotoninérgicas o colinérgicas (Breivogel and Sim-Selley, 2009). En menor medida, se encuentran en oligodendrocitos (Molina-Holgado et al., 2002), progenitoras neuronales (Aguado et al., 2005) y astrocitos (Salio et al., 2002). La existencia de una comunicación neurona-astrocito mediada por eCBs ha sido recientemente descrita (Navarrete and Araque, 2008). Además, los receptores CB₁ han sido encontrados en diversos tejidos periféricos (Mackie, 2005). Existen evidencias de que el receptor CB₁ forma homodímeros in vivo (Wager-Miller et al., 2002), aunque también posee la habilidad de formar heterómeros con otros receptores,

como por ejemplo con el receptor D2 (Kearn et al., 2005), con el receptor orexin-1 (Ellis et al., 2006), con el μ -opioide (Rios et al., 2006), y con los receptores de adenosina A_{2A} (Carriba et al., 2007).

En cuanto al receptor CB₂ fue inicialmente considerado como el receptor cannabinoide periférico, ya que se expresa fundamentalmente en tejidos del sistema inmune, especialmente en el bazo, amígdalas y en algunas células del sistema inmune como los linfocitos T y B y monocitos. Sin embargo, recientemente se ha conseguido identificar la presencia de este receptor en SNC. Por ejemplo, se expresa en células gliales cerebrales, especialmente durante los procesos de neuroinflamación (Benito et al., 2008), pero la existencia de receptores CB₂ en cerebro ha generado mucha controversia (Atwood and Mackie, 2010). Se ha propuesto que bajo condiciones de daño cerebral, los receptores CB₂ podrían actuar como freno de la proliferación microglial y de sus procesos migratorios, y podría así reducir la toxicidad de estas células (por ejemplo, reduciendo la producción de citoquinas), y desempeñando un papel protector en el mantenimiento de la homeostasis neuronal (Ashton and Glass, 2007; Sagredo et al., 2007).

Por otra parte, se ha descubierto que existen otros lugares de acción para los eCBs y compuestos cannabinoide exógenos de origen natural o de síntesis, que sugieren la existencia de otros receptores, tales como el receptor vaniloide tipo 1 (TRPV1) (Toth et al., 2009; Zygmunt et al., 1999), un posible receptor cannabinoide CB₃ (Breivogel et al., 2001; Di Marzo et al., 2000), o el receptor huérfano recientemente propuesto GPR55 (Ryberg et al., 2007), entre otros. El papel que juegan estos receptores en el sistema eCB está por ser elucidado y para ello ha de ser estudiado más en profundidad.

2.2. El sistema endocannabinoide en la patología depresiva

El cannabis ha sido utilizado desde hace siglos por las diferentes culturas por sus efectos euforizantes y de mejora del estado de ánimo. Sin embargo, la primera publicación científica que discute en profundidad la posibilidad de que el sistema eCB se encuentre implicado en la neurobiología de la depresión data del año 2005 (Hill and Gorzalka, 2005a). Desde ese momento, se han publicado numerosos hallazgos de una disregulación del sistema eCB como posible causa subyacente a las alteraciones del estado de ánimo.

Muchas de las evidencias que sustentan esta hipótesis provienen de estudios con animales transgénicos KO para el receptor CB₁. Estos animales presentan mayor vulnerabilidad al desarrollo de anhedonia ante la exposición a estrés crónico (Martin et al., 2002). Además, muestran una mayor respuesta pasiva y menor lucha en el FST (Steiner, 2008b), así como una mayor inmovilidad en el *tail suspension test* (TST) (Aso et al., 2008). También se registraron en estos animales niveles más elevados de corticosterona circulante como respuesta a eventos estresantes, lo que sugiere una hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Urighuen et al., 2004) y que coincide con uno de los hallazgos fundamentales en la patología depresiva.

En paralelo a estos hallazgos algunos autores demostraron que la disrupción de la señalización vía receptor CB₁ conduce al desarrollo de anhedonia, conductas pasivas de hacer frente al estrés y déficits cognitivos (Rubino, 2008c, 2009). Este patrón conductual se acompañó de hallazgos de tipo bioquímico. Por ejemplo, se encontraron alteraciones de la expresión de CREB en determinadas áreas cerebrales, niveles descendidos de marcadores de neuroplasticidad y un menor número de sinapsis activas en PFCx (Rubino et al., 2009; Rubino et al., 2008).

Por otro lado, se han encontrado evidencias de que el antagonismo CB₁ de manera aguda provoca efectos antidepresivos en FST y TST (Griebel et al., 2005; Shearman et al., 2003; Takahashi et al., 2008; Tzavara et al., 2003). Este hecho contrasta con los hallazgos en animales KO, donde parece claro que la

disrupción CB₁ conduce a un fenotipo depresivo, aunque se sabe que la abolición constitutiva de los receptores CB₁, conlleva una serie de adaptaciones a largo plazo que poco tienen que ver con el bloqueo farmacológico agudo de estos receptores.

Por otra parte, se han encontrado efectos pro-depresivos tras la administración crónica de antagonistas CB₁, como fue el caso del rimonabant, aprobado para su ensayo clínico como agente anti-obesidad y que fue retirado del mercado por promover la aparición de síntomas depresivos en los pacientes (Nissen et al., 2008).

Estudios genéticos en pacientes han demostrado que alteraciones en el receptor CB₁ están asociados con un mayor riesgo de padecer depresión ante estímulos estresantes (Juhász et al., 2009) y una respuesta aminorada a estímulos sociales placenteros (Domschke et al., 2008).

El sistema EC ha sido objeto de estudio en los modelos animales de depresión. A continuación se muestran dos tablas con las alteraciones de los principales elementos del sistema eCB (Parolaro et al., 2010) tanto en modelos animales como en pacientes deprimidos víctimas de suicidio.

Tabla 1: Alteraciones en la densidad de receptores CB₁ en depresión (Parolaro et al., 2010).

Species	Model	Brain region	CB1 receptor
Rat	Chronic mild stress	Prefrontal Cortex	↑
		Midbrain	↓
Rat	Chronic unpredictable stress	Prefrontal Cortex	↑
		Hippocampus	↓
		Hypothalamus	↓
		Ventral striatum	↓
Rat	Chronic mild stress	hippocampus	↓
Rat	Bilateral olfactory bulbectomy	Prefrontal Cortex	↑
Female rat	Adolescent exposure to THC	Nucleus accumbens	↓
		Amygdala	↓
		Ventral tegmental area	↓
Human	Depressed suicide victims	Dorso-lateral Prefrontal Cortex	↑

En el modelo de la OBX en rata fue descrito un incremento de la funcionalidad del receptor CB₁ en algunas áreas cerebrales (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2009) y en concreto en la PFCx coincidiendo con lo encontrado en otros modelos animales y en víctimas de suicidio (Hungund et al., 2004), que no se encontró tras el tratamiento con antidepresivos (Valdizán, 2011).

En el caso de los eCBs, las diferencias en los niveles encontradas en los diferentes paradigmas podrían reflejar diferencias en el grado de estrés al que los animales fueron sometidos, o el tiempo que transcurrió hasta el momento de la extracción de la muestra, no podemos olvidar que los eCBs son sintetizados de manera inmediata y a demanda. En cualquier caso, parece clara la existencia de una regulación a la baja del sistema eCB en muchas áreas cerebrales, acompañado de una hiperfunción en la PFCx. También se ha descrito una hipofunción periférica, donde se encontró un descenso de los niveles séricos de eCB en mujeres con depresión mayor (Hill et al., 2009).

Tabla 2: Alteraciones de los niveles de eCBs en depresión (Parolaro et al., 2010).

Species	Model	Brain region	Endocannabinoid	
			AEA	2-AG
Rat	Chronic mild stress	Midbrain	↔	↔
		Thalamus	↔	↑
		Striatum	↔	↔
		Hippocampus	↔	↔
		Prefrontal cortex	↔	↔
Rat	Chronic unpredictable stress	Prefrontal cortex	↓	↔
		Hippocampus	↓	↔
		Hypothalamus	↓	↑
		Amygdala	↓	↔
		Midbrain	↓	↑
Rat	Chronic unpredictable stress	Ventral striatum	↓	↔
		Hippocampus		↓
Human	Women with major depression	Serum levels	↓	↓

De gran interés resulta el hecho la administración crónica de antidepresivos clásicos de lugar, por ejemplo, a una reversión de la hiperfuncionalidad de los receptor CB₁ del modelo OBX (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2009). Además de este estudio, existen otros trabajos en los que se observó que la administración de antidepresivos promovía alteraciones del sistema eCB (Hill et al., 2008; Hill et al., 2006; Smaga et al., 2014). Estos hallazgos apuntan a un papel fundamental del sistema eCB en la reversión de la sintomatología depresiva, aunque podría tratarse de una consecuencia de la mejoría conductual en lugar de su causa, por lo que, es necesario continuar investigando al respecto.

Considerando todo lo anterior, parece clara la existencia de una disfunción del sistema eCB en la patología depresiva. Por ello, la modulación del sistema eCB supone una nueva posibilidad como diana terapéutica para obtener nuevos antidepresivos que quizá logren solventar las limitaciones actuales de la terapia en este campo.

2.2.1. Efectos sobre la depresión de la modulación farmacológica del sistema endocannabinoide

Hasta la fecha, la tendencia más generalizada es considerar que la facilitación de este sistema podría ser de gran utilidad en la terapia antidepresiva. La administración de agonistas cannabinoides CB₁ de manera aguda dio resultados positivos en paradigmas diseñados para la búsqueda de nuevos antidepresivos. Así por ejemplo, se observó un descenso de la inmovilidad en el FST (Bambico et al., 2007; Gobbi et al., 2005; Hill and Gorzalka, 2005b; McLaughlin et al., 2007). Además, este efecto antidepresivo se mantuvo tras la administración crónica de los agonistas CB₁ (Gobbi et al., 2005; Jiang et al., 2005; Morrish et al., 2009), y también se observó mediante otra estrategia de facilitación endocannabonoide. La inhibición de la acción de la FAAH (URB597) que provoca un incremento de los niveles de AEA endógena, también promovió

la reversión del fenotipo depresivo en modelos animales de depresión (Adamczyk et al., 2008; Realini et al., 2011).

De manera paradójica, existen numerosas evidencias que demuestran que el antagonismo cannabinoide dio lugar a efectos antidepresivos en animales en modelos animales de depresión (Griebel et al., 2005; Shearman et al., 2003; Steiner et al., 2008; Tzavara et al., 2003), o que al ser coadministrados junto con antidepresivos clásicos, mejoró su eficacia antidepresiva (Ortega et al., 2013; Takahashi et al., 2008). Estos hallazgos contrastan con los efectos que se registraron en ensayos clínicos en pacientes, donde la administración del antagonista CB₁ (rimonabant) produjo aumento la prevalencia de síntomas depresivos y que obligó a su retirada del mercado (Nissen et al., 2008).

Sin embargo, no podemos olvidar que el sistema eCB presenta determinadas peculiaridades que lo diferencian de otros sistemas de neurotransmisión, y que dan lugar a fenómenos como las curvas dosis-respuesta en forma de U. De modo que podemos encontrar para un mismo compuesto cannabinoide un efecto y el contrario en función de la dosis administrada (Onaivi et al., 1990; Sulcova et al., 1998). Así pues, parece de crucial importancia el ajuste de dosis personalizado para cada paciente en el caso de la terapia con cannabinoides.

2.2.2. Posibles mecanismos bioquímicos subyacentes al efecto antidepresivo de los cannabinoides

A fin de comprender el modo en que los cannabinoides provocan sus efectos antidepresivos, y dado que los cannabinoides modulan otros sistemas de neurotransmisión y afectan procesos implicados en la patología depresiva, se han estudiado los efectos de su administración sobre estos sistemas. Así por ejemplo, se han estudiado los niveles de monoaminas cerebrales tras la administración de cannabinoides ya que éste es el mecanismo principal por el que ejercen sus acciones los antidepresivos clásicos (Berton and Nestler, 2006).

Se ha demostrado que la administración de agentes cannabinoides tanto agonistas, antagonistas CB₁ y la inhibición de la FAAH, aumentan el *firing* del rafe (Bambico et al., 2007; Gobbi et al., 2005), aunque se han observado fenómenos bifásicos dosis dependientes, encontrando del mismo modo que en estudios conductuales, efectos opuestos a dosis altas o bajas. Incluso se ha comprobado que la inhibición de los efectos según la dosis, depende de distintos receptores, implicando a los receptores TRPV1 en los efectos de las dosis altas de agonistas CB₁ sobre el *firing* del rafe, y cuya entrada en escena podría de algún modo explicar los fenómenos bifásicos dosis dependientes que se producen con los compuestos cannabinoides (Bambico et al., 2007). Otra posible explicación es el hecho de que los receptores CB₁ se expresan en áreas presinápticas de diferentes poblaciones neuronales cuya estimulación puede conducir a efectos opuestos (Marsicano and Lutz, 2006). La liberación de 5-HT en áreas postsinápticas como PFCx se ve favorecida por antagonistas y dificultada por agonistas CB₁ (Kleijn et al., 2011; Ortega et al., 2013). Resulta interesante el hecho de la administración local de cannabinoides en el rafe dorsal apenas modifique su actividad neuronal, mientras que la administración en PFCx promueva efectos similar a los obtenidos tras la administración sistémica. Por otra parte, la transección de PFCx impide los efectos de los cannabinoides sobre el *firing* del rafe (Bambico et al., 2007). Todo ello indica un papel fundamental de la PFCx en la iniciación de los efectos antidepresivos de los cannabinoides.

En cuanto al sistema noradrenérgico, se encontró que la estimulación CB₁ provocaba un aumento del *firing* del locus coeruleus y de la liberación de NE en PFCx (Gobbi et al., 2005; Oropeza et al., 2005). En estudios de administración crónica de agonistas CB₁ se describió también la implicación del sistema noradrenérgico en sus efectos antidepresivos en el FST, que eran atenuados mediante el bloqueo tanto α y β -adrenérgicos (Morrish et al., 2009).

Tabla 3: Efecto agudo de la administración de cannabinoides en los sistemas monoaminérgicos en rata, ratón adultos o en regiones cerebrales humanas (Esteban and Garcia-Sevilla, 2012).

Drug treatment (dose or concentration)	Brain region and net effect (% basal change)
<i>Norepinephrine system</i>	
URB597 (0.1 mg/kg)	LC, ↑ firing rate (~55%)
WIN55,212-2, CP55,940 (0.1–0.5 mg/kg)	LC, ↑ firing rate (35–57%)
WIN55,212-2, THC (0.12–1 mg/kg)	LC, ↑ firing rate (20–40%)
SR141716A (0.06–1.0 mg/kg)	LC, ↓ firing rate (~15%)
WIN55,212-2, THC (4–20 mg/kg)	LC/CC/HC/HP, ↑dopa synthesis (35–170%)
SR141716A, AM281 (10 mg/kg)	CC/HC, ≈dopa synthesis
WIN55,212-2 (3, 15 mg/kg)	PFC, ↑ NE release (45–103%)
SR141716A (0.3 mg/kg)	PFC, ≈NE release
WIN55,212-2 (15 mg/kg)	PFC, ↑ NE release (~150%)
SR141716A (0.3–10 mg/kg)	PFC/HT, ↑ NE release (80–200%)
WIN55,212-2 (0.1–10 μM)	HC, ↓ NE release (20–60%)
CP55,940 (up to 1 μM)	HC, ≈NE release
WIN55,212-2, CP55,940 (0.1–10 μM)	HC, ↓ NE release (~25–50%)
WIN55,212-2 (0.1 nM–1 μM)	CC, ≈NE release
<i>Serotonergic system</i>	
URB597 (0.03–0.3 mg/kg)	DR, ↑ firing rate (~81%)
WIN55,212-2 (0.1–0.2 mg/kg)	DR, ↑ firing rate (55–96%)
WIN55,212-2 (0.4 mg/kg)	DR, ↓ firing rate (45%)
WIN55,212-2, THC (4–20 mg/kg)	CC/HC, ↓ 5-HTP synthesis (17–49%)
SR141716A (10 mg/kg)	CC/HC, ≈5-HTP synthesis
THC (6 mg/kg)	HC, ↓ 5-HT release (~60%)
THC (10 mg/kg)	NAcc, ↓ 5-HT release (~50%)
SR141716A (10 mg/kg)	NAcc/PFC ↑ 5-HT release (39–100%)
WIN55,212-2, CP55,940 (1 μM)	CC, ↓ 5-HT release (~20%)
Anandamide (10 μM)	DR, ↓ firing rate (43%)
ACEA (1 μM)	DR, ↑ firing rate (11%)
SR141716A, AM251 (1 μM)	DR, ↓ firing rate (53–62%)
<i>Dopaminergic system</i>	
THC, WIN55,212-2, CP55,940 (0.1–1 mg/kg)	VTA, ↑ firing rate (120–187%)
SR141716A (0.3–3 mg/kg)	VTA, ≈firing rate
SR141716A (1, 10 mg/kg)	VTA, ≈firing rate
THC (0.125–0.5 mg/kg)	SN, ↑ firing rate (~25%)
SR141716A (0.3–3 mg/kg)	VTA/SN, ≈firing rate
THC (5 mg/kg)	VTA/SN, ↑ firing rate (23–46%)
HU210 (100 μg/kg)	VTA, ↑ firing rate (214%)
THC (0.25–2 mg/kg)	SN, ↑ firing rate (~33%)
WIN55,212-2, THC (4–20 mg/kg)	St, ↓ dopa synthesis (16–37%)
THC (0.5–1 mg/kg)	NAcc, ↑ DA release
THC (1, 10 mg/kg)	St, ≈DA release
THC, WIN55,212-2 (0.1–0.3 mg/kg)	NAcc, ↑ DA release (130–150%)
THC (0.5–5 mg/kg)	St, ↑ DA release (42–97%)
SR141716A (10 mg/kg)	PFC, ↑ DA release (163%)
SR141716A (10 mg/kg)	NAcc, ≈DA release
CP55,940, anandamide (1,10 μM)	St, ↓ DA release (~50%)
WIN55,212-2, CP55,940 (1 μM)	St/NAcc, ≈DA release
WIN55,212-2 (3 μM)	St, ↓ DA release (~30%)
HU210 (3–10 μM)	VTA, ↑ firing rate (400%)
WIN55,212-2 (1–5 μM)	St, ↓ DA release (~30%)

Efecto neto: ↑ Incremento, ↓ descenso; ≈ sin cambios significativos. URB597: inhibidor de la FAAH; WIN55212-2, CP-55,9940; HU210, ACEA: agonistas del receptor CB₁; SR141716A o rimonabant: antagonista del receptor CB₁/agonista inverso; THC (Δ⁹-THC); AM251 y AM281: antagonistas del receptor CB₁. LC: locus coeruleus; PFC: cortex prefrontal; CC: cortex cerebral; HC: hipocampo; HT: hipotálamo; NAcc: Nucleus accumbens; 5-HTP: 5-hidroxi-triptófano.

En lo que respecta al eje HPA, los agentes facilitadores de la transmisión eCB atenúan la respuesta neuroendocrina al estrés y facilitan las respuestas de afrontamiento del estrés (Gorzalka et al., 2008; Patel et al., 2004).

Recientemente se ha demostrado que el descenso en la neurogénesis hipocampal provocado por estrés parece ser un factor predisponente a padecer depresión, lo cual condujo a hipotetizar que, el incremento en dicho proceso podría resultar de gran utilidad en el tratamiento de la depresión (Drew and Hen, 2007; Perera et al., 2008). Los cannabinoides también inciden sobre este proceso favoreciendo la neurogénesis en cerebro adulto de manera CB₁/ CB₂-dependiente (Campos et al., 2013b; Goncalves et al., 2008; Hill et al., 2006; Jiang et al., 2005; Marchalant et al., 2009).

También ha sido relacionada la expresión de BDNF y de otras proteínas implicadas neuroplasticidad, con la depresión y la eficacia antidepresiva (Duman and Monteggia, 2006) y los agentes cannabinoides son capaces de modificar su expresión (Derkinderen et al., 2003; Magen et al., 2009; Rubino et al., 2006; Zhao and Levine, 2014).

Por último, como ya se ha mencionado, recientemente se han relacionado los sistemas de transmisión glutamatérgica con los efectos antidepresivos rápidos de fármacos como la ketamina. Los receptores CB₁ se encuentran en gran número en las terminales sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas, desempeñando un papel fundamental en la inhibición retrógrada de su actividad neuronal y por tanto, modulando la actividad de estas poblaciones neuronales (Herkenham et al., 1990; Kawamura et al., 2006; Marsicano and Lutz, 2006; Tanimura et al., 2009). Por otra parte, los receptores CB₁ se localizan de igual modo en células astrogliales (Navarrete and Araque, 2010), desde donde controlan la liberación de glutamato de manera Ca²⁺ dependiente y por tanto la actividad excitatoria de este sistema. Teniendo en cuenta el fuerte control que ejerce el receptor CB₁ sobre el sistema glutamatérgico, cabe esperar que la modulación cannabinoide pueda resultar de gran utilidad en el tratamiento

antidepresivo incluso de manera más rápida que modulando sólo los sistemas de neurotransmisión clásicos como el serotoninérgico y noradrenérgico.

De manera colectiva, todas estas evidencias respaldan la implicación del sistema eCB en la fisiopatología de la depresión, y además y dadas sus particularidades, abren una nueva vía para el abordaje terapéutico de la enfermedad. Sin embargo, es necesario seguir investigando al respecto ya que el conocimiento del funcionamiento del sistema eCB es aún escaso y ambiguo.

2.3. Cannabidiol

El cannabidiol (CBD), principal componente no psicotomimético del extracto del *Cannabis Sativa*, fue aislado por primera vez en 1940 y su estructura y estereoquímica fueron determinadas en 1963 (Michoulam and Shvo, 1963). El CBD es un compuesto que incluye un anillo resorcinol y para el cual se encontraron importantes propiedades antioxidantes directas en estudios de voltametría y ensayos espectrofotométricos de oxidación mediante la reacción de Fenton.

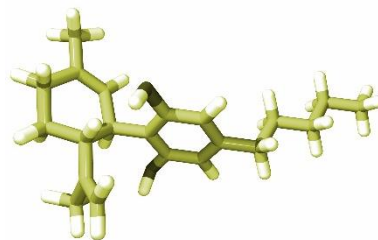


Imagen 5: Representación tridimensional de la estructura química del (-)Cannabidiol.

2.3.1. Aspectos Farmacocinéticos

2.3.1.1. Absorción

La vía de consumo más frecuente del CBD es la vía inhalatoria (cannabis fumado), y por tanto, existen algunos datos acerca del perfil farmacocinético de este compuesto, aunque ésta no es una vía de administración apropiada para la terapéutica. También se han utilizado dispositivos para la aerosolización o vaporización con los que la administración de CBD da lugar a una biodisponibilidad de en torno a un 31 % (Devinsky et al., 2014). También se ha administrado en formulaciones orales como cápsulas lipídicas, aunque dada su elevada lipofilia, el proceso de absorción gastrointestinal es altamente variable y conlleva gran variabilidad en los procesos farmacocinéticos. La biodisponibilidad oral es baja, se ha estimado que alrededor de un 6 % debido a que experimenta metabolismo de primer paso hepático (Devinsky et al., 2014), y formulaciones de liberación sublingual/oro-mucosa han dado lugar a una biodisponibilidad similar aunque sujetas a una menor variabilidad. También se han investigado sistemas de liberación transdérmicos, aunque dada su elevada lipofilia se requieren sistemas de liberación específicos (etosomas) para evitar su acúmulo en la piel, que son costosos y poco prácticos (Lodzki et al., 2003).

2.3.1.2. Distribución

La distribución del CBD está fuertemente determinada por su gran lipofilia ($K_{\text{octanol-water}}=6-7$) y elevado volumen de distribución (estimado en 32 L/kg), con una rápida distribución a cerebro, tejido adiposo, y otros órganos (Devinsky et al., 2014). Presenta también un elevado coeficiente de unión a proteínas plasmáticas y en torno a un 10% circula unido a células sanguíneas. Esta distribución preferencial hacia tejidos adiposos seguida de una lenta liberación desde los mismos, da lugar a su acumulación en tejido graso tras la administración repetida, aunque no en cerebro (Nahas et al., 1981). Por ello, resulta importante considerar que su farmacocinética posiblemente responda a un modelo tricompartimental y el ajuste de la dosis tras la exposición prolongada al compuesto resulta fundamental.

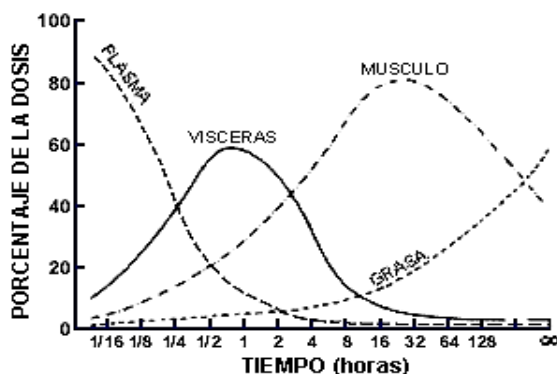
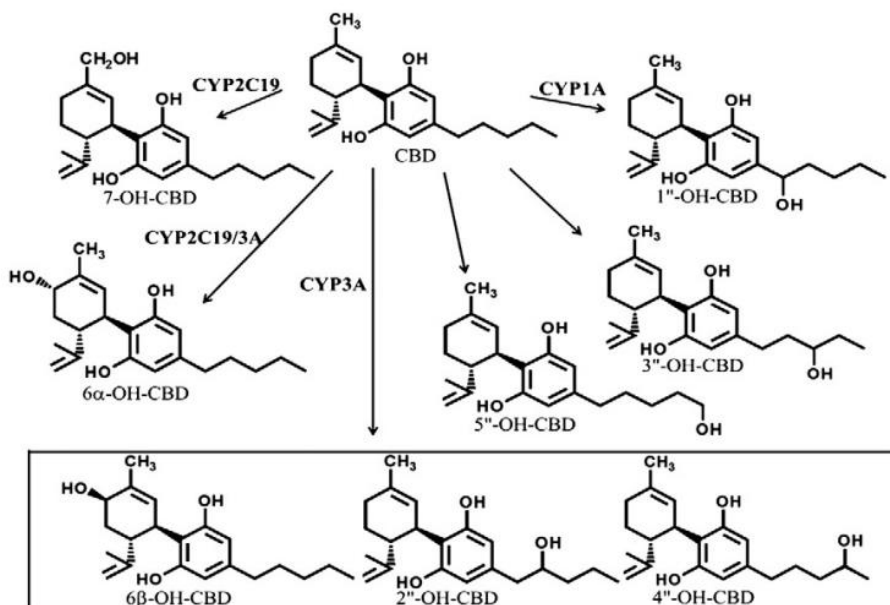


Imagen 6: Modificada de Prices *et al.* Ejemplo de modelo cinético tricompartimental: distribución del tiopental en el cuerpo humano (Price, 1960).

2.3.1.3. Metabolismo y eliminación

Como la mayoría de los cannabinoides, el CBD se metaboliza ampliamente en el hígado mediante reacciones de hidroxilación por el citocromo P450 (CYP), especialmente por las familias de isozimas CYP3A (2/4) y CYP2C (8/9/19) (Jiang et al., 2011). Su principal metabolito es metabolizado de nuevo en el hígado, y los metabolitos resultantes se excretan en heces y en menor proporción en orina. La semivida de eliminación en la especie humana se ha estimado en 18-32 horas tras una administración sencilla en consumidores crónicos de cannabis, con un aclaramiento de 960-1560 ml/min.

Imagen 5: Vías metabólicas del CBD en microsomas hepáticos humanos (Jiang et al., 2011).



2.3.2. Interacciones farmacológicas

De nuevo, existen pocos datos acerca de las interacciones del CBD con otros fármacos aunque teóricamente podrían existir y resultar de cierta relevancia en pacientes con tratamiento antiepiléptico.

El CBD es un potente inhibidor de las isozimas CYP, principalmente de CYP2C y CYP3A, en modelos animales e *in vitro* (Harvey, 1999). Este dato es particularmente importante ya que muchos fármacos son metabolizados por el CYP3A4. Sin embargo, esta inhibición no ha sido observada a las dosis utilizadas en estudios en pacientes (Harvey, 1999).

La administración continuada podría dar lugar a inducción hepática del CYP2B, según lo observado en modelos animales. Ya que muchos de los fármacos antiepilépticos son metabolizados por la familia de enzimas del CYP2B resulta relevante tenerlo en consideración. Por otro lado, algunos fármacos antiepilépticos son inductores del CYP3A4, por lo que las concentraciones plasmáticas de CBD podrían verse disminuidas.

2.3.3. Aspectos farmacodinámicos

2.3.3.1. Acciones farmacológicas

El CBD ha demostrado poseer numerosas propiedades farmacológicas (Fernandez-Ruiz et al., 2013). A nivel del SNC destacan, por ejemplo, la actividad antipsicótica, ansiolítica, hipnótica, “anticraving” y anticonvulsivante (Carlini et al., 1973; Casarotto et al., 2010; Long et al., 2010; Monti, 1977; Moreira et al., 2006; Ren et al., 2009; Schubart et al., 2011; Zuardi et al., 2006).

Principalmente, las acciones ansiolíticas del CBD han promovido su uso y han sido demostradas en ensayos clínicos (Bergamaschi et al., 2011a; Zuardi et al., 1993). Por otro lado, el CBD se ha propuesto para el tratamiento de la epilepsia por su actividad anticonvulsivante (Cortesi and Fusar-Poli, 2007; Cunha et al., 1980), para la esquizofrenia por sus efectos antipsicóticos (Leweke et al., 2012; Schubart et al., 2011; Zuardi et al., 2006) e incluso para tratar los desórdenes del sueño (Murillo-Rodriguez et al., 2006).

Además, se han observado propiedades antitumorales y por ello, ha sido probado para el tratamiento de determinados tipos de cáncer (Ligresti et al., 2006; Massi et al., 2006). Por otra parte, se ha demostrado que el CBD posee eficacia antiinflamatoria y antioxidante, y por tanto podría resultar de gran utilidad en enfermedades de origen inflamatorio, entre otras, patologías de tipo periférico como la artritis (Blake et al., 2006; Malfait et al., 2000), y e incluso para el tratamiento de la espasticidad severa y el dolor en esclerosis múltiple, donde ha mostrado resultados positivos en ensayos clínicos (Costa et al., 2004; Rekand, 2014; Sastre-Garriga et al., 2011). Del mismo modo, se ha estudiado su potencial terapéutico para el tratamiento del dolor neuropático (Langford et al., 2013; Serpell et al., 2014; Toth et al., 2010) y asociado a reacciones inflamatorias derivadas de otras patologías como la diabética (Rajesh et al., 2007).

Basándonos en sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes también se ha demostrado que posee un perfil neuroprotector por lo que se están

realizando ensayos preclínicos de enfermedades neurodegenerativas (Cheng et al., 2014; Hampson et al., 1998; Hayakawa et al., 2007; Pazos et al., 2013; Sagredo et al., 2007).

2.3.3.2. Mecanismo de acción

Aunque en la actualidad se conocen cada vez mejor los efectos farmacológicos del CBD, el modo en que promueve cada uno de ellos continúa sin haber sido completamente esclarecido. De hecho, a diferencia de lo que cabría esperar por su naturaleza cannabinoide, la mayoría de sus efectos terapéuticos no se derivan de su actividad sobre el sistema eCB, sino de su acción sobre otros sistemas. En realidad, parece que la propia naturaleza química del CBD, en cuya estructura incluye dos grupos hidroxilo, le confieren propiedades antioxidantes a las que se atribuyen muchos de sus efectos terapéuticos (Mechoulam et al., 2002).

Entre sus dianas moleculares se encuentran receptores, canales iónicos, enzimas, y procesos de recaptación celular. A continuación se muestra una tabla resumen de los principales hallazgos al respecto, donde se puede apreciar la gran versatilidad de este compuesto.

Entre los principales mecanismos estudiados para el CBD destaca, en primer lugar, su acción sobre el sistema eCB. Por un lado, el CBD ha mostrado propiedades como antagonista/agonista inverso sobre los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ en estudios *in vitro* aunque presenta baja afinidad por los mismos (Thomas et al., 2007). Por otro lado, la administración de CBD promueve un incremento en los niveles de AEA bien sea mediante la inhibición de su recaptación o mediante un descenso de la actividad de la enzima FAAH responsable de su hidrólisis (Bisogno et al., 2001; Leweke et al., 2012). Además, el CBD es un agonista parcial de los receptores vaniloides tipo 1 (TPRV1) (Bisogno et al., 2001) y tipo 2 (TRPV2) (De Petrocellis et al., 2011), dianas de la AEA endógena, a concentraciones superiores a las requeridas para su unión

a los receptores cannabinoides tipo 1 y 2. Efectos como el incremento en los procesos neurogenéticos se han relacionado con sus efectos sobre el receptor CB₁ bien sea de manera directa o indirecta mediante el incremento de los niveles de AEA (Campos et al., 2013b).

Posiblemente el principal mecanismo de acción del CBD y que ha dado lugar a una amplia discusión científica, se centra en sus efectos sobre el sistema serotoninérgico y concretamente, a través del receptor 5-HT_{1A}. En numerosos estudios se ha comprobado que el antagonismo farmacológico de este receptor es capaz de impedir muchas de las acciones del CBD, de manera que el modo en que el CBD interacciona con este receptor ha sido ampliamente estudiado.

Russo y colaboradores demostraron que el CBD se unía a los receptores 5HT_{1A} humano en células ováricas promoviendo su activación a altas concentraciones (Russo et al., 2005). Sin embargo, estos resultados no han sido reproducidos por otros autores. Por otro lado, Rock y colaboradores (Rock et al., 2012) encontraron que el CBD a dosis bajas provoca una potenciación de la actividad de la 8-OH-DPAT, es decir, un agonismo indirecto sugiriendo como posible mecanismo una modulación alostérica positiva del receptor.

La mayoría de los efectos beneficiosos a nivel conductual sobre la ansiedad (Campos and Guimaraes, 2008; Fogaca et al., 2014), el estrés (Campos et al., 2012; Resstel et al., 2009) y el pánico (Campos et al., 2013a; Soares Vde et al., 2010; Twardowschy et al., 2013), así como el antidepresivo agudo (Zanelati et al., 2010), anorexigénico, antiemético (Rock et al., 2012), neuroprotector (Pazos et al., 2013) y determinados efectos motores (Espejo-Porras et al., 2013), han sido atribuidos a la actividad del CBD sobre el sistema serotoninérgico que además requieren de la integridad funcional del receptor 5HT_{1A}.

Tabla 4 (Fernandez-Ruiz et al., 2013): Relación de los receptores, canales iónicos, enzimas y procesos de transporte celular que pueden ser activados, antagonizados o inhibidos *in vitro* por el CBD según lo descrito (Fernandez-Ruiz et al., 2013). 5-HT: serotonina; DA: Dopamina; GABA: ácido γ -aminobutírico; NE: Noradrenalina. *Modulación alostérica aparente, (+) activación; (-) inhibición o antagonismo.

CBD concentration	Pharmacological target and effect
Receptors and channels	
<1 μM	CB ₁ receptor (-)
	CB ₂ receptor (-)
	GPR55 (-)
	5-HT _{3A} ligand-gated channel (-)*
	TRPM8 cation channel (-)
1–10 μM	TRPA1 cation channel (+)
	PPAR γ nuclear receptor (+)
	Ca _v 3 T-type Ca ²⁺ channels (-)
	TRPV1 cation channel (+)
	TRPV2 cation channel (+)
>10 μM	5-HT _{1A} receptor (+)
	μ and δ opioid receptors (-)*
	α_1 and $\alpha_1\beta$ glycine ligand-gated channels (+)*
Enzymes	
<1 μM	CYP1A1 (-)
1–10 μM	CYP1A2 & CYP1B1 (-)
	CYP2B6 (-)
	CYP2D6 (-)
	CYP3A5 (-)
	Mg ²⁺ -ATPase (-)
	Arylalkylamine N-acetyltransferase (-)
	Indoleamine-2,3-dioxygenase (-)
	15-lipoxygenase (-)
	Phospholipase A ₂ (+)
	Glutathione peroxidase (+)
>10 μM	Glutathione reductase (+)
	CYP2A6 (-)
	CYP3A4 and CYP3A7 (-)
	Fatty acid amide hydrolase (-)
	5-lipoxygenase (-)
	Superoxide dismutase (-)
	Catalase (-)
	NAD(P)H-quinone reductase (-)
	Progesterone 17 α -hydroxylase (-)
	Testosterone 6 β -hydroxylase (-)
	Testosterone 16 α -hydroxylase (-)
Transporters and cellular uptake	
<1 μM	Adenosine uptake by cultured microglia and macrophages (-)
1–10 μM	Calcium uptake by synaptosomes (-)
	NE, DA, 5-HT and GABA uptake by synaptosomes (-)
	Anandamide and palmitoylethanolamide cellular uptake (-)
	P-glycoprotein (drug efflux transporter) (-)
>10 μM	Choline uptake by rat hippocampal homogenates (-)

Aparte de su actividad sobre los sistemas endocannabinooide y serotoninérgico, las acciones del CBD parecen involucrar a otros sistemas. Así pues, existen estudios que demuestran que el CBD inhibe de la recaptación de adenosina, facilitando de este modo la señalización a través de sus principales receptores A_{1A} y A_{2A} (Carrier et al., 2006; Castillo et al., 2010; Gonca and Darici, 2015). Con esta acción se relacionan entre otros los efectos terapéuticos de tipo antiinflamatorio y neuroprotector (Liou et al., 2008; Magen et al., 2009; Olah et al., 2014; Ribeiro et al., 2012).

Del mismo modo, se ha comprobado que el CBD es capaz activar los receptores de peroxidasa nucleares PPAR γ , reduciendo la neurodegeneración e inflamación (Esposito et al., 2011; O'Sullivan and Kendall, 2010), y por otro lado, modula la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2 (Ramer et al., 2013; Wheal et al., 2014). Estos efectos junto con otros innatos como su potencial antioxidante, han dado lugar a resultados prometedores en procesos de tipo canceroso, inflamatorios, etc... Cabe señalar, que el CBD promueve alteraciones fundamentales en vías de señalización intracelulares asociadas directamente a algunas de estas patologías, entre ellas destacan ERK, ROS, Akt o MAPK JNK (Aviello et al., 2012; McAllister et al., 2011; Solinas et al., 2013; Yang et al., 2014).

Finalmente, otro de los mecanismos implicados en las acciones neuroprotectoras del CBD entre otras, parece ser la normalización de la homeostasis glutamatérgica de una manera indirecta (Castillo et al., 2010; Pandolfo et al., 2011). Se ha descrito que el CBD previene la toxicidad glutamatérgica en modelos in vitro de daño celular (Hampson et al., 2000a). Por otra parte, parece modular los niveles de glutamato posiblemente mediante su acción sobre elementos que controlan precisamente la liberación de este aminoácido excitatorio, como son los receptores CB₁ situados en terminales glutamatérgicas/GABAérgicas (Rey et al., 2012) y en astrocitos (Navarrete and Araque, 2008), así como los TRPV1 situados en áreas presinápticas.

Tomando en consideración la gran variedad de dianas moleculares de este compuesto, así como las interacciones de cada uno de estos sistemas con los otros, la atribución de los efectos farmacológicos del CBD a uno de ellos en patologías a su vez multifactoriales resulta de gran complejidad. No obstante, es necesario continuar investigando este compuesto tan versátil que abre nuevas puertas para la terapéutica.

2.3.4. Seguridad en pacientes

Numerosos estudios de seguridad en pacientes de tipo control-placebo y ensayos abiertos han concluido que se trata de un compuesto bien tolerado en un amplio rango de dosificación. No se encontraron efectos adversos severos a nivel del SNC, ni en signos vitales o de la conducta a dosis que ascienden a 1500 mg/día (p.o.) o 30 mg/kg (i.v.), tanto en administración aguda como crónica (Bergamaschi et al., 2011b). Existen pocos datos acerca de sus efectos a largo plazo, aunque empieza a existir más información tras su aprobación en Europa y Canadá. Existe un riesgo teórico de inmunosupresión, ya que se ha visto que posee la capacidad de inhibir la producción de interleucinas 8 y 10 e induce apoptosis in vitro de linfocitos (Srivastava et al., 1998; Wu et al., 2008). Cabe destacar, que todos estos estudios se han realizado en adultos por cuestiones éticas y por tanto, la farmacocinética y toxicidad en niños no se conoce bien.

2.3.5. Ensayos clínicos y perspectivas futuras

En la actualidad solo existe un medicamento que contiene CBD aprobado para su uso en clínica, el Nabiximols (Sativex®, GW Pharmaceuticals). Se trata de una mezcla de 9-delta-THC y CBD y está indicado para el tratamiento de la espasticidad moderada a severa en esclerosis múltiple (AEMPS; (Syed et al., 2014). Aunque esta es la única indicación aprobada hasta la fecha, se están llevando a cabo ensayos clínicos en fase III para el tratamiento del dolor en cáncer (Johnson et al., 2013; Portenoy et al., 2012) y en fase II para el

tratamiento del dolor neuropático (Langford et al., 2013). También se ha comenzado su estudio en pacientes para el tratamiento del dolor asociado a artritis reumatoide (Blake et al., 2006).

Sin embargo, los datos clínicos acerca del potencial terapéutico de la administración de CBD sin la presencia de THC son más escasos. A pesar de ello, recientemente está cobrando gran interés dadas los efectos indeseados del THC, de los cuales carece el CBD (Martin-Santos et al., 2012), y por supuesto, debido a los múltiples efectos terapéuticos descritos en estudios preclínicos con este compuesto. Existe un medicamento a base de CBD, el Epidiolex® (GW Pharmaceuticals) que está siendo probado en ensayos clínicos en fase I-II, para el tratamiento de la epilepsia (Síndrome de Dravet y Lennox-Gastaut), aunque aún no se conocen los resultados en cuanto a su eficacia.

Se han llevado a cabo también ensayos clínicos con CBD para el tratamiento de trastornos de tipo ansioso (Crippa et al., 2011; Das et al., 2013), como antipsicótico en esquizofrenia (Leweke et al., 2012) y para el tratamiento de la adicción al tabaco (Morgan et al., 2013), dando lugar a resultados muy prometedores.

2.3.6. Evidencias de la posible eficacia antidepressiva del Cannabidiol

En primer lugar, en estudios preclínicos existen múltiples evidencias que apuntan a un potencial efecto antidepressivo de este compuesto. En particular, la administración aguda de CBD provocó un descenso en el tiempo de inmovilidad en el FST, pero no en el TST, indicando por tanto, su posible eficacia antidepressiva (El-Alfy et al., 2010; Zanelati et al., 2010). En este mismo estudio, Zanelati y colaboradores demostraron que el antagonismo farmacológico del receptor 5-HT_{1A} impedía esta acción. Por otro lado, en el modelo de estrés crónico del *Chronic Unpredictable Stress* (CUS) la administración continuada de

CBD dio lugar a un efecto ansiolítico en el *Novelty Suppressed Feeding (NSF)*, que se asocia a un posible efecto antidepresivo (Campos et al., 2013b).

Al mismo tiempo, hay que tener en cuenta que, como ya se ha mencionado en apartados anteriores, el CBD provoca ansiolisis tanto en seres humanos como en animales, tras su administración aguda o crónica. Considerando la estrecha asociación entre estas dos patologías, dicho efecto no sólo insta a esperar un posible efecto antidepresivo, sino que además la combinación de ambas acciones confiere al CBD un perfil idóneo para el tratamiento de los trastornos ansioso-depresivos.

De nuevo, los efectos ansiolíticos y panicolíticos provocados por el CBD administrado de manera aguda fueron impedidos por antagonistas del receptor 5-HT_{1A} (Resstel et al., 2009; Twardowschy et al., 2013). En lo que se refiere a sus acciones tras la administración continuada, existen diversos resultados. En general, se ha observado que los efectos del CBD sobre la ansiedad, dependen del receptor 5-HT_{1A} ya que fueron impedidos por su bloqueo farmacológico con WAY100635 (Campos et al., 2012; Fogaca et al., 2014; Soares Vde et al., 2010). Sin embargo, en otro estudio se demostró que los efectos ansiolíticos de la administración crónica de CBD en el modelo del CUS, requerían de la neurogenesis hipocampal mediada por el receptor CB₁ (Campos et al., 2013b). Posiblemente, la acción de CBD para la reversión de estas manifestaciones de tipo ansioso implique a más de un sistema y por tanto, estos resultados no son incompatibles sino complementarios.

Por el contrario, en determinados trabajos se observaron efectos ansiogénicos del CBD (ElBatsh et al., 2012; Fogaca et al., 2014). Es interesante reseñar que en estos casos se trataba de animales control y no modelos de estrés, sugiriendo la posibilidad de que los efectos restauradores que presenta este compuesto sobre sistemas dañados, podrían dañar la homeostasis en pacientes sanos. De cualquier manera, también podría tratarse de un fenómeno relacionado con la curva dosis-respuesta en U que tantas veces ha sido descrita para los compuestos de esta familia.

En lo que se refiere a otros sistemas, también se encontraron ciertas evidencias que apuntaban en la misma línea. En el caso del factor neurotrófico BDNF, se describió un incremento de su expresión tras del tratamiento con CBD, asociado habitualmente a eficacia antidepresiva, y en cuyo proceso parecen tomar parte los receptores de adenosina A_{2A} (Magen et al., 2009). Sin embargo, existe cierta controversia en lo que respecta a este factor ya que no todos los autores han encontrado dicho incremento (Campos et al., 2012; Zanelati et al., 2010), y que parece ser región dependiente (Valvassori et al., 2011). De manera adicional, el CBD restauró los déficits neuroproliferativos en animales crónicamente estresados (Campos et al., 2013b), además de producir notables efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores (Malfait et al., 2000). Estos hallazgos sin duda, se corresponderían con lo esperado según las hipótesis de depresión más recientes que encierran entre sus causas la neuroinflamación o los déficits neuroplásticos.

Por último, cabe destacar que en los ensayos clínicos realizados con CBD para el tratamiento de la epilepsia el principal efecto secundario a la toma de este compuesto resultó ser la mejora del estado de ánimo (Porter and Jacobson, 2013). Aunque esta mejora en el estado de ánimo podría estar asociada a la mejora de la sintomatología epiléptica o un efecto placebo por la participación en el ensayo clínico, sin duda constituye un resultado alentador en cuanto a su potencial como fármaco antidepresivo. A la vista de lo anterior, son necesarios más ensayos clínicos para determinar la verdadera relevancia de estas observaciones y su efectividad en pacientes con alteraciones del estado de ánimo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral consistió en la evaluación del potencial del CBD como antidepresivo en un modelo animal de depresión, así como de su mecanismo de acción, mediante el estudio de sus efectos conductuales, neuroquímicos, moleculares y celulares.

Los objetivos concretos fueron:

- La caracterización conductual del modelo de OBX en ratón y la selección de la estrategia de estabulación más apropiada para la evaluación de los efectos antidepresivos del CBD.
- El estudio en profundidad de los efectos conductuales del CBD tras su administración aguda y crónica, en tests para la evaluación de antidepresivos.
- El estudio de los efectos neuroquímicos, moleculares y celulares en diferentes regiones cerebrales tras la administración de CBD sobre:
 - La liberación de 5-HT y glutamato en corteza prefrontal ventromedial (vmPFCx).
 - La funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} y CB₁ en áreas del sistema límbico.
 - Los niveles de expresión de proteínas de vías de señalización asociadas a depresión y efecto antidepresivo, así como de su mRNA.
 - La morfología de los neuroblastos y sus procesos de migración en el cerebro postnatal a través de la corriente migratoria rostral (RMS).
- Estudio *in vivo* del mecanismo de acción de CBD: antagonismo farmacológico de los efectos conductuales y de los efectos sobre la liberación de neurotransmisores (serotonina y glutamato), inducidos por la administración aguda de CBD.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

A lo largo de la presente tesis se utilizaron dos cepas diferentes de ratones: C57BL6 en la mayoría de los experimentos, exceptuando los estudios de morfología y migración de neuroblastos, para los cuales se utilizaron ratones CD1.

Se emplearon ratones machos C57BL/6 (suministrados por el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal “SEEA” de la Universidad de Cantabria) con un peso comprendido entre 20-25 gramos y unos 2 a 3 meses de edad al inicio de los experimentos. Los animales fueron estabulados bajo condiciones estándar de luz (ciclos de luz-oscuridad de 12 horas), temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad relativa (60-70%). Hasta su utilización y sacrificio, fueron mantenidos con agua y una dieta estándar *ad libitum* (pienso A04 para dieta de mantenimiento de ratas y ratones, SAFE, Francia), excepto en aquellos períodos en que los test conductuales requerían determinadas condiciones específicas.

Para el desarrollo del primer bloque de experimentos, parte de los animales fueron estabulados de manera conjunta, y el resto individualmente, a fin de conocer la influencia del tipo de estabulación sobre el síndrome de la bulbectomía y de este modo, seleccionar el tipo de estabulación más adecuada para la evaluación de los efectos farmacológicos del CBD. A partir de este momento, la estabulación individual fue la estrategia seleccionada y utilizada en los experimentos realizados posteriormente.

El cuidado y la manipulación experimental de los animales se realizaron de acuerdo a la normativa tanto nacional (Real Decreto 1201/2005 y la actualmente vigente, Real Decreto 53/2013 y Ley 32/2007) como europea (European Communities Council Directives 86/609/EEC y la actualmente vigente 2010/63/UE). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria. A final de los estudios conductuales, los animales fueron sacrificados por decapitación para la obtención de las muestras tisulares a utilizar en el resto de las técnicas.

Para los estudios de migración de neuroblastos en la RMS se utilizaron crías de ratones CD1 (P2-3 al inicio de los experimentos) de ambos sexos (Charles River) que fueron separados de sus progenitoras para su sacrificio al final del tratamiento. Estos experimentos se llevaron a cabo en el *Wolfson Centre for Age Related Diseases, King's College London University* (London, UK), cumpliendo con la normativa vigente en el Reino Unido (UK Home Office Regulations; Animal Scientific Procedures Act, 1986).

2. Grupos experimentales

Los grupos experimentales se diseñaron de acuerdo a los objetivos planteados para cada tipo de estudio realizado en la presente tesis y serán detallados en cada bloque de experimentos. En cada una de las series experimentales el número de animales inicialmente utilizados se adecuó a los requerimientos de cada técnica. La *n* definitiva de cada grupo viene reflejada en la sección de los resultados obtenidos para cada técnica experimental (*n*).

De forma general, los animales se clasificaron según:

- El fenotipo: animales control (Co), sham-operated (SHAM), bulbectomizados (OBX).
- Las condiciones de estabulación: animales individualizados o aislados (I) y animales conjuntos o agrupados (G).
- Los tratamientos farmacológicos: animales tratados con vehículo (VEH), Cannabidiol (CBD), WAY100635 (WAY), AM251 (AM), AM251 1mg/kg (AM1) y NBQX disodium salt (NBQX).

3. Tratamientos farmacológicos

Todos los fármacos fueron administrados intraperitonealmente (i.p.) (aguja 25G): (-)Cannabidiol 1, 3, 10 y 50 mg/kg, WAY100635 0.3 mg/kg, NBQX (disodium salt) 10mg/kg y AM251 0.3 y 1 mg/kg. El vehículo utilizado para

formular el (-)-cannabidiol y el AM251 (fármacos hidrofóbicos) consistió en una mezcla de Tween 80® al 2%, propilenglycol® al 5%, en suero salino 0.9%. El resto de compuestos hidrosolubles (NBQX disodium salt, WAY100635) fueron disueltos en suero salino 0.9%.

4. Fármacos y Reactivos

Fármacos y Reactivos	Proveedor
(-)-Cannabidiol	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
WAY100635	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
NBQX disodium salt	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
AM251	Abcam, Cambridge, UK
AM630	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
WAY100635	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
LY341495	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
DPCPX	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
WIN552122	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
(±)8-OH-DPAT	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Fluoxetina	Fagron group, B.V., Rotterdam, The Netherlands
Paroxetina	FAES FARMA S.A., Leioa, Bizkaia, España
Pentobarbital sódico	Boeringher Ingelheim (Germany)
Citalopram	FAES FARMA S.A., Leioa, Bizkaia, España
[3H]citalopram	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Tween 80®	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Propilenglycol®	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Isoflurano	Schering Plough, United Kingdom
Sucrose	Scharlau Chemie S.A., Spain
[³⁵ S]-GTPγS	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
GDP	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
DTT	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Adenosin deaminasa	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
GTPγS	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
BSA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
KCl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Paraformaldehido	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PBS	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
DEPC	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

TEA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ácético anhidro	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Etanol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Cloroformo	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
$\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (desoxiadenosina 5'-[α -thio]trifosfato, [^{35}S])	New Research Products, Dupont
Transferasa terminal (TdT)	Promega Biotech Ibérica S.L., Madrid, España
Citrato sódico	Panreac, Barcelona, España
Fosfato sódico	Panreac, Barcelona, España
Dextran sulfato	Panreac, Barcelona, España
Pirofosfato sódico	Panreac, Barcelona, España
Polivinilpirrolidona	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ficoll	Panreac, Barcelona, España
DNA de esperma de salmón	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ácido poliadenilico (poliA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Heparina	Panreac, Barcelona, España
Formamida desionizada	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Hepes-HCl	USB, Buckinghamshire, UK
MgCl ₂	Scharlab S.L., Barcelona, España
KCl	Panreac, Barcelona, España
Igpal	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Deoxicolato de sodio	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
SDS	USB, Buckinghamshire, UK
Tween-20	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Aprotinina	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Leupeptina	Amersham, Buckinghamshire, UK
Pepstatina A	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Antipain	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Quimostatina	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Vanadato de sodio	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Fosfato de sodio	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Cantaridina	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
E-6410	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Acrilamida-bis	Bio-Rad, California, USA
Persulfato de amonio (APS)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Rojo fenol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Glicina	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Metanol	Scharlab S.L., Barcelona, España
CaCl ₂	Panreac, Barcelona, España
NaH ₂ PO ₄	Panreac, Barcelona, España
Sal sódica del ácido 1-octanosulfónico	Panreac, Barcelona, España
Na ₂ -EDTA	Panreac, Barcelona, España
Ácido fosfórico	Panreac, Barcelona, España
Glucosa	Invitrogen
B27 supplement	Invitrogen
L-glutamina	Invitrogen

HEPES	Invitrogen
Penicilina/estreptomicina	Invitrogen
Fetal Calf Serum (FCS)	Invitrogen
Phenol red-free DMEM	Invitrogen
PBS tablets	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Azida sódica	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PFA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Gelatina	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tritón-X	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

5. Modelo de bulbectomía olfatoria bilateral

El procedimiento quirúrgico utilizado para realizar la bulbectomía olfatoria bilateral (OBX) ha sido ampliamente descrito en la literatura (Cairncross et al., 1977; Otmakhova et al., 1992). El agente anestésico que se administró fue el isoflurano al 2%. Una vez anestesiado el animal, se practicó una incisión en el cuero cabelludo sobre los huesos frontales y nasales. Posteriormente, se realizó una osteotomía (1 milímetro de diámetro), con la ayuda de un taladro quirúrgico, en el punto medio de una línea definida entre ambas crestas supraoculares. Con cuidado de no dañar el polo frontal del cerebro, se seccionaron y aspiraron los bulbos olfatorios a través de una cánula roma conectada a una bomba de succión. Una vez aspirados los bulbos, se cerró el orificio con cera ósea. Tras desinfectar el área de intervención se procedió a la sutura del cuero cabelludo con seda trenzada 6.0 (suturas Aragó, Barcelona, España). Los animales sham-operated (SHAM) fueron tratados de forma similar pero manteniendo intactos los bulbos. Tras la cirugía, los animales fueron mantenidos en una sala de post-operatorio (26-27°C), durante 24-48 horas, antes de ser estabulados en su sala habitual.

Todos los tests conductuales se realizaron transcurridas al menos 4 semanas tras la bulbectomía. En el momento del sacrificio, se comprobó que la cirugía hubiese sido realizada correctamente, siendo retirados del estudio aquellos animales que presentaron restos de bulbo olfatorio o lesiones del polo frontal (< 5 % de los animales bulbectomizados).

6. Estudios conductuales

Open field test

El OFT consiste en evaluar la conducta del animal en un recinto cuadrado con el techo descubierto y bajo condiciones aversivas de alta luminosidad. En el caso de la bulbectomía olfatoria, la normalización de las manifestaciones conductuales propias del modelo en el OFT posee validez predictiva de efecto antidepressivo y ansiolítico (Mar et al., 2000).

Las dimensiones del recinto fueron 50x50 cm de ancho y de 25 cm de alto, con paredes reflectantes. En la zona central (30 x30 cm) se aplicó una intensidad luminosa de 350 lux y se comprobó que fuera inferior en la periferia. En cada sesión se analizaron los siguientes parámetros durante 5 minutos: distancia total recorrida, tiempo en la zona central, % de distancia recorrida en la zona central. Después de cada test, el aparato fue limpiado con alcohol para evitar cualquier olor residual. El registro y análisis conductual se realizó con el sistema Any-maze (Any-maze Video-Tracking software, Stoelting Co., U.S.A.).

Novelty supressed feeding

El NSF (Santarelli et al., 2003) consiste en comprobar cuánto tiempo tardan los animales en acercarse a comer al centro de un recinto abierto, tras haber sido privados de toda comida. El grado de ansiedad de los animales, principalmente, condiciona a su respuesta, aunque también se ve afectado por otros factores como la actividad exploratoria o la impulsividad. Este test se utiliza habitualmente para la evaluación de los efectos ansiolíticos de los fármacos de manera aguda y crónica, y además posee validez predictiva de efectos antidepressivos tras administración crónica de los mismos.

El test fue realizado tras 24 horas de privación de comida aunque con agua disponible *ad libitum*. Se llevó a cabo en un recinto cuadrado abierto (50x50 cm ancho y 25 cm de alto), que contenía serrín limpio y utilizando una iluminación

tenue (30-50 lux). En el centro del aparato se colocó un pellet de comida que fue reemplazado por uno nuevo para cada test. Se midió la latencia hasta la ingesta del pellet, así como la velocidad media de movimiento con la ayuda del sistema Any-Maze.

Forced swimming test

El FST consiste en evaluar la conducta de los animales cuando son sometidos a una situación altamente estresante, como es la natación en un cilindro sin posibilidad de escape. Principalmente nos aporta información del grado de indefensión de los mismos y posee validez predictiva de efecto antidepresivo de los fármacos (Porsolt et al., 1977).

Los ratones se introdujeron en un cilindro de plástico transparente (24 cm de alto, 12 cm de diámetro interno), que contenían unos 22 cm de agua a 25-27°C. Cada ratón fue grabado desde la parte superior y su conducta fue analizada con ayuda del sistema Any-Maze. El tiempo acumulado de *immobility*, *swimming* y *climbing* fue contabilizado durante 5 minutos por un observador que previamente había sido entrenado. Se definieron los parámetros como (Detke et al., 1995):

- *Immobility*: el animal se encuentra flotando en el agua sin luchar y realizando sólo aquellos movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua.
- *Swimming*: movimiento en horizontal a lo largo del cilindro.
- *Climbing*: movimientos vigorosos activos con las patas delanteras de dentro a fuera del agua, y normalmente contra las paredes del cilindro.

Sucrose preference test / Sucrose intake test

El test de la sacarosa se utiliza habitualmente para evaluar la anhedonia o incapacidad de experimentar placer de los animales, que es un síntoma cardinal de los pacientes deprimidos. Consiste en analizar la predilección de los animales por las soluciones azucaradas, que se supone deben constituir un estímulo placentero. Los animales con un fenotipo *pseudo*-deprimido muestran una menor predilección por estas soluciones, y los compuestos con actividad antidepresiva poseen la capacidad de revertir este déficit, aunque también lo modulan otros fármacos capaces de activar los sistemas de recompensa cerebrales.

Se llevaron a cabo 2 modalidades distintas de este test: el test de 1 hora de ingesta de sacarosa (*sucrose intake test*) para los estudios de caracterización del modelo y selección de dosis de CBD, y el test de la preferencia de sacarosa (*sucrose preference test*) para la evaluación de los tratamientos con CBD, que a continuación se detallan. En ambos casos se utilizó una solución de sacarosa al 1% en agua de bebida y los animales fueron previamente entrenados durante 2 días a beber soluciones de sacarosa y agua, con acceso libre a ambas. Se contabilizó el consumo total de líquido diario.

Para el *sucrose intake test*, los animales fueron privados de toda bebida durante 24 horas, tras lo cual se les dio libre acceso a una solución de sacarosa durante una hora en una jaula individual. Se cuantificaron los mililitros de sacarosa ingeridos por cada animal y se comparó el promedio de ingesta de sacarosa de cada grupo experimental (Romeas et al., 2009).

Para el *sucrose preference test*, se colocó en cada jaula un biberón de agua y otro de sacarosa de manera permanente y se registró el consumo de cada uno de los biberones a intervalos de 24 horas durante el tratamiento. Se calculó el porcentaje de sacarosa ingerido con respecto al total de líquido consumido y se comparó el promedio del porcentaje de sacarosa ingerido de cada grupo experimental. Cuando fue pertinente, se registró de manera paralela tanto el

consumo diario de comida como el peso corporal de cada animal (Moreau et al., 1992).

Análisis de datos conductuales

Para el tratamiento de los datos se escogió como test estadístico el ANOVA de 2 vías seguido de un *post-hoc Student-Newman-Keuls* en aquellos experimentos donde existían 2 variables y una prueba *t-Student* cuando sólo existía una variable. Se determinó una probabilidad de p menor o igual a 0.5 como nivel de significación estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Se utilizó el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para el tratamiento y análisis de datos.

7. Microdiálisis cerebral *in vivo*

7.1. Construcción de sondas de microdiálisis

La construcción de las sondas de microdiálisis y su uso en ratones se realizó de acuerdo a lo descrito previamente (Adell and Artigas, 1998). La sonda está formada por un tubo de acero inoxidable 25G (con diámetro externo de 0.51 mm y diámetro interno de 0.33 mm) (A-M Systems, Carlsborg, WA, EEUU) de 1.5 cm de longitud. A través de este tubo se insertan dos tubos de sílica fundida (con un diámetro externo de 0.11 mm y un diámetro externo de 0.04 mm) (Composite Metal Services Ltd, The Chase, Harlow, Reino Unido). Uno de estos tubos de sílica, el más largo (la entrada), sobresale por la parte final del tubo de 25G y el otro llega más o menos a la mitad del mismo. A continuación, recubriendo los tubos de sílica que sobresalen por la parte superior, se colocan dos tubos de acero inoxidable de 7 mm de longitud y 27G (con diámetro externo de 0.41 mm y diámetro interno de 0.2 mm). Para sellar la unión entre los tubos metálicos de 25G y 27G se usa una mezcla de Araldit® (Ciba-Geigy) y posteriormente, se le añade cemento dental Kerr® TAB 2000 para endurecer la

unión. Finalmente, se conectan dos tubos de polietileno (con diámetro externo de 0.61 mm y diámetro interno de 0.2 mm) (Portex Ltd., Hythe, Kent, Reino Unido) a los dos tubos de 27G, protegiendo dicha unión mediante una funda de plástico termofundible. Pasados unos días desde la construcción del esqueleto de la sonda, se corta el tubo de sílica a la medida adecuada (2 mm) y se introduce la membrana de diálisis (Cuprophane Gambro, Lund, Suecia) en el interior del tubo de 25G, de manera que la sílica queda recubierta por ésta. El final de la membrana y el del tubo de 25G se sellan con Loctite® gel. La membrana es una fibra hueca de celulosa (con diámetro externo de 0.25 mm y diámetro interno de 0.22 mm) con un tamaño de poro que permite el paso de moléculas de peso inferior a 5000 daltons.

7.2. Implantación de las sondas de microdiálisis

Para la implantación de las sondas de microdiálisis, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p) y colocados a continuación en un aparato estereotáxico (David Kopf instruments, Tujunga, CA, EUA). Las coordenadas se calcularon de acuerdo al atlas de anatomía de cerebro de ratón de George Paxinos y Keith B.J. Franklin ratón (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second edition, Academic Press 2001), tomando bregma para las coordenadas AP (+2.2) y L (-0.2) y la superficie del cerebro para DV (-3.4).

Una vez anestesiado, se colocó al animal en el aparato estereotáxico, se le practicó una incisión longitudinal en la parte superior de la cabeza y se separó la piel para dejar el cráneo al descubierto. Entonces, se tomaron las coordenadas de bregma y se calcularon las coordenadas para la PFCx del hemisferio derecho. Una vez conocidas las coordenadas, se realizó un agujero en el cráneo, sin llegar a romper las meninges. A continuación, se realizaron 2 agujeros más (en forma triangular, quedando el agujero de la sonda en la zona anterior de dicho triángulo) para colocar unos tornillos que permitirían anclar la sonda. Finalmente, se procedió a la introducción de la sonda. Para ello, se tomó la coordenada DV, se rompió la duramáter con ayuda de una aguja y se introdujo

la sonda en el cerebro. Una vez alcanzada la coordenada, se fijó la sonda al cráneo con ayuda de cemento dental TAB 2000® (Kerr, USA).

7.3. Obtención de muestras

Tras la implantación de las sondas de microdiálisis se dejaron transcurrir unas 20 horas, para permitir la recuperación total de animal y la estabilización de los sistemas de neurotransmisores, ya que la introducción de la sonda produce un daño, con rotura de fibras y liberación de neurotransmisores. Los experimentos de diálisis no se deben realizar durante más de 2 días, pues a partir del tercer día hay riesgo de que se desencadene un proceso inflamatorio, con formación de tejido cicatrizante alrededor de la membrana, lo que altera la neurotransmisión en la zona. El día posterior a la cirugía de implantación de la sonda, se realizó el tratamiento con los fármacos (CBD /vehículo/antagonistas).

Tras estas 20 horas de post-operatorio, se conectaron las sondas a una bomba de perfusión (Harvard Apparatus Syringe infusion Pump 22, EUA), que permite la perfusión de líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial a través de la sonda. La composición del LCR es: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.18 mM MgCl₂, y 1.26 mM CaCl₂. El LCR se infundió a un caudal de 1.65 µl/min a través de la sonda. Para ello se usaron unas jeringas que se conectaron con un tubo de polietileno (0.61 diámetro exterior y 0.28 diámetro interior), que a su vez se conectó con una pieza giratoria, el *swivel* (Instech Laboratories, Plymouth Meeting PA, EEUU) que permite al ratón moverse libremente sin que se desconecten los tubos. Este *swivel* estaba conectado a la entrada de la sonda a través de un tubo de polietileno (Microbiotech; 0.12 diámetro interior) y un tubo idéntico unía la salida de la sonda con un vial de polietileno (Elkay Products Inc, Shrewsbury, MA, EEUU) donde se recogió la muestra. Todas las conexiones entre tubos se realizaron con ayuda de unos conectores (Microbiotech, Stockholm, Sweden.).

Tras la conexión del sistema de diálisis al animal, se dejó estabilizar el sistema 3 h a flujo de trabajo. A partir de este momento se recogieron muestras cada 20

minutos, con un volumen de 30 μ l. Las dos primeras horas corresponden a basales, es decir, se recogieron 6 basales, de los que se eligieron los 4 más estables para calcular los valores que se usaron en los cálculos. A partir de la sexta muestra se procedió al tratamiento. Los fármacos se administraron de manera sistémica (i.p.) y se recogieron 6-7 muestras más. De esta manera, la diálisis tuvo entre 12-13 muestras.

Uno de los principales problemas de la diálisis es que la concentración de algunos de los neurotransmisores analizados es muy baja, debido a la alta eficiencia de los sistemas de recaptación y de metabolización. Por ello, en el LCR se añade un inhibidor de la recaptación de 5-HT (citalopram 1 μ M). De acuerdo a (Adell et al., 1991), en presencia de estos inhibidores se puede medir principalmente el componente de liberación, pues en ausencia del mismo la concentración extracelular del neurotransmisor es el balance entre la liberación y la recaptación del neurotransmisor.

7.4. Administración de fármacos durante la microdiálisis

Tras la recogida de los 6 basales se procedió a la administración i.p. de los fármacos (CBD, WAY100635 y NBQX disodium salt). Los antagonistas se disolvieron en NaCl (0.9%) y el CBD se disolvió en vehículo.

7.5. Análisis de las muestras de dializado

Para el análisis de las muestras se utilizó un sistema de cromatografía de alta resolución (HPLC) de acuerdo a lo descrito en (Adell and Artigas, 1998). En el caso de determinación de la 5-HT se utilizó un inyector automático Waters 717plus (Waters Cromatografía, Cerdanyola, España), una bomba Hewlett-Packard 1050 (Agilent Technologies, Las Rozas, España) y una columna Beckman (San Ramon, CA, EUA) de octadecilsílica (ODS) de 3 μ m de tamaño de partícula, longitud de 7.5 cm y diámetro de 0.46 cm para la separación de los

compuestos. La detección se realizó amperométricamente mediante un detector electroquímico Hewlett-Packard 1049 (Agilent Technologies) con un potencial de oxidación de +0.6 V. Como fase móvil se utilizó un eluyente de la siguiente composición por litro de agua milliQ: 0.15 M de fosfato monosódico (NaH_2PO_4), 1.8 mM de la sal sódica del ácido 1-octanosulfónico y 0.2 mM de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, ajustando el pH a 2.8 con ácido fosfórico y añadiendo 30% de metanol. Con un flujo de trabajo de 0.8 ml/min, los tiempos de retención del 5-HIAA y de la 5-HT son de entre 3.5 y 5 minutos, siendo el límite de detección de la 5-HT de 4 fmol.

De las muestras recogidas de 30 μl , para la detección de 5-HT se utilizaron 20 μl , mientras que los 10 restantes fueron guardados para la posterior detección de glutamato (Glu). A este volumen de 10 μl se le añadió 90 μl de agua destilada, llegando a un volumen final de 100 μl para la detección de glutamato. En este caso se utilizó otro HPLC consistente de un inyector automático Waters 717plus, una bomba cuaternaria de gradiente Waters 600 y una columna ODS de 5 μm (10 cm de longitud y 0.4 cm de diámetro, Teknokroma, España). Las muestras, antes de la inyección en la columna, fueron derivatizadas con o-phthalaldehyde (OPA), el proceso lo llevó a cabo el inyector automático, lo que implicó el añadido de 15 μl de OPA a los 100 μl de muestra y, tras 2.5 minutos de reacción, 80 μl de la mezcla se inyectaban en la columna. La detección se realizó con un detector de fluorescencia Waters 470 utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 360 nm y 450 nm, respectivamente. La fase móvil consistió en dos componentes (Calcagno et al., 2006): la solución A (0.05 M Na_2HPO_4 , 28% de metanol y ajustada a pH 6.4 con 85% de H_3PO_4) y la solución B (metanol/agua, en relación de 8:2). El flujo de trabajo fue de 0.8 ml/min. Tras la aparición del pico de glutamato a los 3 minutos con un 100% de la solución A, se establecía el gradiente pasando de 100% de solución A 100% de solución B en 2 minutos. Tras el lavado de los picos más tardíos durante 3 minutos, se recuperaban las condiciones iniciales durante los siguientes 2 minutos. El límite de detección del glutamato fue de 0.2 pmol.

7.6. Comprobación de la posición de las sondas

Al final de cada experimento de diálisis el animal fue sacrificado por decapitación. A continuación, se perfundió a través de la sonda una solución de Fast Green (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) para teñir el tejido circundante a la zona de implantación. Se extrajeron los cerebros y se congelaron a -80°C para su ulterior análisis. Estos cerebros se cortaron en el criostato en secciones de 50 µm, que posteriormente se tiñeron con Neutral Red (Sigma) y fueron analizadas en el microscopio. Los animales en los que la sonda estaba fuera del área de interés se descartaron para el análisis posterior.

7.7. Análisis de datos de microdiálisis

Para el tratamiento de los datos se escogió como test estadístico el ANOVA de 2/3 vías de medidas repetidas, seguido de un *post-hoc Student-Newman-Keuls*, definiéndose las variables tratamiento, cirugía y tiempo, cuando procedía. Se calcularon los niveles de neurotransmisores en cada muestra de dializado, transformados en % respecto a al nivel basal para cada animal, y se compararon los resultados entre los distintos grupos experimentales en determinados períodos de tiempo. Para el estudio de los niveles basales de 5-HT y glutamato tras el tratamiento crónico con CBD, se compararon los niveles absolutos de neurotransmisores en las muestras de dializado correspondientes a los basales. Se consideró la probabilidad de p menor o igual a 0.5 como nivel de significación estadística (*p<0.05, **p<0.01, ***p <0.001). Se utilizó el programa Statistica 8 (Sigma, StatSoft, Inc., USA) para el tratamiento y análisis de datos. Los resultados se expresan como fmol/30 µl de fracción y se han representado como porcentajes respecto de los valores basales (promedio de 4 basales) para el los estudios de liberación de neurotransmisores y como niveles absolutos de 5-HT (fmol/30µl) y glutamato (pmol/30µl) en el caso de los valores basales.

8. Estudios de autorradiografía funcional de receptores en Sistema Nervioso Central

8.1. Obtención de secciones cerebrales de tejido para los estudios de autorradiografía funcional

Los animales fueron sacrificados tras finalizar los estudios conductuales, una vez finalizado el tratamiento crónico con CBD y tras un período de *wash-out* de 24 horas. Se extrajeron los cerebros y se almacenaron congelados a -80°C hasta el momento de la obtención de las secciones cerebrales utilizadas en los estudios autorradiográficos funcionales (estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS por agonistas selectivos de receptores). Se obtuvieron secciones coronales en un criostato (14 μm) (Microm μM 550, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) que fueron montadas en portas Superfrost®Plus (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Los portas con las secciones obtenidas fueron guardados a una temperatura de -80°C hasta su utilización. Las secciones cerebrales fueron seleccionadas de acuerdo con el atlas de George Paxinos y Keith B.J. Franklin ratón (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second edition, Academic Press 2001), siendo las más relevantes para el presente estudio aquellas correspondientes a los niveles 9-13,42-46,52-54,67.

8.2. Autorradiografía funcional del receptor 5-HT_{1A}: estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS por el agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [³⁵S]-GTPγS fueron las descritas en protocolos previos (Castro et al., 2008; Castro et al., 2003; Sim et al., 1997) con ligeras modificaciones. Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C, 30 minutos antes de comenzar el experimento para que se atemperaran. Se realizó una preincubación a 25°C durante 20 minutos en el tampón del ensayo conteniendo Tris-HCl 50 mM, EGTA 0.2 mM,

NaCl 100 mM y $MgCl_2$ 3 mM, GDP 2 mM, DTT 1 mM a pH =7.4. La incubación se realizó en el mismo tampón al que se añadió adenosin deaminasa 10 mU/ml a 25°C durante 2 horas en ausencia (fijación basal) o en presencia (fijación estimulada) del agonista selectivo 5-HT_{1A} ($\pm$)8-OH-DPAT a 10 μ M y de [³⁵S]GTP γ S a una concentración de 0.05 nM. Tras un aclarado rápido en el tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM a 4°C), se realizaron 2 lavados consecutivos de 15 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C. Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó GTP γ S a 10 μ M sin marcar radiactivamente.

8.3. Autorradiografía funcional del receptor CB₁: estimulación de la fijación de [³⁵S]GTP γ S por el agonista CB₁ WIN552122

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [³⁵S]GTP γ S fueron las descritas en protocolos previos (Sim et al., 1997) con ligeras modificaciones. Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C, 30 minutos antes de comenzar el experimento para que se atemperaran. Se realizó una preincubación a 25°C durante 20 minutos en el tampón del ensayo (Tris-HCl 50 mM, EGTA 0.2 mM, NaCl 100 mM y $MgCl_2$ 3 mM, GDP 2 mM, DTT 1 mM, BSA al 0.5% a pH =7.7). Al mismo tampón añadimos adenosin deaminasa 10 mU/ml y se realizó la incubación a 25°C durante 2 horas en ausencia (fijación basal) y presencia del agonista cannabinoide WIN552122 (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 10 μ M (fijación estimulada) y de [³⁵S]GTP γ S a una concentración de 0.05 nM. Tras un aclarado rápido en tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM y BSA 0.1% a 4°C), se realizaron 2 lavados consecutivos de 15 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C. Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó GTP γ S a 10 μ M sin marcar radiactivamente.

8.4. Generación de los autorradiogramas

Para la obtención de los autorradiogramas, las secciones incubadas, una vez secas, fueron colocadas en íntima aposición a un film radiosensible a la radiación β (KODAK Biomax MR Film, Scientific Imaging Film, Nueva York, EEUU) en el interior de un chasis fotográfico (X-Omatic Regular, Kodak, EEUU) a 4°C (Kuhar et al., 1985; Palacios et al., 1981). La exposición de las secciones incubadas se realizó conjuntamente con patrones radioactivos de carbono (^{14}C -microscales, Amersham Pharmacia-Biotech, España) con las que se construyeron las curvas de calibración de densidades de gris (O.D.) versus radioactividad (nCi/g de tejido equivalente). Finalmente, los films fueron revelados de forma convencional (revelado y fijador de Kodak, Madrid, España) obteniendo las imágenes autorradiográficas después de transcurridas 24-48 horas de exposición.

8.5. Análisis de los datos de los autorradiogramas

Las densidades autorradiográficas se determinaron por densitometría (densidad de gris vs. radiactividad) usando el programa Scion 4.03 Image Software (Scion Corporation, Maryland, USA). Se obtuvieron valores de densidad óptica relativa de las secciones (medidas bilaterales) y los valores fueron convertidos nCi/g de tejido. Los datos de la fijación de [^{35}S]GTP γ S se presentan como porcentaje de la fijación basal de [^{35}S]GTP γ S tomado como el 100%. Los resultados autorradiográficos vienen representados como la el promedio $\pm$.E.E.M. de n animales por grupo experimental. Para el análisis estadístico de los resultados autorradiográficos se aplicó un ANOVA de dos vías, realizando un test *Student-Newman-Keuls* como test post hoc para comprobar las diferencias entre los grupos bulbectomizados y control, así como las diferencias entre grupos tratados con CBD o vehículo, y la relación entre ambos. Se escogió una probabilidad de p menor o igual a 0.5 como nivel de significación estadística, y todo ello con ayuda del programa GraphPad.

9. Estudios de hibridación in situ del receptor TrkB y del BDNF

9.1. Pretratamiento de los tejidos para la hibridación *in situ*

Una vez realizadas las pruebas conductuales, los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última inyección de CBD mediante decapitación. Se extrajeron los cerebros y fueron congelados rápidamente a -80°C hasta ser procesados. Se realizaron secciones cerebrales coronales en un criostato (14µm) correspondientes a varios niveles que incluían entre otros PFCx, hipocampo anterior e hipocampo posterior, de acuerdo con el atlas de George Paxinos y Keith B.J. Franklin de ratón. Los tejidos se sometieron a los siguientes tratamientos antes de realizar los experimentos de hibridación: 5 minutos en paraformaldehído 4% a temperatura ambiente, 2 *dipping* en PBS 1% (tampón fosfato salino 10x: NaCl 1.3 M, Na₂HPO₄ 70 mM y NaH₂PO₄ 30 mM; dilución a 1x en H₂O-DEPC autoclavada (1 litro H₂O + 1 ml DEPC (dietilpirocarbonato))), 10 min en TEA/AA (TEA: 19.5 g de trietanolamina y 9 g de NaCl en 1 litro de H₂O-DEPC y 2.50 ml de ácido acético anhidro, pH 8), 1 min en EtOH 70%, 1 min en EtOH 80%, 2 min en EtOH 95%, 1 min en EtOH 100%, 10 min en cloroformo, 1 min en EtOH 100%, 1 min en EtOH 95%, secado con a temperatura ambiente y almacenamiento a -20°C.

9.2. Marcado de la sonda

La solución stock de la sonda se preparó añadiendo a la sonda comercial liofilizada (BDNF: 5' GGT CTC GTA GAA ATA TTG GTT CAG TTG GCC TTT TGA TAC CGG GAC 3' (bp 642–686); TrkB: CCT TTC ATG CCA AAC TTG GAA TGT CTC GCC AAC TTG AGC AGA AGC) la cantidad de H₂O-DEPC necesaria para tener una concentración final de 200 pmoles/µl (según la cantidad de sonda que viene indicada en el bote). Se guardó a una temperatura de -20°C. Para trabajar, hicimos una dilución 1:100 de la sonda, resultando una concentración

final de 2 pmoles/ μ l, que fue guardada a -20°C . Para 20 portaobjetos se preparó la siguiente mezcla de incubación: 1.5 μ l sonda, 6 μ l H₂O-DEPC autoclavada, la incubación se realizó a 65°C durante 5 min tras lo que se detuvo en hielo. Se añadió el resto de los componentes para la reacción de marcado: 2.5 μ l buffer de la enzima 5x, 2 μ l $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (desoxiadenosina 5'-[α -thio]trifosfato, [^{35}S]), 0.5 μ l transferasa terminal (TdT) (30 U/ μ l; añadimos en nuestra reacción 15 U). El volumen final fue de 12.5 μ l. Se mantuvo la reacción en baño a 37°C durante 1 h. Se detuvo la reacción añadiendo 87.5 μ l de H₂O-DEPC autoclavada para alcanzar un volumen final de 100 μ l.

9.3. Purificación de la sonda

Para ello se utilizaron columnas MicroSpin G-50 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) y posterior centrifugación durante 1 min a 3300 rpm. Se añadió en cada una de las columnas 50 μ l de la reacción de marcado. Se centrifugó de nuevo durante 2 min a 3300 rpm. Para determinar las cpm/ μ l de sonda, muestras de 1 μ l fueron cuantificadas en un contador de centelleo, asegurándonos de que la actividad específica de la sonda fuera superior a 10^9 cpm/ μ g. Finalmente, la sonda marcada se guardó en el congelador (-20°C) hasta el momento de su utilización.

9.4. Ensayo de hibridación

Tras proceder a la atemperación de los portas, se preparó la mezcla de hibridación, teniendo en cuenta que para cada porta positivo (marcaje específico) se necesitó: 200 μ l de buffer de hibridación (ver buffer de hibridación), 4 μ l de DTT a 1M, 250000 cpm de sonda, DTT 1.54 g en 10 ml en H₂O-DEPC autoclavada (se guardó en alícuotas a -20°C). En el caso de portas negativos (marcaje no específico) necesitamos: 200 μ l de buffer de hibridación, 4 μ l de DTT 1M, 250.000 cpm de sonda + 200 veces la cantidad de sonda que

añadimos para hacer el positivo, aunque sin marcar. Se añadieron 200 µl de la mezcla de hibridación en cada porta, extendiéndola bien por toda la superficie. Se colocaron los portaobjetos en una caja de hibridación con humedad constante, que metimos en el horno de hibridación durante toda la noche a 42°C.

9.5. Protocolo para el buffer de hibridación de oligonucleótidos

Se prepararon 10 ml SSC 20x (NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M, pH 7.0, filtrado, tratado con DEPC y autoclavado), 2.5 ml de fosfato sódico pH 7.0, 5 g de dextran sulfato, 0.5 ml de pirofosfato sódico 0.1 M, 5 ml de solución Denhardt's 50x (5 g de polivinilpirrolidona, 5 g de BSA, 5 g de Ficoll400 en 500 ml de H₂O-DEPC), 1 ml de 10 mg/ml de DNA de esperma de salmón, 1 ml de 5 mg/ml de ácido poliadenilico (poliA), 50 µl de 120 mg/ml de heparina, 25 ml de formamida desionizada.

9.6. Lavado de los portas

Al día siguiente, se procedió a los lavados, usando 2 litros de buffer de lavado a 50°C: 200 ml SSC 20x, 8 ml DTT 1M, y H₂O. Se sumergieron los portas en un tampón de lavado a temperatura ambiente. Se colocaron los portaobjetos en cestillas de vidrio, que se introdujeron en el buffer de lavado a 50°C, con agitación moderada, durante 30 min. Transcurrido este tiempo se pasó la cestilla a otra cubeta con buffer de lavado durante otros 30 min en las mismas condiciones que antes. Tras esto se pasó la cestilla por los siguientes lavados a temperatura ambiente, 5 min cada uno: SSC 1x, SSC 0,1x, H₂O-DEPC, Etanol al 80%, Etanol al 96% 1 min. Secado de los portas, y exposición a films sensibles durante 4-5 días a temperatura ambiente.

9.7. Cuantificación densitométrica y análisis estadístico

Las densidades de gris de las imágenes se determinaron por densitometría usando el programa Scion 4.03 Image Software (Scion Corporation, Maryland, USA). Se obtuvieron valores de densidad óptica relativa de las secciones, no convertidas a valores reales de concentración debido a que la hibridación in situ es una técnica que sólo permite una valoración semicuantitativa. Para ello, la exposición de las secciones incubadas se realizó conjuntamente con patrones radioactivos de carbono (^{14}C -microscales, Amersham Pharmacia-Biotech, España). Todos los datos se representan como la media + E.E.M. de n animales por grupo experimental. Los datos se analizaron usando un test ANOVA de dos vías para observar las diferencias entre los cuatro grupos experimentales y la posible interacción entre las variables cirugía (bulbectomizado/no bulbectomizado) y tratamiento (CBD/vehículo) seguido de un test post hoc *Student-Newman-Keuls* y usando el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). El nivel de significación estadística se consideró $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

10. Estudios de expresión de proteínas: Western-Blot

10.1. Preparación de tejidos

Una vez realizadas la pruebas conductuales, los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última inyección de CBD mediante decapitación. Se extrajeron los cerebros y se diseccionaron la PFCx y los hipocampos, rápidamente congelados a -80°C . El día del ensayo, todas las muestras se descongelaron y homogeneizaron (1:10, 500-600 μl aprox.) usando un Potter (Kinematica, Suiza) (800 rpm) y después se realizó un lisado durante 30 minutos en hielo y en tampón de lisado: Hepes-HCl 10 mM pH 7.9; MgCl_2 1.5 mM, KCl 10 mM, Igepal 1%; deoxicolato de sodio 0.1%, SDS 0.2% y Tween-20 0.1%) conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasa: PMSF 1 mM; aprotinina 10 $\mu\text{l/ml}$; leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$; pepstatina A 10 $\mu\text{g/ml}$; antipain 10

µg/ml; quimostatina 10 µg/ml; vanadato de sodio 1 mM; fosfato de sodio 1 mM; cantaridina 1 mM; y E-6410 µM. Se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos a 4°C y se recogieron las proteínas solubilizadas en el sobrenadante. Se realizó la determinación de proteínas de los homogeneizados (Lowry et al., 1951).

10.2. Preparación de geles de acrilamida

En primer lugar se prepararon los geles de separación (8.5% 10%, 12.5% y 15% de acrilamida). Los componentes son: agua destilada, acrilamida-bis, tampón de separación 4X (90,85 g Tris HCl (Sigma, Missouri, USA), 20 ml SDS 10 %, pH 8.8, en un volumen de 500 ml), 10% persulfato de amonio (APS), TEMED. Se vertió el gel entre los 2 cristales del sistema, sobre el que añadimos agua destilada hasta su polimerización. Se eliminó el agua restante y se vertió el stacking gel. La composición del stacking gel es: agua destilada, 40 % acrilamida-bis, tampón stacking gel 4X (30.3 g Tris-HCl, 20 ml SDS 10 %, pH 6.8 para un volumen de 500 ml), APS 10 %, rojo fenol (Sigma, Missouri, USA) y TEMED.

10.3. Electroforesis y transferencia a membrana de las proteínas

Se colocó el gel en el módulo de ensamblaje, que se introdujo en el tanque, rellenando la cámara superior con tampón de migración 1X (tampón de migración 10X: 30 g de Tris, 144 g de glicina, 100 ml SDS 10 % y 900 ml de agua destilada para un volumen total de 1 l). Se rellenó la cubeta con tampón de migración 1X. Se retiró el peine, lavando los pocillos para eliminar cualquier resto de acrilamida. Se incluyeron 50-75 µg de proteína en SDS-PAGE. Se puso en marcha la electroforesis (100 V 15 min seguido de 160 V 50 min). Acabada la migración, se extrajo el gel, que se sumergió en tampón de transferencia (200 ml de tampón de trisglicina 10 X, 400 ml de metanol y 1400 ml de agua destilada

para un volumen de 2 litros) durante 30 minutos en agitación, junto con 2 papeles de filtro y 1 membrana (PVDF o nitrocelulosa en el caso de los anticuerpos fosforilados; GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Germany). El tampón de trisglicina 10X contiene: 30 g de Tris, 144 g de y 1 litro de agua destilada. Las membranas de PVDF fueron activadas por inmersión en metanol durante unos segundos. Se montó el sistema de transferencia, rellenando la cubeta con tampón de transferencia en hielo. Se colocó a 100 V durante 90 minutos.

10.4. Bloqueo y marcaje con anticuerpos

Finalizada la transferencia, se bloqueó la unión a los sitios de fijación inespecíficos de anticuerpos durante 1 hora a temperatura ambiente en leche desnatada en polvo al 5 %, y en caso de proteínas fosforiladas, se bloqueó con leche en polvo al 3 % con 200 µl de vanadato de sodio y 100 µl de fosfato de sodio por cada 100 ml de leche como inhibidores. Posteriormente, se procedió a la incubación con los siguientes anticuerpos primarios durante toda la noche: rabbit anti-pmTOR (1:500; Cell signaling, Massachusetts, USA), rabbit anti-mTOR (1:1000; Sigma), rabbit anti-pP70 (1:500; Cell signaling), rabbit anti-P70 (1:500; Cell signaling), rabbit anti-p4EBP1 (1:500; Cell signaling), rabbit anti-4EBP1(1:500; Cell signaling), rabbit anti-pCREB (1:1000; Upstate), rabbit anti-CREB (1:1000; Upstate, Charlottesville, VA), mouse anti-pERK1/2 (1:6000; Sigma), rabbit anti-ERK1/2 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Inc), mouse anti- AKT1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Germany), mouse anti-β-catenina (1:1000), rabbit anti-BDNF (1:250; Santa Cruz), anti-TrkB (1:1000; Abcam), Synapsin I-(8) (1:2000; Santa Cruz), PSD-95 (C-20) (1:500; Santa Cruz) y como house-keeping se utilizó mouse anti-GAPDH (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Inc). Pasada la noche, y tras 3 lavados en TBS-T (TBS (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl / 0.05% Tween 20) las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano durante 1 hora (1:50000 Anti-Mouse IgG; 1:120000 Anti-Rabbit IgG; 1:120000, Anti-Goat

IgG; Sigma-Aldrich). Se realizaron otros 3 lavados en TBS-T y los anticuerpos secundarios se detectaron con el kit avanzado ECL (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Germany).

10.5. Cuantificación densitométrica y análisis estadístico

La cuantificación de las bandas se llevó a cabo mediante densitometría semicuantitativa con el programa informático ImageJ 1.45S (National Institutes of Health, USA). Los valores densitométricos obtenidos con estos anticuerpos se normalizaron con los valores obtenidos con el *house-keeping* anti-GAPDH para corregir cualquier posible desviación en la carga de proteínas. Los datos se analizaron usando un test ANOVA de 2 vías seguido de un post hoc *Student-Newman-Keuls* para detectar las diferencias entre los cuatro grupos experimentales y la posible interacción entre las variables (cirugía y tratamiento) usando el programa GraphPad Prism (significación estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

11. Estudios de morfología y migración de neuroblastos en la corriente migratoria rostral

11.1. Electroporación postnatal *in vivo*

La electroporación se llevó a cabo tal y como había sido descrita (Oudin et al., 2011; Sonogo et al., 2013). Se utilizaron ratones CD1 P2-3 que fueron anestesiados con isoflurano (0.6L/min) durante 1 minuto. Con la ayuda de un fino capilar de vidrio (1.5 mm diámetro, Clark, UK), se inyectaron 3 μ l de plásmido de DNA 1 a μ g/ μ l (pCX-EGFP plasmid, Enhanced Green Fluorescent Protein, donado por el Dr. Masaru Okabe, Osaka University, Japan) en el

ventrículo lateral derecho del ratón como se muestra en la figura. Después se sometió a los animales a 5 pulsos eléctricos de 99.9V durante 50 ms con un intervalo de 850 ms, utilizando para ello el electroporador CUY21SC (Nepagene) y unos electrodos de pinza de 7mm cubiertos con gel conductor (CEFAR, France). Los animales fueron reanimados con oxígeno (1L/min) y devueltos con sus madres. Las crías fueron sacrificadas y sus cerebros extraídos 5 días después.

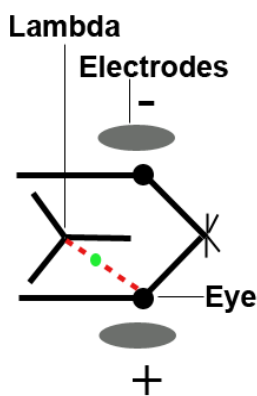


Imagen 7: Electroporación (Sonego et al., 2013).

Dibujo esquemático que muestra el lugar de inyección en el ventrículo lateral de la cabeza del ratón. Las líneas discontinuas rojas indican la línea diagonal virtual desde lambda hasta el ojo derecho y el punto verde indica la posición del ventrículo lateral (LV), donde debe de ser inyectado el plásmido.

11.2. Tratamientos farmacológicos

Se administró CBD 50 mg/kg o vehículo i.p. a las crías con un intervalo de 24 horas. Se realizaron series de tratamiento de una única inyección de CBD o durante 3 días de tratamiento antes del sacrificio para los estudios morfológicos, y tras el análisis de los resultados se seleccionó la pauta de 3 días de tratamiento con CBD 50 mg/kg para los estudios de migración.

11.3. Inmunohistoquímica de GFP en secciones embebidas en gelatina para el estudio morfológico de neuroblastos

11.3.1. Inclusión de cerebros en gelatina

Tras el sacrificio de las crías por decapitación (transcurridas 24 horas desde la última inyección) se extrajeron los cerebros. Se mantuvieron durante 3 horas en agitación en una solución de PBS con PFA al 4% a temperatura ambiente. Después se seccionaron los hemisferios y aquellos que habían sido electroporados (hemisferio derecho) se dejaron en agitación de nuevo PFA 4% a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente los hemisferios fueron embebidos una solución de gelatina al 4% (Sigma) en PBS, y se dejaron en agitación toda la noche a 4°C en PFA al 4%, tras lo cual se transfirieron a una solución de PBS con azida sódica al 0,1%. Los cerebros se cortaron con ayuda de un Vibratomo (VT10005, Leica) en secciones sagitales de 75 µm de grosor para inmunomarcaje con anticuerpos anti-GFP y se seleccionaron aquellas secciones que contenían la RMS.

11.3.2. Inmunohistoquímica de GFP

Se bloquearon las secciones durante 1 hora con BSA 1%, Triton-X 0.1% y azida sódica 0.1% en PBS, y posteriormente se incubaron con anticuerpo primario (rabbit-anti-GFP, Invitrogen) en la misma solución durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras 3 lavados de 10 minutos en PBS, se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-rabbit IgG (1:1000, Invitrogen) y Hoechst (1:5000, Sigma), durante 2 horas a temperatura ambiente (en la misma solución que el bloqueo y el primario). Tras 3 lavados en PBS, las secciones se montaron en medio de montaje para fluorescencia (Dako) y fueron cubiertas con un cubreobjetos. Se tomaron imágenes en Z-stack utilizando un microscopio confocal (Zeiss LSM 710) con objetivos de 40x and 63x y lasers: 405 (DAPI) y A488 (Alexa 488).

11.3.3. Análisis de las imágenes de inmunohistoquímica

Se analizaron todos los neuroblastos completos presentes en las imágenes, es decir, aquellos en el mismo plano del corte (20-80 células por imagen), para varias imágenes de cada área (2-5). Para cada uno de los parámetros estudiados, se calculó el promedio para cada zona en cada animal, y se compararon por grupos experimentales/zona (6-10 animales por grupo). Para el análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo una *t-Student* para comparar los 2 grupos experimentales (con 2 colas). Para ello se utilizó el programa GraphPad Prism. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

11.4. Estudios de migración de neuroblastos

11.4.1. Cultivos de secciones de cerebro

Tras sacrificar a las crías de ratón y extraer sus cerebros, se seccionaron los hemisferios y el derecho (electroporado) se pegó a la plataforma del Vibratomo (VT10005, Leica), quedando situada la línea media hacia abajo. Se realizaron secciones sagitales de 300 μm de grosor. Aquellas secciones que contenían el bulbo olfatorio se colectaron con ayuda de un asa de siembra o con un pequeño pincel, y se comprobó la expresión de GFP en un microscopio de fluorescencia. Aquellas secciones que contenían toda la RMS se seleccionaron y fueron cultivadas durante 1 hora en un Milli Cell insert (30 mm Organotypic PTFE 0.4 μm ; Millipore) situado en una placa con fondo de cristal p35 (MatTek) que contenía medio para la videograbación de secciones de cerebro (1% glucose, B27 supplement, 2% l-glutamine, 10 mM HEPES, 1% Pen/Strep, and 5% FCS in phenol red-free DMEM), al que se añadió CBD 10 μM o vehículo en función del grupo experimental.

11.4.2. *Time-lapse imaging* en secciones de cerebro mediante microscopía confocal de disco rotatorio

Las secciones de cerebro cultivadas se transfirieron a una cámara previamente atemperada (37°C) del sistema de confocal de disco rotatorio Ultraview VoX de Perkin Elmer. Se llevó a cabo la grabación mediante *time-lapse imaging* de las células GFP positivas situadas en la zona 1 de la RMS (RMS1), utilizando un microscopio invertido Nikon Ti-E con un objetivo Nikon CFI Super Plan Fluor ELWD 20x/0.45 acoplado a una cámara digital refrigerada Hamamatsu C10600-10B (ORCA-R2), cada 3 minutos y durante 3 horas. Se tomaron imágenes compuestas en plano Z (Z-stack) que fueron tomadas cada 4 µm cubriendo un intervalo de 100-150 µm dentro de la rodaja de cerebro. Las películas fueron creadas utilizando el software Volocity® de Perkin Elmer (Oudin et al., 2011; Sonogo et al., 2013).

11.4.3. Análisis del *time-lapse imaging* en secciones de cerebro

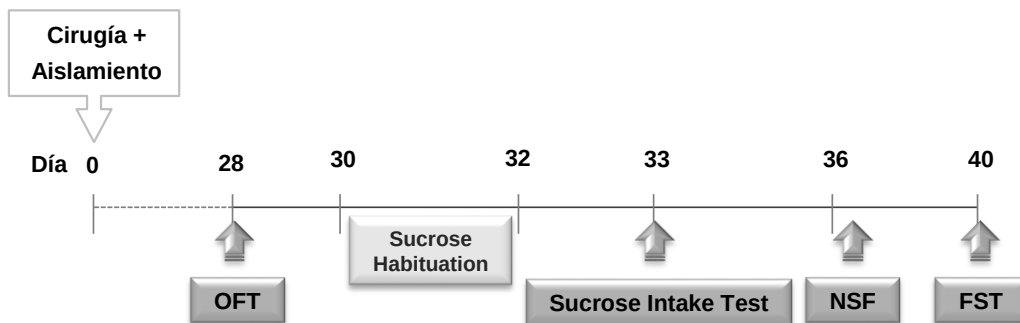
Las grabaciones obtenidas en el microscopio confocal de disco rotatorio se analizaron con el software Volocity®. Se cuantificó la dinámica de los neuroblastos marcados con GFP mediante el rastreo del cuerpo celular de cada neuroblasto presente en el campo de vista durante toda la duración de la película. Se consideraron sólo aquellas células que se desplazaron al menos 10 µm y en total se estudiaron unos 15-30 neuroblastos por película. Los registros numéricos de la dinámica de los neuroblastos se compararon por grupos experimentales con la ayuda del programa GraphPad Prism, y se aplicó un análisis estadístico mediante *t-Student* (2 colas), siendo consideradas las diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

RESULTADOS

A. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL MODELO DE DEPRESIÓN ANIMAL: BULBECTOMÍA OLFATORIA BILATERAL

En primer lugar, se probaron diferentes test conductuales en dos modelos animales crónicos de depresión (corticosterona crónica y OBX) a fin de seleccionar las mejores condiciones para la evaluación del potencial efecto antidepresivo del CBD. Tras una primera aproximación se escogió el modelo de la OBX en ratón y se procedió a la caracterización del modelo. Todos los experimentos comenzaron tras 4 semanas de post-operatorio, por ser éste el período de tiempo necesario para el establecimiento del síndrome de la OBX en ratón. A fin de decidir la estrategia de estabulación más apropiada, adicionalmente, se estudió la influencia del aislamiento social sobre el fenotipo del modelo y su utilidad para el ensayo de fármacos.

Para ello, se diseñó el siguiente cronograma conductual para los cuatro grupos experimentales, con un tamaño muestral de 7 a 10 ratones por grupo:



Grupos experimentales:

- Sham-operated estabulados conjuntamente: SHAM-G
- Sham-operated estabulados individualmente: SHAM-I
- OBX estabulados conjuntamente: OBX-G
- OBX estabulados individualmente: OBX-I

Open field test

En el OFT se evaluaron la actividad locomotora, reflejada en la distancia total recorrida y en los alzamientos, y la ambulación central, tomando como parámetros a tener en cuenta el tiempo en la zona central y el % de la distancia recorrida en este área. La reversión de la hiperactividad periférica en ambientes aversivos que caracteriza al modelo de la OBX, se considera indicativo de efecto antidepressivo, mientras que el incremento en la ambulación central evidencia efecto ansiolítico.

Transcurridas 4 semanas desde la cirugía, tanto los animales OBX-G como los OBX-I mostraron hiperactividad en el OFT, en comparación con sus respectivos grupos control (sham), medido como incremento en la distancia total recorrida ($p < 0.05$, OBX-G vs. SHAM-G; $p < 0.001$, OBX-I vs. SHAM-I) y como número de alzamientos ($p < 0.05$, OBX-G vs. SHAM-G; $p < 0.001$, OBX-I vs. SHAM-I).

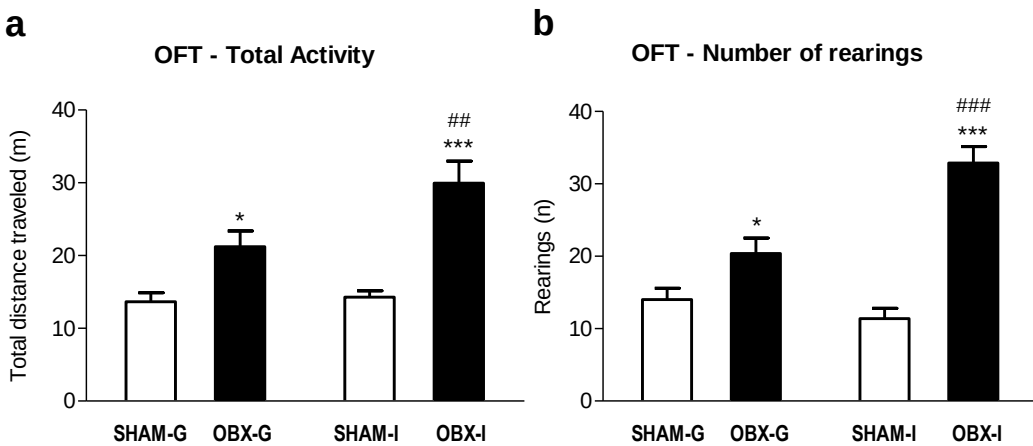


Figura 1. Efecto del aislamiento social sobre la conducta de los animales OBX en el OFT. La hiperactividad locomotora típica (a) y el elevado número de alzamientos (b) inducidos por la OBX fueron superiores en el grupo de animales OBX individualizados que en los agrupados. Resultados expresados como promedio $\pm$ error medio estándar (SEM) de n 7-10 animales/grupo. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo sham; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo estabulado conjuntamente.

Sin embargo, el aislamiento social no afectó del mismo modo a los animales sham y b OBX. El análisis estadístico mediante ANOVA de 2 vías reveló la existencia de una interacción entre las variables cirugía y aislamiento para ambos parámetros (distancia total recorrida [$F(1,30) = 5.18$, $p < 0.05$; y alzamientos [$F(1,29) = 16.19$, $p < 0.001$]. El análisis *post-hoc* *Student-Newman-Keuls*, demostró la existencia de un incremento significativo de la actividad locomotora (distancia total recorrida $p < 0.01$) y exploratoria (alzamientos $p < 0.001$) de los animales OBX aislados, en comparación con los agrupados. Por el contrario, no se detectaron diferencias entre los animales sham en función del tipo de estabulación en estos parámetros.

En cuanto a la actividad central, se analizaron el porcentaje de distancia recorrida y el tiempo en la zona central. En este caso, no se encontró interacción entre la cirugía y las condiciones de estabulación, aunque ambas condiciones por separado tuvieron un efecto significativo en los paradigmas (Cirugía [$F(1,31) = 17.12$, $p < 0.001$] y estabulación [$F(1,31) = 30.19$, $p < 0.001$]. El análisis *post-hoc* reveló que la OBX indujo una disminución en el porcentaje de distancia central recorrida en todos los animales (OBX-G (-44%; $p < 0.001$ vs. SHAM-G) and OBX-I (-54%; $p < 0.05$ vs. SHAM-I). Por otra parte, el aislamiento social dio lugar a una reducción del porcentaje de actividad central tanto en animales sham como OBX (sham: -56% and OBX: -63%), al compararse con sus correspondientes controles agrupados ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectivamente). El tiempo en la zona central también se vio reducido por ambas condiciones (OBX y aislamiento), aunque en este caso, sí se detectó interacción entre las variables ([$F(1,32) = 6.75$, $p < 0.05$]). El análisis *post-hoc* determinó que la OBX provocó un descenso significativo del tiempo en el centro del OFT en los animales agrupados (-61%; $p < 0.001$ vs. SHAM-G), pero no en los aislados. Por otra parte, el aislamiento causó una reducción del tiempo en la zona central que resultó estadísticamente significativa sólo en los animales sham (-69%; $p < 0.001$ vs. SHAM-G).

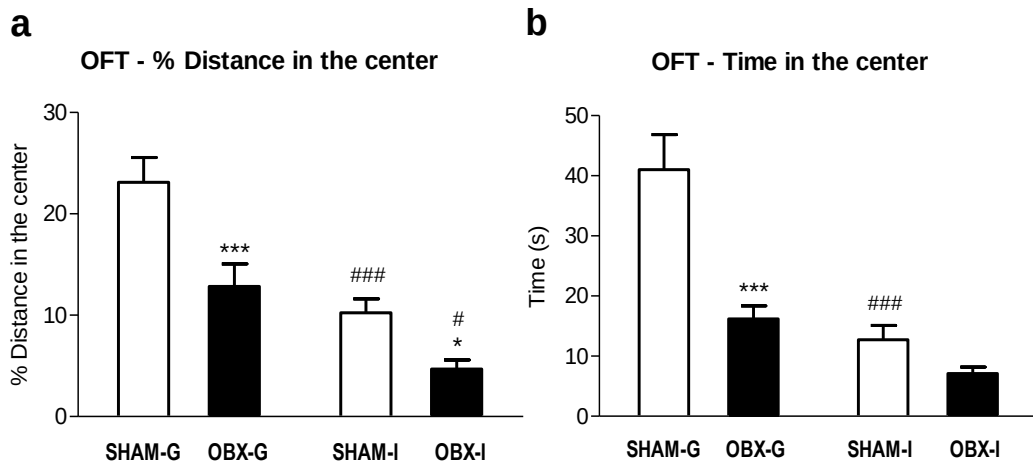


Figura 2. Efecto del aislamiento sobre la actividad central en el OFT en animales sham y OBX. El aislamiento redujo el % de distancia recorrida en el centro en todos los animales (a) y el tiempo en el centro en los animales sham (b). El nivel de ansiedad basal presentado por los animales OBX se vio potenciado por el aislamiento como se observa en el % de distancia central. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de n 7-10 animales/grupo. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo sham; ### $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo estabulado conjuntamente.

Novelty Supressed Feeding

En el NSF, el animal debe afrontar el dilema entre la hostilidad de aproximarse a la zona central del recinto, expuesta e iluminada, frente a la necesidad de comer tras 24h de privación de comida y la inquietud exploratoria natural.

Se analizó el tiempo de latencia hasta que el animal comenzó a comer el pellet situado en el centro. No se encontró interacción entre las variables aunque cada una de ellas afectó significativamente a la latencia (OBX [$F(1,33) = 2.31$, $p < 0.001$]; y aislamiento [$F(1,33) = 18.55$, $p < 0.001$]). Los animales OBX exhibieron una menor latencia en comparación con los sham (OBX-G: 147.5 ± 25.3 s vs. SHAM-G: 319.3 ± 68.4 s, ns; OBX-I: 300.3 ± 57.1 s vs. SHAM-I: 588.9 ± 8.47 s, $p < 0.001$). Por el contrario, el aislamiento dio lugar a un notorio incremento en la latencia en ambos grupos (SHAM-I + 85%; $p < 0.001$ vs. SHAM-G; y OBX-I +108%; $p < 0.05$ vs. OBX-G).

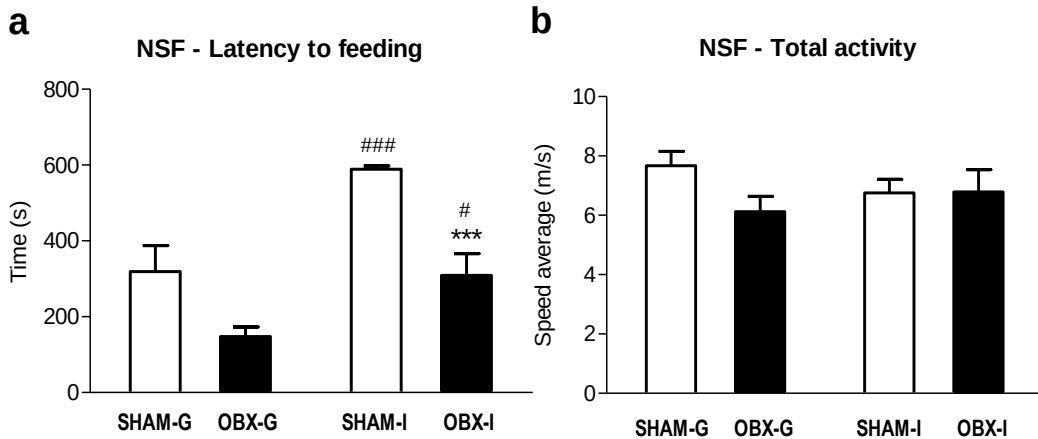


Figura 3. Efecto conductual del aislamiento sobre la conducta de los animales sham y OBX en el NSF, latencia (a) y actividad total (b). El tiempo de latencia hasta la ingesta de comida fue inferior en todos los animales OBX. El aislamiento indujo un incremento en la latencia tanto en sham como en OBX. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de n 7-10 animales/grupo. *** $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo sham; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo estabulado conjuntamente.

En lo que respecta a la actividad locomotora, no se registraron cambios reseñables entre grupos en este entorno de baja luminosidad, y por tanto poco aversivo (velocidad media en m/s, SHAM-G: 7.6 ± 1.5 ; OBX-G: 6.1 ± 1.4 ; SHAM-I: 6.7 ± 1.5 ; OBX-I: 6.8 ± 2.4).

Forced Swimming Test

Para el análisis del FST se analizaron las distintas conductas durante el transcurso del test, *immobility*, *swimming* y *climbing*, en base a las especificaciones definidas. Mientras la *immobility* refleja una manera pasiva de supervivencia que denota indefensión, el *swimming* constituiría una manera activa de afrontar la amenaza y el *climbing*, por su parte, mostraría una actitud de lucha activa e intensa a fin de escapar de la ofensiva.

El análisis estadístico no reveló interacción entre cirugía y estabulación para ninguna de las 3 conductas evaluadas. Sin embargo, la OBX dio lugar a alteraciones significativas en los tiempos de *immobility*, *climbing* y *swimming* ($p < 0.001$ para todos ellos), pero no se observó ninguna influencia del aislamiento. El análisis *post-hoc* determinó que la *immobility* se ve significativamente reducida en todos los animales OBX (OBX-G: $95.5 \pm 9.9s$ vs. SHAM-G: $162.3 \pm 21.8s$, $p < 0.05$; OBX-I: $107.5 \pm 5.9s$ vs. SHAM-I: $159.4 \pm 17.6s$, $p < 0.05$). Este resultado se acompañó de un incremento en el *swimming* (OBX-G vs. SHAM-G, $p < 0.01$; OBX-I vs. SHAM-I, $p < 0.001$). Por el contrario, la OBX provocó un dramático descenso en el *climbing* (OBX-G vs. SHAM-G, $p < 0.05$; OBX-I vs. SHAM-I, $p < 0.01$).

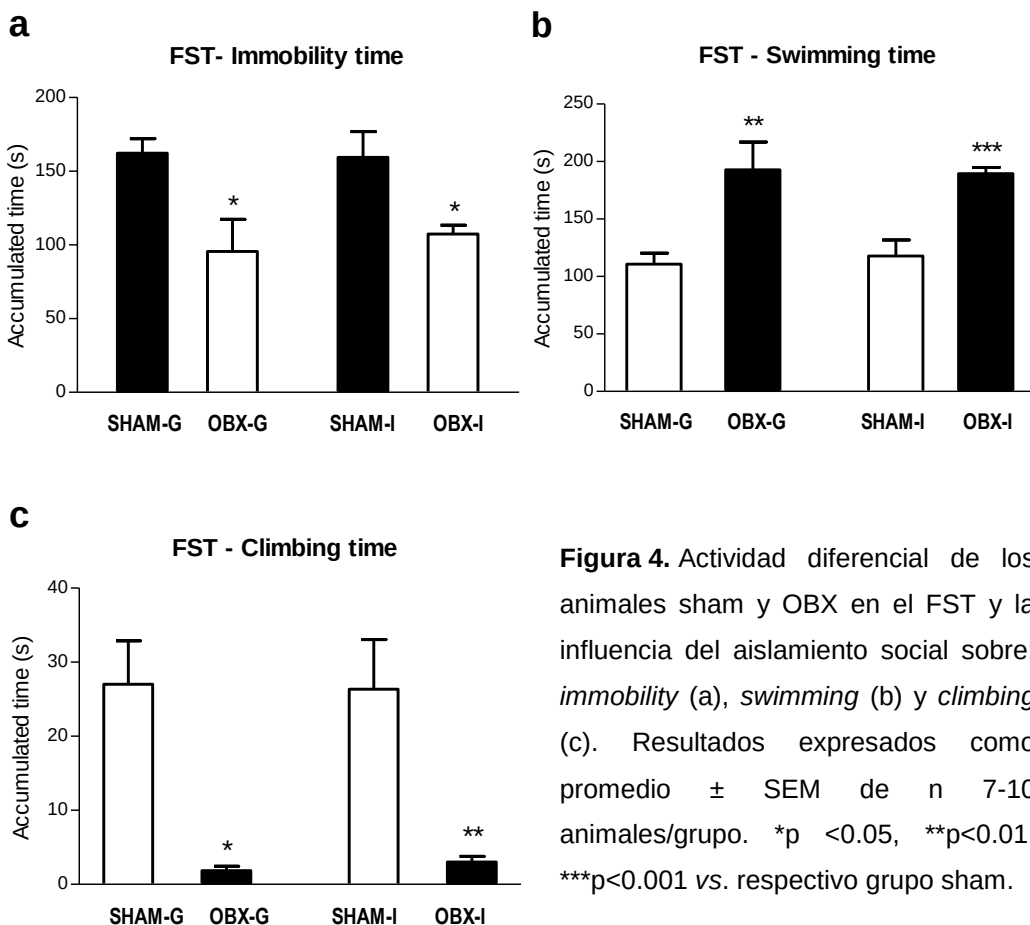


Figura 4. Actividad diferencial de los animales sham y OBX en el FST y la influencia del aislamiento social sobre: *immobility* (a), *swimming* (b) y *climbing* (c). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de $n = 7-10$ animales/grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. respectivo grupo sham.

Sucrose Intake Test

Dadas las condiciones experimentales y el cronograma conductual, en este caso se consideró más apropiada la realización del *sucrose intake test* de 1 hora frente al *sucrose preference test*. Se evaluó el promedio de consumo total de sacarosa de cada uno de los grupos experimentales. En primer lugar, se comprobó que el consumo basal de líquidos de cada grupo no presentaba diferencias significativas (Consumo total de líquido por día: OBX-G: 6.2 ± 2.2 ml; SHAM-G: 5.9 ± 1.9 .ml; OBX-I: 6.3 ± 1.5 ml; SHAM-I: 6.5 ± 1.3 ml). Tras confirmar que no existían alteraciones de la ingesta se procedió a la realización del test.

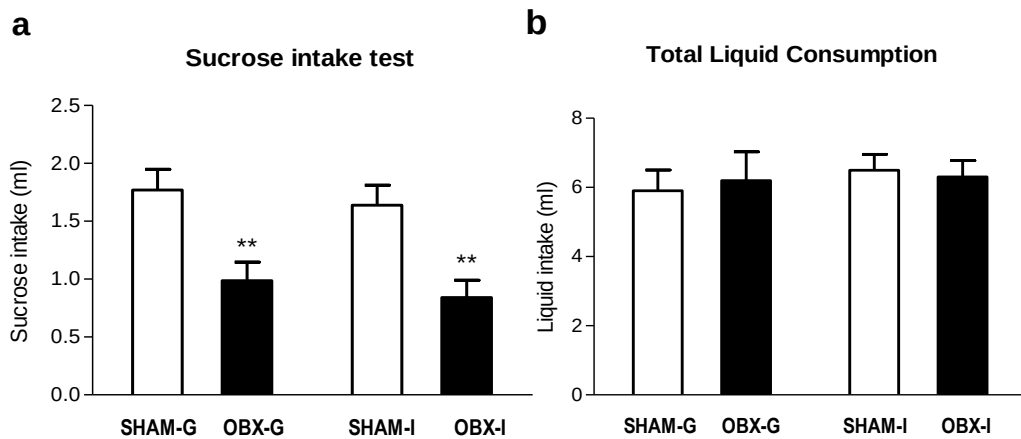


Figura 5. *Sucrose intake test* (1 h). El consumo de sacarosa fue inferior en los animales OBX en comparación con los sham. La respuesta anhedónica no se vio afectada por el aislamiento. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de n 7-10 animales/grupo. ** $p < 0.01$ vs. respectivo grupo sham.

El análisis mediante el ANOVA de 2 vías reveló que no existía interacción entre la variable cirugía y aislamiento para este parámetro. De hecho, en el análisis *post-hoc* de los resultados, tampoco se detectaron diferencias entre los animales aislados y agrupados. Por el contrario, la OBX afectó fuertemente el consumo de sacarosa ($p < 0.001$), resultando en un claro descenso del consumo de sacarosa en todos los animales OBX durante el test (OBX-G: 0.9 ± 0.2 ml vs. SHAM-G: 1.8 ± 0.2 ml, $p < 0.01$; OBX-I: 0.8 ± 0.1 ml vs. SHAM-I: 1.6 ± 0.2 ml, $p < 0.01$).

B. EFECTOS CONDUCTUALES, NEUROQUÍMICOS, MOLECULARES Y CELULARES DEL CANNABIDIOL

El principal objetivo de este segundo bloque de experimentos consistió en evaluar los efectos conductuales, neuroquímicos y moleculares del CBD sobre el animal *pseudo*-deprimido OBX y sus controles sham.

Basándonos en los hallazgos de los experimentos previos, se seleccionó el modelo de la OBX en condiciones de estabulación individual como modelo animal de depresión.

Se ensayaron varias dosis de CBD en el *OFT* con el fin optimizar la pauta de dosificación a utilizar en los estudios conductuales y neuroquímicos. La dosis seleccionada en esta primera aproximación (estudios preliminares), fue administrada durante un período de tiempo más prolongado (10 mg/kg/día i.p. durante 6 semanas) lo que permitió la observación de los efectos de la administración de CBD sobre la conducta a largo plazo. Posteriormente, con objeto de minimizar el retraso en la aparición de los efectos conductuales del CBD, se implementó una dosis inicial de carga de 50 mg/kg/día durante 3 días.

Una vez seleccionada la pauta de dosificación más apropiada (50 mg/kg durante 3 días seguido de 10 mg/kg hasta el día 14 de tratamiento), se llevó a cabo el estudio en profundidad de los efectos conductuales, neuroquímicos y moleculares de la administración de CBD a lo largo del tratamiento.

Los grupos experimentales para el desarrollo de los experimentos de este bloque fueron:

- SHAM VEH
- SHAM CBD
- OBX VEH
- OBX CBD

ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA PAUTA DE DOSIFICACIÓN DE CANNABIDIOL

Se realizó una primera aproximación conductual a fin de seleccionar la dosis de CBD para el subsecuente estudio crónico. Para ello, se evaluó el efecto de 1, 3 y 10 mg/kg (s.c.) de CBD tras 3, 7 y 10 días de administración. Se analizó el efecto sobre la actividad locomotora tanto en animal sham como en animal OBX, dado que la reversión de la hiperactividad característica de los animales OBX es indicativo de efecto antidepresivo.

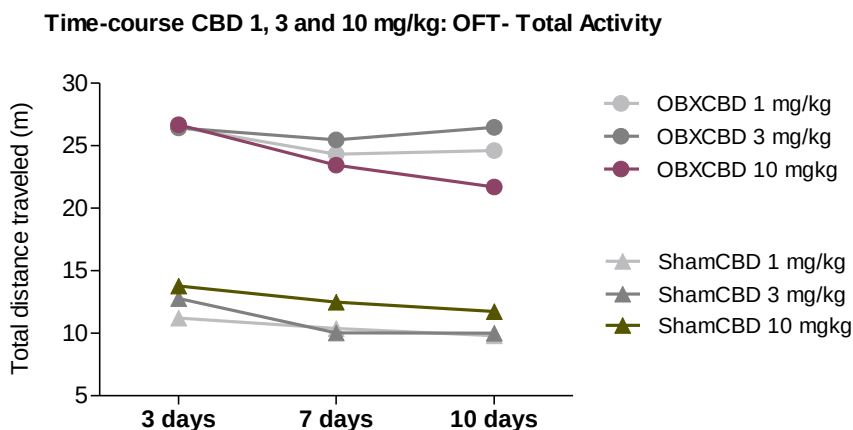
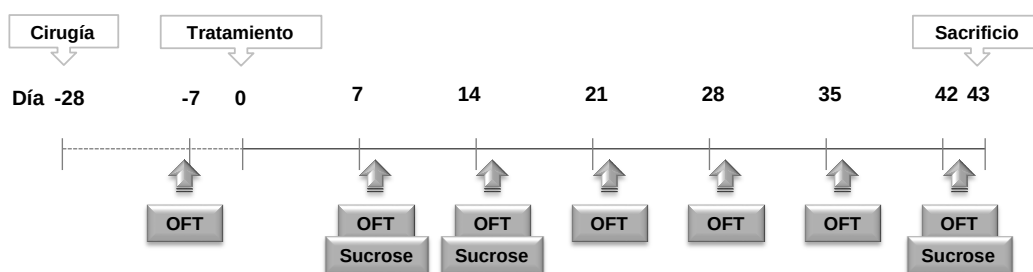


Figura 6. Curso temporal de la administración diaria de CBD a diferentes dosis en animales sham y OBX. Tras la administración durante 10 días de CBD 10 mg/kg se observó una tendencia al descenso de la hiperactividad de los animales OBX, que no alcanzó significación estadística. No se encontraron alteraciones relevantes en la actividad locomotora de los animales sham tratados con CBD a ninguna de las dosis ensayadas.

En los animales sham la administración de CBD no produjo ningún efecto sobre la actividad locomotora, mientras que en los animales OBX sí se observó una tendencia al descenso en la distancia total recorrida de los OBX a la dosis de 10 mg/kg. En consecuencia, se decidió llevar a cabo un estudio más en profundidad, valorando la actividad locomotora total y central tras la administración aguda y crónica de CBD a una dosis de 10 mg/kg.

Estudio de la administración de cannabidiol 10 mg/kg

Para la seleccionar la dosis de CBD para el subsecuente estudio crónico se realizaron el OFT y *sucrose intake test*, por considerarse los de mayor utilidad para este caso concreto. Se utilizaron varias series de animales, dado que no es posible testar a los animales en todos los momentos del tratamiento, sin que su respuesta conductual se vea alterada por el estrés y elevado grado de manipulación. El cronograma conductual que se siguió fue el que se muestra a continuación:



Efectos agudos de Cannabidiol 10 mg/kg

Open field test

La administración aguda de CBD produjo una reducción significativa de la hiperactividad locomotora de los animales OBX transcurridos 30 minutos desde la inyección (OBX CBD 15.61 ± 1.92 vs. OBX VEH 21.02 ± 1.16 , $p < 0.05$). En los animales sham no se observó alteración de dicha actividad. El análisis estadístico mediante ANOVA de 2 vías determinó la existencia de interacción significativa entre las variables cirugía y tratamiento ($[F(1,36) = 4.79, p < 0.05]$).

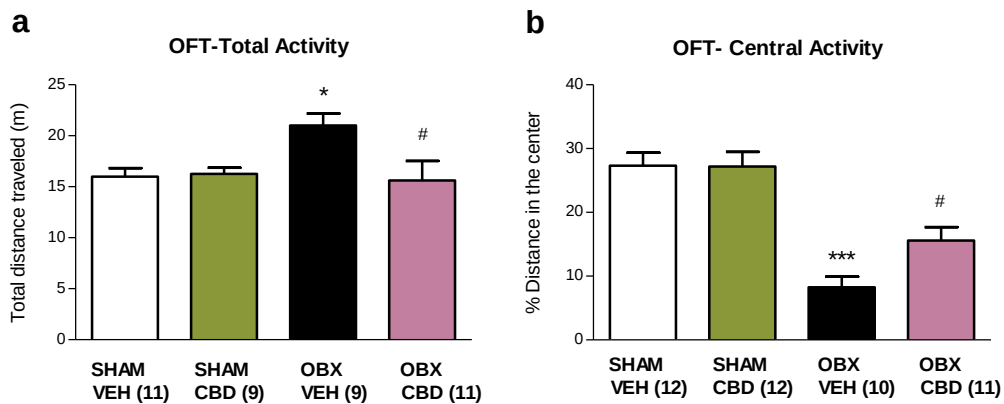


Figura 7. Efecto conductual en el OFT de la administración aguda de CBD 10 mg/kg sobre la actividad total (a) y la actividad central (b). La administración aguda de CBD dio lugar a una reversión de la hiperactividad (a) y a un incremento de la ambulación central (b) de los animales OBX. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo sham; # $p < 0.05$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

Por otro lado, el porcentaje de distancia recorrida en la zona central aumentó de manera significativa en los animales OBX (OBX CBD 15.58 ± 2.12 % vs. OBX VEH 8.24 ± 1.69 %; $p < 0.05$), que presentan un descenso de la misma de manera basal (vs. SHAM VEH 27.31 ± 2.04 %, $p < 0.001$), debido a su fenotipo ansioso. De nuevo, la administración de CBD no afectó a la ambulación central de los animales sham, y en este caso el análisis por ANOVA de 2 vías no alcanzó significación estadística ($p = 0.081$).

Efectos de la administración crónica de Cannabidiol 10 mg/kg

Open field test

Se llevó a cabo el estudio del curso temporal de los efectos crónicos de la administración de CBD 10 mg/kg, realizándose las sesiones del OFT transcurridas 24 horas desde la última inyección. Se encontró que el efecto

sobre los animales OBX resulta visible y significativo tras 2 semanas de tratamiento, y se mantiene y consolida con la administración continuada (OBX CBD vs. OBX VEH: 14 días $p<0.05$; 21 días $p<0.05$; 28 días $p<0.01$; 35 días $p<0.01$; 42 días $p<0.001$). En el caso de los animales sham, la administración repetida de CBD no condujo a ninguna alteración significativa de la actividad locomotora.

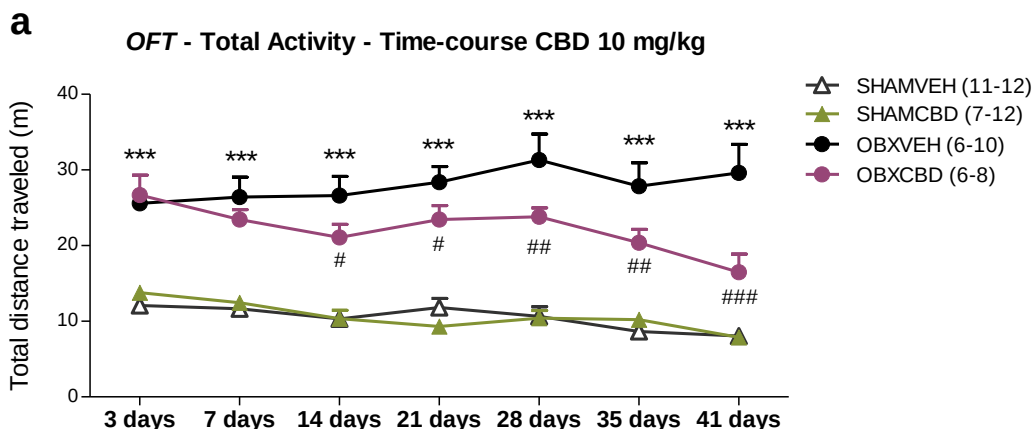


Figura 8. Efecto conductual en el OFT de la administración crónica de CBD 10 mg/kg sobre la actividad total. El CBD dio lugar a una atenuación de la hiperactividad inducida por la OBX a partir de la segunda semana de tratamiento, que se hizo más notoria con la continuación del tratamiento. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs. el respectivo grupo sham; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

El análisis estadístico por ANOVA de 2 vías reveló una interacción significativa entre los factores cirugía y tratamiento a partir de la cuarta semana de tratamiento (28 días [$F(1,32) = 5.92$, $p<0.05$]; 35 días [$F(1,36) = 7.28$, $p<0.05$]; 41 días [$F(1,35) = 9.56$, $p<0.01$]).

En lo que se refiere a los efectos ansiolíticos, la administración crónica de CBD no dio lugar a efectos sobre la ambulación central ni en sham en OBX a la dosis de 10 mg/kg a ninguno de los tiempos de tratamiento ensayados, a diferencia de lo que sucedió tras su administración aguda.

Sucrose intake test

De manera paralela se estudió la evolución de la conducta anhedónica de los animales OBX mediante el *sucrose intake test* a distintos tiempos.

De manera similar a lo registrado en el OFT, se encontró una mejoría en la anhedonia de los animales OBX tras 2 semanas de tratamiento (SHAM VEH 1.21 ± 0.061 vs. OBX VEH 0.86 ± 0.10 ; $p < 0.05$; OBX VEH vs. OBX CBD 1.31 ± 0.060 , $p < 0.05$), que se mantuvo hasta el final del mismo tras 6 semanas de administración (SHAM VEH 1.34 ± 0.10 vs. OBX VEH 0.79 ± 0.07 , $p < 0.01$; OBX VEH vs. OBX CBD 1.23 ± 0.10 $p < 0.05$, $p < 0.01$). El análisis por ANOVA de 2 vías evidenció una interacción entre cirugía y tratamiento en ambos momentos del tratamiento (14 días: $[F(1,42) = 4.47, p < 0.05]$ y 42 días: $[F(1,32) = 4.70, p < 0.05]$).

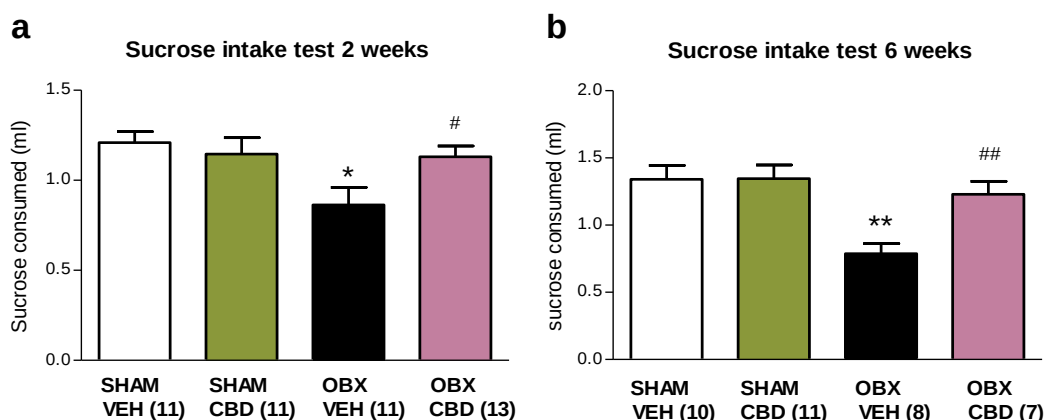
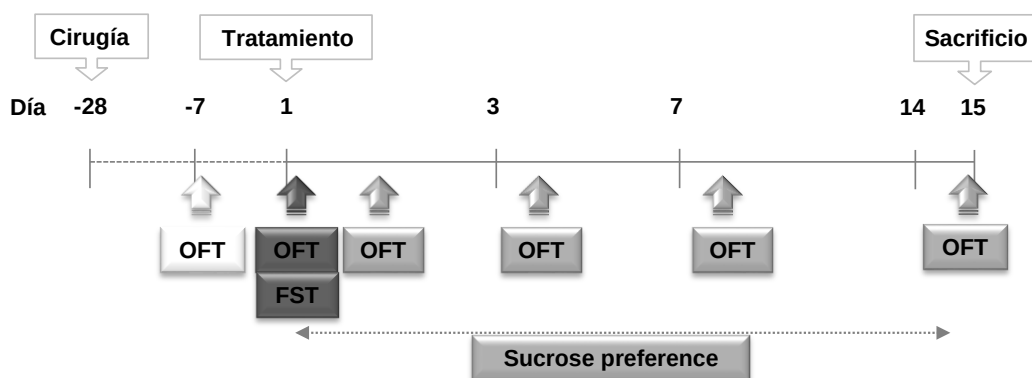


Figura 9. Efectos conductuales de la administración crónica de CBD 10 mg/kg en el *sucrose intake test*. La anhedonia de los animales OBX reflejada en el consumo descendido de sacarosa, fue revertido a partir de la segunda semana de administración diaria de CBD (a) y siguió presente tras seis semanas de tratamiento (b). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. el respectivo grupo sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

Administración de Cannabidiol 10 mg/kg con dosis inicial de 50 mg/kg

Dado el retraso en la aparición de las acciones de tipo antidepresivo, se procedió al ensayo de la implementación de una dosis inicial de carga consistente en la administración de una dosis 5 veces superior durante los 3 primeros días de tratamiento (50 mg/kg) que se continuó con la dosis de 10 mg/kg previamente seleccionada. De nuevo, se llevaron a cabo los test conductuales tras la administración crónica y también se ensayaron los efectos agudos para la dosis inicial superior. Del mismo modo que en los experimentos anteriores, fueron necesarias varias series de animales para completar el total de los experimentos de caracterización conductual. El cronograma se muestra a continuación.



Esta pauta de dosificación fue elegida en base al elevado volumen de distribución de los compuestos de tipo cannabinoide hacia tejidos grasos (Huestis, 2007), la posibilidad de encontrarnos frente a un modelo farmacocinético tricompartmental, y considerando que el retraso en la aparición del efecto antidepresivo se pudiese deber en parte a una cuestión farmacocinética. Se probó para ello la administración de una dosis 5 veces superior durante los 3 primeros días de tratamiento a fin de saturar las reservas lipídicas. Tras 3 días de administración de CBD 50 mg/kg se continuó el

tratamiento con la dosis de 10 mg/kg asumiendo la saturación de los reservorios de fármaco en tejido graso, y a fin de evitar efectos adversos de tipo anorexigénico por las dosis elevadas de cannabinoide, que se detallan más adelante. Dado que el objetivo final de esta tesis no consiste en aislar los fenómenos farmacocinéticos que subyacen a los efectos farmacológicos, sino al estudio de dichos efectos, no se profundizó más en la hipótesis farmacocinética que inspiró la nueva pauta de dosificación.

Con esta pauta de dosificación se consiguió un marcado acortamiento de la aparición de los efectos de tipo antidepresivo, que se detallan en el siguiente apartado.

EFFECTOS FARMACOLÓGICOS DEL CANNABIDIOL

B.1. ESTUDIOS CONDUCTUALES

Forced swimming test

En el FST, la primera inyección de 50 mg/kg de CBD produjo de forma aguda (30 min post-inyección) un descenso de la *immobility* en los animales OBX (OBX VEH 67.21 ± 15.21 vs. 29.34 ± 9.44 , $p < 0.05$), acompañado de un incremento del *swimming* (OBX VEH 227.1 ± 15.22 vs. 263.1 ± 9.81 , $p < 0.05$). En el caso del *climbing* se observó una tendencia al incremento de este tipo de conducta, aunque no se alcanzaron valores significativos. El análisis por ANOVA de 2 vías reveló una interacción significativa entre las variables cirugía y tratamiento tanto en el tiempo de *immobility* como en el *swimming* ($[F(1,24) = 4.75, p < 0.05]$; $[F(1,25) = 4.48, p < 0.05]$, respectivamente). En los animales sham no se encontró alteración alguna en ninguno de los 3 parámetros analizados.

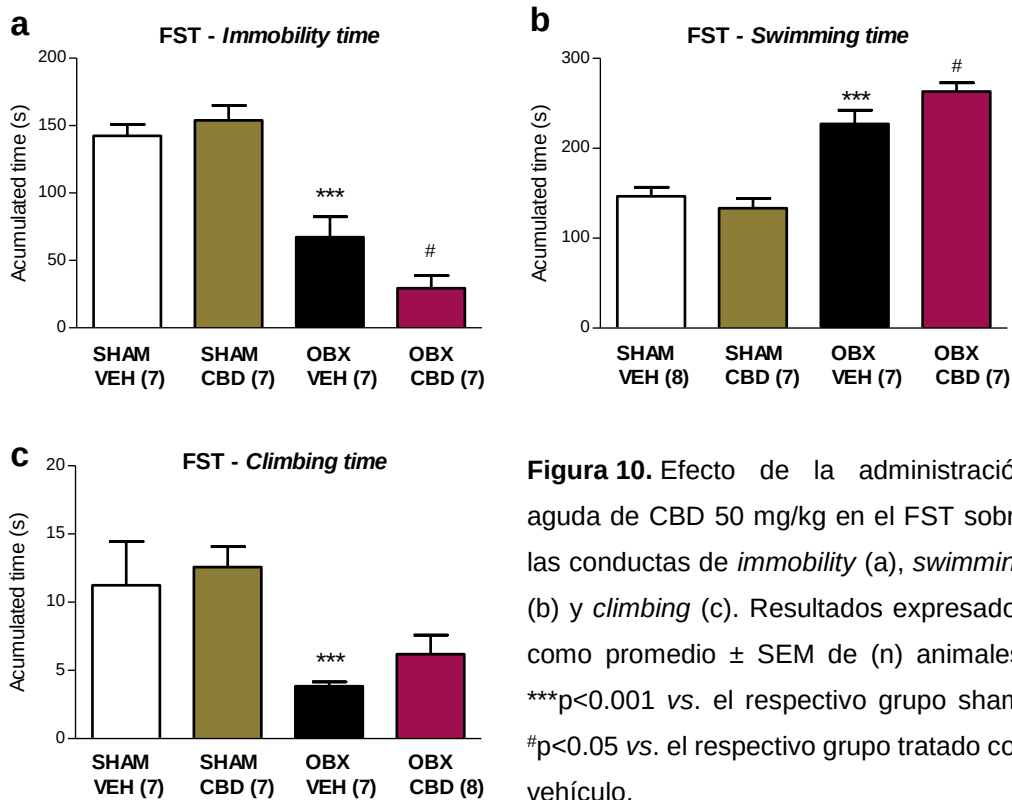


Figura 10. Efecto de la administración aguda de CBD 50 mg/kg en el FST sobre las conductas de *immobility* (a), *swimming* (b) y *climbing* (c). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. *** $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo sham; # $p < 0.05$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

Open field test

Efecto agudo de la administración de Cannabidiol 50 mg/kg

La administración de 50 mg/kg de CBD produjo un efecto de tipo antidepresivo desde la primera dosis (a los 30 min post-inyección). El análisis estadístico mediante un ANOVA de 2 vías reveló la existencia de una interacción significativa entre las variables cirugía y tratamiento ($[F(1,22) = 6.80, p < 0.05]$). El análisis *post-hoc* determinó que la dosis de 50 mg/kg de manera aguda, del mismo modo que la dosis de 10 mg/kg, produjo una reversión de la hiperactividad de los animales OBX (OBX VEH 24.95 ± 2.83 vs. OBX CBD 13.19 ± 2.12 , $p < 0.01$), mientras que no alteró la repuesta de los animales sham.

En cuanto a la actividad central, el análisis por ANOVA de 2 vías no reveló una interacción significativa entre cirugía y tratamiento. De manera aguda, el CBD 50 mg/kg produjo un incremento de la ambulación central sólo en los animales que presentaban un descenso de esta conducta, es decir, los animales OBX (OBX VEH 3.54 ± 0.52 vs. OBX CBD 9.30 ± 1.84 , $p < 0.05$).

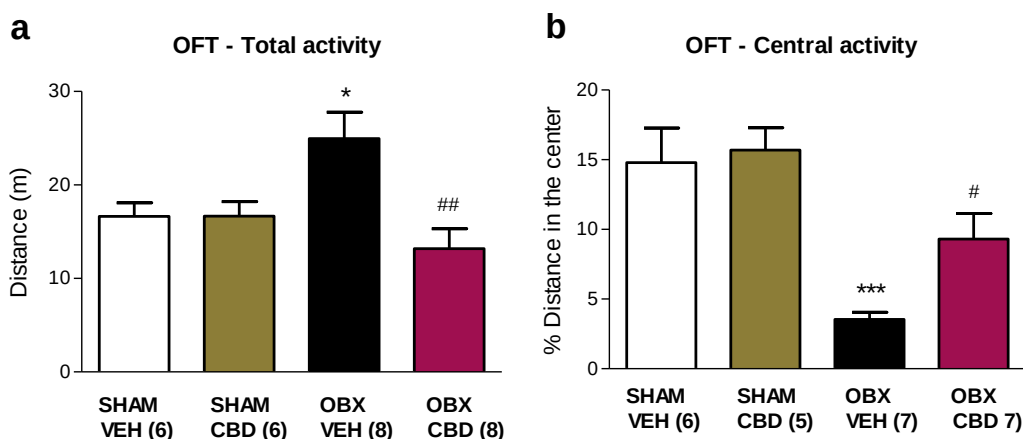


Figura 11. Efecto de la administración aguda de CBD 50 mg/kg en el OFT. La hiperactividad inducida por la OBX fue completamente revertida por el (a). La escasa ambulación central propia de los animales OBX se vio considerablemente incrementada por la administración de CBD (b). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

Efecto subagudo-crónico del Cannabidiol (50 - 10 mg/kg)

El efecto antidepresivo de 50 mg/kg de CBD, reflejado en la reversión de la hiperactividad inducida por la OBX, tuvo lugar no sólo de manera inmediata (de igual modo que ocurrió con la dosis de 10 mg/kg) sino que, transcurridas 24 horas desde la primera inyección, aún se conservaba el efecto anti-hiperactividad en los animales OBX (Día 1: OBX VEH 25.37 ± 1.43 vs. OBX CBD 17.64 ± 4.83 , $p < 0.001$). Además con esta pauta de administración (50 mg/kg x 3 + 10 mg/kg x 11), el efecto antidepresivo se mantuvo en todos los momentos del tratamiento ensayados (3 días, 7 días y 14 días: $^{**}p < 0.01$). Por lo tanto, se consiguió eliminar por completo el retraso en la implementación del efecto antidepresivo en el OFT, que pasó de requerir 2 semanas para establecerse de manera significativa, a estar presente desde la primera inyección y mantenerse a lo largo del tratamiento. Por otro lado se comprobó que, una vez alcanzado el efecto antidepresivo, una dosis inferior (10 mg/kg) es suficiente para el mantenimiento del efecto, lo cual resulta de gran interés a la hora de prevenir la aparición de posibles efectos adversos por la administración crónica del fármaco, especialmente a dosis altas.

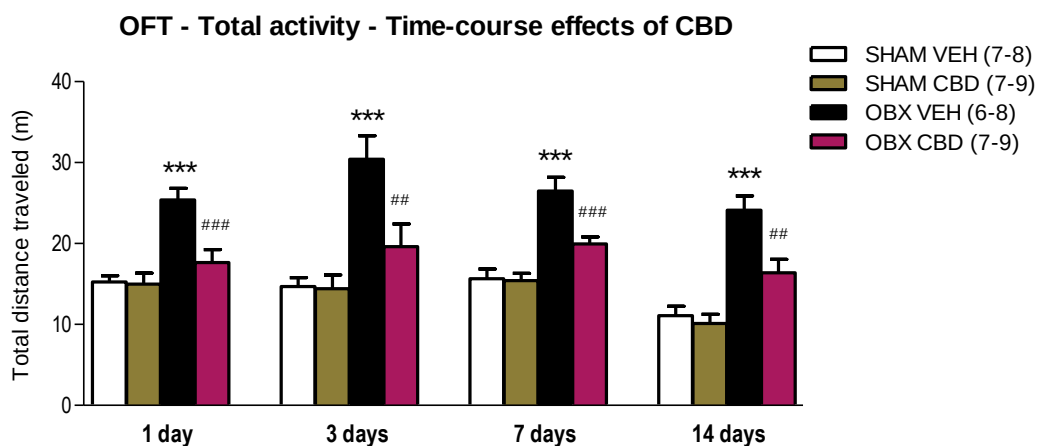


Figura 12. Curso temporal del efecto antidepresivo de la administración de CBD (50+10) en el OFT. La hiperactividad inducida por la OBX fue revertida por la administración de CBD de manera rápida y eficaz. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. $^{***}p < 0.001$ vs. el respectivo grupo sham; $^{##}p < 0.01$ $^{###}p < 0.001$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

En todos los momentos del tratamiento ensayados, el análisis estadístico por ANOVA de 2 vías reflejó la existencia de interacción entre las 2 variables (1 día: [F(1,29) = 7.49, $p < 0.05$], 3 días: [F(1,25) = 5.20, $p < 0.05$], 7 días: [F(1,25) = 7.29, $p < 0.05$], 14 días: [F(1,25) = 5.68, $p < 0.05$]).

En los animales sham no se registró ninguna alteración en su actividad locomotora tras el tratamiento crónico con CBD.

El efecto ansiolítico reflejado en un incremento de la ambulación central que tuvo lugar tras la administración aguda de CBD, no resultó estadísticamente significativo a las 24 horas post-inyección, aunque la tendencia a la ansiolisis se conservó durante todo el tratamiento (3, 7 y 14 días). En los animales sham el CBD tampoco produjo alteraciones sobre la ambulación central tras la administración crónica. No se encontró interacción significativa entre las 2 variables analizadas mediante el análisis por ANOVA de 2 vías.

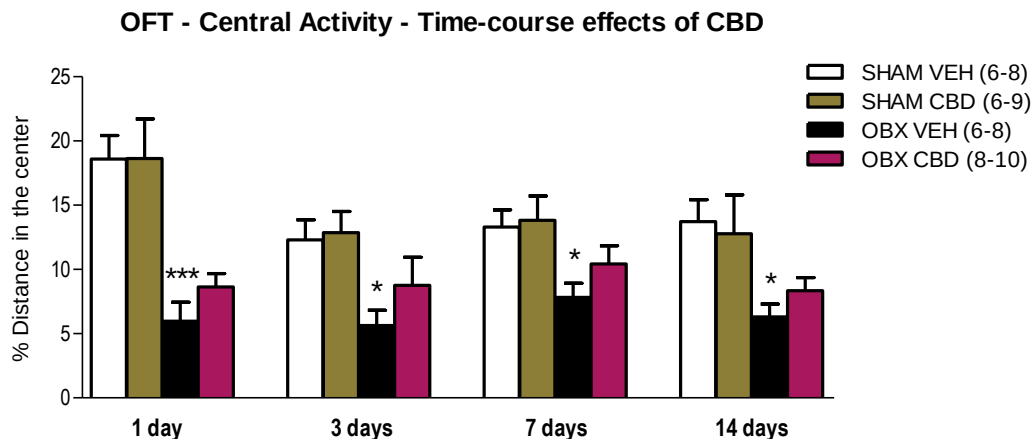


Figura 13. Curso temporal del efecto de la administración de CBD (50+10) sobre la ambulación central de los animales sham y OBX en el OFT. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. el respectivo grupo sham.

Sucrose preference test

En el caso de la preferencia por soluciones azucaradas, con esta pauta de dosificación también se redujo la histéresis, aunque en este caso a diferencia de lo sucedido con la hiperactividad en el OFT, fue necesaria una semana para observar una mejoría significativa en la preferencia por sacarosa de los animales OBX (SHAM VEH vs. OBX VEH $p < 0.01$; OBX VEH vs. OBX CBD $p < 0.01$). Tras 2 semanas de tratamiento se confirmó que se mantenía la eficacia anti-anhedónica (OBX VEH vs. OBX CBD $p < 0.01$). El análisis por ANOVA de 2 vías determinó la existencia de interacción significativa entre las variables cirugía y tratamiento en los dos momentos ensayados (7 días: $[F(1,27) = 4.30, p < 0.05]$, 14 días: $[F(1,24) = 6.68, p < 0.05]$).

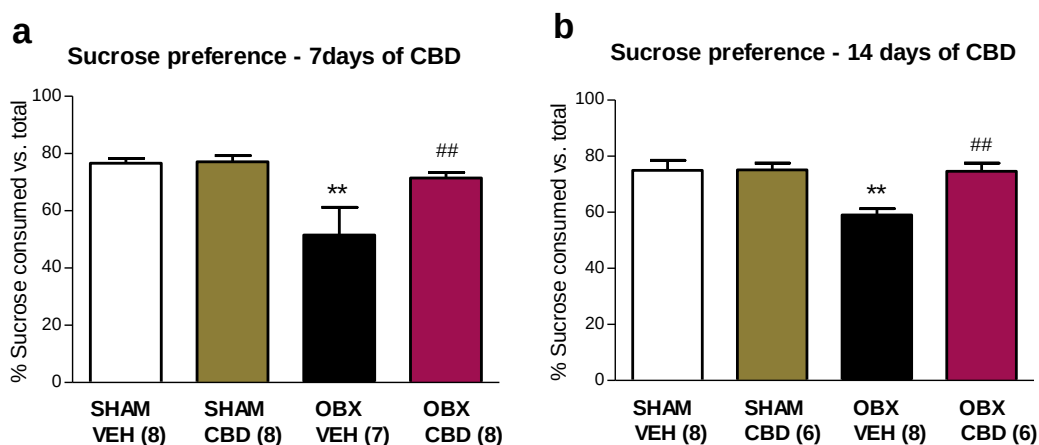


Figura 14. Sucrose preference test tras 7 (a) y 14 días (b) de tratamiento con CBD (50+10). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. ** $p < 0.01$ vs. el respectivo grupo sham; ## $p < 0.01$. vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

Efectos sobre el apetito de Cannabidiol 50 mg/kg

Cabe destacar que, al comienzo del tratamiento con CBD, a la dosis de 50 mg/kg se registró un descenso en el consumo de sacarosa en la mitad de los animales sham (SHAM CBD-RES vs. SHAM VEH: día 1 $p<0.05$, día 2 $p<0.01$, día 3 $p<0.001$). En los animales OBX se observó una ligera potenciación de la anhedonia tras 2 días de administración de CBD 50 mg/kg que no alcanzó significación estadística.

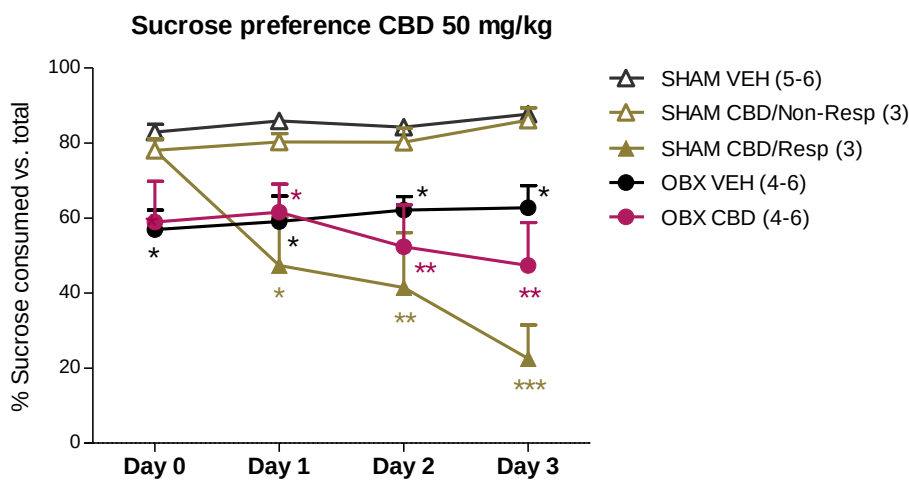


Figura 15. *Sucrose preference test* tras la administración de CBD 50 mg/kg. La administración de CBD dio lugar a un descenso en el consumo de sacarosa en la mitad de los animales sham (SHAM CBD/ Resp), que se vio potenciado con la administración repetida de CBD 50 mg/kg, mientras que no produjo efecto alguno en la otra mitad de animales sham (SHAM CBD/Non-REsp). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ vs. SHAM VEH.

Para comprobar si este fenómeno respondía a un empeoramiento anímico de algunos de los animales control al recibir CBD, o bien se trataba de una alteración del apetito, se realizó un registro de otros parámetros. Los valores de

ingesta de comida y consumo total de líquidos fueron analizados, ya que la capacidad de los compuestos cannabinoides de producir alteraciones de la ingesta de alimentos es un efecto conocido y ampliamente descrito en la bibliografía. Los resultados evidenciaron un efecto anorexigénico del CBD a la dosis de 50 mg/kg en algunos de los animales sometidos a tratamiento, que se acompañó de una reducción en el volumen total de líquido ingerido y también en la apetencia por sacarosa. Tras la primera inyección, los animales OBX presentaron una disminución en la ingesta de alimento en un 33.2% ($p<0.001$) y los sham un 36.9% ($p<0.001$), dándose de manera paralela un adelgazamiento de un 4 % ($p<0.01$) y un 5 % ($p<0.001$) del peso respectivamente, frente al 1 % de adelgazamiento que se da en los animales tratados con vehículo. En el caso de los animales OBX la anhedonia no se vio alterada por el efecto anorexigénico del CBD. Sin embargo, en el caso de los animales sham, la mitad de los individuos presentaron un notorio descenso de la preferencia por sacarosa, mientras que la otra mitad mostró una conducta inalterada. A la dosis de 10 mg/kg de CBD no se registraron alteraciones reseñables de la ingesta de alimentos en animales control ni OBX.

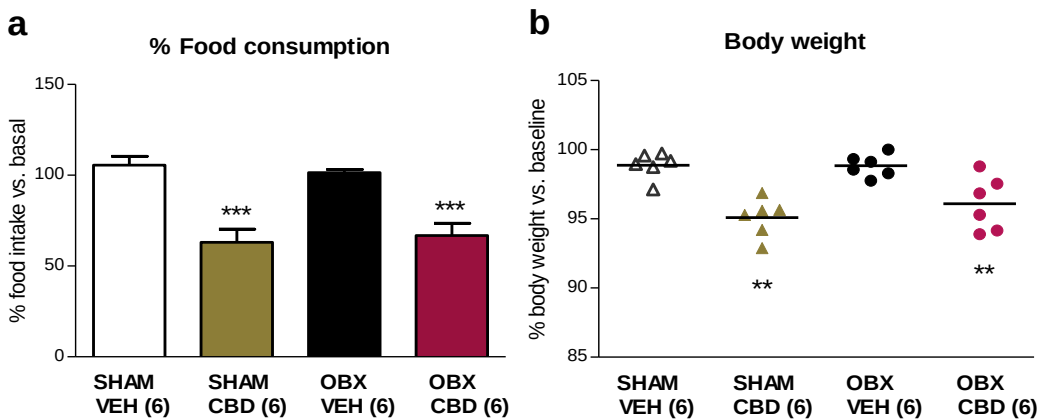


Figura 16. Consumo de comida (durante 24 horas) (a) y peso corporal (24 horas post-inyección) (b) respecto a las condiciones basales tras la administración de CBD 50 mg/kg o vehículo. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

B.2. ESTUDIO LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN CORTEZA PREFRONTAL TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE CANNABIDIOL

Con el fin de explorar el mecanismo neuroquímico responsable del rápido efecto antidepresivo del CBD, se procedió al estudio de la liberación de 5-HT y glutamato en la vmPFCx tras la administración del compuesto. Se estudió la liberación de 5-HT, en primer lugar, por tratarse del principal neurotransmisor implicado en la patología depresiva y responsable, en gran magnitud, de la eficacia de los tratamientos antidepresivos utilizados en clínica. El glutamato, por su parte, fue seleccionado ya que recientemente se ha descrito que juega un papel fundamental en los efectos antidepresivos rápidos de fármacos como la ketamina, además de por las innumerables alteraciones que presenta este sistema de neurotransmisión en la depresión, del mismo modo que el sistema serotoninérgico.

Efectos agudos del cannabidiol sobre la liberación de serotonina y glutamato

Los estudios de microdiálisis in vivo mostraron que la administración de CBD 50 mg/kg de manera aguda (s.c), provocó un pico de liberación de 5-HT al espacio extracelular en la vmPFCx de los ratones OBX ($p < 0.05$). Sin embargo, en los animales sham no dio lugar a una modificación significativa de la liberación de 5-HT.

Al mismo tiempo, se registró un marcado incremento de los niveles de glutamato, inmediatamente después de la administración CBD 50 mg/kg, tanto en animales sham como OBX ($p < 0.01$). El análisis por ANOVA de 3 vías determinó que no existía interacción significativa entre las variables cirugía, tratamiento y tiempo para ninguno de los dos neurotransmisores estudiados.

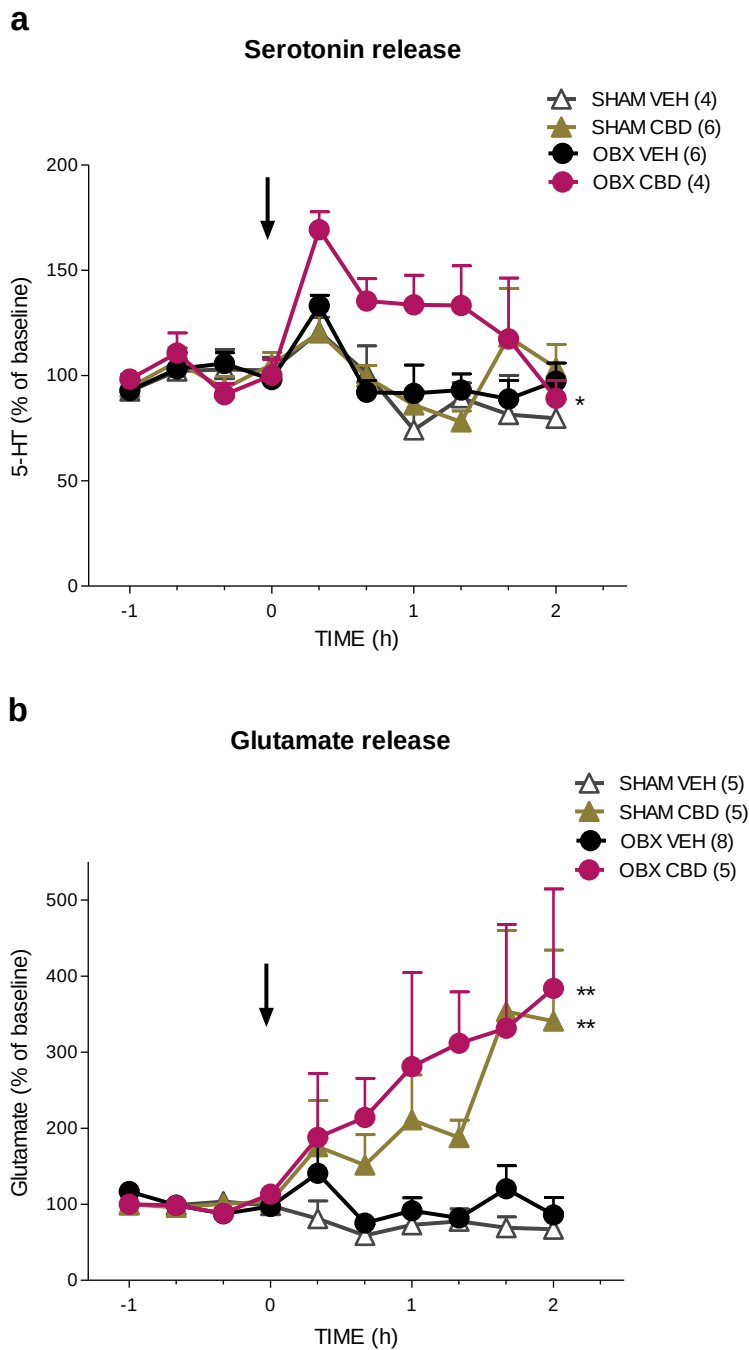


Figura 17. Efecto diferencial de la administración aguda de CBD sobre la liberación de 5-HT (a) y glutamato (b) en animales sham y OBX. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

Efectos del Cannabidiol tras la administración crónica sobre la liberación de serotonina y glutamato

Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios de microdialisis tras el tratamiento crónico (2 semanas) con CBD (50 mg/kg x 3 + 10 mg/kg x 11) para comprobar si el patrón de liberación pudiera haberse visto alterado por mecanismos compensatorios como consecuencia a la administración repetida del fármaco.

La administración de una dosis *challenge* de CBD después de su administración crónica derivó en un patrón de liberación de neurotransmisores diferente en comparación con la administración de una dosis única. En cuanto a la 5-HT, el CBD provocó un aumento de la liberación al espacio extracelular en todos los animales tratados, tanto sham como OBX (Sham $p < 0.01$; OBX $p < 0.05$) tras el tratamiento crónico, a diferencia de lo observado tras una única inyección donde no se produjo incremento en los animales sham.

Por el contrario, el incremento en la liberación de glutamato inducida por CBD, sólo se pudo apreciar en los animales OBX en esta ocasión ($p < 0.01$). Los animales sham no conservaron esa respuesta glutamatérgica tras la administración repetida de CBD durante 14 días. En este caso, se determinó la existencia de interacción significativa entre cirugía, tratamiento y tiempo mediante el análisis por ANOVA de 3 vías [$F(1,24) = 7.37$, $p < 0.05$].

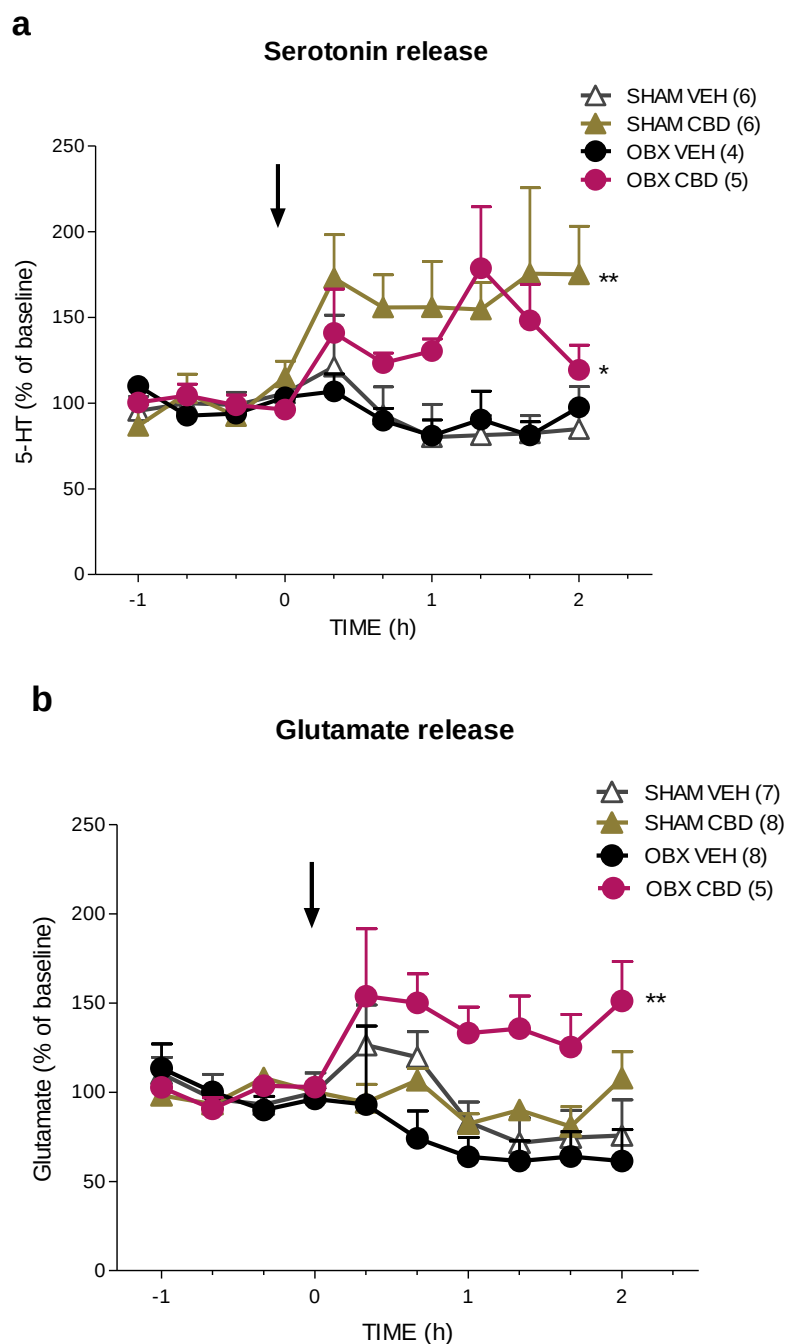


Figura 18. Efecto diferencial de la administración crónica de CBD sobre la liberación de 5-HT (a) y glutamato (b) en animales sham y OBX en mPFCx. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

En segundo lugar, se analizaron los niveles basales para cada neurotransmisor en términos absolutos y las modificaciones sobre los mismos por efecto del tratamiento crónico con CBD. En cuanto a los niveles de 5-HT no se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos sham y OBX y tampoco al comparar a los animales tratados con vehículo o CBD a los largo del experimento, aunque se observa una ligera tendencia al incremento de los niveles basales de aquellos animales tratados con CBD. Los niveles basales de glutamato en vmPFCx se vieron incrementados tras la administración crónica de CBD en animales sham ($p<0.01$) y OBX ($p<0.05$). El análisis por ANOVA de 2 vías determinó la no existencia de interacción significativa entre los factores cirugía y tratamiento.

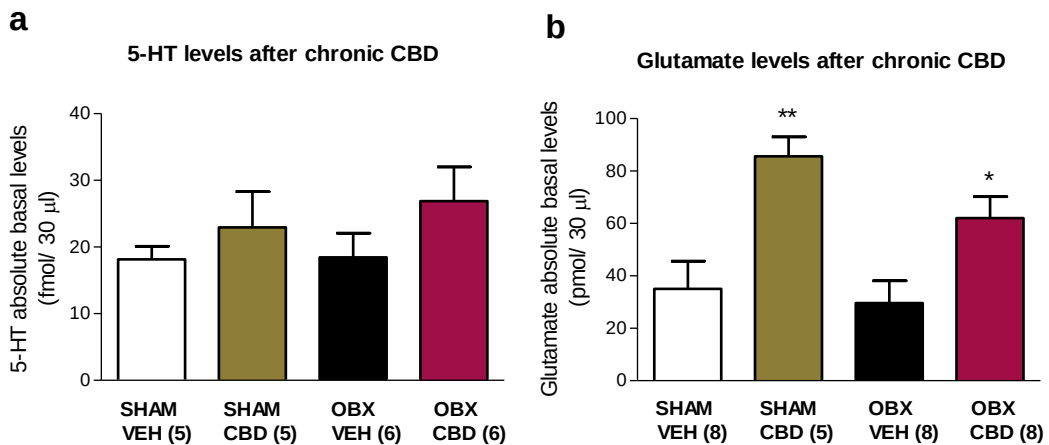


Figura 19. Efecto de la administración crónica de CBD sobre los niveles basales de 5-HT (a) y glutamato (b) extracelulares en vmPFCx de animales sham y OBX. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

B.3. FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES 5-HT_{1A} Y CB₁ TRAS EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON CANNABIDIOL

Autorradiografía funcional del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}

El análisis de la autorradiografía funcional del receptor 5-HT_{1A} reveló algunas diferencias en la capacidad de fijación de [³⁵S]GTPγS en áreas límbicas entre los grupos tratados con vehículo y con CBD durante 2 semanas. En la mPFCx, el tratamiento crónico con CBD indujo un incremento de la fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por (+)8-OH-DPAT 10 μM del 42 ± 12 % y 40 ± 7 % vs. fijación basal en animales sham y OBX respectivamente (p<0.01 en ambos casos), sin existir interacción entre las variables cirugía y tratamiento, analizado mediante un ANOVA de 2 vías.

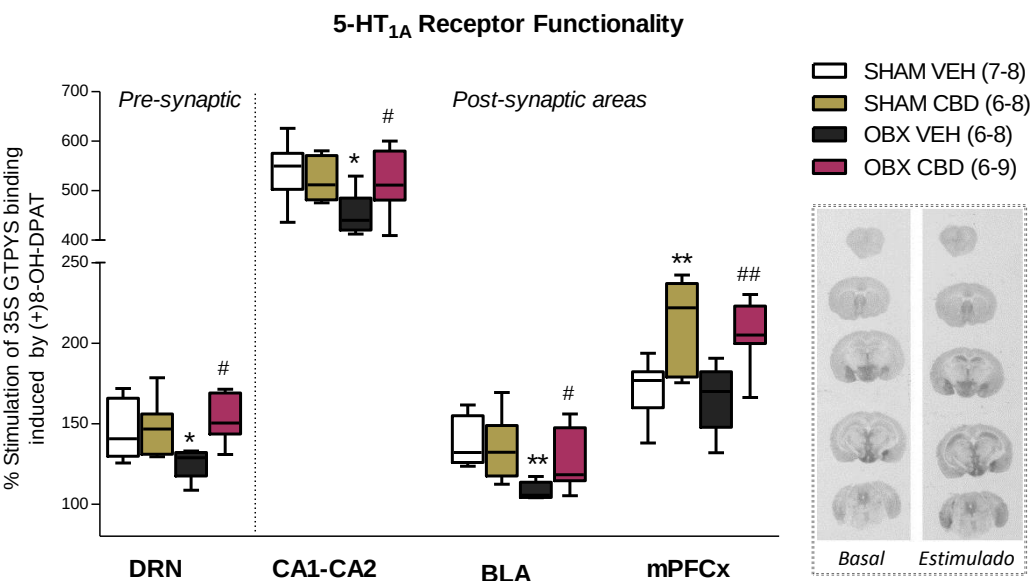


Figura 20. Diagrama de cajas correspondiente al efecto de la administración crónica de CBD sobre la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A}. DRN: núcleos del rafe dorsal, CA1-CA2: áreas CA1-CA2 del hipocampo, BLA: amígdala basolateral; mPFCx: corteza prefrontal medial. Resultados expresados como porcentaje de la estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS estimulada respecto a la fijación específica basal, como promedio ± mínimo/máximo. *p<0.05, **p<0.01. vs. el respectivo grupo sham; #p<0.05, ##p<0.01 vs. el respectivo grupo tratado con vehículo. A la derecha autorradiograma de la fijación de [³⁵S]GTPγS basal vs. estimulada por 8-OH-DPAT.

Por otra parte, en DRN, amígdala y el área CA1-CA2 del hipocampo se observó una reducción de la fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada en animales OBX de un $22 \pm 4 \%$ ($p < 0.05$), $30 \pm 2 \%$ ($p < 0.01$), $89 \pm 14 \%$ ($p < 0.05$), respectivamente, que fue revertida por la administración crónica de CBD ($p < 0.05$ vs. OBX VEH, en todos los casos), mientras que no se encontró ningún efecto en los ratones sham. El análisis estadístico por ANOVA de 2 vías reveló interacción significativa entre las variables cirugía y tratamiento en hipocampo CA₁-CA₂ [$F(1,29) = 5.37$, $p < 0.05$] y DRN [$F(1,23) = 5.55$, $p < 0.05$].

En la tabla que se muestra a continuación se recogen los valores medios registrados en las áreas de mayor interés para este trabajo.

Tabla 1. Porcentaje de fijación específica de [³⁵S]GTPγS estimulada por 8-OH-DPAT en diferentes áreas cerebrales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. el respectivo grupo sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. el respectivo grupo tratado.

	% Estímulo				% Estímulo		
	Media	EM	N		Media	EM	N
mPFCx				PFCx lateral			
SH VEH	171	7	7	SH VEH	197	15	8
SH CBD	**213	12	6	SH CBD	210	15	8
OB VEH	166	7	8	OB VEH	208	13	8
OB CBD	##206	7	8	OB CBD	207	14	7
Hipocampo CA1-CA2				Hipotálamo			
SH VEH	541	21	8	SH VEH	119	5	7
SH CBD	524	16	8	SH CBD	112	2	8
OB VEH	*452	14	8	OB VEH	118	4	6
OB CBD	#519	20	9	OB CBD	126	9	6
Amígdala (BLA)				Rafe Dorsal			
SH VEH	138	6	6	SH VEH	147	7	7
SH CBD	136	8	7	SH CBD	147	6	8
OB VEH	**108	2	8	OB VEH	*125	4	6
OB CBD	#128	7	8	OB CBD	#153	6	6

Autorradiografía funcional del receptor cannabinoide CB₁

En cuanto a la fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por WIN552122, se encontró un incremento del $40 \pm 7 \%$ ($p < 0.05$) en el hipotálamo de ratón OBX en comparación con el animal sham, que se recupera hasta el nivel de los controles tras el tratamiento crónico con CBD ($p < 0.05$ vs. OBX VEH).

Por otra parte, se encontró un descenso de la capacidad de acoplamiento a proteínas G del receptor CB₁ en la mPFCx (descenso del $252 \pm 34 \%$, $p < 0.01$), que fue corregido tras la administración crónica de CBD ($p < 0.05$ vs. OBX VEH).

El análisis estadístico por ANOVA de 2 vías reveló interacción significativa entre las variables cirugía y tratamiento tanto en hipotálamo [$F(1,25) = 4.45$, $p < 0.05$] como en mPFCx [$F(1,25) = 4.39$, $p < 0.05$].

CB₁ receptor functionality:

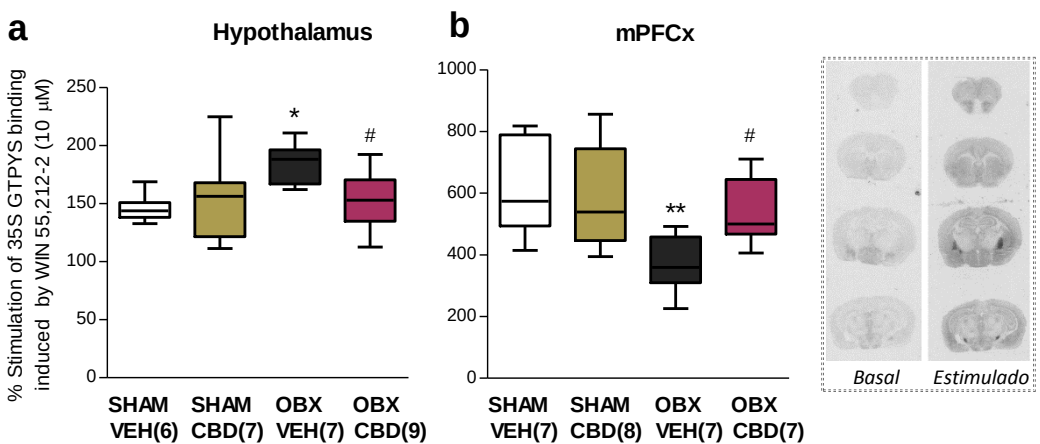


Figura 21. Diagrama de cajas correspondiente al efecto de la administración crónica de CBD sobre la funcionalidad de los receptores CB₁ en hipotálamo (a) y mPFCx (b). Los resultados se expresan en porcentaje de la estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS estimulada respecto a la fijación específica basal, como promedio $\pm$ mínimo/máximo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. vs. el respectivo grupo sham; # $p < 0.05$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo. A la derecha autorradiograma de la fijación de [³⁵S]GTPγS basal vs. estimulada por WIN552122.

A continuación se muestran los valores registrados para cada grupo en las diferentes áreas de interés.

Tabla 2. Porcentaje de fijación específica de [³⁵S]GTPγS estimulada por WIN552122 en diferentes áreas cerebrales respecto a la fijación basal. *p<0.05, **p<0.01 vs. el respectivo grupo sham; #p<0.05 vs. el respectivo grupo tratado.

	% Estímulo				% Estímulo		
	Media	EM	N		Media	EM	N
mPFCx				PFCx Lateral			
SH VEH	619	58	7	SH VEH	506	49	8
SH CBD	586	59	8	SH CBD	501	54	8
OB VEH	**367	34	7	OB VEH	435	28	7
OB CBD	#544	42	7	OB CBD	464	40	7
Hipocampo CA3				Hipotálamo			
SH VEH	629	61	8	SH VEH	146	5	6
SH CBD	551	33	8	SH CBD	154	14	7
OB VEH	620	53	8	OB VEH	*186	7	7
OB CBD	565	39	9	OB CBD	#154	8	9
Amígdala (BLA)				Caudado Putamen			
SH VEH	160	6	8	SH VEH	450	26	8
SH CBD	154	15	7	SH CBD	463	31	8
OB VEH	160	11	8	OB VEH	440	26	8
OB CBD	156	11	8	OB CBD	441	35	8

B.4. ESTUDIO POR WESTERN BLOT DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR Y PLASTICIDAD NEURONAL

El análisis semicuantitativo por densidad óptica de las bandas obtenidas por Western Blot, reveló que el tratamiento crónico con CBD dio lugar a alteraciones en los niveles de expresión de ciertas proteínas implicadas en vías de plasticidad neuronal y cascadas de señalización intracelulares. Además de estudiar los niveles de determinadas proteínas clásicamente relacionadas con los efectos intracelulares de los antidepresivos y con la patología depresiva, como BDNF, CREB, ERK, AKT, b-catenina, Synapsin I/N-caderina; se estudiaron proteínas relacionadas de manera más reciente con los efectos de compuestos con eficacia antidepresiva inmediata, como es la vía de mTOR. El análisis de dichos marcadores se llevó a cabo en la PFCx e hipocampo, por tratarse de áreas clave en la modulación de los estados anímicos ansioso-depresivos y la respuesta conductual ante eventos estresantes.

Análisis de marcadores en corteza prefrontal

En la PFCx, el estudio de elementos de la vía de mTOR, reveló en primer lugar, que la proteína mTOR se encuentra más activada en el modelo de la OBX, reflejado en un incremento del grado de fosforilación de la misma (pmTOR/mTOR OBX VEH 135.7 ± 10.13 %, $p < 0.01$ vs. SHAM VEH) y que tras el tratamiento crónico con CBD se produjo una normalización de dicha actividad (pmTOR/mTOR OBX CBD 110.5 ± 9.15 %, $p < 0.05$ vs. OBX VEH). Del mismo modo, algunos elementos *downstream* de la cascada de señalización de esta proteína se encontraron alterados, como en el caso de la proteína 4EBP1 donde, del mismo modo, se observó un incremento del grado de fosforilación (p4EBP1/4EBP1 OBX VEH 142.6 ± 12.26 %, $p < 0.05$ vs. SHAM VEH) en el modelo de la OBX, que no se refiere tan acusado en los grupos tratados con

CBD ($127.9 \pm 10.2\%$ vs. SHAM VEH, *ns*) Por otra parte, la actividad de la proteína P70 se encontró ligeramente descendida en el modelo de la OBX sin tratamiento farmacológico (pP70/P70 OBX VEH $76.67 \pm 4.51\%$, $p < 0.05$ vs. SHAM VEH), mientras que no se observó este descenso de la activación en los animales tratados con CBD ($90.76 \pm 5.35\%$ vs. SHAM VEH, *ns*). Para este marcador el análisis por ANOVA de 2 vías determinó la existencia de una interacción significativa entre las variables cirugía y tratamiento [$F(1,23) = 7.81$, $p < 0.05$].

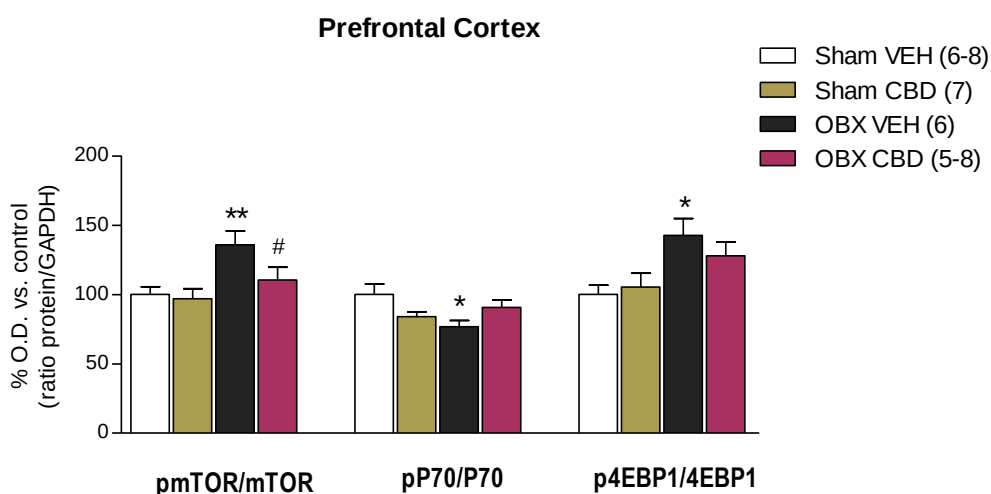


Figura 22. Efecto del tratamiento crónico con CBD sobre los niveles de proteínas de la cascada de señalización de la vía de mTOR. Los resultados se expresan como porcentaje de expresión (densidad óptica) respecto al grupo control (SHAM VEH). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. vs. el respectivo grupo sham; # $p < 0.05$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo.

Interesantemente, se encontró un llamativo incremento en la expresión de BDNF en los animales OBX (OBX VEH $318.0 \pm 74.81\%$, $p < 0.01$ vs. SHAM VEH) que fue revertido hasta niveles control por el tratamiento con CBD (OBX CBD $125.8 \pm 16.96\%$, $p < 0.01$ vs. OBX VEH).

Por otro lado, el CBD dio lugar a un incremento de la activación de la vía de ERK en animales sham (pERK/ERK: SHAM CBD $132.6 \pm 9.66 \%$, $p < 0.05$ vs. SHAM VEH), que no ocurrió en los animales OBX.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del resto de proteínas estudiadas: AKT, CREB, b-catenina; Synapsin I, TrkB.

Prefrontal cortex

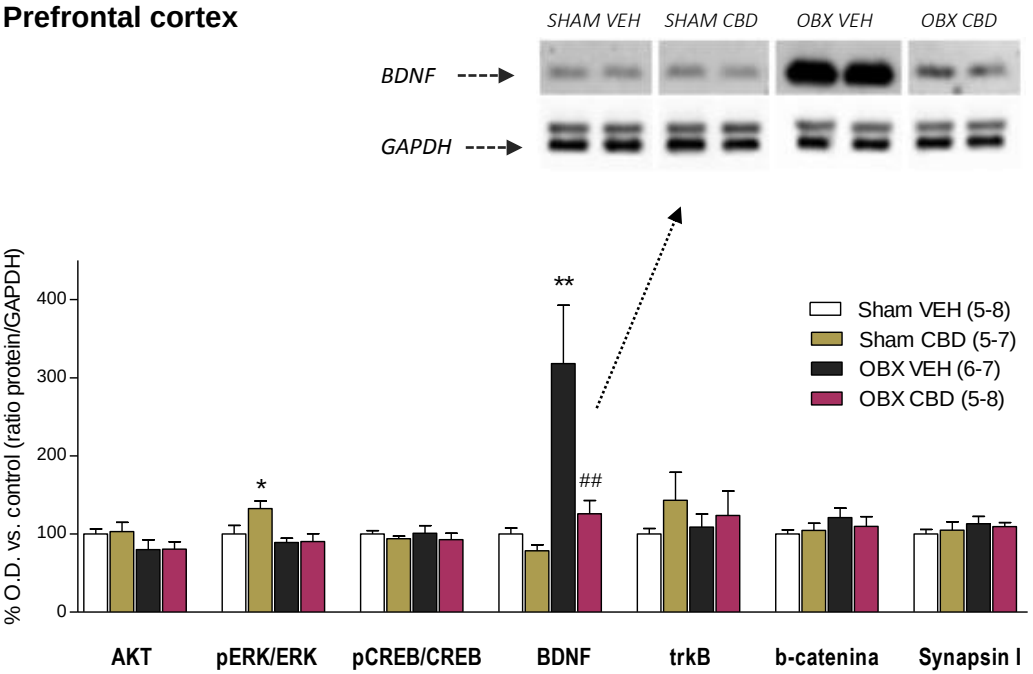


Figura 23. Efecto del tratamiento crónico con CBD sobre los niveles de proteínas de cascadas de señalización intracelular implicadas en neuroplasticidad en mPFCx. Los resultados se expresan como porcentaje de expresión (densidad óptica) respecto al grupo control (SHAM VEH). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. vs. el respectivo sham; # $p < 0.05$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo. Arriba una imagen representativa de las bandas obtenidas por Western Blot de BDNF para los diferentes grupos experimentales.

Análisis de marcadores en hipocampo

Se llevó a cabo adicionalmente el estudio de la expresión de algunas de estas proteínas en el hipocampo. En este caso, sólo se encontró alteración significativa en los niveles de BDNF, que de igual manera a lo observado en PFCx, se presenta fuertemente incrementado en el modelo de la OBX (BDNF OBX VEH 417.2 ± 147.6 %, $p < 0.05$ vs. SHAM VEH) y tras el tratamiento con CBD, este incremento es de menor magnitud no alcanzando diferencias significativas con respecto al grupo control (OBX CBD 197.3 ± 48.89 % vs. SHAM VEH, *ns*).

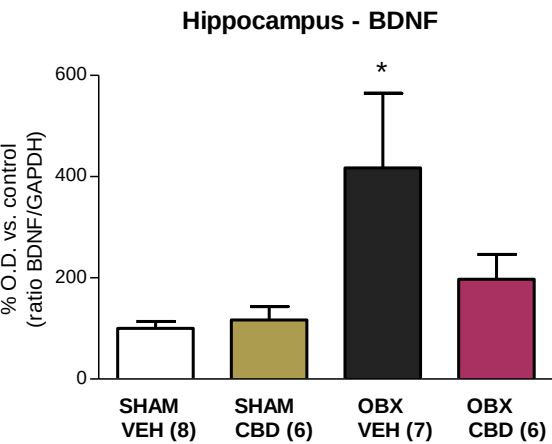


Figura 24. Efecto del tratamiento crónico con CBD sobre la expresión de BDNF en hipocampo. Los resultados se expresan como porcentaje de expresión (densidad óptica) respecto al grupo control (SHAM VEH). * $p < 0.05$. vs. el respectivo grupo sham.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del resto de proteínas estudiadas en este área: pmTOR/mTOR, pP70/P70, AKT, pCREB/CREB, pERK/ERK, b-catenina, N-caderina.

B.5. ESTUDIO POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA PARA BDNF Y TrkB

Tras los estudios de Western Blot que revelaron profundas alteraciones en la expresión del marcador de plasticidad BDNF, se llevó a cabo un estudio de los niveles de expresión de su mRNA en las distintas regiones cerebrales, así como de su principal receptor TrkB. Para ello, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* y se analizaron los niveles en diferentes áreas cerebrales, tales como PFCx medial y lateral, hipocampo (CA1/CA2, dentate gyrus (DG)), amígdala basolateral, cortex cingular, cortex piriforme y SVZ.

De entre las áreas estudiadas se encontró un notorio incremento de la expresión de mRNA para BDNF en animales OBX en mPFCx ($p<0.05$), de acuerdo con los resultados obtenidos sobre la expresión de la proteína por Western Blot. El tratamiento crónico con CBD también dio lugar en este caso a la normalización de sus niveles en los animales OBX ($p<0.05$), mientras que no provocó ninguna alteración significativa en los animales sham. Por otro lado, se encontró una elevación de los niveles de mRNA para BDNF en cortex piriforme tanto en animales sham como OBX.

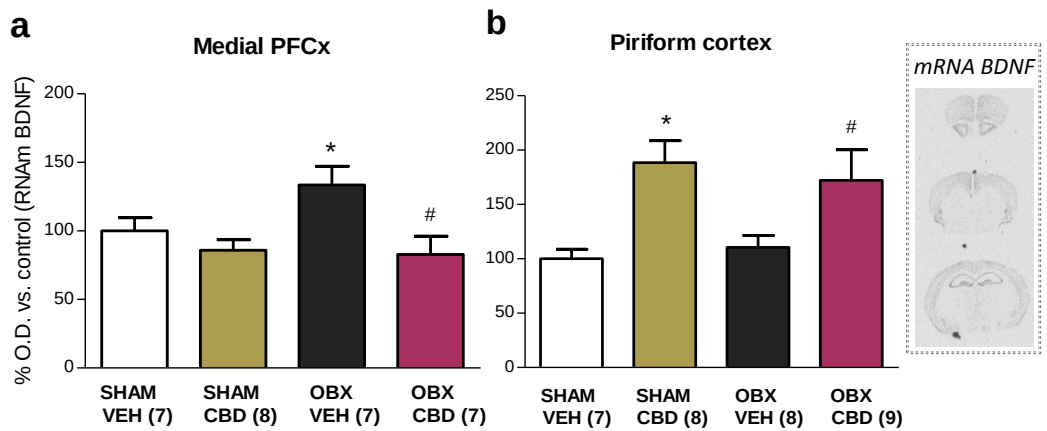


Figura 25. Efecto de la administración crónica de CBD sobre la expresión de mRNA de BDNF en mPFCx (a) y cortex piriforme (b). Los resultados se expresan como porcentaje de expresión de mRNA respecto al grupo control (SHAM VEH) * $p<0.05$. vs. el respectivo grupo sham; # $p<0.05$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo. A la derecha una imagen de la hibridación *in situ* de mRNA de BDNF.

En cuanto a los niveles de mRNA para el receptor TrkB, no se encontraron diferencias significativas en mPFCx, a diferencia de lo registrado para BDNF. En cambio, en cortex piriforme se registró una elevación significativa en aquellos animales tratados con CBD (Sham: $p<0.05$; OBX: $p<0.05$).

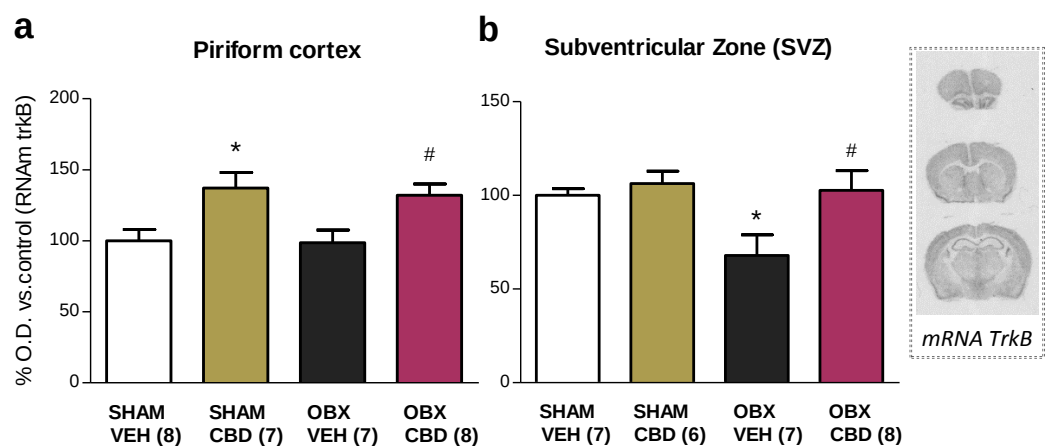
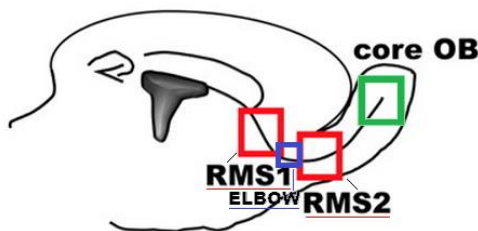


Figura 26. Efecto de la administración crónica de CBD sobre la expresión de mRNA de TrkB en cortex piriforme (a) y SVZ (b). Los resultados se expresan como porcentaje de expresión respecto al grupo control (SHAM VEH). * $p<0.05$. vs. el respectivo grupo sham; # $p<0.05$ vs. el respectivo grupo tratado con vehículo. A la derecha una imagen de la hibridación *in situ* de mRNA de TrkB.

B.6. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA Y PROCESOS DINÁMICOS DE LA CORRIENTE MIGRATORIA ROSTRAL TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE CANNABIDIOL

Dadas las alteraciones encontradas en la expresión de proteínas relacionadas con vías de plasticidad cerebral por efecto del tratamiento con CBD, se llevó a cabo el estudio de la morfología de los neuroblastos y su dinámica de migración en el cerebro tras la administración de CBD. Para ello, se escogió uno de los principales nichos de neurogénesis en cerebro adulto, la RMS, que nace en la SVZ, y que dirige su trayectoria hasta alcanzar el bulbo olfatorio. Se analizaron 3 áreas de la misma 3 áreas de la misma (RMS1, Elbow, RMS2).

Imagen 8: Modificada de Belvindrah y colaboradores (Belvindrah et al., 2011). Representación de un corte sagital de la RMS donde se observan las 3 regiones que se han considerado para su análisis (RMS1, Elbow, RMS2).



Inmunohistoquímica de GFP

En una primera aproximación se analizó la morfología y dirección de los neuroblastos tras 1 y 3 días de tratamiento con CBD (50 mg/kg, i.p.). Se analizaron la longitud del axón principal, el porcentaje de células en dirección alterada (no tangencial hacia el bulbo olfatorio (OB), el porcentaje de células no unipolares y el grosor de la corriente.

Imagen 9: Modificada de de Belvindrah y colaboradores (Belvindrah et al., 2011). A la izquierda una representación de los tipos de células contabilizadas (unipolares: type 1; no-unipolares: type 2 y type 3); a la derecha una representación de la dirección tangencial de los neuroblastos en cada área a estudio.

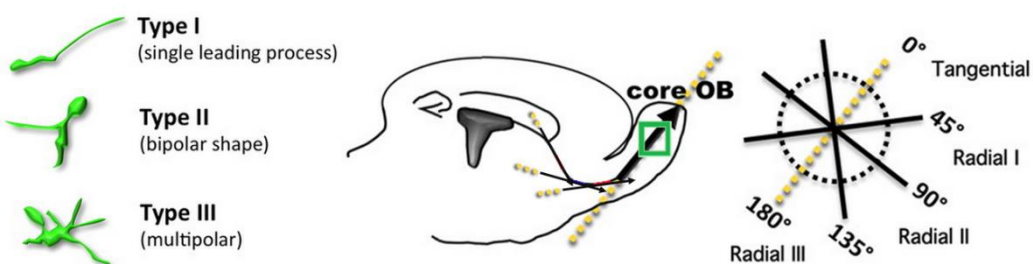
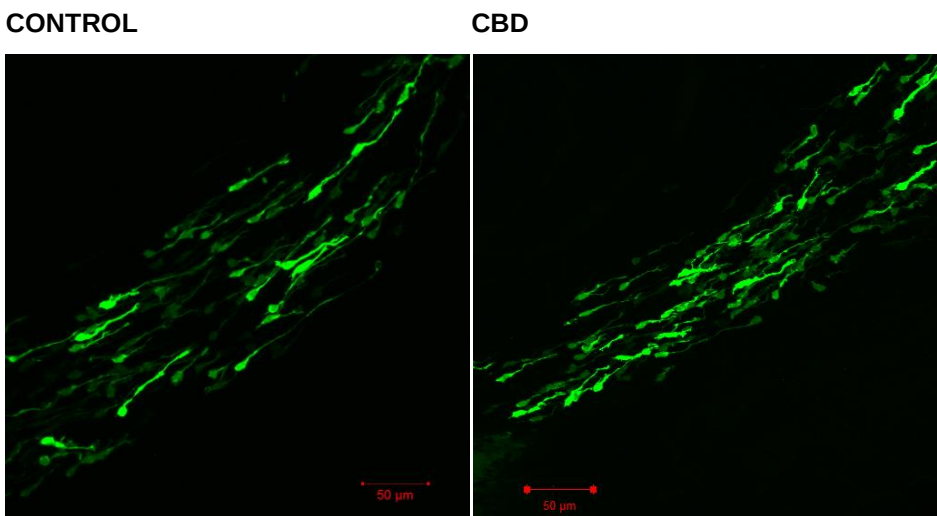


Imagen 10: Inmunohistoquímica de GFP Imagen confocal (Z-Stack) de una sección sagital de cerebro donde se observan las células GFP⁺ en el área RMS1 de animales control y tratados con CBD 50 mg/kg durante 3 días.



En el caso de una única inyección de CBD no se encontraron diferencias significativas en ninguno de éstos parámetros. Sin embargo, cuando la administración de CBD se prolongó a 3 días, se registraron algunas modificaciones. La longitud del axón principal descendió ligeramente con respecto a los controles tratados con vehículo, en las 3 áreas estudiadas (Promedio RMS Co-VEH 43.64 ± 1.09 vs. Co-CBD 38.98 ± 1.04 μm, $p < 0.05$).

Por otra parte, el grosor de la corriente no se vio alterado, y el porcentaje de células no unipolares contabilizadas, aunque tiende al incremento, tampoco alcanzó valores de significación estadística. En cambio, si se encontró un aumento en el porcentaje de neuroblastos cuya trayectoria se desvió de la principal en la región inicial RMS1 y final RMS2 de la corriente (RMS1, Co-VEH 1.13 ± 0.77 vs. Co-CBD 5.31 ± 0.72 , $p < 0.01$; RMS2, Co-VEH 5.61 ± 0.60 vs. Co-CBD 13.26 ± 2.30 , $p < 0.05$).

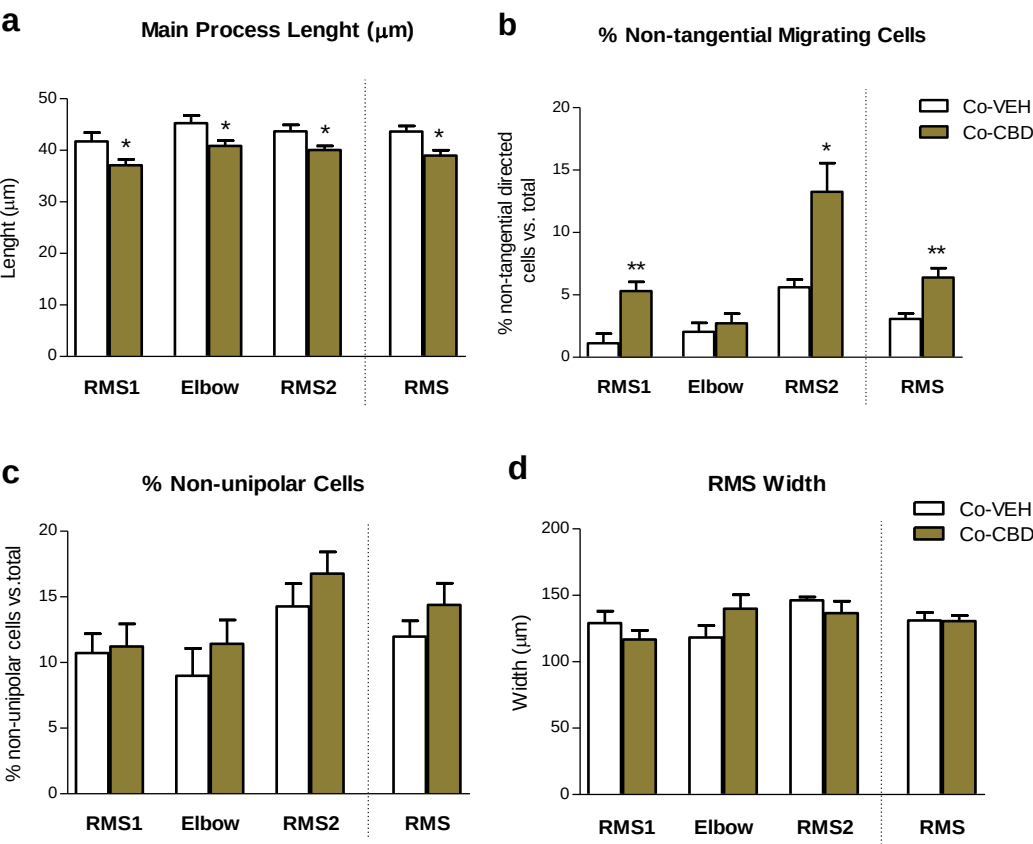


Figura 27. Análisis de la morfología y dirección de los neuroblastos nacidos en SVZ en dirección al OB. Áreas analizadas: RMS1, Elbow, RMS2, y análisis global de RMS (incluyendo las 3 áreas). (a) Longitud del axón principal (Co-VEH: 6 n, Co-CBD: 9-10 n), (b) % de células migrando en dirección no tangencial (Co-VEH: 6 n, Co-CBD: 9-11 n), (c) % de células no unipolares (Co-VEH: 6 n, Co-CBD: 10-11 n), (d) anchura de la RMS (Co-VEH: 6 n, Co-CBD: 7-8 n). Los resultados se expresan como promedio $\pm$ SEM de cada grupo experimental (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Análisis de la migración de neuroblastos mediante time-lapse imaging

Con ayuda del software Volocity® se registró la dinámica de los neuroblastos presentes en la grabación a lo largo de las 3 horas de película, y se compararon una serie de parámetros relativos a la migración de los grupos tratados con CBD (50 mg/kg i.p durante 3 días y 10 μ M 1h en el medio de incubación) frente a los animales control tratados con vehículo. De los datos obtenidos se compararon: la longitud de los neuroblastos, velocidad de movimiento media, el desplazamiento total y el índice de “meandrización”.

Se demostraron diferencias significativas entre los grupos vehículo ($n = 5-6$) y CBD ($n = 5$) en la longitud de los neuroblastos (Co-VEH 205.10 ± 12.41 vs. Co-CBD 167.4 ± 7.73 , $p < 0.05$) de manera similar a lo observado en el análisis del axón principal por inmunohistoquímica, y también se encontró una disminución en la velocidad de migración (Co-VEH $19.40 \times 10^{-3} \pm 9.5 \times 10^{-4}$ vs. Co-CBD $16.03 \times 10^{-3} \pm 5.6 \times 10^{-4}$, $p < 0.05$). En el caso del desplazamiento total, se observa una tendencia a la reducción del mismo tras el tratamiento con CBD, aunque no se alcanzan valores de significación estadística. No se encontraron alteraciones en el patrón de migración reflejado en el índice de “meandrización” de los neuroblastos.

Adicionalmente se contabilizó el porcentaje de células migratorias con respecto al total de células presentes en el vídeo para cada grupo experimental. Interesantemente, se encontró una mayor estanqueidad en la RMS1 en los neuroblastos de las secciones cerebrales de aquellos animales tratados con CBD en comparación a los controles (% células migratorias: Co-VEH 57.40 ± 6.54 vs. Co-CBD 33.40 ± 2.87 , $p < 0.05$).

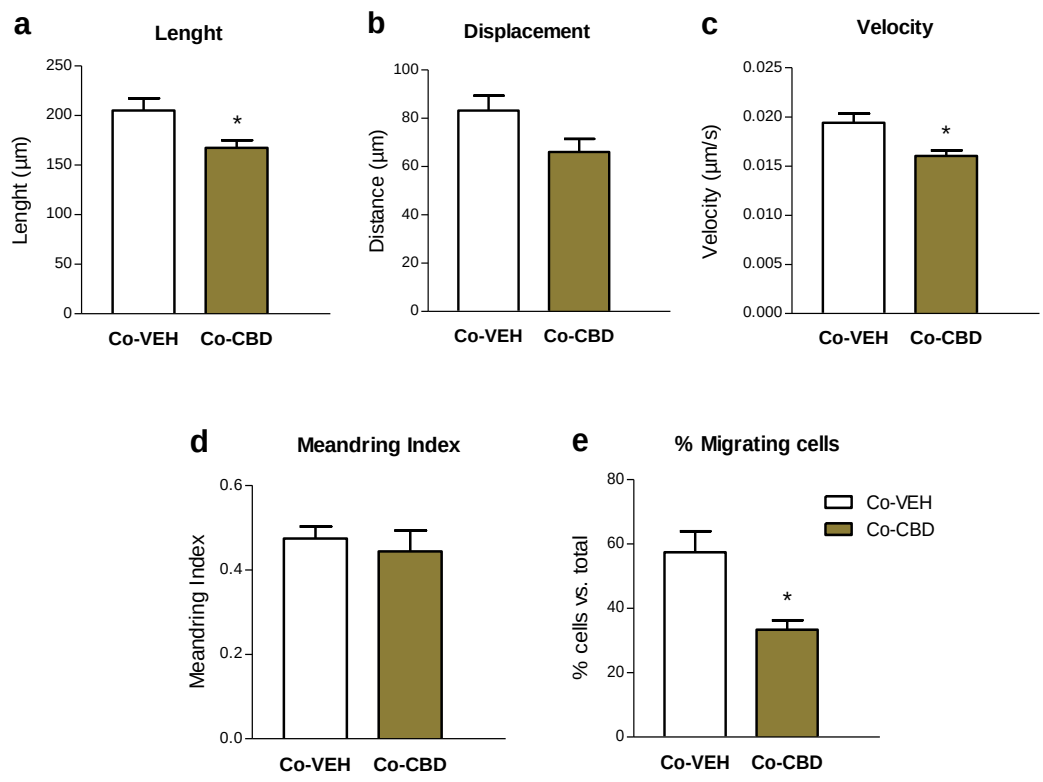


Figura 28. Efecto de la administración de CBD (50 mg/kg/3 días) sobre la dinámica migratoria de los neuroblastos de la RMS. (a) longitud de los neuroblastos, (b) desplazamiento, (c) velocidad, (d) índice de “meandrización”, (e) porcentaje de células migratorias. Los resultados se expresan como promedio ± SEM de (Co-VEH: 5-6 n, Co-CBD: 5 n) animales (*p<0.05, **p<0.01).

Vídeos de Volocity®: *Time-lapse imaging* en secciones cerebrales de neuroblastos migrando a lo largo de la RMS de animales control tratados con vehículo (Vídeo 1) y tratados con CBD (Vídeo 2).



C. ESTUDIOS DE FARMACODINAMIA DEL CANNABIDIOL

El objetivo del último bloque de experimentos consiste en profundizar en el mecanismo por el cual el CBD produjo los efectos antidepresivos descritos en este trabajo. Este bloque, se dividió en dos apartados.

En primer lugar, se llevó a cabo el antagonismo farmacológico de los efectos conductuales inducidos por la administración aguda de CBD. Para ello, se seleccionó como test el OFT y se ensayó la administración del CBD en presencia de los antagonistas seleccionados. Los test se llevaron a cabo 30 min tras la administración de los compuestos. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para el análisis del antagonismo farmacológico fueron la distancia total recorrida y la ambulación central.

A continuación, y basándonos en el resultado del antagonismo de los efectos conductuales del CBD, se ensayó de nuevo la liberación de 5-HT y glutamato en vmPFCx en experimentos de microdiálisis. En esta ocasión, se coadministró un antagonista del receptor 5-HT_{1A}, por ser el responsable del antagonismo de los efectos *in vivo*, y también un antagonista de receptores AMPA glutamatérgicos, a fin de obtener información de los circuitos implicados en la liberación de ambos neurotransmisores.

C.1. ESTUDIOS DE ANTAGONISMO FARMACOLÓGICO DE LOS EFECTOS ANTIDEPRESIVOS DEL CBD

A fin de investigar el mecanismo de acción por el cual la administración aguda de CBD dio lugar a efectos antidepresivos y liberación de 5-HT y glutamato, se llevó a cabo el antagonismo farmacológico de los receptores 5-HT_{1A} y CB₁ junto con el CBD y se realizó un OFT a los 30 min. Se escogieron antagonistas de estos 2 receptores, por ser los mayoritariamente implicados en los efectos del CBD según lo referido en la bibliografía (Rock et al., 2012; Thomas et al., 2007), y dados nuestros resultados en membranas cerebrales de ratón (material suplementario).

Se probaron los efectos de los antagonistas individualmente y se seleccionaron dosis a las cuales no provocaban ningún efecto conductual en los parámetros analizados, pero para las cuales se ha demostrado potencia como antagonistas de estos receptores en estudios de otros autores (Abush and Akirav, 2013; Adamczyk et al., 2012; Hjorth et al., 1997; Mirza et al., 2005). Las dosis seleccionadas fueron 0.3 mg/kg de AM251 y 0.3 mg/kg de WAY100635.

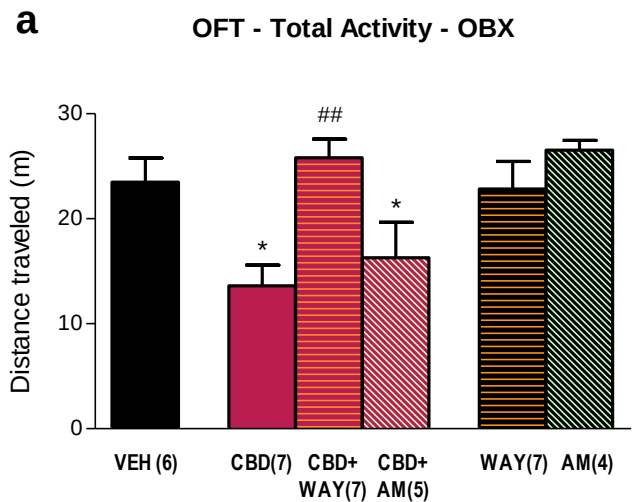


Figura 29. Administración aguda de antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y CB₁ junto con CBD en el OFT. La reversión de la hiperactividad inducida por CBD fue bloqueada por la administración de WAY100635. *p < 0.05 vs. OBX VEH; ##p < 0.01 vs. OBX CBD.

El antagonista del receptor 5-HT_{1A} (WAY100635) fue capaz de prevenir por completo la reversión de la hiperactividad post-OBX por CBD (OBX CBD 13.62 ± 1.98 vs. OBX CBD + WAY 25.82 ± 1.77 , $p < 0.01$). La co-administración de WAY100635 también inhibió el incremento de la ambulación central promovido por CBD (OBX CBD 10.51 ± 1.62 vs. OBX CBD+WAY 3.88 ± 0.54 , $p < 0.05$), sin dar lugar a ninguna modificación significativa del comportamiento de los animales sham.

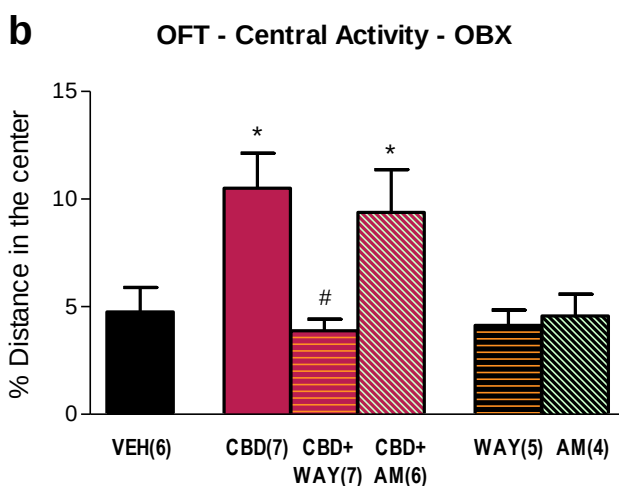


Figura 30. Efecto de la administración aguda de antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y CB₁ junto con CBD en el OFT. El incremento en la actividad central inducida por CBD fue inhibido por WAY100635. Los resultados se expresan como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p < 0.05$ vs. OBX VEH; # $p < 0.05$ vs. OBX CBD.

La administración de un antagonista del receptor CB₁, AM251 0.3 mg/kg no previno los efectos del CBD ni en la actividad ambulatoria total, ni en la actividad central. Una dosis superior de AM251 de 1 mg/kg fue descartada dado que promovía un incremento de la actividad central administrado en solitario (OBX AM (1) vs. OBX VEH, $p < 0.05$).

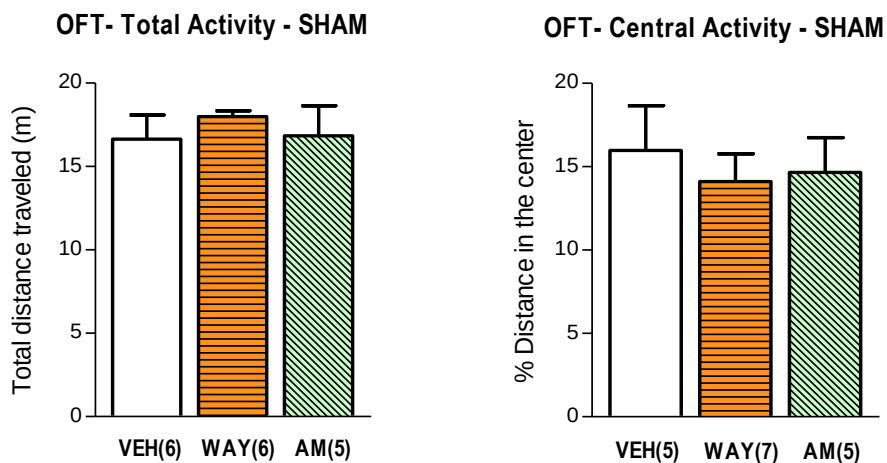


Figura 31. Efecto de la administración aguda de antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y CB₁ en el OFT. (a) Actividad locomotora total, (b) actividad central. Los resultados se expresan como promedio $\pm$ SEM de (n) animales.

C.2. ANTAGONISMO FARMACOLÓGICO DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES IN VIVO

En una segunda aproximación, se estudiaron los efectos neuroquímicos sobre la liberación de 5-HT y glutamato del bloqueo del receptor 5-HT_{1A}, mediante el cual se previenen los efectos antidepresivos inmediatos del CBD.

En primer lugar se ensayó la administración de WAY100635 0,3 mg/kg y se comprobaron los efectos de la administración del antagonista. De manera similar a los tests conductuales, no se encontraron modificaciones significativas en la liberación de 5-HT ni glutamato tras administración del antagonista en solitario.

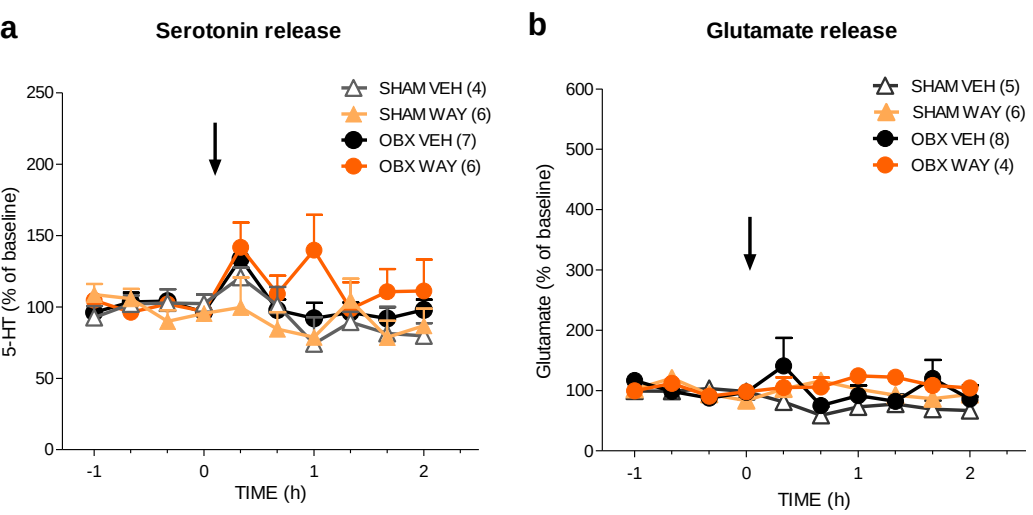


Figura 32. Efecto de la inyección de WAY100635 sobre los niveles de 5-HT (a) y glutamato (b) extracelular de animales sham y OBX. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales.

Posteriormente, se procedió a la coadministración de CBD 50 mg/kg y WAY100635 0,3 mg/kg, para evaluar los efectos de la administración de CBD bajo el bloqueo del receptor receptor 5-HT_{1A}. El análisis de las muestras de dializado, reveló que el bloqueo del receptor 5-HT_{1A} es suficiente para prevenir

el incremento de la liberación de 5-HT en los animales OBX provocado por CBD ($p<0.05$). Interesantemente, en el caso de los animales sham, donde en experimentos previos de microdialisis la administración de CBD no dio lugar a alteraciones los niveles de 5-HT, se produjo un pico de liberación de 5-HT tras la inyección de CBD cuando los receptores 5-HT_{1A} fueron bloqueados mediante la administración de WAY100635 ($p<0.05$).

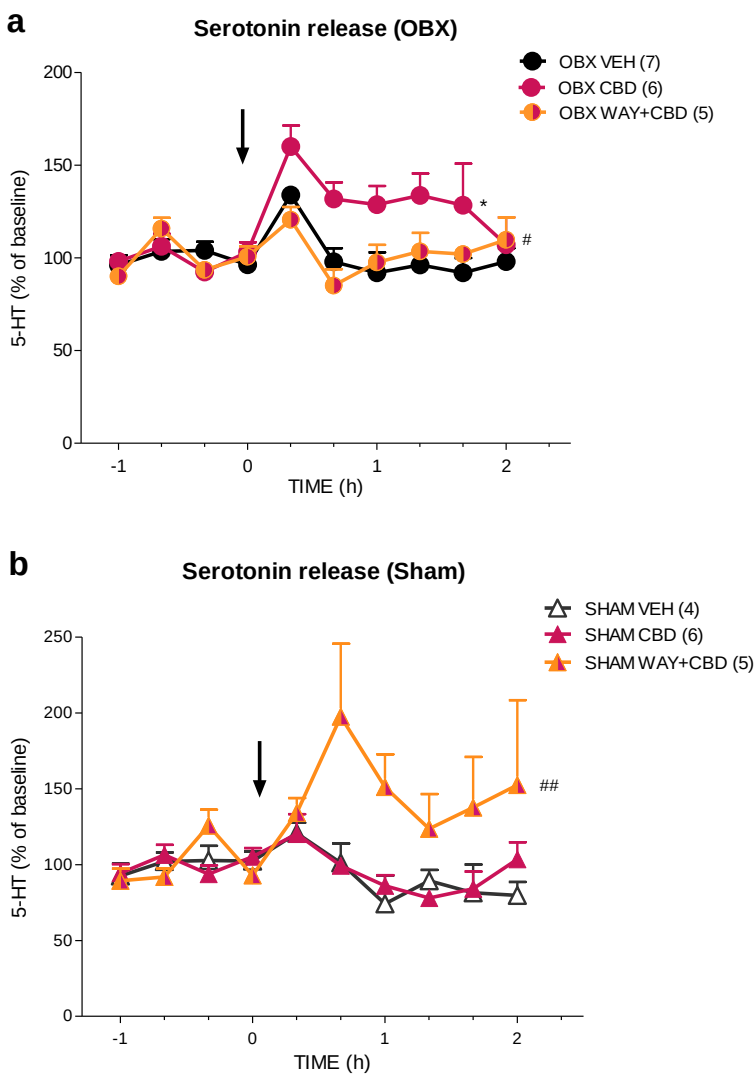


Figura 33. Efecto del bloqueo del receptor 5-HT_{1A} con WAY100635 sobre la liberación de 5-HT inducida por CBD en vmPFCx de animales OBX (a) y sham (b). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p<0.05$, vs. correspondiente grupo tratado con vehículo; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. correspondiente grupo tratado con CBD.

Del mismo modo, la administración de WAY100635 previno el incremento en la liberación de glutamato inducida por CBD en ambos tipos de animales (OBX: $p<0.01$ y SHAM: $p<0.05$).

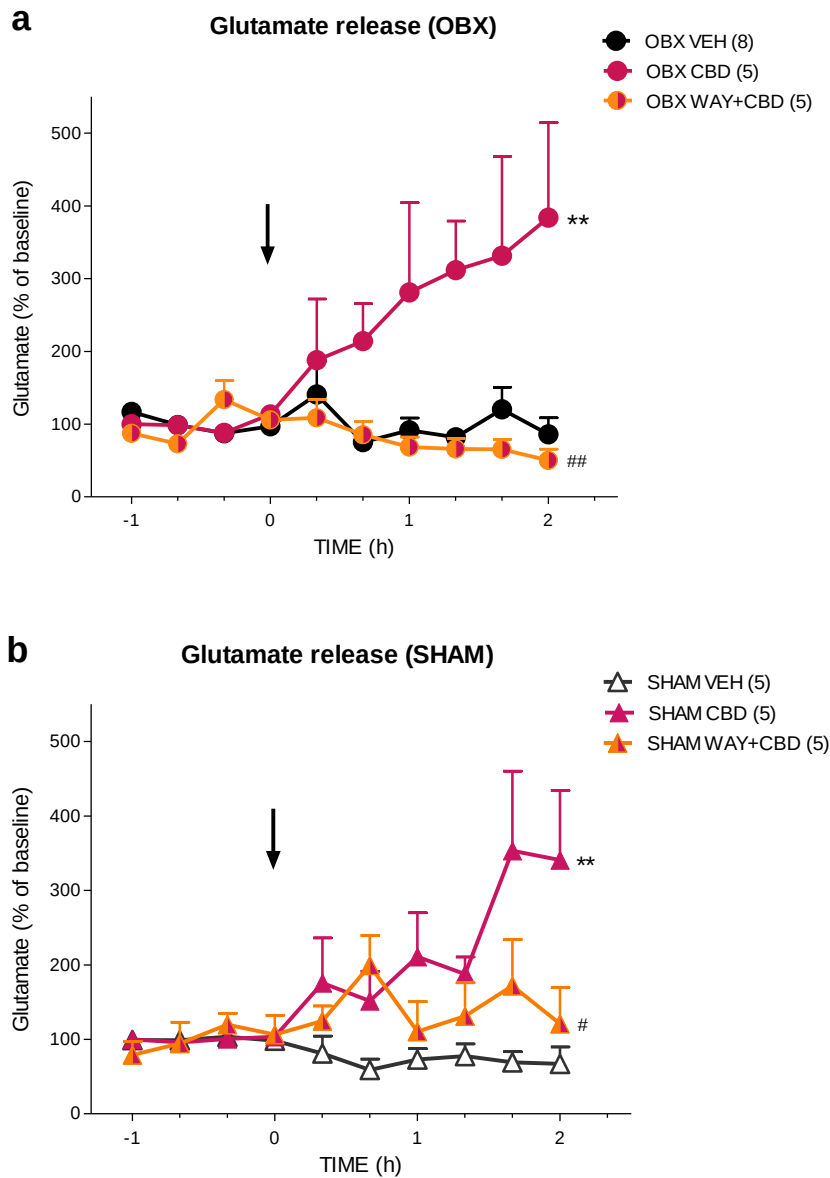


Figura 34. Efecto del bloqueo del receptor 5-HT_{1A} con WAY100635 sobre la liberación de glutamato inducida por CBD en vmPFCx de animales OBX (a) y sham (b). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. ** $p<0.01$, vs. correspondiente grupo tratado con vehículo; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. correspondiente grupo tratado con CBD.

En segundo lugar, se administró un antagonista de los receptores AMPA-glutamatérgicos para comprobar si la liberación de glutamato es subsecuente a la liberación de 5-HT o viceversa, dada la estrecha interconexión entre ambos sistemas en la PFCx. La administración de NBQX en solitario no produjo alteración de los niveles de glutamato ni 5-HT.

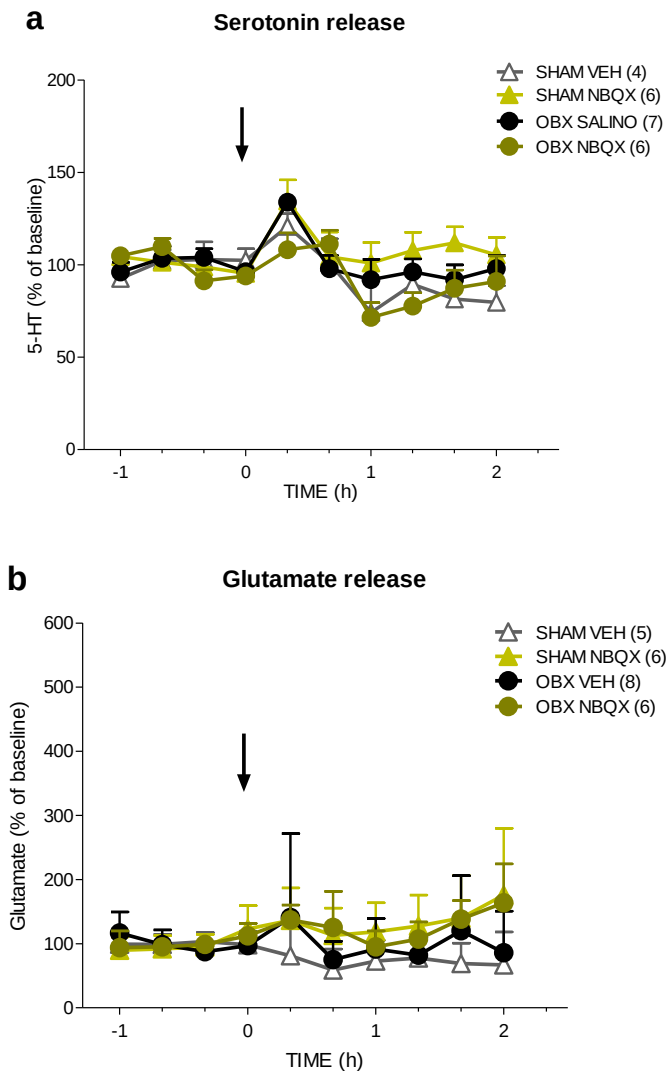


Figura 35. Efecto de la inyección de NBQX sobre los niveles de 5-HT (a) y glutamato (b) extracelular de animales sham y OBX. Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales.

El bloqueo AMPA con NBQX no modificó la respuesta serotoninérgica de los animales OBX tratados con CBD (OBX CBD+NBQX $p<0.05$ vs. OBX VEH), ni produjo alteraciones en la liberación serotoninérgica de los animales sham. Sin embargo, la administración de NBQX dio lugar a una inhibición de la liberación de glutamato inducida por CBD tanto en animales en animales OBX ($p<0.01$ vs. OBX CBD) como sham ($p<0.001$ vs. SHAM CBD).

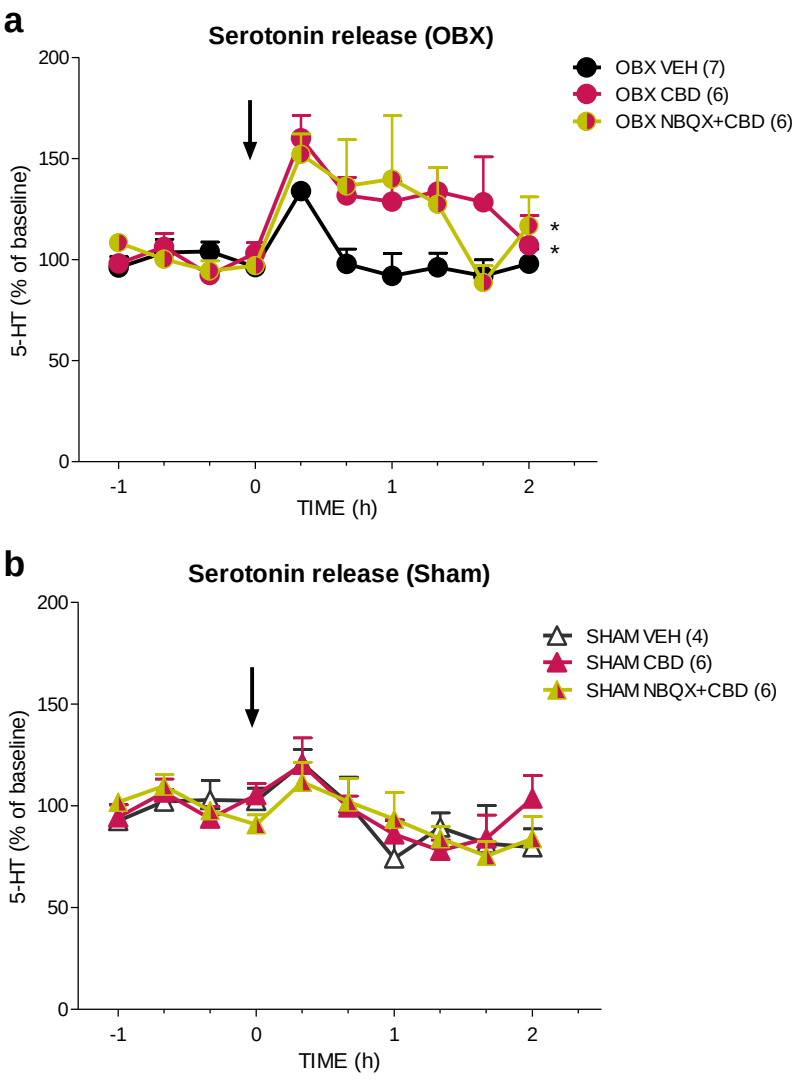


Figura 36. Efecto del bloqueo del receptor AMPA glutamatérgico con NBQX sobre la liberación se 5-HT inducida por CBD en vmPFCx de animales OBX (a) y sham (b). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. * $p<0.05$, vs. correspondiente grupo tratado con vehículo.

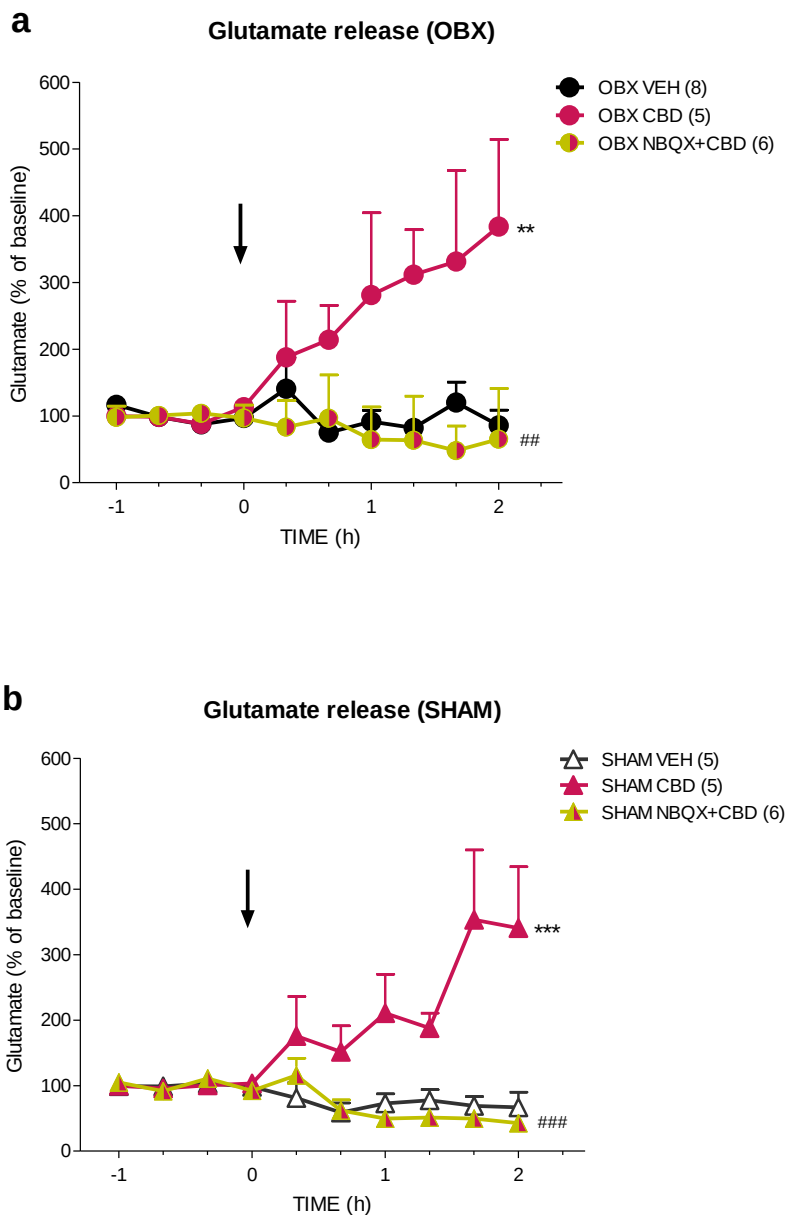


Figura 37. Efecto del bloqueo del receptor AMPA glutamatérgico con NBQX sobre la liberación de glutamato inducida por CBD en vmPFCx de animales OBX (a) y sham (b). Resultados expresados como promedio $\pm$ SEM de (n) animales. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. correspondiente grupo tratado con vehículo; ### $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. correspondiente grupo tratado con CBD.

DISCUSIÓN

A. INFLUENCIA DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE EL SÍNDROME DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA EN RATÓN

En esta primera sección se estudió la respuesta conductual del modelo de la OBX de ratón en una serie de paradigmas experimentales que evalúan respuestas de tipo depresivo y/o ansioso, y frecuentemente utilizados para el *screening* de fármacos antidepresivos/ansiolíticos, a fin de seleccionar aquellos de mayor utilidad en nuestro modelo. Al mismo tiempo, se evaluó cómo esta respuesta conductual se ve influenciada por las condiciones de estabulación, y la conveniencia de utilizar una estrategia de estabulación u otra para nuestros objetivos concretos.

El modelo de la OBX, especialmente en rata, ha sido ampliamente utilizado para la investigación preclínica de los efectos antidepresivos y ansiolíticos de distintos compuestos (Kelly et al., 1997; Song and Leonard, 2005), sin embargo, la repercusión que el modo de estabulación posee sobre las manifestaciones conductuales no se ha tenido en cuenta. Nuestros resultados muestran claramente que el aislamiento social modifica el comportamiento depresivo y ansioso de los animales bulbectomizados.

En primer lugar, el síndrome de la OBX, caracterizado por hiperactividad e incremento de la actividad exploratoria (Mucignat-Caretta et al., 2006; Wang et al., 2007) se vio potenciado por el aislamiento. Además, la concurrencia de este factor estresante adicional resultó en un empeoramiento de la falta de habituación de los animales bulbectomizados ante la exposición a nuevas situaciones aversivas (Mar et al., 2002). Por el contrario, el nivel de actividad de los animales sham no se vio afectado por el aislamiento social, resultado que coincide con estudios publicados por otros autores (Koike et al., 2009; Voikar et al., 2005). En cambio, ha sido descrito un aumento de la actividad locomotora nocturna (Naert et al., 2011), lo que indicaría diferencias dependientes de los ritmos circadianos. Es digno de mención el hecho de que la potenciación del síndrome de la OBX por el aislamiento permite que se aprecien con mayor facilidad las diferencias entre ambos grupos experimentales, aun cuando se

emplea un número inferior de animales. Con toda probabilidad, esta misma polarización conductual resultará ventajosa para la evaluación de la capacidad de un fármaco antidepresivo para revertir las manifestaciones del modelo de la OBX, utilizado frecuentemente por su validez predictiva. Tener en consideración este hecho podría minimizar los costes económicos y de tiempo.

El aislamiento social dio lugar a una modulación significativa de las respuestas de tipo ansioso tanto de ratones bulbectomizados como de sham, como se observa en paradigmas para la valoración de respuestas ansiogénicas (OFT y el NSF). Por un lado, el descenso de la ambulación central propio de la OBX se redujo aún más cuando los animales fueron aislados, como refleja el porcentaje de distancia en el centro. Cabe destacar, que este parámetro no depende del nivel de actividad de cada animal, mientras que el tiempo en la zona central sí podría verse afectado (de crucial importancia en el caso de la OBX). De hecho, aunque en nuestras manos el descenso del tiempo en la zona central no llega a alcanzar significación estadística, se observó una clara tendencia. Otros investigadores han referido no sólo una tendencia sino un descenso significativo en el tiempo en la zona central, utilizando un número mayor de animales y una zona central más restrictiva (15 x 15 cm en lugar de 30 x 30 cm). Estos resultados coinciden con estudios previos que describen manifestaciones ansiosas inducidas por la OBX (Mucignat-Caretta et al., 2006; Wang et al., 2007; Zueger et al., 2005), así como por el aislamiento social en ratones (Koike et al., 2009; Voikar et al., 2005). Sin embargo, debemos tener presente que cuando las dos variables coexisten, el resultado no corresponde a la suma de ambos efectos.

Así pues, cuando se selecciona el modelo de la OBX en condiciones de estabulación individual, el elevado grado de ansiedad basal de los animales sham aislados podría ocultar la verdadera magnitud de la ansiedad inducida por la OBX y viceversa. Por esta razón, podría resultar complicado evaluar el potencial ansiolítico de un determinado compuesto en este modelo, ya que cualquier cambio en la actividad central estaría influenciado por el aislamiento

tanto en los animales sham como OBX y la magnitud real del efecto ansiolítico podría ser infraestimada o incluso pasar desapercibida.

Por otra parte, la estabulación individual de los animales promovió un incremento de la latencia en el NSF, indicando de nuevo una potenciación de la ansiedad, hecho que coincide con lo observado en el OFT. Sorprendentemente, los animales bulbectomizados mostraron una menor latencia en comparación con sus controles, en contraposición a lo esperado en un modelo de ansiedad/depresión. Dado que el test se realizó en condiciones de iluminación leve, los ratones OBX no mostraron hiperactividad según los datos de velocidad media. Por lo tanto, esta reducción en la latencia no se podría achacar a una mayor actividad locomotora, sino probablemente más bien a un incremento de la impulsividad del modelo. De hecho, existen publicaciones que demuestran que la OBX no sólo aumenta la actividad exploratoria (Zueger et al., 2005), sino también la impulsividad en el *hole board test* (Saitoh et al., 2006). En este estudio, los autores referían una mayor impulsividad de los animales OBX sometidos a aislamiento social y no en aquellos estabulados conjuntamente aunque se apreciaba una cierta tendencia a la alza. En nuestros estudios, se observó un incremento de la impulsividad en todos los animales OBX, aunque en aquellos aislados el incremento es menos notorio. Esta discrepancia se podría deber a la concurrencia de la privación de comida junto con el aislamiento, como un factor estresante adicional que potenciaría la aversividad del test, y de este modo, el factor ansiedad/miedo jugaría un papel preferencial frente a la impulsividad en la respuesta conductual de los OBX aislados en el NSF.

Adicionalmente, se estudiaron las respuestas de tipo depresivo mediante el FST y el *sucrose intake test*. El aislamiento social no modificó la respuesta de los animales sham ni OBX en ninguno de los parámetros analizados en el FST. Como ya había sido descrito con anterioridad, nuestros resultados confirmaron que el aislamiento *per se* no altera la respuesta de ratones C57BL6 machos (Voikar et al., 2005) ni de ratas (Hong et al., 2012). Sin embargo, la repercusión del aislamiento es diferente cuando el FST se lleva a cabo en hembras (Martin

and Brown, 2010) o durante el ciclo nocturno (Brenes and Fornaguera, 2009; Pisu et al., 2011). Interesantemente, todos los animales OBX mostraron unos tiempos de *immobility* inferiores y de *swimming* mayores que los controles sham, resultado de nuevo inesperado en un modelo de depresión. Este descenso en la *immobility* ya ha sido descrito (Mucignat-Caretta et al., 2006) y se explica en base a la hiperactividad del modelo ante situaciones estresantes. Lo mismo ocurre con el *swimming*, aunque este parámetro no había sido explorado aún. Por el contrario, si se han descrito conductas depresivas en el FST en otras especies de ratones como DDY (Han et al., 2009) y en ratas (Smaga et al., 2012) bajo el síndrome de la OBX, lo cual sugiere la existencia de diferencias dependientes de especie y raza. En cuanto al *climbing*, que responde a una actitud activa de escape frente a una amenaza, este es el primer estudio, en que se describe un dramático descenso de dicha conducta en animales bulbectomizados. Postulamos que esta reducción en los intentos de escape de los ratones OBX, se podría interpretar como una mayor desesperación o incapacidad de hacer frente a situaciones altamente estresantes. Si hacemos una diferenciación de las conductas en el FST, se ha sugerido que el *swimming* implica al sistema serotoninérgico mientras que el *climbing* a la neurotransmisión adrenérgica (Detke et al., 1995), ya que los SSRIs aumentan el *swimming*, mientras los NRIs potencian el *climbing* (Aksoz et al., 2008; Cryan et al., 2005). De manera congruente, otros autores han descrito diferencias regionales en los niveles de noradrenalina y 5-HT de los animales OBX (Xu, 2005; Roche, 2012), aunque se necesitarían más estudios para concluir si estas alteraciones neuroquímicas subyacen a las diferencias observadas en la respuesta de nuestros animales OBX en el FST. Finalmente, cabe destacar la posible utilidad de la respuesta de *climbing* para evaluar la eficacia de los antidepresivos en este modelo animal de depresión.

En nuestros experimentos, el *sucrose intake test* se utilizó como paradigma validado para inferir anhedonia, síntoma cardinal de la depresión. Nuestros resultados confirman el status anhedónico de los ratones bulbectomizados dado el descenso en el consumo de sacarosa, que no se debe a un descenso en la

ingesta de líquidos, ya que se comprobó que no existían diferencias tales durante el período de habituación. De manera interesante, el aislamiento social no alteró el consumo de sacarosa ni en los animales OBX, ni en los sham, contrariamente a los hallazgos de otros autores en ratas (Brenes and Fornaguera, 2009; Hong et al., 2012; Pisu et al., 2011). Como ya se ha mencionado anteriormente, la ansiedad inducida por el aislamiento social tampoco modifica la repuesta de los ratones OBX en el. Por ello, podemos concluir que las alteraciones conductuales en estos paradigmas reflejarían principalmente el estado depresivo del animal, sin influencia del factor ansiedad provocado por el aislamiento. Esta posibilidad de discriminación entre las conductas depresivas y ansiosas puede resultar de gran valor cuando se evalúan compuestos moduladores de la conducta.

Con todo lo anterior, nuestros resultados indican que el aislamiento social altera de manera relevante no sólo el comportamiento de los animales sham, sino también la conducta de los OBX en algunos de los test realizados. El aislamiento social de los animales OBX conduce a una potenciación del síndrome de la OBX y presumiblemente facilite la evaluación de los compuestos antidepresivos, en determinados paradigmas que se llevan a cabo frecuentemente para ensayar la actividad locomotora y exploratoria. Por otro lado, la estabulación individual aumenta los niveles basales de ansiedad, dificultando la detección de éstas respuestas patológicas de los animales OBX. Por todo ello, este hallazgo ha de ser tomado en consideración para el diseño de las condiciones experimentales, ya que la estrategia de estabulación más conveniente variará dependiendo del objetivo del estudio.

B. EFECTOS DE TIPO ANTIDEPRESIVO DEL CANNABIDIOL: ASPECTOS CONDUCTUALES, NEUROQUÍMICOS, MOLECULARES Y CELULARES

El segundo bloque de experimentos de la presente tesis doctoral se centró en la evaluación de los efectos conductuales, neuroquímicos, moleculares y celulares del CBD, bajo la hipótesis de su posible eficacia como antidepresivo, basada en las numerosas evidencias científicas descritas en el apartado de introducción.

Efectos conductuales del cannabidiol

En primer lugar se llevó a cabo la optimización de la pauta de dosificación, que resulta ser un aspecto de vital importancia en el caso del CBD. Esta cuestión se extiende al resto de compuestos de tipo cannabinoide, posiblemente debido tanto a su naturaleza altamente lipofílica, como a las curvas dosis-respuesta en U típicas de este grupo de compuestos (SEIC, 2009). En los estudios preliminares para la optimización de la pauta de dosificación, se escogió la dosis de 10 mg/kg de CBD para su evaluación como antidepresivo. Tras una serie de tests conductuales en régimen de administración aguda y crónica se encontró que, efectivamente, el CBD daba lugar a efectos indicativos de eficacia antidepresiva en el modelo de la OBX, tales como la reversión de la hiperactividad en el OFT o la normalización del consumo de sacarosa reflejando una acción anti-anhedónica. De manera aguda, el CBD produjo tanto atenuación de la hiperactividad como un incremento de la ambulación central de los animales OBX, reflejando también efectos ansiolíticos como ya había sido descrito por diversos autores (Bergamaschi et al., 2011a; Campos and Guimaraes, 2008; Guimaraes et al., 1990; Resstel et al., 2009). Sin embargo, al evaluar los efectos mantenidos a las 24 horas de la última inyección de CBD (significativo de consolidación de los efectos antidepresivos), fue necesaria la

administración diaria de CBD durante al menos 2 semanas para observarse una atenuación significativa de la hiperactividad y de la respuesta anhedónica.

Dado que el fin de esta primera aproximación consistía no sólo en la obtención de efectos conductuales antidepresivos sino también en la reducción del período necesario para su aparición, se procedió al ensayo de la administración de una dosis inicial de carga de 50 mg/kg. Se postuló que, dada la naturaleza altamente lipofílica del CBD, quizá el retraso en la aparición de los efectos antidepresivos pudiera deberse a fenómenos farmacocinéticos, y no tanto a fenómenos farmacodinámicos como es el caso de los antidepresivos clásicos. Se planteó la posibilidad de encontrarnos frente a un modelo cinético tricompartmental, donde el elevado volumen de distribución del CBD requiriese de semanas para la saturación de las reservas lipídicas en tejido, hasta alcanzar concentraciones eficaces en el estado estacionario. Para ello, se probó si la implementación de la dosis de carga de 50 mg/kg promovía un acortamiento de la histéresis, aunque no se profundizó en las cuestiones farmacocinéticas ya que no formaban parte de los objetivos de la presente tesis doctoral.

La administración de 50 mg/kg de CBD dio lugar a efectos antidepresivos inmediatos en el FST y también en el OFT, donde además fueron de carácter mantenido, como se detallará en el siguiente apartado. Sin embargo, en paralelo se encontraron efectos proanhedónicos-anorexigénicos a esta concentración elevada en la mitad de los animales sham y una ligera potenciación en los OBX. Bien es sabido que los compuestos antagonistas del receptor CB₁ promueven efectos anorexigénicos como por ejemplo el Rimonabant o el AM251. Posiblemente las propiedades del CBD como antagonista de dichos receptores (Thomas et al., 2007) podrían ser responsables de los efectos anorexigénicos encontrado a esta dosis y de ese modo, la alteración del apetito podría subyacer al descenso en el consumo de sacarosa. Dado que de manera simultánea en el OFT no se encontró ni un empeoramiento conductual de los animales OBX ni un detrimento de los sham, se consideró que el descenso en el consumo de sacarosa había de deberse a una alteración del apetito y no a un detrimento emocional.

A fin de evitar posibles efectos colaterales anorexigénicos, se decidió administrar la dosis de 50 mg/kg durante 3 días para acelerar la aparición de los efectos antidepresivos, y posteriormente, continuar con la dosis de 10 mg/kg para el mantenimiento de los mismos. Aunque la dosis de 50 mg/kg provocó efectos anorexigénicos durante su administración, también dio lugar a un acortamiento del tiempo necesario hasta la aparición de los efectos anti-anhedónicos del CBD que se alcanzaron tras 1 semana de tratamiento siguiendo la pauta de dosis combinadas.

Con el régimen de administración aquí seleccionado se ha demostrado por primera vez que el CBD promueve efectos antidepresivos eficaces en un modelo animal de depresión. Este hallazgo supone la confirmación, en un paradigma experimental de enfermedad, de la potencialidad antidepresiva del CBD demostrada por otros autores en animales control en tests predictivos como el FST (El-Alfy et al., 2010; Zanelati et al., 2010), y de sus acciones ansiolíticas demostradas en un modelo de estrés (Campos et al., 2013b).

El principal hallazgo de dicha evaluación conductual se centra en la rapidez de los efectos antidepresivos del CBD, que se producen inmediatamente tras su inyección, y se mantienen y consolidan con la administración continuada. Así pues, el CBD no sólo dio lugar a la reversión de la hiperactividad característica de los animales bulbectomizados de manera aguda, sino que debidamente optimizada la pauta de dosificación, sus efectos se mantienen a las 24 horas post-inyección tras 1 único día de tratamiento, y del mismo modo en el resto de momentos en los que se ensayó este mismo parámetro (3, 7 y 14 días de tratamiento). Además, tras 1 semana de tratamiento se alcanzó la normalización en el consumo de sacarosa de los animales OBX, que presentaban una reducción considerada reflejo de un estado anhedónico, y por tanto indicativo de efecto anti-anhedónico del CBD.

En cuanto a los efectos ansiolíticos del CBD, se confirmó su instauración de manera inmediata a la inyección, aunque a diferencia de las conductas relativas a eficacia antidepresiva, en este caso no se mantuvieron a las 24 horas de su

administración en ninguno de los momentos ensayados (1, 3, 7 y 14 días de tratamiento). Sin embargo, cabe destacar que en nuestros experimentos se vio una tendencia al incremento de la ambulación central de los animales OBX en todos los momentos ensayados, aunque no se alcanzaron diferencias significativas. Otros autores han demostrado efectos ansiolíticos mantenidos del CBD tras su administración crónica aunque existen diferencias metodológicas que podrían explicar esta discrepancia como la dosis, la duración del tratamiento o el modelo animal utilizado (Campos et al., 2013b). De hecho, como ya se ha explicado en el bloque anterior, el modelo de la OBX en condiciones de estabulación individual, no es el más apropiado para el estudio en profundidad de los efectos ansiolíticos de los compuestos, ya que dadas las alteraciones basales sobre la ansiedad que induce, dichos efectos podrían verse enmascarados (Linge et al., 2013). Por ello, la carencia de efectos ansiolíticos mantenidos que aquí se expone es una observación que ha de ser interpretada con cautela.

Por el contrario, algunos autores han señalado que la administración de CBD a animales control da lugar a conductas ansiogénicas (ElBatsh et al., 2012; Fogaca et al., 2014). Tampoco hemos observado este efecto en nuestros animales sham, aunque de nuevo, se debe tener en cuenta que existen diferencias metodológicas fundamentales, tales como que nuestros animales fueron estabulados individualmente para la optimización de la evaluación antidepresiva, lo que en última instancia repercute en los niveles basales de ansiedad de todos los animales (Linge et al., 2013).

Alteraciones de tipo neuroquímico inducidas por el Cannabidiol

En segundo lugar, se procedió al estudio de los cambios neuroquímicos que tienen lugar tras la administración de CBD y que pudiesen subyacer a los beneficios conductuales.

El tono de los neurotransmisores cerebrales, y en concreto la 5-HT y el glutamato, son dianas clave en la terapia antidepresiva. De hecho, los antidepresivos clásicos actúan a través de la potenciación serotoninérgica, y los efectos de los nuevos antidepresivos de acción rápida implican en su mayoría una potenciación de la señalización glutamatérgica (Du et al., 2006). Sin embargo, apenas existe información acerca de las modificaciones inducidas por el CBD sobre la transmisión serotoninérgica y glutamatérgica. En este trabajo se llevó a cabo el estudio de los efectos del CBD sobre el patrón de liberación de estos neurotransmisores, ya que aporta una valiosa información acerca de las bases mecanísticas que subyacen a las acciones conductuales del CBD.

Para ello, se utilizaron técnicas de microdiálisis in vivo en PFCx, por ser un área clave en la regulación de la respuesta conductual al estrés (Davidson, 2002; Drevets et al., 2008), y de gran interés puesto que precisamente la maladaptación al estrés resulta ser un rasgo característico de los pacientes deprimidos y los animales OBX (Fitzgerald et al., 2008; Song and Leonard, 2005). De manera interesante, la administración aguda de CBD provocó un rápido incremento en los niveles de 5-HT sólo en los animales OBX, hecho que podría asociarse a los efectos diferenciales del CBD en condiciones fisiológicas o patológicas. De hecho, el incremento de 5-HT en mPFCx se observa tras el tratamiento crónico (Gardier et al., 1996) pero no agudo (Beyer et al., 2002) con antidepresivos clásicos, coincidiendo por tanto con la instauración de sus efectos antidepresivos. Precisamente este incremento se ha señalado como el principal mecanismo responsable de las acciones conductuales de los antidepresivos, junto con los cambios adaptativos del sistema serotoninérgico que desencadena, acerca de los cuales trataremos más adelante. Por otro lado, tras la administración crónica de CBD, una inyección *challenge* de CBD indujo de nuevo un incremento en la liberación de 5-HT en vmPFCx, aunque en este caso se detectó no sólo en los animales OBX sino también en lo sham, lo que apunta a posibles cambios adaptativos en el sistema serotoninérgico de los ratones sham.

Sorprendentemente en los estudios agudos de microdialisis se encontró también que, de manera simultánea, el CBD dio lugar a un marcado incremento en la liberación de glutamato tanto en animales sham como en OBX. En el tratamiento crónico, por el contrario, el incremento de glutamato tras la inyección de CBD sólo tuvo lugar en los animales OBX. Se debe tener en cuenta que tras el tratamiento crónico con CBD, los niveles basales de glutamato en términos absolutos, se vieron incrementados significativamente en ambos grupos, aunque el en caso de los OBX la magnitud del incremento fue inferior. Este hallazgo explicaría el hecho de que una inyección *challenge* de CBD no provocase un incremento relativo de los niveles de glutamato en comparación con los niveles basales en animales sham, y que en el caso de OBX sí se produjese un incremento significativo, aunque en cualquier caso, de magnitud notoriamente inferior al promovido de manera aguda. Este menor incremento del tono glutamatérgico sostenido de los animales OBX, podría relacionarse con una “disfunción” del sistema glutamatérgico, descrita en animales OBX y también en pacientes deprimidos (Hashimoto, 2009; Webster et al., 2000). En relación con lo anterior, en los últimos tiempos se ha descrito que la potenciación de la transmisión glutamatérgica a través de un mecanismo dependiente de los receptores AMPA, está asociado precisamente a la eficacia antidepressiva rápida de la ketamina (Maeng et al., 2008). Por ello, consideramos que la elevación del contenido de glutamato que provoca el CBD desde la primera inyección y que aquí se describe, podría estar directamente relacionado con los efectos antidepressivos rápidos del CBD, mientras que el incremento sostenido de los niveles basales de glutamato estaría favoreciendo los efectos mantenidos.

Seguidamente y como ya hemos anticipado, se procedió al estudio de mecanismos adaptativos del sistema serotoninérgico y cannabinoide, que pudieran al menos de manera parcial ser responsables de los hallazgos conductuales. Para ello, se estudió de la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} y CB₁ en diferentes áreas cerebrales.

En referencia a esto, se hallaron una serie de alteraciones de la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} tanto en el modelo de la OBX como tras el tratamiento crónico con CBD, que podrían resultar de gran relevancia para la comprensión de los hallazgos neuroquímicos y conductuales. En el modelo de la OBX se registró un descenso en la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} en el DRN, en línea con estudios en pacientes deprimidos donde otros autores han descrito un descenso de la expresión de receptores 5-HT_{1A} (Arango et al., 2001; Drevets et al., 1999; Drevets et al., 2007; Meltzer et al., 2004; Sargent et al., 2000). Tal y como se ha explicado en el capítulo de introducción, en la bibliografía existe gran variabilidad de resultados al respecto (Cheetham et al., 1990; Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997), lo que probablemente responda a la presencia de patologías de origen diverso englobadas dentro de lo que se considera el síndrome depresivo. Un descenso en la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} del DRN se traduciría neurobiológicamente en la alteración de los niveles y el *timing* de liberación de serotonina en otras áreas cerebrales (Drevets et al., 2007) de vital importancia para la regulación de las conductas depresivas. En el caso de los animales OBX, este menor tono inhibitorio por parte del receptor 5-HT_{1A} sobre el *firing* del raphe, podría explicar la mayor liberación de 5-HT en las áreas de proyección tras la administración de CBD, que no sucede en animales sham.

En vista de lo anterior, tras el tratamiento crónico con CBD se esperaba encontrar un descenso de la funcionalidad de los 5-HT_{1A} en el DRN de los animales sham, que de algún modo justificase el incremento de los niveles corticales de 5-HT inducido por una dosis *challenge* de CBD, y que no estaba presente tras su administración aguda. Sin embargo, nuestros estudios no revelaron alteración alguna la funcionalidad del 5-HT_{1A} en el DRN de animales sham. De todos modos, se debe señalar que la desensibilización del receptor 5-HT_{1A} del DRN no siempre es detectable mediante técnicas de fijación de radioligandos, que miden exclusivamente el acoplamiento de dichos receptores a proteínas G, y no contemplan la participación de otra serie de mecanismos de regulación de la descarga del DRN (Rossi et al., 2006).

De manera complementaria, se observó un incremento de la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} en mPFCx en todos los animales tratados crónicamente con CBD, tal y como sucede frecuentemente con antidepresivos eficaces como los SSRIs (Matsuda, 2013). Los niveles de este receptor en corteza prefrontal modulan de manera indirecta la liberación de serotonina ante situaciones de estrés, de modo que, este incremento en la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} corticales, determinaría un cambio en la liberación serotoninérgica y consecuentemente en la respuesta conductual al estrés. Por otro lado, los déficits funcionales que presentaban los animales bulbectomizados en áreas límbicas (DRN, amígdala, hipocampo) fueron revertidos tras la administración crónica de CBD en paralelo a la normalización conductual, lo cual sugiere un rol crucial de estos receptores en la farmacodinamia del CBD.

Posteriormente se procedió al estudio de la funcionalidad del receptor CB₁ tras el tratamiento crónico con CBD, ya que tanto el antagonismo de este receptor como su activación mediante el incremento de los niveles de AEA han sido postulados como posibles mecanismos farmacodinámicos del CBD. En este caso, se encontraron alteraciones funcionales tanto en el hipotálamo como en la PFCx en los animales bulbectomizados, que fueron revertidas tras la administración crónica de CBD. Dada la relevancia del hipotálamo en la regulación hormonal (Hill and Tasker, 2012), esta alteración de la funcionalidad del receptor CB₁ y por tanto, del control inhibitorio sobre el eje HPA, podría ser determinante en la repuesta hormonal al estrés y en los beneficios descritos para el CBD en modelos crónicos como CUS (Campos et al., 2013b). De hecho, otros antidepresivos como el citalopram promueven del mismo modo, un descenso en el acoplamiento del receptor CB₁ a proteínas G en el hipotálamo tras su administración crónica, coincidiendo con la aparición de los beneficios conductuales (Hesketh et al., 2008). Otros autores han descrito un descenso en la densidad de receptores CB₁ en el hipotálamo, acompañado de un incremento en la afinidad por los agonistas (Hill et al., 2008) en animales sometidos a CUS, que se ha asociado a un menor control de la actividad HPA. Esta reducción de la densidad de receptores CB₁ podría responder a un descenso compensatorio

por el incremento de la funcionalidad o viceversa. De manera similar, la administración de citalopram crónicamente condujo a la normalización de la densidad del receptor CB₁ junto con la restauración de los déficits en la señalización endocannabinoide (AEA). En cualquier caso, la función del receptor CB₁ en el hipotálamo y el control de la actividad del eje HPA parece ser crucial tanto en modelos de estrés como tras la terapia antidepresiva (Hill et al., 2008), sugiriendo que la normalización que el CBD ejerce sobre dicho receptor podría ser determinante en los beneficios conductuales observados ante situaciones estresantes, bien sea como causa directa o como consecuencia de los mismos.

En cuanto a la PFCx, de manera opuesta a lo encontrado en hipotálamo, se registró un descenso de la funcionalidad del receptor CB₁ en animales OBX. La PFCx constituye un área fundamental en la regulación de las respuestas conductuales y, otros autores han referido alteraciones de la funcionalidad del receptor CB₁ en modelos de estrés, en algunos casos coincidiendo con nuestros hallazgos (Llorente-Berzal et al., 2013). Sin embargo, en la mayoría de los casos se ha descrito una elevación del acoplamiento a proteínas Gi en este área, entre ellos en el propio modelo de OBX en rata (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2009) o en víctimas de suicidio (Hungund et al., 2004; Valdizán, 2011). Esta curiosa contraposición entre el modelo de la OBX en ratón y rata, ya ha sido más veces encontrada para otros marcadores (Hendriksen et al., 2015), del mismo modo que son frecuentes las diferencias entre lo registrado en ratón o en muestras de humanos. Estas discrepancias podrían responder a las diferencias inter-especie en el patrón temporal de la aparición de alteraciones o el perfil de regulación de los mecanismos compensatorios endógenos. En general, la hipótesis más aceptada defiende que los estados de estrés crónico producen una reducción del acoplamiento del receptor CB₁ a proteínas Gi en PFCx, del mismo modo que el bloqueo de este receptor mediante la administración de antagonistas da lugar a un agravamiento de las conductas pro-depresivas (McLaughlin et al., 2013). Sin embargo, un mecanismo compensatorio de adaptación consiste en el incremento de la densidad de los mismos a fin de mantener una función

adecuada, que podría por otro lado, provocar por sí mismo respuestas patológicas de maladaptación al estrés (McLaughlin et al., 2014). Esta hipótesis que apoya el papel de la potenciación del sistema eCB como mecanismo adaptativo de defensa, ha sido reforzada por múltiples evidencias. Por ejemplo, el hecho de que la administración crónica de antidepresivos en animales control promueva un incremento en la funcionalidad CB₁ en PFCx, apuntando a un papel protector de los mismos (Mato et al., 2010) y que va en consonancia con los hallazgos aquí descritos para el CBD.

Con todo lo anterior, nuestros resultados indican que aquellas alteraciones propias del modelo de la OBX en ratón que atañen a la funcionalidad del receptor CB₁, fueron normalizadas por efecto del CBD, en paralelo a su mejoría conductual, y podrían por tanto, estar asociadas a ella. El mecanismo por el cual el CBD lleva acabo la modulación de la funcionalidad del receptor CB₁, podría responder a una estimulación directa de los elementos del sistema eCB o a un efecto indirecto a través de otro sistema de neurotransmisión que a su vez interactúe con el eCB. En cualquier caso, el receptor CB₁ parece jugar un papel de gran relevancia en la patología depresiva y en los efectos del tratamiento con CBD, del mismo modo que el receptor 5-HT_{1A}, y que podría deberse en parte a la interacción 5-HT/eCB (Mato et al., 2010).

Consecuencias moleculares del tratamiento con Cannabidiol

En relación con la hipótesis neurotrófica-neuroplástica de la depresión, determinados marcadores de plasticidad neuronal se asocian a eficacia antidepresiva a largo plazo, mientras que determinadas cascadas de señalización celular parecen ser decisivas para los efectos antidepresivos de inicio de acción rápido. En el presente trabajo, se estudiaron los niveles de algunos de estos marcadores a fin de comprobar los posibles efectos del CBD sobre la plasticidad neuronal.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio a diferentes niveles de la vía intracelular de mTOR, que ha cobrado en los últimos tiempos gran protagonismo por estar implicada en la mediación de los efectos antidepresivos rápidos de compuestos tales como la ketamina que facilitan la señalización glutamatérgica (Cryan et al., 2005; Li et al., 2010). Puesto que el CBD provocó un rápido incremento de los niveles de glutamato corticales, así como efectos antidepresivos rápidos, se procedió al estudio de sus efectos a largo plazo sobre dicha vía de la señalización intracelular. Lo que observamos, fue una normalización de aquellos componentes que se expresaban de manera alterada en el modelo de la OBX. Así, en el modelo de la OBX donde se encontró un incremento de la fosforilación y por tanto, una mayor activación de mTOR y 4EBP1, y por el contrario, una disminución en la activación de P70 en PFCx, el tratamiento con CBD durante dos semanas condujo a la restauración de su actividad hasta niveles control. Resulta paradójico el hecho de que en el modelo de la OBX de ratón, se encuentre incrementada la actividad de mTOR y que el CBD de lugar a un descenso de su activación, ya que precisamente una elevación de la misma ha sido propuesto como principal mecanismo mediador de efectos antidepresivos rápidos (Cryan et al., 2005). Sin embargo, hay que tener en cuenta diferencias metodológicas fundamentales, como por ejemplo el tiempo transcurrido desde la inyección del fármaco hasta el estudio de los marcadores, que resulta ser de vital importancia en la observación de la activación secuencial de los diferentes elementos de la vía (Li et al., 2010). En nuestros experimentos las muestras se recogieron habiendo transcurrido 24 horas desde la última inyección y tras el tratamiento crónico, mientras que otros autores lo describen tras la administración aguda de los compuestos o a las pocas horas para tratar de ver efectos mediadores inmediatos (Li et al., 2010). Por otro lado, en estudios relacionados con los efectos antineoplásicos del CBD, y coincidiendo con nuestros hallazgos, se ha demostrado que el CBD promueve un descenso en la activación de mTOR y 4EBP1 (Shrivastava et al., 2011), induciendo además apoptosis y autofagia. Esto podría explicar que en el modelo de la OBX, donde existe un proceso de remodelación cerebral tras un insulto quirúrgico, encontremos una elevación de la vía de mTOR, quizá asociada a

procesos proliferativos e inflamatorios, y que gracias a los efectos antiinflamatorios del CBD (Fernandez-Ruiz et al., 2013) se produzca una normalización de los mismos.

Otra serie de marcadores de plasticidad asociados a eficacia antidepressiva fueron analizados. De entre ellos destacan los hallazgos para BDNF y su receptor TrkB. En este caso, encontramos un marcado incremento de los niveles de BDNF tanto en la PFCx como en el hipocampo de los animales bulbectomizados, que se acompañó de un incremento en los niveles de expresión de su mRNA en PFCx. Resulta de gran interés el hecho de que dichos incrementos fueran revertidos tras el tratamiento con CBD. En el caso del receptor TrkB, ni los niveles de proteína ni de expresión de su mRNA se vieron alterados por la OBX o el tratamiento en PFCx. Sin embargo en otras áreas cerebrales como el cortex piriforme, el CBD promovió una elevación de la expresión del mRNA tanto para BDNF como para su receptor TrkB en todos los animales que recibieron el compuesto. Finalmente, en la SVZ, uno de los principales nichos de neurogénesis en cerebro adulto, encontramos una disminución de la expresión de mRNA de TrkB en el modelo de la OBX que fue normalizado tras la administración crónica de CBD.

Esta fuerte expresión de BDNF en los ratones OBX especialmente en mPFCx coincide con los hallazgos de otros autores (Hellweg et al., 2007), y contrasta con lo estipulado por la hipótesis neurotrófica y los hallazgos para otros modelos de depresión e incluso el modelo de la OBX en rata (Hendriksen et al., 2012) y se postula que pudiera deberse bien a mecanismos compensatorios, o bien al incremento de la plasticidad e inflamación en las áreas que se ven afectadas de manera directa o indirecta por la intervención quirúrgica, y que por tanto respondan a un proceso de remodelación cerebral post-traumático. En este sentido, el CBD gracias a sus propiedades antiinflamatorias y pro-apoptóticas/pro-autofágicas (Fernandez-Ruiz et al., 2013; Shrivastava et al., 2011) favorecería la normalización del sistema y por tanto de los marcadores de plasticidad como el BDNF y de la vía de mTOR, que se vería reflejado en la

restauración conductual de los animales bulbectomizados tras el tratamiento crónico con CBD.

Acciones celulares inducidas por el Cannabidiol sobre los procesos neurotróficos: morfología y migración de neuroblastos

La señalización a través de BDNF mediada por su receptor de gran afinidad TrkB, posee una fuerte influencia sobre los procesos neurotróficos, migratorios y de maduración de los neuroblastos que nacen precisamente en la SVZ y que se dirigen a lo largo de la RMS hacia el bulbo olfatorio para diferenciarse a interneuronas (Bagley and Belluscio, 2010; Chiaramello et al., 2007). Dadas las alteraciones encontradas en la expresión de los receptores TrkB en SVZ, y puesto que otros autores han demostrado la influencia de la señalización endocannabinoide sobre los procesos de neurogénesis tanto en SVZ como en SGZ (Aguado et al., 2005; Campos et al., 2013b; Jiang et al., 2005; Jin et al., 2004) y migración de neuroblastos en cerebro adulto (Oudin et al., 2011), se llevó a cabo un estudio del efecto de la administración de CBD sobre la morfología y procesos migratorios de los neuroblastos que nacen en SVZ.

Los estudios de morfología y dinámica migratoria de neuroblastos a través de la RMS mostraron un ligero acortamiento de la longitud del axón principal en aquellos animales tratados con CBD, y cierto incremento en el porcentaje de células en dirección alterada, así como un descenso en el porcentaje de células migratorias. Este efecto podría deberse a las propiedades del CBD como antagonista CB₁ en concordancia con los hallazgos de Oudin y colaboradores (Oudin et al., 2011), donde el bloqueo del receptor CB₁ provocó efectos similares. Otra posible explicación atribuiría estas alteraciones a un efecto indirecto del CBD, mediante la modulación de los niveles de BDNF y TrkB, que juegan un papel crucial en el control de dichos procesos (Chiaramello et al., 2007; Zhou et al., 2015). Por otro lado, tanto los niveles de 5-HT como los tratamientos crónicos con agonistas del receptor 5-HT_{1A} parecen ejercer una fuerte influencia sobre los procesos de neurogénesis y migración de

neuroblastos en SVZ (Soumier et al., 2009; Tong et al., 2014). En cualquier caso, las modificaciones observadas en el presente trabajo, aunque significativas, fueron de carácter leve. Serían necesarios estudios adicionales que determinasen la relevancia de la relación entre los efectos promovidos por el CBD sobre la morfología y migración de los neuroblastos en la RMS, y sus acciones antidepresivas/ansiolíticas.

C. MECANISMO DE ACCIÓN FARMACOLÓGICO DEL CANNABIDIOL

El último bloque de experimentos engloba una serie de estudios *in vivo* cuyo fin es la investigación del mecanismo farmacodinámico responsable de los efectos antidepresivos rápidos y sobre la liberación de neurotransmisores inducidos por el CBD. Para ello se llevaron a cabo estudios de antagonismo farmacológico en test conductuales (OFT) y en microdiálisis cerebral.

Papel crucial del receptor 5-HT_{1A} en las acciones antidepresivas rápidas del Cannabidiol in vivo

Con objeto de profundizar en el mecanismo de acción del CBD *in vivo*, inicialmente se investigó la implicación de las 2 principales dianas farmacológicas para este compuesto en base a los resultados de los estudios *in vitro* (material suplementario): los receptores 5-HT_{1A} y CB₁, y puesto que ambos son cruciales en la respuesta conductual al estrés (Davidson, 2002; Kheirbek et al., 2012) y en el control de la liberación de 5-HT y glutamato (Bambico et al., 2007; Bisogno et al., 2001; Brown et al., 2003; McLaughlin et al., 2012; Mendiguren and Pineda, 2009; Navarrete and Araque, 2008; Santana et al., 2004).

Así pues, los receptores 5-HT_{1A} que se expresan en las neuronas serotoninérgicas del DRN, en las interneuronas locales GABAérgicas y terminales glutamatérgicas (Celada et al., 2001) y en interneuronas y células piramidales en áreas corticales, afectan al flujo de salida de neurotransmisores (Santana et al., 2004). Por lo tanto, el CBD actuando como un modulador alostérico positivo del 5-HT_{1A} alteraría la liberación de 5-HT y glutamato corticales. Mientras tanto, el CBD actuando sobre el sistema eCB, como antagonista/agonista inverso o bien mediante el incremento de los niveles de AEA, podría fomentar la liberación de neurotransmisores, ya que es un sistema fuertemente implicado en el control de la liberación de 5-HT y glutamato en diferentes localizaciones (Bambico et

al., 2007; Bisogno et al., 2001; Brown et al., 2003; McLaughlin et al., 2012; Mendiguren and Pineda, 2009; Navarrete and Araque, 2008).

En este experimento, se administraron antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y CB₁ agudamente junto con CBD y se analizaron los efectos del CBD bajo el bloqueo de dichos receptores. Nuestros resultados mostraron que el receptor 5-HT_{1A} juega un papel fundamental en los efectos conductuales del CBD, puesto que el WAY100635 pero no el AM251, previno tanto la reversión de la hiperactividad de los OBX como los efectos de tipo ansiolítico promovidos por el CBD. Estos hallazgos concuerdan con datos publicados por otros autores donde el CBD redujo la *immobility* en el FST (Zanelati et al., 2010) y las respuestas de tipo pánico/ansiosas mediante un mecanismo dependiente del receptor 5-HT_{1A} (Campos et al., 2013a; Campos and Guimaraes, 2008; Fogaca et al., 2014; Marinho et al., 2015; Soares Vde et al., 2010). Por el contrario, también ha sido descrito que algunos efectos agudos y crónicos del CBD necesitan del receptor CB₁ para producirse, especialmente los de tipo ansiolítico (Campos et al., 2013b; Casarotto et al., 2010; Do Monte et al., 2013). Dado que la ansiedad es un síndrome complejo que se ve afectado por diferentes procesos y áreas cerebrales (Davidson, 2002; Kheirbek et al., 2012), estos dos receptores podrían estar implicados en las manifestaciones ansiosas a diferentes niveles. En cualquier caso, en nuestros experimentos el bloqueo del receptor CB₁ no impidió los efectos de tipo antidepresivo del CBD y tampoco los reprodujo cuando se administró de manera aislada, así que la modulación endocannabinoide no parece ser la responsable de la iniciación de los efectos antidepresivos del CBD. En cuanto a los efectos ansiolíticos del CBD, puesto que nuestro modelo no es el más exhaustivo para su estudio, aunque sí podemos concluir que el receptor 5-HT_{1A} participa de los mismos, no podríamos asegurar que el CB₁ no lo haga. Sería necesaria la utilización de un modelo y paradigmas más apropiados para dicho fin, ya que de hecho las evidencias apuntan a que el CB₁ si juega un papel relevante en las acciones ansiolíticas del CBD (Campos et al., 2013a; Casarotto et al., 2010).

Con todo lo anterior, nuestros resultados indican que el receptor 5-HT_{1A} media los efectos antidepresivos del CBD, y aquí se propone un posible mecanismo de acción. Postulamos que el CBD, mediante la potenciación de la función del receptor 5-HT_{1A} induciría la liberación de 5-HT/glutamato en mPFCx, que finalmente mediaría los efectos antidepresivos rápidos del CBD.

Para su comprobación, se llevaron a cabo estudios de microdiálisis bajo el bloqueo el receptor 5-HT_{1A}. De manera interesante, no sólo el incremento de 5-HT inducido por CBD, sino también el incremento de glutamato fueron anulados por la administración de WAY100635, lo cual podría explicar los hallazgos conductuales en los estudios de antagonismo. Aunque estos resultados confirman nuestra propuesta, se requieren más estudios para averiguar el modo en que el CBD actuando sobre el receptor 5-HT_{1A} induce la liberación de 5-HT y glutamato.

Por último, se realizó un último estudio de microdiálisis donde, en esta ocasión, se llevó a cabo el bloqueo de los receptores AMPA glutamatérgicos junto con CBD. Se optó por la administración de un antagonista de los receptores AMPA para el bloqueo glutamatérgico puesto que los efectos de los antidepresivos de acción rápida (como los observados para el CBD) están mediados por la activación de estos receptores, como sucede con la ketamina (Maeng et al., 2008). Con este experimento se pretendía averiguar si la liberación aguda de 5-HT en animales OBX inducida por el CBD y la liberación de glutamato, eran 2 procesos encadenados y debidos a la estimulación del *loop* entre mPFCx-DRN, o por el contrario sucedían de manera concomitante e independiente. Esta cuestión surge precisamente del hecho de que las proyecciones descendentes de las neuronas piramidales al DRN cuando son estimuladas por el glutamato, estimulan a su vez el *firing* del DRN, lo que acarrearía subsecuentemente un incremento de los niveles 5-HT cortical (Celada et al., 2013; Soiza-Reilly and Commons, 2011). Por otro lado, la 5-HT cuando es liberada en áreas corticales, mediante su unión a los receptores 5-HT_{2A} de neuronas glutamatérgicas entre otros, promueve un efecto estimulatorio en las mismas dando lugar a liberación de glutamato en mPFCx (Celada et al., 2013). Todo ello, constituye el

mencionado *loop* estimuladorio mPFCx-DRN, de tal manera que de ser este el mecanismo implicado, resultaría de gran interés conocer donde reside el inicio de acción del CBD.

El bloqueo de la transmisión glutamatérgica con NBQX impidió la liberación de glutamato en todos los animales tratados con CBD aunque no evitó la liberación cortical de 5-HT en los OBX. Este hallazgo demuestra que los incrementos de 5-HT y glutamato se inician de manera independiente, aunque en todo caso a través del receptor 5-HT_{1A}, como se demostró en los experimentos previos. Esto no descartaría una posterior estimulación del *loop* mPFCx-DRN que podría ser responsable de la perpetración de sus efectos conductuales, que como vimos se mantienen a las 24 horas post-inyección. Puesto que el papel de los receptores 5-HT_{1A} en neuronas piramidales es de carácter inhibitorio, la prevalencia de la potenciación del 5-HT_{1A} en interneuronas, disminuyendo de este modo el bloqueo sobre la liberación de glutamato, resultaría ser el mecanismo más razonable para el CBD.

Hipótesis farmacodinámica de los efectos antidepresivos del cannabidiol

En base a todos los hallazgos de esta tesis, se propone una hipótesis para explicar el mecanismo subyacente a las acciones de tipo antidepresivo del CBD (Figura). Tal y como se observó en los estudios *in vitro* (material suplementario), y de acuerdo a la modulación alostérica positiva propuesta por Rock y colaboradores (Rock et al., 2012), el CBD actuaría potenciando la señalización a través del receptor 5-HT_{1A}, posiblemente como un modulador alostérico positivo. En este contexto, el CBD potenciaría la función inhibitoria del 5-HT_{1A} sobre las interneuronas GABAérgicas (Celada et al., 2001), lo cual conllevaría un descenso del balance GABA/glutamato, y favorecería la señalización glutamatérgica en áreas postsinápticas. Esta facilitación glutamatérgica en mPFCx, a través de las proyecciones descendentes, estimularía el *firing* del DRN y de ese modo, resultaría en un incremento de los niveles corticales de 5-HT (Celada et al., 2001). Otros autores han descrito como la administración de compuestos agonistas del receptor 5-HT_{1A} conduce a una potenciación del *firing* de las células piramidales en PFCx a través de una acción preferencial sobre las interneuronas GABAérgicas (Llado-Pelfort et al., 2012). Adicionalmente, el CBD actuando sobre el 5-HT_{1A} de las interneuronas locales del DRN (Bonnavion et al., 2010; Day et al., 2004) provocaría la misma desinhibición del *firing*. Puesto que la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} en el DRN de animales OBX está disminuida, un menor *feedback* inhibitorio permitiría una fuerte liberación de 5-HT en las áreas de proyección. Mientras en los animales sham, cuya funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} en el DRN no se encuentra alterada, la 5-HT cortical no se vería incrementada de manera considerable a menos que los receptores 5-HT_{1A} fuesen bloqueados. Esta hipótesis fue confirmada mediante los estudios de microdiálisis donde la administración de CBD junto con WAY100635 produjo una potenciación serotoninérgica en mPFCx de los animales sham, que no se encontró cuando el CBD se administró individualmente.

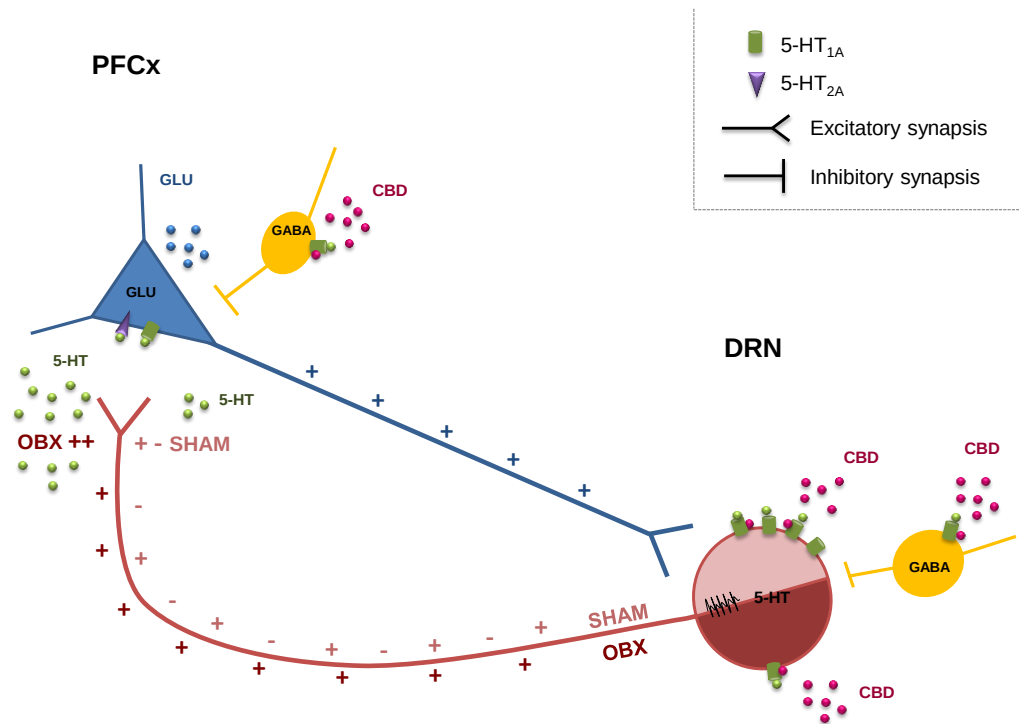


Figura 37. Representación esquemática de los efectos neuroquímicos rápidos inducidos por la administración de CBD y del mecanismo de acción propuesto como modulador alostérico positivo del receptor 5-HT_{1A}. En el dibujo observamos cómo la administración de CBD da lugar a un incremento del glutamato extracelular en mPFCx, que resultaría de la potenciación de inhibición que ejerce el receptor 5-HT_{1A} sobre las interneuronas GABAérgicas. Este incremento de la transmisión glutamatérgica, a través de las proyecciones descendentes de las neuronas piramidales al DRN, provocaría una estimulación del *firing* neuronal de las neuronas serotonérgicas, y de ese modo, produciría un incremento de la liberación de 5-HT en mPFCx. Adicionalmente, el CBD actuando sobre las interneuronas locales en DRN, reduciría su efecto inhibitorio sobre la descarga del DRN y de esta manera, contribuiría a su estimulación. Sin embargo, la activación simultánea de los receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos de los somas del DRN promovería un impulso inhibitorio, controlando la liberación cortical de 5-HT en animales sham. Mientras, el descenso en la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} en DRN de animales OBX, explicaría el marcado incremento en la liberación de 5-HT en mPFCx provocado por el CBD, debido a un menor *feedback* inhibitorio. Finalmente, el incremento de la 5-HT en mPFCx en los ratones OBX tras CBD, modularía la actividad de las neuronas piramidales a través de su unión a los receptores 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A}.

En síntesis, la potenciación de la transmisión glutamatérgica junto con el aumento serotoninérgico en animales OBX inmediatamente tras la primera inyección de CBD, podrían subyacer a las rápidas respuestas de tipo antidepresivo observadas en los animales OBX. La estimulación del *loop* mPFCx-DRN podría además ser responsable del mantenimiento de los efectos conductuales a corto plazo (24 horas post-inyección). Asimismo, el incremento sostenido de los niveles de glutamato tras la administración crónica de CBD, junto con los incrementos en la 5-HT y los cambios adaptativos en la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A}, podrían sustentar la consolidación y mejoría de los efectos de tipo antidepresivo del CBD crónico (incluyendo las acciones antianhedónicas). Adicionalmente, todas las modificaciones sobre los procesos neurotróficos y neuroplásticos que el CBD induce, podrían constituir la base biológica de las acciones que se derivan de su administración, dada la relevancia de la remodelación cerebral para la ocurrencia de los efectos de los antidepresivos.

Aunque el mecanismo que aquí se propone parece el más factible acorde con nuestros resultados, no descartamos la participación adicional de otros receptores y/o crosstalk entre sistemas en el cómputo global de los efectos observados, tal y como indican por ejemplo los resultados relativos a la funcionalidad de receptores CB₁, o a los efectos del CBD sobre las vías de señalización y procesos neurotróficos. Al fin y al cabo, el CBD es un compuesto “multidiana” que puede modular numerosos sistemas implicados en el control del estado de ánimo y precisamente por ello, resulta de gran valor desde un punto de vista clínico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

- El aislamiento social induce alteraciones conductuales en los animales bulbectomizados, facilitando la caracterización de los estados de tipo depresivo, y por el contrario, dificultando el estudio de las conductas de tipo ansioso.
- El cannabidiol ejerce efectos antidepresivos rápidos en un modelo animal de depresión, que se mantienen y consolidan con la administración continuada.
- El cannabidiol desencadena, de manera inmediata a su administración, fenómenos neuroquímicos asociados a eficacia antidepresiva, tales como la potenciación de la transmisión glutamatérgica y el aumento serotoninérgico en la corteza prefrontal.
- El tratamiento continuado con cannabidiol revierte las alteraciones funcionales en los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide inducidas por la bulbectomía.
- La administración crónica de cannabidiol conduce a la normalización de los niveles de expresión de determinados marcadores de neuroplasticidad, alterados en el modelo de la bulbectomía, y que se asocian a la etiopatogenia y tratamiento de la depresión.
- La administración de cannabidiol induce alteraciones en los neuroblastos derivados de la zona subventricular, nicho de neurogénesis en cerebro adulto, relativos a la morfología y procesos migratorios a lo largo de la corriente migratoria rostral.
- El receptor 5-HT_{1A} juega un papel crucial en el mecanismo de acción antidepresivo del cannabidiol, tanto a nivel conductual como neuroquímico.

- El cannabidiol podría representar un nuevo fármaco para el tratamiento de la depresión que solventaría muchas de las limitaciones actuales gracias a su rápido inicio de acción, a los efectos ansiolíticos simultáneos, el amplio margen de seguridad y la carencia de efectos psicotomiméticos.
- La potenciación dual de la transmisión serotoninérgica y glutamatérgica como nueva estrategia farmacológica, podría abrir una prometedora vía al descubrimiento de nuevas terapias antidepresivas rápidas y eficaces.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abadji, V., Lucas-Lenard, J.M., Chin, C., Kendall, D.A., 1999. Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of Gs. *J Neurochem* 72, 2032-2038.

Abush, H., Akirav, I., 2013. Cannabinoids ameliorate impairments induced by chronic stress to synaptic plasticity and short-term memory. *Neuropsychopharmacology* 38, 1521-1534.

Adamczyk, P., Golda, A., McCreary, A.C., Filip, M., Przegalinski, E., 2008. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. *J Physiol Pharmacol* 59, 217-228.

Adamczyk, P., Miszkiel, J., McCreary, A.C., Filip, M., Papp, M., Przegalinski, E., 2012. The effects of cannabinoid CB1, CB2 and vanilloid TRPV1 receptor antagonists on cocaine addictive behavior in rats. *Brain Res* 1444, 45-54.

Adams, B.W., Moghaddam, B., 2001. Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 50, 750-757.

Adayev, T., Ranasinghe, B., Banerjee, P., 2005. Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Biosci Rep* 25, 363-385.

Adell, A., Artigas, F., 1998. A microdialysis study of the in vivo release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. *British journal of pharmacology* 125, 1361-1367.

Adell, A., Carceller, A., Artigas, F., 1991. Regional distribution of extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the brain of freely moving rats. *Journal of neurochemistry* 56, 709-712.

Aghajanian, G.K., Sprouse, J.S., Sheldon, P., Rasmussen, K., 1990. Electrophysiology of the central serotonin system: receptor subtypes and transducer mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 600, 93-103; discussion 103.

Aguado, T., Monory, K., Palazuelos, J., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzman, M., Galve-Roperh, I., 2005. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J* 19, 1704-1706.

Ahn, K., McKinney, M.K., Cravatt, B.F., 2008. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev* 108, 1687-1707.

Akinfiresoye, L., Tizabi, Y., 2013. Antidepressant effects of AMPA and ketamine combination: role of hippocampal BDNF, synapsin, and mTOR. *Psychopharmacology (Berl)*.

Aksoz, E., Aksoz, T., Bilge, S.S., Ilkaya, F., Celik, S., Diren, H.B., 2008. Antidepressant-like effects of echo-planar magnetic resonance imaging in mice determined using the forced swimming test. *Brain Res* 1236, 194-199.

Albert, P.R., Vahid-Ansari, F., Luckhart, C., 2014. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front Behav Neurosci* 8, 199.

Almeida, R.F., Thomazi, A.P., Godinho, G.F., Saute, J.A., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., Ganzella, M., 2010. Effects of depressive-like behavior of rats on brain glutamate uptake. *Neurochem Res* 35, 1164-1171.

Amargos-Bosch, M., Bortolozzi, A., Puig, M.V., Serrats, J., Adell, A., Celada, P., Toth, M., Mengod, G., Artigas, F., 2004. Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14, 281-299.

Arango, V., Ernsberger, P., Marzuk, P.M., Chen, J.S., Tierney, H., Stanley, M., Reis, D.J., Mann, J.J., 1990. Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT2 and beta-adrenergic receptor binding sites in the brain of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 47, 1038-1047.

Arango, V., Underwood, M.D., Boldrini, M., Tamir, H., Kassir, S.A., Hsiung, S., Chen, J.J., Mann, J.J., 2001. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 25, 892-903.

Arborelius, L., Owens, M.J., Plotsky, P.M., Nemeroff, C.B., 1999. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 160, 1-12.

Arora, R.C., Meltzer, H.Y., 1989. Increased serotonin2 (5-HT2) receptor binding as measured by 3H-lysergic acid diethylamide (3H-LSD) in the blood platelets of depressed patients. *Life Sci* 44, 725-734.

Artigas, F., 2013. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther* 137, 119-131.

Artigas, F., Romero, L., de Montigny, C., Blier, P., 1996. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists. *Trends Neurosci* 19, 378-383.

Asberg, M., 1997. Neurotransmitters and suicidal behavior. The evidence from cerebrospinal fluid studies. *Ann N Y Acad Sci* 836, 158-181.

Asberg, M., Traskman, L., Thoren, P., 1976. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch Gen Psychiatry* 33, 1193-1197.

Ashton, J.C., Glass, M., 2007. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 5, 73-80.

Aso, E., Ozaita, A., Valdizan, E.M., Ledent, C., Pazos, A., Maldonado, R., Valverde, O., 2008. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J Neurochem* 105, 565-572.

Atwood, B.K., Mackie, K., 2010. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol* 160, 467-479.

Autry, A.E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E.S., Los, M.F., Cheng, P.F., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2011. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 475, 91-95.

Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Capasso, R., Gallo, L., Piscitelli, F., Di Marzo, V., Izzo, A.A., 2012. Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *J Mol Med (Berl)* 90, 925-934.

Bagley, J.A., Belluscio, L., 2010. Dynamic imaging reveals that brain-derived neurotrophic factor can independently regulate motility and direction of neuroblasts within the rostral migratory stream. *Neuroscience* 169, 1449-1461.

Bambico, F.R., Katz, N., Debonnel, G., Gobbi, G., 2007. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 27, 11700-11711.

Banasr, M., Duman, R.S., 2008. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol Psychiatry* 64, 863-870.

Barnes, N.M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083-1152.

Beique, J.C., Campbell, B., Perring, P., Hamblin, M.W., Walker, P., Mladenovic, L., Andrade, R., 2004. Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex: coordinated expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A}, 5-HT_{2A}, and 5-HT₇ receptors. *J Neurosci* 24, 4807-4817.

Bel, N., Artigas, F., 1992. Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 229, 101-103.

Belvindrah, R., Nissant, A., Lledo, P.M., 2011. Abnormal neuronal migration changes the fate of developing neurons in the postnatal olfactory bulb. *J Neurosci* 31, 7551-7562.

Benito, C., Tolon, R.M., Pazos, M.R., Nunez, E., Castillo, A.I., Romero, J., 2008. Cannabinoid CB₂ receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol* 153, 277-285.

Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H., Chagas, M.H., de Oliveira, D.C., De Martinis, B.S., Kapczinski, F., Quevedo, J., Roesler, R., Schroder, N., Nardi, A.E., Martin-Santos, R., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., 2011a. Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology* 36, 1219-1226.

Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., 2011b. Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Curr Drug Saf* 6, 237-249.

Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., Krystal, J.H., 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47, 351-354.

Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A., Rios, M., Monteggia, L.M., Self, D.W., Nestler, E.J., 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311, 864-868.

Berton, O., Nestler, E.J., 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7, 137-151.

Beyer, C.E., Boikess, S., Luo, B., Dawson, L.A., 2002. Comparison of the effects of antidepressants on norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study. *J Psychopharmacol* 16, 297-304.

Biegon, A., Israeli, M., 1988. Regionally selective increases in beta-adrenergic receptor density in the brains of suicide victims. *Brain Res* 442, 199-203.

Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., Di Marzo, V., 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134, 845-852.

Bjartmar, L., Johansson, I.M., Marcusson, J., Ross, S.B., Seckl, J.R., Olsson, T., 2000. Selective effects on NGFI-A, MR, GR and NGFI-B hippocampal mRNA expression after chronic treatment with different subclasses of antidepressants in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 151, 7-12.

Blake, D.R., Robson, P., Ho, M., Jubb, R.W., McCabe, C.S., 2006. Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45, 50-52.

Blendy, J.A., 2006. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 59, 1144-1150.

Blier, P., Bouchard, C., 1994. Modulation of 5-HT release in the guinea-pig brain following long-term administration of antidepressant drugs. *Br J Pharmacol* 113, 485-495.

Blier, P., de Montigny, C., 1985. Serotonergic but not noradrenergic neurons in rat central nervous system adapt to long-term treatment with monoamine oxidase inhibitors. *Neuroscience* 16, 949-955.

Boldrini, M., Underwood, M.D., Hen, R., Rosoklija, G.B., Dwork, A.J., John Mann, J., Arango, V., 2009. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34, 2376-2389.

Boldrini, M., Underwood, M.D., Mann, J.J., Arango, V., 2008. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res* 42, 433-442.

Bonnaïon, P., Bernard, J.F., Hamon, M., Adrien, J., Fabre, V., 2010. Heterogeneous distribution of the serotonin 5-HT(1A) receptor mRNA in chemically identified neurons of the mouse rostral brainstem: Implications for the role of serotonin in the regulation of wakefulness and REM sleep. *J Comp Neurol* 518, 2744-2770.

Borrito-Escuela, D.O., Romero-Fernandez, W., Mudo, G., Perez-Alea, M., Ciruela, F., Tarakanov, A.O., Narvaez, M., Di Liberto, V., Agnati, L.F., Belluardo, N., Fuxe, K., 2012. Fibroblast growth factor receptor 1- 5-hydroxytryptamine 1A heteroreceptor complexes and their enhancement of hippocampal plasticity. *Biol Psychiatry* 71, 84-91.

Bowley, M.P., Drevets, W.C., Ongur, D., Price, J.L., 2002. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 52, 404-412.

Breivogel, C.S., Griffin, G., Di Marzo, V., Martin, B.R., 2001. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 60, 155-163.

Breivogel, C.S., Sim-Selley, L.J., 2009. Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *Int Rev Psychiatry* 21, 113-121.

Brenes, J.C., Fornaguera, J., 2009. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav Brain Res* 198, 199-205.

Briley, M.S., Langer, S.Z., Raisman, R., Sechter, D., Zarifian, E., 1980. Tritiated imipramine binding sites are decreased in platelets of untreated depressed patients. *Science* 209, 303-305.

Brown, T.M., Brotchie, J.M., Fitzjohn, S.M., 2003. Cannabinoids decrease corticostriatal synaptic transmission via an effect on glutamate uptake. *J Neurosci* 23, 11073-11077.

Cairncross, K.D., Cox, B., Forster, C., Wren, A.F., 1977. The olfactory bulbectomized rat: a simple model for detecting drugs with antidepressant potential [proceedings]. *Br J Pharmacol* 61, 497P.

Calcagno, E., Carli, M., Invernizzi, R.W., 2006. The 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT prevents prefrontocortical glutamate and serotonin release in response to blockade of cortical NMDA receptors. *Journal of neurochemistry* 96, 853-860.

Callado, L.F., Meana, J.J., Grijalba, B., Pazos, A., Sastre, M., Garcia-Sevilla, J.A., 1998. Selective increase of alpha2A-adrenoceptor agonist binding sites in brains of depressed suicide victims. *J Neurochem* 70, 1114-1123.

Cammalleri, M., Lutjens, R., Berton, F., King, A.R., Simpson, C., Francesconi, W., Sanna, P.P., 2003. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14368-14373.

Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., MacQueen, G.M., 2004. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 161, 598-607.

Campos, A.C., de Paula Soares, V., Carvalho, M.C., Ferreira, F.R., Vicente, M.A., Brandao, M.L., Zuardi, A.W., Zangrossi, H., Jr., Guimaraes, F.S., 2013a. Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 226, 13-24.

Campos, A.C., Ferreira, F.R., Guimaraes, F.S., 2012. Cannabidiol blocks long-lasting behavioral consequences of predator threat stress: possible involvement of 5HT1A receptors. *J Psychiatr Res* 46, 1501-1510.

Campos, A.C., Guimaraes, F.S., 2008. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 199, 223-230.

Campos, A.C., Ortega, Z., Palazuelos, J., Fogaca, M.V., Aguiar, D.C., Diaz-Alonso, J., Ortega-Gutierrez, S., Vazquez-Villa, H., Moreira, F.A., Guzman, M., Galve-Roperh, I., Guimaraes, F.S., 2013b. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 1407-1419.

Carlini, E.A., Leite, J.R., Tannhauser, M., Berardi, A.C., 1973. Letter: Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. *J Pharm Pharmacol* 25, 664-665.

Carlsen, J., De Olmos, J., Heimer, L., 1982. Tracing of two-neuron pathways in the olfactory system by the aid of transneuronal degeneration: projections to the amygdaloid body and hippocampal formation. *J Comp Neurol* 208, 196-208.

Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Muller, C., Woods, A.S., Hope, B.T., Ciruela, F., Casado, V., Canela, E.I., Lluís, C., Goldberg, S.R., Moratalla, R., Franco, R., Ferre, S., 2007. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* 32, 2249-2259.

Carrier, E.J., Auchampach, J.A., Hillard, C.J., 2006. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7895-7900.

Casarotto, P.C., Gomes, F.V., Resstel, L.B., Guimaraes, F.S., 2010. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. *Behav Pharmacol* 21, 353-358.

Castillo, A., Tolon, M.R., Fernandez-Ruiz, J., Romero, J., Martinez-Orgado, J., 2010. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis* 37, 434-440.

Castillo, P.E., Younts, T.J., Chavez, A.E., Hashimotodani, Y., 2012. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 76, 70-81.

Castro, E., Diaz, A., Rodriguez-Gaztelumendi, A., Del Olmo, E., Pazos, A., 2008. WAY100635 prevents the changes induced by fluoxetine upon the 5-HT1A receptor functionality. *Neuropharmacology* 55, 1391-1396.

Castro, M., Diaz, A., del Olmo, E., Pazos, A., 2003. Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT1A receptors in rat brain. *Neuropharmacology* 44, 93-101.

Celada, P., Puig, M., Amargos-Bosch, M., Adell, A., Artigas, F., 2004. The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci* 29, 252-265.

Celada, P., Puig, M.V., Artigas, F., 2013. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Front Integr Neurosci* 7, 25.

Celada, P., Puig, M.V., Casanovas, J.M., Guillazo, G., Artigas, F., 2001. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21, 9917-9929.

Cleary, C., Linde, J.A., Hiscock, K.M., Hadas, I., Belmaker, R.H., Agam, G., Flaisher-Grinberg, S., Einat, H., 2008. Antidepressive-like effects of rapamycin in animal models: Implications for mTOR inhibition as a new target for treatment of affective disorders. *Brain Res Bull* 76, 469-473.

Coppen, A., 1967. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113, 1237-1264.

Cortesi, M., Fusar-Poli, P., 2007. Potential therapeutical effects of cannabidiol in children with pharmacoresistant epilepsy. *Med Hypotheses* 68, 920-921.

Costa, B., Giagnoni, G., Franke, C., Trovato, A.E., Colleoni, M., 2004. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol* 143, 247-250.

Cotter, D., Mackay, D., Chana, G., Beasley, C., Landau, S., Everall, I.P., 2002. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb Cortex* 12, 386-394.

Cotter, D., Mackay, D., Landau, S., Kerwin, R., Everall, I., 2001a. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 58, 545-553.

Cotter, D.R., Pariante, C.M., Everall, I.P., 2001b. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull* 55, 585-595.

Crippa, J.A., Derenusson, G.N., Ferrari, T.B., Wichert-Ana, L., Duran, F.L., Martin-Santos, R., Simoes, M.V., Bhattacharyya, S., Fusar-Poli, P., Atakan, Z., Santos Filho, A., Freitas-Ferrari, M.C., McGuire, P.K., Zuardi, A.W., Busatto, G.F., Hallak, J.E., 2011. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. *J Psychopharmacol* 25, 121-130.

Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, I., 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23, 238-245.

Cryan, J.F., Mombereau, C., 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry* 9, 326-357.

Cryan, J.F., O'Leary, O.F., 2010. Neuroscience. A glutamate pathway to faster-acting antidepressants? *Science* 329, 913-914.

Cryan, J.F., Page, M.E., Lucki, I., 2005. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 182, 335-344.

Cunha, A.B., Frey, B.N., Andreazza, A.C., Goi, J.D., Rosa, A.R., Goncalves, C.A., Santin, A., Kapczinski, F., 2006. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett* 398, 215-219.

Cunha, J.M., Carlini, E.A., Pereira, A.E., Ramos, O.L., Pimentel, C., Gagliardi, R., Sanvito, W.L., Lander, N., Mechoulam, R., 1980. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology* 21, 175-185.

Czeh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., de Biurrun, G., van Kampen, M., Bartolomucci, A., Fuchs, E., 2001. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12796-12801.

Czesak, M., Lemonde, S., Peterson, E.A., Rogaeva, A., Albert, P.R., 2006. Cell-specific repressor or enhancer activities of Deaf-1 at a serotonin 1A receptor gene polymorphism. *J Neurosci* 26, 1864-1871.

Chaki, S., Yoshikawa, R., Hirota, S., Shimazaki, T., Maeda, M., Kawashima, N., Yoshimizu, T., Yasuhara, A., Sakagami, K., Okuyama, S., Nakanishi, S., Nakazato, A., 2004. MGS0039: a potent and selective group II metabotropic glutamate receptor antagonist with antidepressant-like activity. *Neuropharmacology* 46, 457-467.

Cheetham, S.C., Crompton, M.R., Katona, C.L., Horton, R.W., 1990. Brain 5-HT1 binding sites in depressed suicides. *Psychopharmacology (Berl)* 102, 544-548.

Chen, Z.Y., Patel, P.D., Sant, G., Meng, C.X., Teng, K.K., Hempstead, B.L., Lee, F.S., 2004. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci* 24, 4401-4411.

Cheng, D., Low, J.K., Logge, W., Garner, B., Karl, T., 2014. Chronic cannabidiol treatment improves social and object recognition in double transgenic APP^{swe}/PS1^{E9} mice. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 3009-3017.

Chiaromello, S., Dalmasso, G., Bezin, L., Marcel, D., Jourdan, F., Peretto, P., Fasolo, A., De Marchis, S., 2007. BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci* 26, 1780-1790.

Chowdhury, G.M., Behar, K.L., Cho, W., Thomas, M.A., Rothman, D.L., Sanacora, G., 2012. (1)H-[(1)(3)C]-nuclear magnetic resonance spectroscopy measures of ketamine's effect on amino acid neurotransmitter metabolism. *Biol Psychiatry* 71, 1022-1025.

D'Haenen, H., Bossuyt, A., Van Mulders, I., 1992. Psychobiological substrate of hedonic capacity. *Clin Neuropharmacol* 15 Suppl 1 Pt A, 556A-557A.

D'Sa, C., Eisch, A.J., Bolger, G.B., Duman, R.S., 2005. Differential expression and regulation of the cAMP-selective phosphodiesterase type 4A splice variants in rat brain by chronic antidepressant administration. *Eur J Neurosci* 22, 1463-1475.

Das, R.K., Kamboj, S.K., Ramadas, M., Yogan, K., Gupta, V., Redman, E., Curran, H.V., Morgan, C.J., 2013. Cannabidiol enhances consolidation of explicit fear extinction in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 226, 781-792.

Davidson, R.J., 2002. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiatry* 51, 68-80.

Day, H.E., Greenwood, B.N., Hammack, S.E., Watkins, L.R., Fleshner, M., Maier, S.F., Campeau, S., 2004. Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 474, 364-378.

De Bellis, M.D., Gold, P.W., Geraciotti, T.D., Jr., Listwak, S.J., Kling, M.A., 1993. Association of fluoxetine treatment with reductions in CSF concentrations of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in patients with major depression. *Am J Psychiatry* 150, 656-657.

De Paermentier, F., Cheetham, S.C., Crompton, M.R., Katona, C.L., Horton, R.W., 1990. Brain beta-adrenoceptor binding sites in antidepressant-free depressed suicide victims. *Brain Res* 525, 71-77.

De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A.S., Allara, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., Di Marzo, V., 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol* 163, 1479-1494.

De Vivo, M., Maayani, S., 1986. Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 238, 248-253.

Derkinderen, P., Valjent, E., Toutant, M., Corvol, J.C., Enslen, H., Ledent, C., Trzaskos, J., Caboche, J., Girault, J.A., 2003. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23, 2371-2382.

Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121, 66-72.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.

Devinsky, O., Cilio, M.R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., Di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., Notcutt, W.G., Martinez-Orgado, J., Robson, P.J., Rohrback, B.G., Thiele, E., Whalley, B., Friedman, D., 2014. Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia* 55, 791-802.

Di Marzo, V., Breivogel, C.S., Tao, Q., Bridgen, D.T., Razdan, R.K., Zimmer, A.M., Zimmer, A., Martin, B.R., 2000. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 75, 2434-2444.

Do Monte, F.H., Souza, R.R., Bitencourt, R.M., Kroon, J.A., Takahashi, R.N., 2013. Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. *Behav Brain Res* 250, 23-27.

Domschke, K., Dannlowski, U., Ohrmann, P., Lawford, B., Bauer, J., Kugel, H., Heindel, W., Young, R., Morris, P., Arolt, V., Deckert, J., Suslow, T., Baune, B.T., 2008. Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 18, 751-759.

Drevets, W.C., Frank, E., Price, J.C., Kupfer, D.J., Holt, D., Greer, P.J., Huang, Y., Gautier, C., Mathis, C., 1999. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry* 46, 1375-1387.

Drevets, W.C., Price, J.L., Furey, M.L., 2008. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct* 213, 93-118.

Drevets, W.C., Thase, M.E., Moses-Kolko, E.L., Price, J., Frank, E., Kupfer, D.J., Mathis, C., 2007. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol* 34, 865-877.

Drew, M.R., Hen, R., 2007. Adult hippocampal neurogenesis as target for the treatment of depression. *CNS & neurological disorders drug targets* 6, 205-218.

Du, J., Machado-Vieira, R., Maeng, S., Martinowich, K., Manji, H.K., Zarate, C.A., Jr., 2006. Enhancing AMPA to NMDA throughput as a convergent mechanism for antidepressant action. *Drug Discov Today Ther Strateg* 3, 519-526.

Duman, R.S., Li, N., Liu, R.J., Duric, V., Aghajanian, G., 2012. Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology* 62, 35-41.

Duman, R.S., Malberg, J., Nakagawa, S., D'Sa, C., 2000. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry* 48, 732-739.

Duman, R.S., Malberg, J., Thome, J., 1999. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 46, 1181-1191.

Duman, R.S., Monteggia, L.M., 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59, 1116-1127.

Dwyer, J.M., Lepack, A.E., Duman, R.S., 2012. mTOR activation is required for the antidepressant effects of mGluR(2)/(3) blockade. *Int J Neuropsychopharmacol* 15, 429-434.

Egan, M.F., Weinberger, D.R., Lu, B., 2003. Schizophrenia, III: brain-derived neurotrophic factor and genetic risk. *Am J Psychiatry* 160, 1242.

El-Alfy, A.T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D., Khan, I., ElSohly, M., Ross, S., 2010. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav* 95, 434-442.

ElBatsh, M.M., Assareh, N., Marsden, C.A., Kendall, D.A., 2012. Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 221, 239-247.

Elfving, B., Wegener, G., 2012. Electroconvulsive seizures stimulate the vegf pathway via mTORC1. *Synapse* 66, 340-345.

Elsohly, M.A., Slade, D., 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* 78, 539-548.

Ellis, J., Padiani, J.D., Canals, M., Milasta, S., Milligan, G., 2006. Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem* 281, 38812-38824.

Espejo-Porras, F., Fernandez-Ruiz, J., Pertwee, R.G., Mechoulam, R., Garcia, C., 2013. Motor effects of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol that are mediated by 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology* 75, 155-163.

Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G.I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratu, M.R., Iuvone, T., Steardo, L., 2011. Cannabidiol reduces Abeta-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS One* 6, e28668.

Esteban, S., Garcia-Sevilla, J.A., 2012. Effects induced by cannabinoids on monoaminergic systems in the brain and their implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 38, 78-87.

Fargin, A., Raymond, J.R., Regan, J.W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 1989. Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor. *J Biol Chem* 264, 14848-14852.

Fava, M., Kendler, K.S., 2000. Major depressive disorder. *Neuron* 28, 335-341.

Fernandez-Ruiz, J., Sagredo, O., Pazos, M.R., Garcia, C., Pertwee, R., Mechoulam, R., Martinez-Orgado, J., 2013. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br J Clin Pharmacol* 75, 323-333.

Fitzgerald, P.B., Laird, A.R., Maller, J., Daskalakis, Z.J., 2008. A meta-analytic study of changes in brain activation in depression. *Hum Brain Mapp* 29, 683-695.

Flórez, J.A., JA; y Mediavilla, A., 2008. *Farmacología Humana*. 5ª edición, 5 ed. Elsevier.

Fogaca, M.V., Reis, F.M., Campos, A.C., Guimaraes, F.S., 2014. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: involvement of 5HT_{1A} receptors and previous stressful experience. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 410-419.

Fone, K.C., Porkess, M.V., 2008. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 1087-1102.

Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gomez del Pulgar, T., Velasco, G., Guzman, M., 2002. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 62, 1385-1392.

Gardier, A.M., Malagie, I., Trillat, A.C., Jacquot, C., Artigas, F., 1996. Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol* 10, 16-27.

Garnovskaya, M.N., van Biesen, T., Hawe, B., Casanas Ramos, S., Lefkowitz, R.J., Raymond, J.R., 1996. Ras-dependent activation of fibroblast mitogen-activated protein kinase by 5-HT_{1A} receptor via a G protein beta gamma-subunit-initiated pathway. *Biochemistry* 35, 13716-13722.

Gerard, C., Langlois, X., Gingrich, J., Doucet, E., Verge, D., Kia, H.K., Raisman, R., Gozlan, H., el Mestikawy, S., Hamon, M., 1994. Production and characterization of

polyclonal antibodies recognizing the intracytoplasmic third loop of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor. *Neuroscience* 62, 721-739.

Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Mor, M., Trezza, V., Goldberg, S.R., Cuomo, V., Piomelli, D., 2005. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18620-18625.

Gonca, E., Darici, F., 2015. The effect of cannabidiol on ischemia/reperfusion-induced ventricular arrhythmias: the role of adenosine A₁ receptors. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 20, 76-83.

Goncalves, M.B., Suetterlin, P., Yip, P., Molina-Holgado, F., Walker, D.J., Oudin, M.J., Zentar, M.P., Pollard, S., Yanez-Munoz, R.J., Williams, G., Walsh, F.S., Pangalos, M.N., Doherty, P., 2008. A diacylglycerol lipase-CB₂ cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. *Mol Cell Neurosci* 38, 526-536.

Gordon, J.A., Hen, R., 2004. The serotonergic system and anxiety. *Neuromolecular Med* 5, 27-40.

Gorzalka, B.B., Hill, M.N., Hillard, C.J., 2008. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 1152-1160.

Gosselin, R.D., Gibney, S., O'Malley, D., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2009. Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. *Neuroscience* 159, 915-925.

Gresack, J.E., Risbrough, V.B., Scott, C.N., Coste, S., Stenzel-Poore, M., Geyer, M.A., Powell, S.B., 2010. Isolation rearing-induced deficits in contextual fear learning do not require CRF(2) receptors. *Behav Brain Res* 209, 80-84.

Griebel, G., Stemmelin, J., Scatton, B., 2005. Effects of the cannabinoid CB₁ receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry* 57, 261-267.

Guimaraes, F.S., Chiaretti, T.M., Graeff, F.G., Zuardi, A.W., 1990. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100, 558-559.

Hammen, C., 2005. Stress and depression. *Annual review of clinical psychology* 1, 293-319.

Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J., Wink, D., 1998. Cannabidiol and (-)-Delta⁹-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8268-8273.

Hampson, A.J., Grimaldi, M., Lolic, M., Wink, D., Rosenthal, R., Axelrod, J., 2000a. Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Ann N Y Acad Sci* 899, 274-282.

Hampson, R.E., Mu, J., Deadwyler, S.A., 2000b. Cannabinoid and kappa opioid receptors reduce potassium K current via activation of G(s) proteins in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 84, 2356-2364.

Han, F., Nakano, T., Yamamoto, Y., Shioda, N., Lu, Y.M., Fukunaga, K., 2009. Improvement of depressive behaviors by nefiracetam is associated with activation of CaM kinases in olfactory bulbectomized mice. *Brain Res* 1265, 205-214.

Hardingham, G.E., Bading, H., 2002. Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochim Biophys Acta* 1600, 148-153.

Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., Bading, H., 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5, 405-414.

Harvey, D.J., 1999. Absorption, distribution, and biotransformation of the cannabinoids. Springer.

Hashimoto, K., 2009. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* 61, 105-123.

Hashimoto, K., 2011. Role of the mTOR signaling pathway in the rapid antidepressant action of ketamine. *Expert Rev Neurother* 11, 33-36.

Hay, N., Sonenberg, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-1945.

Hayakawa, K., Mishima, K., Nozako, M., Ogata, A., Hazekawa, M., Liu, A.X., Fujioka, M., Abe, K., Hasebe, N., Egashira, N., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2007. Repeated treatment with cannabidiol but not Delta9-tetrahydrocannabinol has a neuroprotective effect without the development of tolerance. *Neuropharmacology* 52, 1079-1087.

Haynes, L.E., Barber, D., Mitchell, I.J., 2004. Chronic antidepressant medication attenuates dexamethasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum. *Brain Res* 1026, 157-167.

Heidbreder, C.A., Weiss, I.C., Domeney, A.M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou, G., Feldon, J., Moran, M.C., Nelson, P., 2000. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100, 749-768.

Hellweg, R., Zueger, M., Fink, K., Hortnagl, H., Gass, P., 2007. Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. *Neurobiol Dis* 25, 1-7.

Hendriksen, H., Mechiel Korte, S., Olivier, B., Oosting, R.S., 2015. The olfactory bulbectomy model in mice and rat: One story or two tails? *Eur J Pharmacol* 753, 105-113.

Hendriksen, H., Meulendijks, D., Douma, T.N., Bink, D.I., Breuer, M.E., Westphal, K.G., Olivier, B., Oosting, R.S., 2012. Environmental enrichment has antidepressant-like action without improving learning and memory deficits in olfactory bulbectomized rats. *Neuropharmacology* 62, 270-277.

Heninger, G.R., Delgado, P.L., Charney, D.S., 1996. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry* 29, 2-11.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1932-1936.

Herman, J.P., Cullinan, W.E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20, 78-84.

Hesketh, S.A., Brennan, A.K., Jessop, D.S., Finn, D.P., 2008. Effects of chronic treatment with citalopram on cannabinoid and opioid receptor-mediated G-protein coupling in discrete rat brain regions. *Psychopharmacology (Berl)* 198, 29-36.

Hetman, M., Kanning, K., Cavanaugh, J.E., Xia, Z., 1999. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 274, 22569-22580.

Hill, M.N., Carrier, E.J., McLaughlin, R.J., Morrish, A.C., Meier, S.E., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2008. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem* 106, 2322-2336.

Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2005a. Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav Pharmacol* 16, 333-352.

Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2005b. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol* 15, 593-599.

Hill, M.N., Kambo, J.S., Sun, J.C., Gorzalka, B.B., Galea, L.A., 2006. Endocannabinoids modulate stress-induced suppression of hippocampal cell proliferation and activation of defensive behaviours. *Eur J Neurosci* 24, 1845-1849.

Hill, M.N., Miller, G.E., Carrier, E.J., Gorzalka, B.B., Hillard, C.J., 2009. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1257-1262.

Hill, M.N., Tasker, J.G., 2012. Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 204, 5-16.

Hirvonen, J., Karlsson, H., Kajander, J., Lepola, A., Markkula, J., Rasi-Hakala, H., Nagren, K., Salminen, J.K., Hietala, J., 2008. Decreased brain serotonin 5-HT_{1A} receptor availability in medication-naïve patients with major depressive disorder: an in-vivo imaging study using PET and [carbonyl-¹¹C]WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* 11, 465-476.

Hjorth, S., Westlin, D., Bengtsson, H.J., 1997. WAY100635-induced augmentation of the 5-HT-elevating action of citalopram: relative importance of the dose of the 5-HT_{1A} (auto)receptor blocker versus that of the 5-HT reuptake inhibitor. *Neuropharmacology* 36, 461-465.

Hoeffler, C.A., Klann, E., 2010. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33, 67-75.

Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477-501.

Holsboer, F., Dorr, H.G., Sippell, W.G., 1982. Blunted aldosterone response to dexamethasone in female patients with endogenous depression. *Psychoneuroendocrinology* 7, 155-162.

Hong, S., Flashner, B., Chiu, M., ver Hoeve, E., Luz, S., Bhatnagar, S., 2012. Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. *Physiol Behav* 105, 269-275.

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54, 161-202.

Huestis, M.A., 2007. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers* 4, 1770-1804.

Hungund, B.L., Vinod, K.Y., Kassir, S.A., Basavarajappa, B.S., Yalamanchili, R., Cooper, T.B., Mann, J.J., Arango, V., 2004. Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTPgammaS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Mol Psychiatry* 9, 184-190.

Ibi, D., Takuma, K., Koike, H., Mizoguchi, H., Tsuritani, K., Kuwahara, Y., Kamei, H., Nagai, T., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Yamada, K., 2008. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J Neurochem* 105, 921-932.

Ising, M., Holsboer, F., 2007. CRH-sub-1 receptor antagonists for the treatment of depression and anxiety. *Exp Clin Psychopharmacol* 15, 519-528.

Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., Su, B., 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125-137.

Jacobs, B.L., van Praag, H., Gage, F.H., 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry* 5, 262-269.

Jancsar, S.M., Leonard, B.E., 1984. Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 8, 263-269.

Jarosik, J., Legutko, B., Unsicker, K., von Bohlen Und Halbach, O., 2007. Antidepressant-mediated reversal of abnormal behavior and neurodegeneration in mice following olfactory bulbectomy. *Exp Neurol* 204, 20-28.

Jernigan, C.S., Goswami, D.B., Austin, M.C., Iyo, A.H., Chandran, A., Stockmeier, C.A., Karolewicz, B., 2011. The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 1774-1779.

- Jiang, R., Yamaori, S., Takeda, S., Yamamoto, I., Watanabe, K., 2011. Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. *Life Sci* 89, 165-170.
- Jiang, W., Zhang, Y., Xiao, L., Van Cleemput, J., Ji, S.P., Bai, G., Zhang, X., 2005. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 115, 3104-3116.
- Jin, K., Xie, L., Kim, S.H., Parmentier-Batteur, S., Sun, Y., Mao, X.O., Childs, J., Greenberg, D.A., 2004. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 66, 204-208.
- Johnson, J.R., Lossignol, D., Burnell-Nugent, M., Fallon, M.T., 2013. An open-label extension study to investigate the long-term safety and tolerability of THC/CBD oromucosal spray and oromucosal THC spray in patients with terminal cancer-related pain refractory to strong opioid analgesics. *J Pain Symptom Manage* 46, 207-218.
- Juhasz, G., Chase, D., Pegg, E., Downey, D., Toth, Z.G., Stones, K., Platt, H., Mekli, K., Payton, A., Elliott, R., Anderson, I.M., Deakin, J.F., 2009. CNR1 gene is associated with high neuroticism and low agreeableness and interacts with recent negative life events to predict current depressive symptoms. *Neuropsychopharmacology* 34, 2019-2027.
- Karasawa, J., Shimazaki, T., Kawashima, N., Chaki, S., 2005. AMPA receptor stimulation mediates the antidepressant-like effect of a group II metabotropic glutamate receptor antagonist. *Brain Res* 1042, 92-98.
- Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T., Kano, M., 2006. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 26, 2991-3001.
- Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K., Glass, M., 2005. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* 67, 1697-1704.
- Kelly, J.P., Wrynn, A.S., Leonard, B.E., 1997. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther* 74, 299-316.
- Kempermann, G., Kronenberg, G., 2003. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* 54, 499-503.
- Kendler, K.S., Gatz, M., Gardner, C.O., Pedersen, N.L., 2006. A Swedish national twin study of lifetime major depression. *Am J Psychiatry* 163, 109-114.
- Kessler, R.C., Nelson, C.B., McGonagle, K.A., Liu, J., Swartz, M., Blazer, D.G., 1996. Comorbidity of DSM-III-R major depressive disorder in the general population: results from the US National Comorbidity Survey. *The British journal of psychiatry. Supplement*, 17-30.
- Kheirbek, M.A., Klemenhagen, K.C., Sahay, A., Hen, R., 2012. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci* 15, 1613-1620.

Kim, D.H., Sabatini, D.M., 2004. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Current topics in microbiology and immunology* 279, 259-270.

Kleijn, J., Cremers, T.I., Hofland, C.M., Westerink, B.H., 2011. CB-1 receptors modulate the effect of the selective serotonin reuptake inhibitor, citalopram on extracellular serotonin levels in the rat prefrontal cortex. *Neurosci Res* 70, 334-337.

Klimek, V., Zak-Knapik, J., Mackowiak, M., 1994. Effects of repeated treatment with fluoxetine and citalopram, 5-HT uptake inhibitors, on 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the rat brain. *J Psychiatry Neurosci* 19, 63-67.

Kobe, F., Renner, U., Woehler, A., Wlodarczyk, J., Papusheva, E., Bao, G., Zeug, A., Richter, D.W., Neher, E., Ponimaskin, E., 2008. Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1503-1516.

Koike, H., Ibi, D., Mizoguchi, H., Nagai, T., Nitta, A., Takuma, K., Nabeshima, T., Yoneda, Y., Yamada, K., 2009. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav Brain Res* 202, 114-121.

Koike, H., Iijima, M., Chaki, S., 2011. Involvement of the mammalian target of rapamycin signaling in the antidepressant-like effect of group II metabotropic glutamate receptor antagonists. *Neuropharmacology* 61, 1419-1423.

Krishnan, V., Nestler, E.J., 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894-902.

Krystal, J.H., Sanacora, G., Duman, R.S., 2013. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry* 73, 1133-1141.

Kugaya, A., Sanacora, G., 2005. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS spectrums* 10, 808-819.

Kuhar, M.J., Unnerstall, J.R., De Souza, E.B., 1985. Receptor mapping in neuropharmacology by autoradiography: some technical problems. *NIDA Res Monogr* 62, 1-12.

Kuhn, R., 1958. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry* 115, 459-464.

Langford, R.M., Mares, J., Novotna, A., Vachova, M., Novakova, I., Notcutt, W., Ratcliffe, S., 2013. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 260, 984-997.

Lapiz, M.D., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., Marsden, C.A., 2003. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci Behav Physiol* 33, 13-29.

Lauckner, J.E., Hille, B., Mackie, K., 2005. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB₁ receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19144-19149.

Leal, S.L., Tighe, S.K., Jones, C.K., Yassa, M.A., 2014. Pattern separation of emotional information in hippocampal dentate and CA3. *Hippocampus* 24, 1146-1155.

Lembo, P.M., Albert, P.R., 1995. Multiple phosphorylation sites are required for pathway-selective uncoupling of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor by protein kinase C. *Mol Pharmacol* 48, 1024-1029.

Leonard, B.E., 1984. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Polish journal of pharmacology and pharmacy* 36, 561-569.

Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C., Klosterkotter, J., Hellmich, M., Koethe, D., 2012. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2, e94.

Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y., Aghajanian, G., Duman, R.S., 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329, 959-964.

Li, X., Tizzano, J.P., Griffey, K., Clay, M., Lindstrom, T., Skolnick, P., 2001. Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). *Neuropharmacology* 40, 1028-1033.

Ligresti, A., Moriello, A.S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., Laezza, C., Portella, G., Bifulco, M., Di Marzo, V., 2006. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 1375-1387.

Linge, R., Pazos, A., Diaz, A., 2013. Social isolation differentially affects anxiety and depressive-like responses of bulbectomized mice. *Behav Brain Res* 245, 1-6.

Liou, G.I., Auchampach, J.A., Hillard, C.J., Zhu, G., Yousufzai, B., Mian, S., Khan, S., Khalifa, Y., 2008. Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative nucleoside transporter and A_{2A} adenosine receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 5526-5531.

Lodzki, M., Godin, B., Rakou, L., Mechoulam, R., Gallily, R., Touitou, E., 2003. Cannabidiol-transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *J Control Release* 93, 377-387.

Long, L.E., Chesworth, R., Huang, X.F., McGregor, I.S., Arnold, J.C., Karl, T., 2010. A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 13, 861-876.

Lopez-Gil, X., Babot, Z., Amargos-Bosch, M., Sunol, C., Artigas, F., Adell, A., 2007. Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 32, 2087-2097.

Lopez-Leon, S., Janssens, A.C., Gonzalez-Zuloeta Ladd, A.M., Del-Favero, J., Claes, S.J., Oostra, B.A., van Duijn, C.M., 2008. Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 13, 772-785.

López-Muñoz, F.A., C., 2011. *The neurobiology of depression*, Florida.

Lorrain, D.S., Baccei, C.S., Bristow, L.J., Anderson, J.J., Varney, M.A., 2003. Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 117, 697-706.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Lowther, S., De Paermentier, F., Cheetham, S.C., Crompton, M.R., Katona, C.L., Horton, R.W., 1997. 5-HT_{1A} receptor binding sites in post-mortem brain samples from depressed suicides and controls. *J Affect Disord* 42, 199-207.

Lumia, A.R., Teicher, M.H., Salchli, F., Ayers, E., Possidente, B., 1992. Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Brain Res* 587, 181-185.

Llado-Pelfort, L., Santana, N., Ghisi, V., Artigas, F., Celada, P., 2012. 5-HT_{1A} receptor agonists enhance pyramidal cell firing in prefrontal cortex through a preferential action on GABA interneurons. *Cereb Cortex* 22, 1487-1497.

Llorente-Berzal, A., Assis, M.A., Rubino, T., Zamberletti, E., Marco, E.M., Parolaro, D., Ambrosio, E., Viveros, M.P., 2013. Sex-dependent changes in brain CB₁R expression and functionality and immune CB₂R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure. *Pharmacol Res* 74, 23-33.

Mackie, K., 2005. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*, 299-325.

Maeng, S., Zarate, C.A., Jr., Du, J., Schloesser, R.J., McCammon, J., Chen, G., Manji, H.K., 2008. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* 63, 349-352.

Magen, I., Avraham, Y., Ackerman, Z., Vorobiev, L., Mechoulam, R., Berry, E.M., 2009. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in mice with bile duct ligation. *J Hepatol* 51, 528-534.

Malberg, J.E., 2004. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci* 29, 196-205.

Malberg, J.E., Duman, R.S., 2003. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28, 1562-1571.

Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 9104-9110.

Malfait, A.M., Gallily, R., Sumariwalla, P.F., Malik, A.S., Andreanos, E., Mechoulam, R., Feldmann, M., 2000. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9561-9566.

Malison, R.T., Price, L.H., Berman, R., van Dyck, C.H., Pelton, G.H., Carpenter, L., Sanacora, G., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., Rajeevan, N., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P.,

Innis, R.B., Charney, D.S., 1998. Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [123I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry* 44, 1090-1098.

Mann, J.J., Stanley, M., McBride, P.A., McEwen, B.S., 1986. Increased serotonin2 and beta-adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 43, 954-959.

Mar, A., Spreekmeester, E., Rochford, J., 2000. Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat. *Psychopharmacology (Berl)* 150, 52-60.

Mar, A., Spreekmeester, E., Rochford, J., 2002. Fluoxetine-induced increases in open-field habituation in the olfactory bulbectomized rat depend on test aversiveness but not on anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 703-712.

Marchalant, Y., Brothers, H.M., Norman, G.J., Karelina, K., DeVries, A.C., Wenk, G.L., 2009. Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis. *Neurobiol Dis* 34, 300-307.

Marinho, A.L., Vila-Verde, C., Fogaca, M.V., Guimaraes, F.S., 2015. Effects of intra-infralimbic prefrontal cortex injections of cannabidiol in the modulation of emotional behaviors in rats: Contribution of 5HT receptors and stressful experiences. *Behav Brain Res* 286, 49-56.

Marsicano, G., Lutz, B., 2006. Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest* 29, 27-46.

Martin-Santos, R., Crippa, J.A., Batalla, A., Bhattacharyya, S., Atakan, Z., Borgwardt, S., Allen, P., Seal, M., Langohr, K., Farre, M., Zuardi, A.W., McGuire, P.K., 2012. Acute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Curr Pharm Des* 18, 4966-4979.

Martin, A.L., Brown, R.E., 2010. The lonely mouse: verification of a separation-induced model of depression in female mice. *Behav Brain Res* 207, 196-207.

Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O., 2002. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 159, 379-387.

Massi, P., Vaccani, A., Bianchessi, S., Costa, B., Macchi, P., Parolaro, D., 2006. The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cell Mol Life Sci* 63, 2057-2066.

Mato, S., Vidal, R., Castro, E., Diaz, A., Pazos, A., Valdizan, E.M., 2010. Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms. *Mol Pharmacol* 77, 424-434.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.

Matsuda, T., 2013. Neuropharmacologic studies on the brain serotonin1A receptor using the selective agonist osetmozotan. *Biol Pharm Bull* 36, 1871-1882.

McAllister, S.D., Murase, R., Christian, R.T., Lau, D., Zielinski, A.J., Allison, J., Almanza, C., Pakdel, A., Lee, J., Limbad, C., Liu, Y., Debs, R.J., Moore, D.H., Desprez, P.Y., 2011. Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 129, 37-47.

McEwen, B.S., 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews* 87, 873-904.

McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Bambico, F.R., Stuhr, K.L., Gobbi, G., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2012. Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. *Eur Neuropsychopharmacol* 22, 664-671.

McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Dang, S.S., Wainwright, S.R., Galea, L.A., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2013. Upregulation of CB(1) receptor binding in the ventromedial prefrontal cortex promotes proactive stress-coping strategies following chronic stress exposure. *Behav Brain Res* 237, 333-337.

McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2014. A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 42, 116-131.

McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Morrish, A.C., Gorzalka, B.B., 2007. Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect. *Behav Pharmacol* 18, 431-438.

Meana, J.J., Barturen, F., Garcia-Sevilla, J.A., 1992. Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biol Psychiatry* 31, 471-490.

Mechoulam, R., Gaoni, Y., 1965. A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 87, 3273-3275.

Mechoulam, R., Parker, L.A., Gallily, R., 2002. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol* 42, 11S-19S.

Meltzer, C.C., Price, J.C., Mathis, C.A., Butters, M.A., Ziolk, S.K., Moses-Kolko, E., Mazumdar, S., Mulsant, B.H., Houck, P.R., Lopresti, B.J., Weissfeld, L.A., Reynolds, C.F., 2004. Serotonin 1A receptor binding and treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 2258-2265.

Mendiguren, A., Pineda, J., 2009. Effect of the CB(1) receptor antagonists rimonabant and AM251 on the firing rate of dorsal raphe nucleus neurons in rat brain slices. *Br J Pharmacol* 158, 1579-1587.

Menke, A., Binder, E.B., 2014. Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. *Dialogues Clin Neurosci* 16, 395-404.

Meyer, J.H., Kapur, S., Houle, S., DaSilva, J., Owczarek, B., Brown, G.M., Wilson, A.A., Kennedy, S.H., 1999. Prefrontal cortex 5-HT₂ receptors in depression: an [¹⁸F]setoperone PET imaging study. *Am J Psychiatry* 156, 1029-1034.

- Michoulam, R., Shvo, Y., 1963. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 19, 2073-2078.
- Miguel-Hidalgo, J.J., Baucom, C., Dilley, G., Overholser, J.C., Meltzer, H.Y., Stockmeier, C.A., Rajkowska, G., 2000. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 48, 861-873.
- Millan, M.J., 2009. Dual- and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: novel concepts, new drugs. *Neurotherapeutics* 6, 53-77.
- Miller, B.R., Hen, R., 2015. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol* 30, 51-58.
- Miller, H.L., Delgado, P.L., Salomon, R.M., Berman, R., Krystal, J.H., Heninger, G.R., Charney, D.S., 1996. Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Arch Gen Psychiatry* 53, 117-128.
- Mirza, N.R., Bright, J.L., Stanhope, K.J., Wyatt, A., Harrington, N.R., 2005. Lamotrigine has an anxiolytic-like profile in the rat conditioned emotional response test of anxiety: a potential role for sodium channels? *Psychopharmacology (Berl)* 180, 159-168.
- Molina-Holgado, E., Vela, J.M., Arevalo-Martin, A., Almazan, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J., Guaza, C., 2002. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 22, 9742-9753.
- Mongeau, R., Blier, P., de Montigny, C., 1993. In vivo electrophysiological evidence for tonic activation by endogenous noradrenaline of alpha 2-adrenoceptors on 5-hydroxytryptamine terminals in the rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347, 266-272.
- Mongeau, R., Blier, P., de Montigny, C., 1997. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Brain Res Rev* 23, 145-195.
- Mongeau, R., de Montigny, C., Blier, P., 1994. Electrophysiologic evidence for desensitization of alpha 2-adrenoceptors on serotonin terminals following long-term treatment with drugs increasing norepinephrine synaptic concentration. *Neuropsychopharmacology* 10, 41-51.
- Monteggia, L.M., Barrot, M., Powell, C.M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., Meuth, S., Nagy, A., Greene, R.W., Nestler, E.J., 2004. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10827-10832.
- Monteggia, L.M., Luikart, B., Barrot, M., Theobald, D., Malkovska, I., Nef, S., Parada, L.F., Nestler, E.J., 2007. Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry* 61, 187-197.
- Monti, J.M., 1977. Hypnoticlike effects of cannabidiol in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 55, 263-265.

- Moreau, J.L., Jenck, F., Martin, J.R., Mortas, P., Haefely, W.E., 1992. Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2, 43-49.
- Moreira, F.A., Aguiar, D.C., Guimaraes, F.S., 2006. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30, 1466-1471.
- Morgan, C.J., Das, R.K., Joye, A., Curran, H.V., Kamboj, S.K., 2013. Cannabidiol reduces cigarette consumption in tobacco smokers: preliminary findings. *Addict Behav* 38, 2433-2436.
- Moriguchi, S., Han, F., Nakagawasai, O., Tadano, T., Fukunaga, K., 2006. Decreased calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C activities mediate impairment of hippocampal long-term potentiation in the olfactory bulbectomized mice. *J Neurochem* 97, 22-29.
- Morrish, A.C., Hill, M.N., Riebe, C.J., Gorzalka, B.B., 2009. Protracted cannabinoid administration elicits antidepressant behavioral responses in rats: role of gender and noradrenergic transmission. *Physiol Behav* 98, 118-124.
- Mostany, R., Valdizan, E.M., Pazos, A., 2008. A role for nuclear beta-catenin in SNRI antidepressant-induced hippocampal cell proliferation. *Neuropharmacology* 55, 18-26.
- Mucignat-Caretta, C., Bondi, M., Caretta, A., 2006. Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice. *Physiol Behav* 89, 637-643.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.
- Murillo-Rodriguez, E., Millan-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Mechoulam, R., Drucker-Colin, R., 2006. Cannabidiol, a constituent of *Cannabis sativa*, modulates sleep in rats. *FEBS Lett* 580, 4337-4345.
- Naert, A., Callaerts-Vegh, Z., D'Hooge, R., 2011. Nocturnal hyperactivity, increased social novelty preference and delayed extinction of fear responses in post-weaning socially isolated mice. *Brain Res Bull* 85, 354-362.
- Nahas, G., Leger, C., Tocque, B., Hoellinger, H., 1981. The kinetics of cannabinoid distribution and storage with special reference to the brain and testis. *J Clin Pharmacol* 21, 208S-214S.
- Navarrete, M., Araque, A., 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57, 883-893.
- Navarrete, M., Araque, A., 2010. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68, 113-126.
- Nemeroff, C.B., Bissette, G., Akil, H., Fink, M., 1991. Neuropeptide concentrations in the cerebrospinal fluid of depressed patients treated with electroconvulsive therapy. Corticotrophin-releasing factor, beta-endorphin and somatostatin. *Br J Psychiatry* 158, 59-63.

Nemeroff, C.B., Knight, D.L., Krishnan, R.R., Slotkin, T.A., Bissette, G., Melville, M.L., Blazer, D.G., 1988a. Marked reduction in the number of platelet-tritiated imipramine binding sites in geriatric depression. *Arch Gen Psychiatry* 45, 919-923.

Nemeroff, C.B., Owens, M.J., Bissette, G., Andorn, A.C., Stanley, M., 1988b. Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 45, 577-579.

Nemeroff, C.B., Vale, W.W., 2005. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. *J Clin Psychiatry* 66 Suppl 7, 5-13.

Nemeroff, C.B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C.D., Loosen, P.T., Vale, W., 1984. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226, 1342-1344.

Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25.

Nibuya, M., Morinobu, S., Duman, R.S., 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15, 7539-7547.

Nissen, S.E., Nicholls, S.J., Wolski, K., Rodes-Cabau, J., Cannon, C.P., Deanfield, J.E., Despres, J.P., Kastelein, J.J., Steinhubl, S.R., Kapadia, S., Yasin, M., Ruzyllo, W., Gaudin, C., Job, B., Hu, B., Bhatt, D.L., Lincoff, A.M., Tuzcu, E.M., 2008. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA* 299, 1547-1560.

O'Sullivan, S.E., Kendall, D.A., 2010. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology* 215, 611-616.

Olah, A., Toth, B.I., Borbiri, I., Sugawara, K., Szollosi, A.G., Czifra, G., Pal, B., Ambrus, L., Kloepper, J., Camera, E., Ludovici, M., Picardo, M., Voets, T., Zouboulis, C.C., Paus, R., Biro, T., 2014. Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *J Clin Invest* 124, 3713-3724.

Onaivi, E.S., Green, M.R., Martin, B.R., 1990. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 1002-1009.

Ongur, D., Drevets, W.C., Price, J.L., 1998. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13290-13295.

Oropeza, V.C., Page, M.E., Van Bockstaele, E.J., 2005. Systemic administration of WIN 55,212-2 increases norepinephrine release in the rat frontal cortex. *Brain Res* 1046, 45-54.

Ortega, J.E., Gonzalez-Lira, V., Horrillo, I., Herrera-Marschitz, M., Callado, L.F., Meana, J.J., 2013. Additive effect of rimonabant and citalopram on extracellular serotonin levels monitored with in vivo microdialysis in rat brain. *Eur J Pharmacol* 709, 13-19.

- Otmakhova, N.A., Gurevich, E.V., Katkov, Y.A., Nesterova, I.V., Bobkova, N.V., 1992. Dissociation of multiple behavioral effects between olfactory bulbectomized C57Bl/6J and DBA/2J mice. *Physiol Behav* 52, 441-448.
- Oudin, M.J., Gajendra, S., Williams, G., Hobbs, C., Lalli, G., Doherty, P., 2011. Endocannabinoids regulate the migration of subventricular zone-derived neuroblasts in the postnatal brain. *J Neurosci* 31, 4000-4011.
- Palacios, J.M., Niehoff, D.L., Kuhar, M.J., 1981. Receptor autoradiography with tritium-sensitive film: potential for computerized densitometry. *Neurosci Lett* 25, 101-105.
- Palucha-Poniewiera, A., Wieronska, J.M., Branski, P., Stachowicz, K., Chaki, S., Pilc, A., 2010. On the mechanism of the antidepressant-like action of group II mGlu receptor antagonist, MGS0039. *Psychopharmacology (Berl)* 212, 523-535.
- Pandolfo, P., Silveirinha, V., dos Santos-Rodrigues, A., Venance, L., Ledent, C., Takahashi, R.N., Cunha, R.A., Kofalvi, A., 2011. Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum. *Eur J Pharmacol* 655, 38-45.
- Paradisi, A., Pasquariello, N., Barcaroli, D., Maccarrone, M., 2008. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *J Biol Chem* 283, 6005-6012.
- Pariante, C.M., Lightman, S.L., 2008. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31, 464-468.
- Parker, K.J., Schatzberg, A.F., Lyons, D.M., 2003. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Hormones and behavior* 43, 60-66.
- Parks, C.L., Robinson, P.S., Sibille, E., Shenk, T., Toth, M., 1998. Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10734-10739.
- Parolaro, D., Realini, N., Vigano, D., Guidali, C., Rubino, T., 2010. The endocannabinoid system and psychiatric disorders. *Exp Neurol* 224, 3-14.
- Parsey, R.V., Hastings, R.S., Oquendo, M.A., Hu, X., Goldman, D., Huang, Y.Y., Simpson, N., Arcement, J., Huang, Y., Ogden, R.T., Van Heertum, R.L., Arango, V., Mann, J.J., 2006. Effect of a triallelic functional polymorphism of the serotonin-transporter-linked promoter region on expression of serotonin transporter in the human brain. *Am J Psychiatry* 163, 48-51.
- Patel, S., Roelke, C.T., Rademacher, D.J., Cullinan, W.E., Hillard, C.J., 2004. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 145, 5431-5438.
- Pazos, M.R., Mohammed, N., Lafuente, H., Santos, M., Martinez-Pinilla, E., Moreno, E., Valdizan, E., Romero, J., Pazos, A., Franco, R., Hillard, C.J., Alvarez, F.J., Martinez-Orgado, J., 2013. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT(1A) and CB2 receptors. *Neuropharmacology* 71, 282-291.
- Perera, T.D., Park, S., Nemirovskaya, Y., 2008. Cognitive role of neurogenesis in depression and antidepressant treatment. *Neuroscientist* 14, 326-338.

Peroutka, S.J., Snyder, S.H., 1980. Regulation of serotonin₂ (5-HT₂) receptors labeled with [³H]spiroperidol by chronic treatment with the antidepressant amitriptyline. *J Pharmacol Exp Ther* 215, 582-587.

Perry, E.K., Marshall, E.F., Blessed, G., Tomlinson, B.E., Perry, R.H., 1983. Decreased imipramine binding in the brains of patients with depressive illness. *Br J Psychiatry* 142, 188-192.

Pierz, K.A., Thase, M.E., 2014. A review of vilazodone, serotonin, and major depressive disorder. *Prim Care Companion CNS Disord* 16.

Pilar-Cuellar, F., Vidal, R., Diaz, A., Castro, E., dos Anjos, S., Pascual-Brazo, J., Linge, R., Vargas, V., Blanco, H., Martinez-Villayandre, B., Pazos, A., Valdizan, E.M., 2013. Neural plasticity and proliferation in the generation of antidepressant effects: hippocampal implication. *Neural Plast* 2013, 537265.

Pisu, M.G., Dore, R., Mostallino, M.C., Loi, M., Pibiri, F., Mameli, R., Cadeddu, R., Secci, P.P., Serra, M., 2011. Down-regulation of hippocampal BDNF and Arc associated with improvement in aversive spatial memory performance in socially isolated rats. *Behav Brain Res* 222, 73-80.

Popoli, M., Brunello, N., Perez, J., Racagni, G., 2000. Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs. *J Neurochem* 74, 21-33.

Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229, 327-336.

Portenoy, R.K., Ganai-Motan, E.D., Allende, S., Yanagihara, R., Shaiova, L., Weinstein, S., McQuade, R., Wright, S., Fallon, M.T., 2012. Nabiximols for opioid-treated cancer patients with poorly-controlled chronic pain: a randomized, placebo-controlled, graded-dose trial. *J Pain* 13, 438-449.

Porter, B.E., Jacobson, C., 2013. Report of a parent survey of cannabidiol-enriched cannabis use in pediatric treatment-resistant epilepsy. *Epilepsy Behav* 29, 574-577.

Posternak, M.A., Zimmerman, M., 2005. Dual reuptake inhibitors incur lower rates of tachyphylaxis than selective serotonin reuptake inhibitors: a retrospective study. *J Clin Psychiatry* 66, 705-707.

Preskorn, S.H., Baker, B., Kolluri, S., Menniti, F.S., Krams, M., Landen, J.W., 2008. An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28, 631-637.

Price, H.L., 1960. A dynamic concept of the distribution of thiopental in the human body. *Anesthesiology* 21, 40-45.

Price, J.L., Drevets, W.C., 2010. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35, 192-216.

Pucadyil, T.J., Kalipatnapu, S., Chattopadhyay, A., 2005. Membrane organization and dynamics of the G-protein-coupled serotonin_{1A} receptor monitored using fluorescence-based approaches. *J Fluoresc* 15, 785-796.

Quirk, J.C., Nisenbaum, E.S., 2002. LY404187: a novel positive allosteric modulator of AMPA receptors. *CNS drug reviews* 8, 255-282.

Raadsheer, F.C., Hoogendijk, W.J., Stam, F.C., Tilders, F.J., Swaab, D.F., 1994. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60, 436-444.

Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Batkai, S., Hasko, G., Liaudet, L., Drel, V.R., Obrosova, I.G., Pacher, P., 2007. Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H610-619.

Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., 2007. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS & neurological disorders drug targets* 6, 219-233.

Ramer, R., Heinemann, K., Merkord, J., Rohde, H., Salamon, A., Linnebacher, M., Hinz, B., 2013. COX-2 and PPAR-gamma confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 12, 69-82.

Raymond, J.R., Mukhin, Y.V., Gettys, T.W., Garnovskaya, M.N., 1999. The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br J Pharmacol* 127, 1751-1764.

Realini, N., Vigano, D., Guidali, C., Zamberletti, E., Rubino, T., Parolaro, D., 2011. Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology* 60, 235-243.

Redmond, A.M., Kelly, J.P., Leonard, B.E., 1997. Behavioural and neurochemical effects of dizocilpine in the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 58, 355-359.

Rekand, T., 2014. THC:CBD spray and MS spasticity symptoms: data from latest studies. *Eur Neurol* 71 Suppl 1, 4-9.

Ren, Y., Whittard, J., Higuera-Matas, A., Morris, C.V., Hurd, Y.L., 2009. Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *J Neurosci* 29, 14764-14769.

Renner, U., Zeug, A., Woehler, A., Niebert, M., Dityatev, A., Dityateva, G., Gorinski, N., Guseva, D., Abdel-Galil, D., Frohlich, M., Doring, F., Wischmeyer, E., Richter, D.W., Neher, E., Ponimaskin, E.G., 2012. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Sci* 125, 2486-2499.

Resstel, L.B., Tavares, R.F., Lisboa, S.F., Joca, S.R., Correa, F.M., Guimaraes, F.S., 2009. 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 156, 181-188.

Rey, A.A., Purrio, M., Viveros, M.P., Lutz, B., 2012. Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB₁ and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 37, 2624-2634.

Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Vitoretti, L.B., Mariano-Souza, D.P., Quinteiro-Filho, W.M., Akamine, A.T., Almeida, V.I., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Palermo-Neto, J., 2012. Cannabidiol, a non-psychoactive plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol* 678, 78-85.

Ricci, L.C., Wellman, M.M., 1990. Monoamines: biochemical markers of suicide? *J Clin Psychol* 46, 106-116.

Ridder, S., Chourbaji, S., Hellweg, R., Urani, A., Zacher, C., Schmid, W., Zink, M., Hortnagl, H., Flor, H., Henn, F.A., Schutz, G., Gass, P., 2005. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci* 25, 6243-6250.

Rios, C., Gomes, I., Devi, L.A., 2006. μ opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol* 148, 387-395.

Risch, S.C., Nemeroff, C.B., 1992. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J Clin Psychiatry* 53 Suppl, 3-7.

Rock, E.M., Bolognini, D., Limebeer, C.L., Cascio, M.G., Anavi-Goffer, S., Fletcher, P.J., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., Parker, L.A., 2012. Cannabidiol, a non-psychoactive component of cannabis, attenuates vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT(1A) somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus. *Br J Pharmacol* 165, 2620-2634.

Roche, M., Kerr, D.M., Hunt, S.P., Kelly, J.P., 2012. Neurokinin-1 receptor deletion modulates behavioural and neurochemical alterations in an animal model of depression. *Behav Brain Res* 228, 91-98.

Rodriguez-Gaztelumendi, A., Rojo, M.L., Pazos, A., Diaz, A., 2009. Altered CB receptor-signaling in prefrontal cortex from an animal model of depression is reversed by chronic fluoxetine. *J Neurochem* 108, 1423-1433.

Romeas, T., Morissette, M.C., Mnie-Filali, O., Pineyro, G., Boye, S.M., 2009. Simultaneous anhedonia and exaggerated locomotor activation in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 205, 293-303.

Rossi, D.V., Valdez, M., Gould, G.G., Hensler, J.G., 2006. Chronic administration of venlafaxine fails to attenuate 5-HT1A receptor function at the level of receptor-G protein interaction. *Int J Neuropsychopharmacol* 9, 393-406.

Rubino, T., Realini, N., Braida, D., Alberio, T., Capurro, V., Vigano, D., Guidali, C., Sala, M., Fasano, M., Parolaro, D., 2009. The depressive phenotype induced in adult female rats by adolescent exposure to THC is associated with cognitive impairment and altered neuroplasticity in the prefrontal cortex. *Neurotox Res* 15, 291-302.

Rubino, T., Vigano, D., Premoli, F., Castiglioni, C., Bianchessi, S., Zippel, R., Parolaro, D., 2006. Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins in mouse brain during cannabinoid tolerance: a role for RAS-ERK cascade. *Mol Neurobiol* 33, 199-213.

Rubino, T., Vigano, D., Realini, N., Guidali, C., Braidà, D., Capurro, V., Castiglioni, C., Cherubino, F., Romualdi, P., Candeletti, S., Sala, M., Parolaro, D., 2008. Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* 33, 2760-2771.

Rueda, D., Galve-Roperh, I., Haro, A., Guzman, M., 2000. The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 58, 814-820.

Russo-Neustadt, A.A., Chen, M.J., 2005. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity. *Curr Pharm Des* 11, 1495-1510.

Russo, E.B., Burnett, A., Hall, B., Parker, K.K., 2005. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1A} receptors. *Neurochem Res* 30, 1037-1043.

Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J., 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152, 1092-1101.

Sagredo, O., Garcia-Arencibia, M., de Lago, E., Finetti, S., Decio, A., Fernandez-Ruiz, J., 2007. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol* 36, 82-91.

Saitoh, A., Hirose, N., Yamada, M., Nozaki, C., Oka, T., Kamei, J., 2006. Changes in emotional behavior of mice in the hole-board test after olfactory bulbectomy. *J Pharmacol Sci* 102, 377-386.

Salio, C., Doly, S., Fischer, J., Franzoni, M.F., Conrath, M., 2002. Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 329, 13-16.

Sanacora, G., Gueorguieva, R., Epperson, C.N., Wu, Y.T., Appel, M., Rothman, D.L., Krystal, J.H., Mason, G.F., 2004. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* 61, 705-713.

Sanders, A.R., Detera-Wadleigh, S.D., Gershon, E.S., 1999. Molecular genetics of mood disorders. In *Neurobiology of Mental illness*. . Oxford, New York

Santana, N., Bortolozzi, A., Serrats, J., Mengod, G., Artigas, F., 2004. Expression of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14, 1100-1109.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.

Sapolsky, R.M., 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57, 925-935.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.

Sargent, P.A., Kjaer, K.H., Bench, C.J., Rabiner, E.A., Messa, C., Meyer, J., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Cowen, P.J., 2000. Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry* 57, 174-180.

Sastre-Garriga, J., Vila, C., Clissold, S., Montalban, X., 2011. THC and CBD oromucosal spray (Sativex(R)) in the management of spasticity associated with multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 11, 627-637.

Scott, A.I., Boddy, H., 2000. The effect of repeated bilateral electroconvulsive therapy on seizure threshold. *J ECT* 16, 244-251.

Schildkraut, J.J., 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122, 509-522.

Schubart, C.D., Sommer, I.E., van Gastel, W.A., Goetgebuer, R.L., Kahn, R.S., Boks, M.P., 2011. Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. *Schizophr Res* 130, 216-221.

SEIC, S.E.d.I.s.C., 2009. Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoides, Madrid.

Serpell, M., Ratcliffe, S., Hovorka, J., Schofield, M., Taylor, L., Lauder, H., Ehler, E., 2014. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group study of THC/CBD spray in peripheral neuropathic pain treatment. *Eur J Pain* 18, 999-1012.

Shearman, L.P., Rosko, K.M., Fleischer, R., Wang, J., Xu, S., Tong, X.S., Rocha, B.A., 2003. Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB₁ receptor inverse agonist AM251 in mice. *Behav Pharmacol* 14, 573-582.

Sheline, Y.I., Gado, M.H., Kraemer, H.C., 2003. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* 160, 1516-1518.

Shirayama, Y., Chen, A.C., Nakagawa, S., Russell, D.S., Duman, R.S., 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22, 3251-3261.

Shrivastava, A., Kuzontkoski, P.M., Groopman, J.E., Prasad, A., 2011. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther* 10, 1161-1172.

Sim, L.J., Selley, D.E., Childers, S.R., 1997. Autoradiographic visualization in brain of receptor-G protein coupling using [³⁵S]GTP gamma S binding. *Methods Mol Biol* 83, 117-132.

Slipczuk, L., Bekinshtein, P., Kathe, C., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2009. BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One* 4, e6007.

Smaga, I., Bystrowska, B., Gawlinski, D., Przegalinski, E., Filip, M., 2014. The endocannabinoid/endovanilloid system and depression. *Curr Neuropharmacol* 12, 462-474.

Smaga, I., Pomierny, B., Krzyzanowska, W., Pomierny-Chamiolo, L., Miszkiel, J., Niedzielska, E., Ogorka, A., Filip, M., 2012. N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: behavioral and biochemical analyses in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39, 280-287.

Soares Vde, P., Campos, A.C., Bortoli, V.C., Zangrossi, H., Jr., Guimaraes, F.S., Zuardi, A.W., 2010. Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT_{1A} receptors. *Behav Brain Res* 213, 225-229.

Soiza-Reilly, M., Commons, K.G., 2011. Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat* 41, 247-255.

Solinas, M., Massi, P., Cinquina, V., Valenti, M., Bolognini, D., Gariboldi, M., Monti, E., Rubino, T., Parolaro, D., 2013. Cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid compound, inhibits proliferation and invasion in U87-MG and T98G glioma cells through a multitarget effect. *PLoS One* 8, e76918.

Sonego, M., Zhou, Y., Oudin, M.J., Doherty, P., Lalli, G., 2013. In vivo postnatal electroporation and time-lapse imaging of neuroblast migration in mouse acute brain slices. *J Vis Exp*.

Song, C., Leonard, B.E., 2005. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 627-647.

Sonino, N., Fava, G.A., 2002. Erratum to "CNS drugs in Cushing's disease: pathophysiological and therapeutic implications for mood disorders" [*Prog. Neuro-Psychol. Biol. Psychiatry*, 26, 763 (2002)]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26, 1011-1018.

Soumier, A., Banasr, M., Lortet, S., Masméjean, F., Bernard, N., Kerkerian-Le-Goff, L., Gabriel, C., Millan, M.J., Mocaer, E., Daszuta, A., 2009. Mechanisms contributing to the phase-dependent regulation of neurogenesis by the novel antidepressant, agomelatine, in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34, 2390-2403.

Sprouse, J.S., Aghajanian, G.K., 1987. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1, 3-9.

Srivastava, M.D., Srivastava, B.I., Brouhard, B., 1998. Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology* 40, 179-185.

Stanley, M., Virgilio, J., Gershon, S., 1982. Tritiated imipramine binding sites are decreased in the frontal cortex of suicides. *Science* 216, 1337-1339.

Starkman, M.N., Giordani, B., Gebarski, S.S., Berent, S., Schork, M.A., Schteingart, D.E., 1999. Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry* 46, 1595-1602.

Starowicz, K., Nigam, S., Di Marzo, V., 2007. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114, 13-33.

Steiner, M.A., Marsicano, G., Nestler, E.J., Holsboer, F., Lutz, B., Wotjak, C.T., 2008. Antidepressant-like behavioral effects of impaired cannabinoid receptor type 1 signaling

coincide with exaggerated corticosterone secretion in mice. *Psychoneuroendocrinology* 33, 54-67.

Stockmeier, C.A., Dilley, G.E., Shapiro, L.A., Overholser, J.C., Thompson, P.A., Meltzer, H.Y., 1997. Serotonin receptors in suicide victims with major depression. *Neuropsychopharmacology* 16, 162-173.

Stockmeier, C.A., Shapiro, L.A., Dilley, G.E., Kolli, T.N., Friedman, L., Rajkowska, G., 1998. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* 18, 7394-7401.

Stone, J.M., Dietrich, C., Edden, R., Mehta, M.A., De Simoni, S., Reed, L.J., Krystal, J.H., Nutt, D., Barker, G.J., 2012. Ketamine effects on brain GABA and glutamate levels with 1H-MRS: relationship to ketamine-induced psychopathology. *Mol Psychiatry* 17, 664-665.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 89-97.

Sulcova, E., Mechoulam, R., Frider, E., 1998. Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol Biochem Behav* 59, 347-352.

Sulser, F., Vetulani, J., Mobley, P.L., 1978. Mode of action of antidepressant drugs. *Biochem Pharmacol* 27, 257-261.

Sullivan, P.F., Neale, M.C., Kendler, K.S., 2000. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157, 1552-1562.

Syed, Y.Y., McKeage, K., Scott, L.J., 2014. Delta-9-tetrahydrocannabinol/cannabidiol (Sativex(R)): a review of its use in patients with moderate to severe spasticity due to multiple sclerosis. *Drugs* 74, 563-578.

Takahashi, E., Katayama, M., Niimi, K., Itakura, C., 2008. Additive subthreshold dose effects of cannabinoid CB(1) receptor antagonist and selective serotonin reuptake inhibitor in antidepressant behavioral tests. *Eur J Pharmacol* 589, 149-156.

Tang, S.J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Schuman, E.M., 2002. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 467-472.

Tanimura, A., Kawata, S., Hashimoto, K., Kano, M., 2009. Not glutamate but endocannabinoids mediate retrograde suppression of cerebellar parallel fiber to Purkinje cell synaptic transmission in young adult rodents. *Neuropharmacology* 57, 157-163.

Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., Pertwee, R.G., 2007. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 150, 613-623.

Tiraboschi, E., Tardito, D., Kasahara, J., Moraschi, S., Pruneri, P., Gennarelli, M., Racagni, G., Popoli, M., 2004. Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades. *Neuropsychopharmacology* 29, 1831-1840.

Tong, C.K., Chen, J., Cebrian-Silla, A., Mirzadeh, Z., Obernier, K., Guinto, C.D., Tecott, L.H., Garcia-Verdugo, J.M., Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., 2014. Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell* 14, 500-511.

Toth, A., Blumberg, P.M., Boczan, J., 2009. Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitam Horm* 81, 389-419.

Toth, C.C., Jedrzejewski, N.M., Ellis, C.L., Frey, W.H., 2nd, 2010. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. *Mol Pain* 6, 16.

Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K., Walker, J.M., 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393-411.

Tsou, K., Mackie, K., Sanudo-Pena, M.C., Walker, J.M., 1999. Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 93, 969-975.

Twardowsky, A., Castiblanco-Urbina, M.A., Uribe-Marino, A., Biagioni, A.F., Salgado-Rohner, C.J., Crippa, J.A., Coimbra, N.C., 2013. The role of 5-HT1A receptors in the anti-aversive effects of cannabidiol on panic attack-like behaviors evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (Reptilia, Boidae). *J Psychopharmacol* 27, 1149-1159.

Tzavara, E.T., Davis, R.J., Perry, K.W., Li, X., Salhoff, C., Bymaster, F.P., Witkin, J.M., Nomikos, G.G., 2003. The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol* 138, 544-553.

Uriguen, L., Perez-Rial, S., Ledent, C., Palomo, T., Manzanares, J., 2004. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* 46, 966-973.

Vaidya, V.A., Duman, R.S., 2001. Depression--emerging insights from neurobiology. *Br Med Bull* 57, 61-79.

Valdizán, E.M., S; Gonzalez-Maeso, J.; Rodriguez-Puertas, R.; Meana, J.J.; Sallés, J., 2011. Functionality of cannabinoid receptors in the prefrontal cortex of major depression suicide victims: influence of antidepressant treatment at time of death., XIV Congreso Nacional de Neurociencia (SENC), Salamanca.

Valvassori, S.S., Elias, G., de Souza, B., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Kapczinski, F., Trzesniak, C., Tumas, V., Dursun, S., Chagas, M.H., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Quevedo, J., Crippa, J.A., 2011. Effects of cannabidiol on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychopharmacol* 25, 274-280.

Valzelli, L., 1973. The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia* 31, 305-320.

van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 1995. Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376, 781-784.

van der Stelt, H.M., Breuer, M.E., Olivier, B., Westenberg, H.G., 2005. Permanent deficits in serotonergic functioning of olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study. *Biol Psychiatry* 57, 1061-1067.

van Riesen, H., Leonard, B.E., 1990. Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Ther* 47, 21-34.

Veith, R.C., Lewis, N., Langohr, J.I., Murburg, M.M., Ashleigh, E.A., Castillo, S., Peskind, E.R., Pascualy, M., Bissette, G., Nemeroff, C.B., et al., 1993. Effect of desipramine on cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in human subjects. *Psychiatry Res* 46, 1-8.

Verge, D., Daval, G., Marcinkiewicz, M., Patey, A., el Mestikawy, S., Gozlan, H., Hamon, M., 1986. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci* 6, 3474-3482.

Vetulani, J., Stawarz, R.J., Dingell, J.V., Sulser, F., 1976. A possible common mechanism of action of antidepressant treatments: reduction in the sensitivity of the noradrenergic cyclic AMP generating system in the rat limbic forebrain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 293, 109-114.

Vidal, R., Pilar-Cuellar, F., dos Anjos, S., Linge, R., Treceno, B., Vargas, V.I., Rodriguez-Gaztelumendi, A., Mostany, R., Castro, E., Diaz, A., Valdizan, E.M., Pazos, A., 2011. New strategies in the development of antidepressants: towards the modulation of neuroplasticity pathways. *Curr Pharm Des* 17, 521-533.

Videbech, P., Ravnkilde, B., 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* 161, 1957-1966.

Voikar, V., Polus, A., Vasar, E., Rauvala, H., 2005. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav* 4, 240-252.

Wager-Miller, J., Westenbroek, R., Mackie, K., 2002. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids* 121, 83-89.

Wang, D., Noda, Y., Tsunekawa, H., Zhou, Y., Miyazaki, M., Senzaki, K., Nabeshima, T., 2007. Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety. *Behav Brain Res* 178, 262-273.

Warner-Schmidt, J.L., Duman, R.S., 2006. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16, 239-249.

Webster, H.H., Flores, G., Marcotte, E.R., Cecyre, D., Quirion, R., Srivastava, L.K., 2000. Olfactory bulbectomy alters NMDA receptor levels in the rat prefrontal cortex. *Synapse* 37, 159-162.

Wheal, A.J., Cipriano, M., Fowler, C.J., Randall, M.D., O'Sullivan, S.E., 2014. Cannabidiol improves vasorelaxation in Zucker diabetic fatty rats through cyclooxygenase activation. *J Pharmacol Exp Ther* 351, 457-466.

Witkin, J.M., Marek, G.J., Johnson, B.G., Schoepp, D.D., 2007. Metabotropic glutamate receptors in the control of mood disorders. *CNS & neurological disorders drug targets* 6, 87-100.

- Woehler, A., Wlodarczyk, J., Ponimaskin, E.G., 2009. Specific oligomerization of the 5-HT1A receptor in the plasma membrane. *Glycoconj J* 26, 749-756.
- Wong, E.Y., Herbert, J., 2006. Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* 137, 83-92.
- Wrynn, A.S., Mac Sweeney, C.P., Franconi, F., Lemaire, L., Pouliquen, D., Herlidou, S., Leonard, B.E., Gandon, J., de Certaines, J.D., 2000. An in-vivo magnetic resonance imaging study of the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Brain Res* 879, 193-199.
- Wu, H.Y., Chu, R.M., Wang, C.C., Lee, C.Y., Lin, S.H., Jan, T.R., 2008. Cannabidiol-induced apoptosis in primary lymphocytes is associated with oxidative stress-dependent activation of caspase-8. *Toxicol Appl Pharmacol* 226, 260-270.
- Yang, C., Hu, Y.M., Zhou, Z.Q., Zhang, G.F., Yang, J.J., 2013. Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. *Upsala journal of medical sciences* 118, 3-8.
- Yang, L., Rozenfeld, R., Wu, D., Devi, L.A., Zhang, Z., Cederbaum, A., 2014. Cannabidiol protects liver from binge alcohol-induced steatosis by mechanisms including inhibition of oxidative stress and increase in autophagy. *Free Radic Biol Med* 68, 260-267.
- Yatham, L.N., Liddle, P.F., Dennie, J., Shiah, I.S., Adam, M.J., Lane, C.J., Lam, R.W., Ruth, T.J., 1999. Decrease in brain serotonin 2 receptor binding in patients with major depression following desipramine treatment: a positron emission tomography study with fluorine-18-labeled setoperone. *Arch Gen Psychiatry* 56, 705-711.
- Yu, J.J., Zhang, Y., Wang, Y., Wen, Z.Y., Liu, X.H., Qin, J., Yang, J.L., 2013. Inhibition of calcineurin in the prefrontal cortex induced depressive-like behavior through mTOR signaling pathway. *Psychopharmacology (Berl)* 225, 361-372.
- Zanelati, T.V., Biojone, C., Moreira, F.A., Guimaraes, F.S., Joca, S.R., 2010. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol* 159, 122-128.
- Zarate, C.A., Jr., Singh, J.B., Carlson, P.J., Brutsche, N.E., Ameli, R., Luckenbaugh, D.A., Charney, D.S., Manji, H.K., 2006. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63, 856-864.
- Zhao, L., Levine, E.S., 2014. BDNF-endocannabinoid interactions at neocortical inhibitory synapses require phospholipase C signaling. *J Neurophysiol* 111, 1008-1015.
- Zhou, Y., Oudin, M.J., Gajendra, S., Sonogo, M., Falenta, K., Williams, G., Lalli, G., Doherty, P., 2015. Regional effects of endocannabinoid, BDNF and FGF receptor signalling on neuroblast motility and guidance along the rostral migratory stream. *Molecular and Cellular Neuroscience* 64, 32-43.
- Zhu, W.L., Shi, H.S., Wang, S.J., Wu, P., Ding, Z.B., Lu, L., 2011. Hippocampal CA3 calcineurin activity participates in depressive-like behavior in rats. *J Neurochem* 117, 1075-1086.

Zink, M., Vollmayr, B., Gebicke-Haerter, P.J., Henn, F.A., 2010. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology* 58, 465-473.

Zuardi, A.W., Cosme, R.A., Graeff, F.G., Guimaraes, F.S., 1993. Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol* 7, 82-88.

Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Hallak, J.E., Moreira, F.A., Guimaraes, F.S., 2006. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res* 39, 421-429.

Zueger, M., Urani, A., Chourbaji, S., Zacher, C., Roche, M., Harkin, A., Gass, P., 2005. Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. *Neurosci Lett* 374, 142-146.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., Hogestatt, E.D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452-457.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

ESTUDIOS *IN VITRO* DE LA FARMACODONAMIA DEL CANNABIDIOL MEDIANTE TÉCNICAS DE FIJACIÓN DE RADIOLIGANDOS

Dados los resultados obtenidos en los estudios autorradiográficos sobre la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} y CB₁, así como los resultados de los estudios de liberación de neurotransmisores en corteza prefrontal en el cerebro de los animales bulbectomizados tras el tratamiento crónico con CBD, se planteó la realización de ensayos complementarios en homogeneizados de membranas de corteza cerebral (que a continuación se describen) con el fin de determinar el mecanismo farmacodinámico del CBD *in vitro* y las posibles diferencias entre su efecto en animales control y bulbectomizados.

La primera aproximación se centró en el estudio de la afinidad del CBD sobre el 5-HTT, así como sus efectos sobre la funcionalidad de las proteínas G acopladas a receptores. Se estudiaron los efectos del CBD sobre la señalización de los receptores acoplados a proteínas G, tanto individualmente como en presencia de antagonistas específicos para diferentes receptores de membrana. También se analizó la influencia del CBD sobre la fijación específica de [³⁵S]GTPγS en solitario (en membranas de animal control y KO/WT del receptor CB₁) y en presencia de agonistas de los receptores CB₁ y 5-HT_{1A}.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para los estudios de fijación de [35 S]GTP γ S se utilizaron homogeneizados de membranas de ratones C57BL6 (controles, OBX y sham), y ratones C57BL6 *knock out* del receptor CB $_1$ (KO) y wild type (WT).

1. Marcaje del transportador de serotonina (5-HTT)

1.1. Preparación de homogeneizados de membranas de corteza cerebral

Se sacrificaron animales, se extrajeron los cerebros, se disecó la corteza y las muestras fueron posteriormente almacenadas a -80°C hasta la preparación de los homogeneizados de membranas sinaptosomales. Las muestras de corteza fueron homogeneizadas (1:25 peso/vol) en un tampón frío (Tris HCl 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 5mM). Los homogeneizados tisulares se centrifugaron a 45000 G durante 10 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada de eppendorf 5430R, con rotor tipo FA-45-30-11, Hamburgo, Alemania). Se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el mismo tampón y volumen. Se llevó a cabo otra centrifugación a 45000 G durante 10 minutos a 4°C. De nuevo, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el mismo tampón y volumen. Se centrifugo por tercera vez, a 45000 G durante 10 min a 4°C. El pellet final obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso para los experimentos de marcaje del transportador. Se realizó la determinación de la cantidad de proteínas de las muestras empleadas en el ensayo (mg/ml) según el método propuesto por Lowry y colaboradores (Lowry *et al.*, 1951).

1.2. Ensayos de fijación de [3 H]Citalopram

Las condiciones específicas para los ensayos de marcaje del 5-HTT con [3 H]citalopram fueron las descritas en protocolos previos (Yamaguchi, 1998) pero con ligeras modificaciones. Se incubó una alícuota de homogeneizados de membrana (50 mg de proteína) durante 1h a 25°C en el tampón de ensayo (Tris-

HCl 50 mM, NaCl 100 mM, KCl 5 mM, pH = 7.4), en presencia de fluoxetina 10 μ M para la fijación no-específica. Se utilizó paroxetina como agonista que se ensayó para un amplio rango de concentraciones y se añadió (-)-cannabidiol como desplazante a 3 concentraciones distintas (10^{-8} , 10^{-6} y 10^{-4} M).

Al final de la incubación, el filtrado y lavado de la mezcla se realizó en un tampón de filtrado (Tris-HCl 50 mM, pH = 7.4 a 4°C) y usando filtros Whatman GF/C no pretratados. La radioactividad contenida en los filtros se midió por espectroscopía en líquido de centelleo Ecoscint A (National Diagnosis, Atlanta, USA) mediante un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman LS 6000IC (Beckman Instruments Inc, CA, USA) durante un minuto.

2. Estudios de fijación de [35 S]GTP γ S estimulada

2.1. Preparación de homogeneizados de membranas de corteza cerebral y tronco del encéfalo

Se sacrificaron animales control y se extrajo su corteza cerebral para el estudio de los efectos del CBD sobre la fijación de la [35 S]GTP γ S. Una serie de animales sham y OBX fueron sacrificados y sus PFCxs disecadas para el estudio de los efectos del CBD sobre la fijación de [35 S]GTP γ S para cada uno de los fenotipos. Las muestras fueron posteriormente almacenadas a -80°C hasta la preparación de los homogeneizados de membranas sinaptosomales. Fueron homogeneizadas (1:100 peso/vol) en un tampón frío (sacarosa 250 mM, Tris HCl 50 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 3mM, DTT 1mM y, pH = 7.4). Los homogeneizados tisulares se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada de eppendorf 5430R, con rotor tipo FA-45-30-11, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en tampón (Tris HCl 50 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 3mM, DTT 1mM y, pH = 7.4) y fue recentrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. En el caso de las membranas de tronco del encéfalo se realizó una etapa de incubación a 37 °C durante 15 min previa a la

centrifugación, a fin de eliminar los posibles restos de neurotransmisores y de este modo incrementar la sensibilidad del método. El pellet final obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso para los experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS. Se realizó la determinación de la cantidad de proteínas de las muestras empleadas en el ensayo (mg/ml) según el método propuesto por Lowry y colaboradores (Lowry et al., 1952).

2.2. Fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por (-)Cannabidiol

Los experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS se realizaron como está descrito en la literatura (González-Maeso *et al.*, 2000) con ligeras modificaciones. Se preincubó una alícuota de homogeneizados de membrana (50 µg de proteína) durante 30 min a 30 °C en el tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, GDP 30 µM, adenosin deaminasa 10 mU/ml, BSA 0.1%, pH = 7.4) conteniendo la [³⁵S]GTPγS a 0.1 nM y los antagonistas. Posteriormente se añadió el CBD y se incubó durante 1 hora. Se ensayó un amplio rango de concentraciones para el CBD (10⁻⁹ a 10⁻³ M) a fin de estudiar la estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS (potencia y eficacia). La actividad basal fue determinada en ausencia de CBD, la fijación estimulada en presencia del fármaco, y la fijación no específica en presencia de GTPγS a 10 µM. La especificidad farmacológica del efecto del CBD se probó con diferentes antagonistas de distintos receptores a fin de encontrar el principal responsable: AM251, AM630, WAY100635, LY341495, DPCPX. Al final de la incubación, el filtrado y lavado de la mezcla se realizó como ya se ha descrito anteriormente.

2.3. Modulación por (-)Cannabidiol de la fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por WIN552122

Se estudió si diferentes concentraciones de CBD (10⁻⁸M a 10⁻³M) antagonizaban la fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada con WIN552122. El protocolo a seguir fue similar al utilizado en el apartado anterior. Se incubó una alícuota de

homogeneizados de membrana durante 1 hora en el tampón de ensayo conteniendo la [35 S]GTP γ S, el agonista WIN552122 en un amplio rango de concentraciones, y el CBD. Después se procedió al filtrado y lavado de la mezcla, que se realizó del modo descrito anteriormente.

2.4. Modulación por (-)Cannabidiol de la fijación de [35 S]GTP γ S estimulada por (+)8-(OH)-DPAT

Se ensayó también como diferentes concentraciones de CBD (10^{-8} M a 10^{-6} M) modulaban la fijación específica de [35 S]GTP γ S estimulada con (+)8-(OH)-DPAT. Se incubó una alícuota de homogeneizados de membrana (50 μ g de proteína) durante 1h min a 30 °C en el tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, GDP 300 μ M, adenosin deaminasa 10 mU/ml, pH = 7.4) conteniendo la [35 S]GTP γ S a 0.1 nM, el agonista (+)8-(OH)-DPAT en un amplio rango de concentraciones y el CBD. Al final de la incubación, el filtrado y lavado de la mezcla se realizó de cómo ya se ha descrito anteriormente.

2.5. Análisis de resultados de fijación de [35 S]GTP γ S estimulada

Los experimentos de fijación de [35 S]GTP γ S en membranas de corteza se llevaron a cabo usando triplicados y los resultados se expresan como la media $\pm$ E.E.M. de los n valores obtenidos de cada grupo experimental. La Emax (máximo efecto estimulador expresado como porcentaje de la fijación basal) y pEC₅₀ (potencia expresada como -logEC₅₀) para los experimentos de fijación a [35 S]GTP γ S en membranas de corteza fueron determinados por un análisis de regresión no lineal usando el programa GraphPad Prism 5.01. Para los experimentos de modulación de fijación específica de [35 S]GTP γ S estimulada con (+)8-(OH)-DPAT se utilizó como test estadístico la prueba *t de student* aplicada a cada punto de la curva.

RESULTADOS

1. Desplazamiento de la unión de [^3H]Citalopram al transportador de serotonina por Cannabidiol

Dado que la administración de CBD promovió efectos antidepresivos y liberación de 5-HT en PFCx de animales deprimidos, se comprobó si el mecanismo de acción del CBD se correspondía con una inhibición de la recaptación de 5-HT por bloqueo de su transportador, del mismo modo que sucede con los fármacos antidepresivos clásicos (SSRIs). Para ello, se realizó el marcaje del 5-HTT con [^3H]Citalopram y posteriormente se procedió al desplazamiento de su unión con CBD, utilizando como control interno paroxetina (IC_{50} : 13 nM).

Los resultados de los estudios de marcaje demostraron que el CBD no muestra apenas afinidad por el 5-HTT, puesto que a la concentración de 1 μM desplazó únicamente el 20 % de la fijación específica del [^3H]Citalopram, por lo que se descartó esta posibilidad.

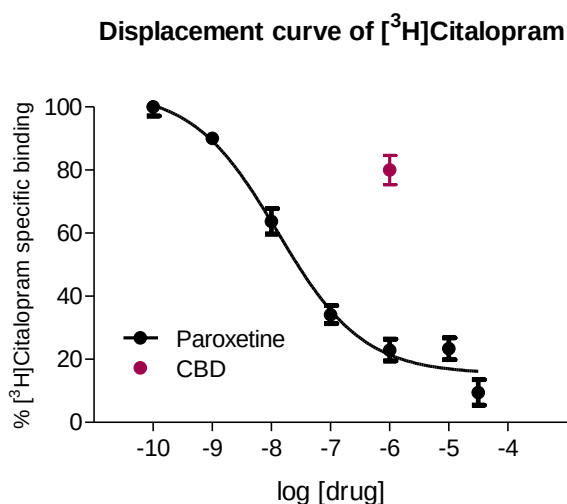


Figura 38. Curva de marcaje con [^3H]Citalopram y desplazamiento con paroxetina como control en homogeneizados de membrana de corteza de ratón. El CBD apenas es capaz de desplazar el 20 % de la fijación específica a 10^{-6}M . Resultados representados como % de la fijación específica del radioligando respecto al logaritmo de la concentración de fármaco.

2. Estudios de fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por Cannabidiol

A fin de recabar más información acerca del mecanismo de acción mediante el cual el CBD desencadena la liberación de 5-HT y glutamato, se llevaron a cabo una serie de experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS. El principal objetivo consistía en comprobar si el CBD posee alguna actividad sobre, principalmente, receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$, tales como el 5-HT_{1A} y el CB₁, GlumR_{2/3}...y que justificasen, por tanto, la respuesta liberadora de neurotransmisores en vmPFCx que en este trabajo se describe.

En primer lugar, el CBD indujo una inhibición de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS en homogenizados de membranas de corteza de ratones C57BL6, con una potencia de $4,8 \times 10^{-5} \text{M} \pm$ y una eficacia del $42\% \pm 3.5$, que podría ser indicativo de agonismo inverso.

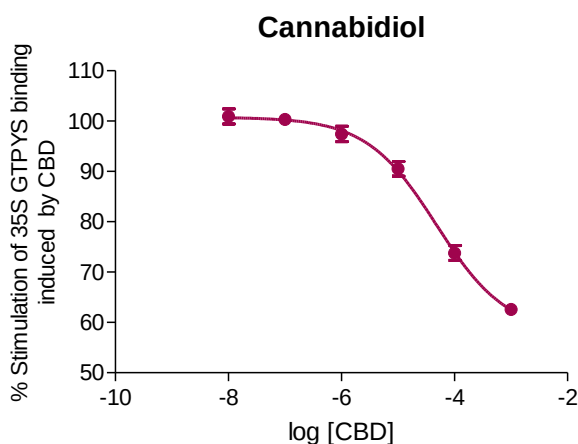


Figura 39. Curva de fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por CBD a diferentes concentraciones en homogeneizados de membranas de corteza de ratón. Resultados representados como % de la fijación específica del radioligando respecto al logaritmo de la concentración de fármaco, y expresados como promedio $\pm$ SEM.

Por otra parte, y dado que los efectos de la administración de CBD *in vivo* tanto en aproximaciones conductuales como en experimentos de microdiálisis dependen significativamente del fenotipo animal (sham vs. OBX), se procedió al estudio de los efectos de CBD sobre la fijación de [35 S]GTP γ S, en membranas de PFCx de animales OBX en comparación a sus efectos en membranas de animales sham. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos OBX y sham en la curva de fijación específica de [35 S]GTP γ S en presencia de CBD, reproduciéndose con ambos fenotipos los resultados obtenidos en corteza de animales control (Eficacia de la inhibición SHAM: 48.67 % $\pm$ 5.39, OBX: 47.12 % $\pm$ 7.15).

En segundo lugar, se trató de antagonizar farmacológicamente la inhibición de la fijación específica de [35 S]GTP γ S inducida por CBD, utilizando antagonistas de diversos receptores acoplados a proteínas G_i, que pudiesen ser diana del CBD. Ninguno de los antagonistas probados (WAY100635, AM251, AM630, LY341495, DPCPX) fue capaz de revertir el descenso de la fijación de [35 S]GTP γ S promovido por CBD a concentraciones altas.

3. Estudio de la actividad antagonista/agonista inverso del cannabidiol sobre el receptor CB₁ mediante técnicas de fijación de [35 S]GTP γ S estimulada con WIN552122 y en membranas ratones KO del receptor CB₁

Se estudió la actividad del CBD como antagonista/agonista inverso del receptor CB₁, efecto que ha sido descrito en la bibliografía (Thomas, 2007). Para ello, se realizaron curvas de desplazamiento de la fijación de [35 S]GTP γ S estimulada con WIN552122 en presencia de concentraciones crecientes de CBD. En esta serie de experimentos se encontró que el CBD posee cierta actividad como antagonista del receptor CB₁ *in vitro*, ya que es capaz de desplazar con relativa eficacia el ligando WIN552122.

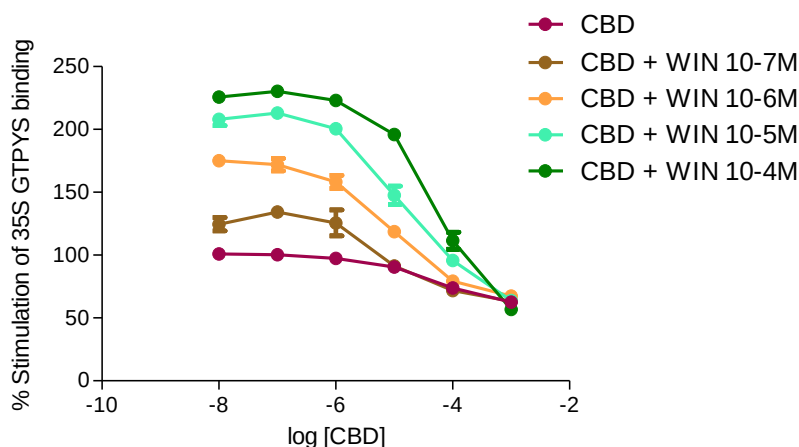


Figura 40. Curva de desplazamiento por CBD de la fijación de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ estimulada por WIN552122 en homogeneizados de membranas de corteza de ratón. Resultados representados como % de la fijación específica del radioligando respecto al logaritmo de la concentración de fármaco, y expresados como promedio $\pm$ SEM.

Posteriormente, se consideró de gran interés el estudio de la curva de CBD en membranas de ratones KO para el receptor CB_1 para averiguar si el descenso en la fijación de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ inducida por CBD se debe a una acción sobre dicho receptor. La curva de fijación de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ en presencia de CBD en animales KO no presentó diferencias significativas con respecto a los animales *wild type*, exhibiendo el característico descenso en el acoplamiento de proteínas G observado en todos los experimentos con CBD a concentraciones elevadas (Eficacia de la inhibición WT: $46.78\% \pm 17.62$, KO: $44.78\% \pm 9.77$). Estos resultados demuestran que el efecto inhibitorio del CBD sobre la fijación específica de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$, no está mediado por el receptor CB_1 .

4. Estudio de la modulación de la actividad del receptor 5-HT_{1A} por cannabidiol mediante fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada con 8-OH-DPAT

Por último, se realizó una curva de fijación específica de [³⁵S]GTPγS estimulada por 8-OH-DPAT en presencia de concentraciones crecientes de CBD. Otros autores han demostrado que el CBD a concentraciones bajas, potencia la fijación específica de [³⁵S]GTPγS estimulada por 8-OH-DPAT (Rock *et al.* 2012), por lo que se ha propuesto que el CBD podría promover sus efectos farmacológicos mediante una acción moduladora alostérica positiva sobre el receptor 5-HT_{1A}.

En membranas de corteza total no se encontró una potenciación clara, por lo que se procedió al estudio en membranas de tronco del encéfalo, con una preparación específica para la eliminación de los restos de serotonina en tejido. En este caso, se observó una potenciación significativa de la fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por 8-OH-DPAT en presencia de CBD 10⁻⁷M (p<0,05), con un incremento de la potencia de LogEC₅₀ 7.0 ± 0.3 para la 8-OH-DPAT sola, a un 7.4 ± 0.2 en presencia de CBD a 10⁻⁷M. Con CBD a 10⁻⁸M y 10⁻⁶M no se encontró un incremento significativo.

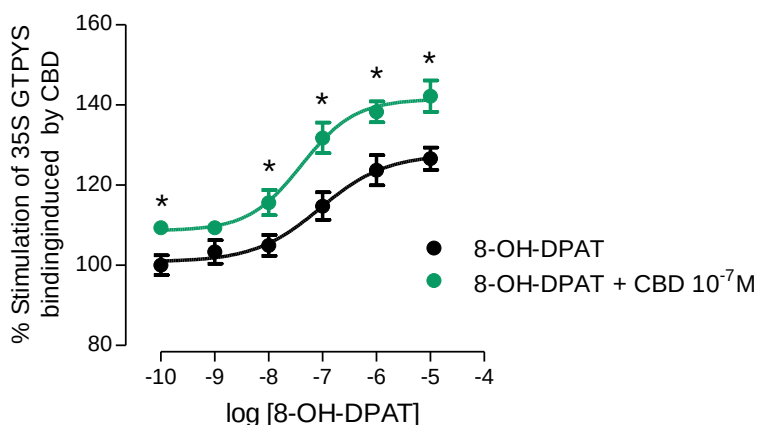


Figura 41. Curva de fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por 8-OH-DPAT en homogeneizados de membranas de tronco del encéfalo de ratón. Resultados representados como % de la fijación específica del radioligando respecto al logaritmo de la concentración de fármaco, y expresados como promedio ± SEM.

ANEXOS

Doctoral Thesis

(Summary)

*Cannabidiol potential for fast-antidepressant
therapy: behavioural, neurochemical, molecular
and cellular evidences. Implication of serotonergic
and glutamatergic systems*

Raquel Linge

2015

Supervisors: Álvaro Díaz and Ángel Pazos



This thesis was performed partially with the economic support of University of Cantabria (UC), as Raquel Linge Méndez is a recipient of a predoctoral research contract of the Institute of Biomedicine and Biotechnology of Cantabria (IBBTEC) (CSIC-UC-Sodercan).

This work was also supported by Spanish Ministry of Science (SAF07-61862), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2011-25020) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (*CIBERSAM*).

Research collaborations in this thesis were cofounded and undertaken in the laboratories of D. Patrick Doherty and D. Giovanna Lalli in the *Wolfson Centre for Age Related Diseases* of the *King's College University of London* (London, United Kingdom), and in the laboratory of D. Albert Adell in the Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB) (CSIC, IDIBAPS) of the Hospital Clínic de Barcelona (Barcelona, Spain).

ABBREVIATIONS LIST

4EBP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein

5-HT: Serotonin

5-HT_{1A}: Serotonin receptor type 1A

5-HT_{2A}: Serotonin receptor type 2A

5-HTT: Serotonin transporter

AEA: Anandamide

Akt: Protein kinase B

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor

AP: Anteroposterior

BDNF: Brain derived neurotrophic factor

BLA: Basolateral Amygdala

CB₁: Cannabinoid receptor type 1

CB₂: Cannabinoid receptor type 2

CBD: Cannabidiol

CNS: central nervous system

CREB: cAMP response element-binding protein

CUS: Chronic unpredictable stress

DRN: Dorsal raphe nucleus

DV: Dorsoventral

eCB: endocannabinoid

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

Fig.: Figure

FST: Forced swimming test

GABA: Gamma-aminobutyric acid

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GFP: Green fluorescent protein

GTP γ S: Guanosine 5'-O-[gamma-thio] triphosphate

HPA: Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis

HPLC: High-performance liquid chromatography

i.p.: Intraperitoneally

L: Lateral

mPFCx: Medial prefrontal cortex

mRNA: Ribonucleid acid messenger

mTOR: Mamalian target of Rapamycin

NSF: Novelty suppressed feeding test

OBX: Bilateral ofactory bulbectomy

OFT: Open field Test

p: phosphorylated

P2-3: 2-3 days pups

P70: P70 ribosomal serine/threonine kinase

PFA: Paraformaldehyde

PFCx: Prefrontal cortex

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

RMS: Rostral migratory stream

S.E.M: Standard error mean

SSRIs: Selective serotonin reuptake inhibitors

SVZ: Subventricular zone

TrkB: Tropomyosin receptor kinase B

TRPV1: Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1- Vanilloid receptor type 1.

vmPFCx: ventro medial prefrontal cortex

INDEX

INTRODUCTION	1
- <i>Olfactory Bulbectomy model: influence of housing conditions</i>	<i>2</i>
- <i>Putative antidepressant efficacy of Cannabidiol: pharmacological effects and mechanism of action related with antidepressant effects</i>	<i>4</i>
OBJECTIVES.....	7
- OBJECTIVES	8
MATERIAL AND METHODS	9
1. Animals	10
2. Experimental groups	10
3. Drugs and treatments.....	11
4. Olfactory Bulbectomy	11
5. Behavioural assessment	11
Open field Test	11
Novelty suppressed feeding.....	12
Forced swimming test.....	12
Sucrose intake test/ Sucrose preference test.....	13
Data analysis	13
6. Microdialysis studies	13
7. Functional autoradiography of G-protein coupled receptors	14
Stimulated [³⁵ S]GTP γ S autoradiography of 5-HT _{1A} receptor.....	14
Stimulated [³⁵ S]GTP γ S autoradiography of brain CB ₁ receptor	15
Data analysis	15
8. Western Blot.....	15
9. <i>In situ</i> Hybridization of BDNF and TrkB	16

10. Postnatal <i>in vivo</i> electroporation.....	17
11. Immunohistochemistry of gelatin embedded sections.....	17
12. Time-lapse imaging of brain slices using spinning disk confocal microscopy.....	18
RESULTS.....	19
A. SELECTION OF THE OPTIMAL HOUSING STRATEGY TO ASSESS ANTIDEPRESSANT ACTIVITY	20
Open Field Test	20
Novelty Suppressed Feeding	22
Forced Swimming Test	22
Sucrose Intake Test.....	23
B. BEHAVIOURAL, NEUROCHEMICAL, MOLECULAR AND CELLULAR EFFECTS OF CANNABIDIOL ASSOCIATED WITH ANTIDEPRESSANT ACTIONS	25
- <i>Optimization of cannabidiol administration regime</i>	25
- <i>Study of the effects of cannabidiol acute and chronic administration</i>	28
B.1. Fast and maintained antidepressant-like effects of cannabidiol in behavioural paradigms	28
Forced swimming test.....	28
Open field test	29
Sucrose preference test	30
B.2. Differential effects of acute and chronic cannabidiol on serotonin and glutamate release in ventro-medial prefrontal cortex	31
Acute cannabidiol administration	31
Chronic cannabidiol treatment.....	33
B.3. Alterations on 5-HT _{1A} receptor functionality induced by chronic cannabidiol.....	34
B.4. Alterations on CB ₁ receptor functionality induced by chronic cannabidiol.....	36

B.5. Impact of chronic cannabidiol administration on neuroplasticity intracellular pathways.....	37
B.6. Impact of cannabidiol administration on the morphology and migration process of subventricular zone-derived neuroblasts in postnatal brain	40
C. KEY ROLE OF 5-HT_{1A} RECEPTOR IN THE BEHAVIOURAL AND NEUROCHEMICAL EFFECTS OF CANNABIDIOL	43
C.1. 5-HT _{1A} receptor-dependent antidepressant-like effects of cannabidiol in the open field test	43
C.2. 5-HT _{1A} receptor-mediated inhibition of serotonin and glutamate efflux induced by cannabidiol	44
DISCUSSION	48
A. SOCIAL ISOLATION DIFFERENTIALLY AFFECTS ANXIETY AND DEPRESSIVE-LIKE RESPONSES OF BULBECTOMIZED MICE	49
B. CANNABIDIOL ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECTS: BEHAVIOURAL, NEUROCHEMICAL, MOLECULAR AND CELLULAR ASPECTS.....	51
C. 5-HT_{1A} RECEPTOR-MEDIATED FAST ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFICACY OF CANNABIDIOL	56
CONCLUSIONS.....	60
- CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES.....	61
REFERENCES.....	62
- REFERENCES	63
ANNEX.....	71
- ANNEX	72

INTRODUCTION

Olfactory Bulbectomy model: influence of housing conditions

Animal models are usually employed in psychopharmacological assays. Nevertheless, no single animal model can mimic by itself a complete psychiatric disorder, although in some cases, these approaches might be useful to replicate many of the symptoms associated or even to predict the effectiveness of some therapeutics (Markou et al., 2009). For this issue, animal models are unexpectedly helpful in the screening of new drugs in pharmacology, despite of the obvious limitations as a model of human diseases.

In this sense, bilateral olfactory bulbectomy (OBX), an animal model of depression with comorbid anxiety (Wang et al., 2007), has been extensively used for preclinical research in rodents, since it prompts some behavioural, neurochemical, neuroendocrine and immunological changes similar to those observed in depressive patients (Kelly et al., 1997; Song and Leonard, 2005). Bulbectomized animals display a typical phenotype accompanied with hyperactivity, increased exploratory behaviour and memory and learning deficits (Tadano et al., 2004; Zueger et al., 2005) that can be measured by some simple behavioural tests and thus, allowing the characterization of the “emotional and cognitive state” of the animals. Probably the most useful feature of this animal model is its predictive validity (Kelly et al., 1997; Song and Leonard, 2005) since clinically effective antidepressants and anxiolytics reverse some of the behavioural, neurochemical and structural disturbances exhibited by OBX animals (Jarosik et al., 2007; Sato et al., 2008; Song and Leonard, 2005), therefore representing a suitable tool for pharmacological research.

In addition, social environment can profoundly affect the emotional state of animals, and therefore, housing conditions play an important role in animal's health to determine the behavioural output of the model studied (Heidbreder et al., 2000; Lapiz et al., 2003; Valzelli, 1973), in such a way that a variation in these conditions could even lead to the transformation of the model in another different one. It has been previously described that social isolation in rodents prompts a myriad of behavioural, neurochemical and anatomical brain changes (Heidbreder et al., 2000; Voikar et al., 2005). It interferes with the development of the limbic system, which is involved in regulation of emotional behaviours and learning and memory formation (Gresack et al., 2010). All these alterations may be related to clinical symptoms and pathophysiology in patients with psychiatric disorders such as depression, schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder or anxiety (Fone and Porkess, 2008; Koike et al., 2009; Naert et al., 2011). In this sense, anxiety and depressive-like behaviour, hyperactivity, aggressiveness,

abnormal social interaction and cognitive impairment have been reported in some animal models such as post-weaning social isolation in mice (Ibi et al., 2008; Naert et al., 2011; Voikar et al., 2005).

In the first section of the thesis, we have studied the influence of social isolation to bulbectomized mice behaviour to determine if the combination of both models can result in either an improvement or limitation of the utility they display separately.

Putative antidepressant efficacy of Cannabidiol: pharmacological effects and mechanism of action related with antidepressant effects

Cannabinoid compounds have been used for recreational purposes and to improve mood by different cultures since ancient times. For this reason, the study of the endocannabinoid (eCB) system and cannabinoid derivatives has gained a great interest in anxiety /depression research (Bambico et al., 2007; Hill and Gorzalka, 2005; McLaughlin et al., 2007; Shearman et al., 2003).

In this regard, cannabidiol (CBD), the main non-psychomimetic component of marihuana, has shown anxiolytic properties both in humans and rodents (Bergamaschi et al., 2011; Guimaraes et al., 1990) and after acute or chronic administration even under pathological conditions (Campos and Guimaraes, 2008; Campos et al., 2013b; Resstel et al., 2009). Nevertheless, little is known about its potential for treating depression. It was proposed as a putative novel antidepressant as it displayed positive responses after acute administration in the forced swimming test (FST) in normal animals (El-Alfy et al., 2010; Zanelati et al., 2010) and in the novelty suppressed feeding test (NSF) in the chronic mild stress model (Campos et al., 2013b). Furthermore, CBD exerts a positive impact on some neuroplasticity markers of antidepressant effects; it has been shown to increase brain-derived neurotrophic factor levels (Magen et al., 2010), restores the impaired neuroproliferation of chronically stressed animals (Campos et al., 2013b), and also presents notable anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Esposito et al., 2011; Malfait et al., 2000).

The mechanism of action of CBD has been extensively scrutinized (McPartland et al., 2015). This multifaceted drug produces different pharmacological actions modulating several receptors in the central nervous system (CNS) (CB₁, CB₂, 5-HT_{1A}, TRPV1 and PPAR_γ receptors, among others) (Campos et al., 2013a; Campos et al., 2013b; Casarotto et al., 2010; Costa et al., 2004; Do Monte et al., 2013; Esposito et al., 2011; Pazos et al., 2013; Soares Vde et al., 2010; Thomas et al., 2007). Given the crosstalk among systems involved in mood control, the ability of CBD to modulate some of them, could result advantageous for the treatment of such a complex disease as depression. Among all the above highlighted mechanisms, the CB₁ and 5-HT_{1A} receptors seem to be the most strongly implicated in CBD mood regulatory effects. Pharmacological approaches with selective receptor antagonists showed that the acute anxiolytic-like and panicolytic-like properties of CBD are predominantly mediated by 5-HT_{1A} receptors (Campos et al., 2013a; Campos and Guimaraes, 2008; Resstel et al., 2009; Soares Vde

et al., 2010; Zanelati et al., 2010), whereas the anxiolytic-like effects induced by its chronic administration, involving neurogenic actions, seem to be CB₁-receptor dependent (Campos et al., 2013b). On the one hand, CBD has been reported to act as an antagonist/inverse agonist of CB₁ receptors (Thomas et al., 2007) and to increase anandamide (AEA) levels (Bisogno et al., 2001; Leweke et al., 2012). On the other hand, it has been shown to exert a positive allosteric modulation of 5-HT_{1A} receptors rather than a direct agonism (Rock et al., 2012), a fact that could explain the unexpected key role of these serotonergic receptors in many CBD effects.

However, there is scarce knowledge about the impact of CBD administration in serotonergic and glutamatergic pathways. Both neurotransmitters tones are key targets for the treatment of depression, since classical antidepressants act through serotonergic potentiation, and the effects of fast-acting agents are rather mediated by glutamatergic signalling (Du et al., 2006). Thus, the study of CBD effects upon these neurotransmitters release pattern would shed light on the mechanistic basis of CBD behavioural actions.

In this regard, 5-HT_{1A} receptor is expressed in the dorsal raphe nucleus (DRN) on serotonergic, local GABAergic interneurons and glutamatergic terminals (Celada et al., 2001) exerting an inhibitory function and controlling serotonergic neuronal firing, as well as in cortical interneurons and pyramidal cells affecting neurotransmitters efflux (Santana et al., 2004). Thereby, CBD acting as an allosteric modulator of 5-HT_{1A} receptors would alter the overall serotonergic and glutamatergic cortical release. Meanwhile, CBD affecting eCB system could also lead to an increase in neurotransmitters boost, since this system is also strongly implicated in the control of 5-HT (5-HT) and glutamate release at different locations (Bambico et al., 2007; Bisogno et al., 2001; Brown et al., 2003; McLaughlin et al., 2012; Mendiguren and Pineda, 2009; Navarrete and Araque, 2008).

Herein, we have evaluated the behavioural and neurochemical actions of CBD in the OBX model of depression, since its antidepressant efficacy under pathological conditions has not been proved yet. Acute and chronic approaches were undertaken in the present work. Firstly, we assayed the behavioural effects induced by acute and chronic administration of CBD, and in parallel we performed microdialysis studies to assess the CBD effects on the 5-HT and glutamate release in the ventromedial prefrontal cortex (vmPFCx), a pivotal area for the behavioural outcome depending on emotional status.

In addition, the functionality [³⁵S]GTPγS autoradiography of brain 5-HT_{1A} receptors following chronic administration of CBD was analysed, given their role in the mechanism

of action of antidepressants/anxiolytics (Gordon and Hen, 2004; Matsuda, 2013; Parks et al., 1998) and especially in this case, since 5-HT_{1A} receptors seem to play a key role in CBD actions. Also, the functionality of CB₁ receptors was assessed in some limbic brain areas, as some authors have demonstrated relevant alterations in their expression and functionality under pathological conditions and after effective antidepressant treatments (Hesketh et al., 2008; Hill et al., 2008a).

On the other hand, we investigated the impact of chronic CBD treatment on some neuroplasticity marker levels associated with antidepressant efficacy and depression such as BDNF, TrkB, Akt, ERK, CREB, Synapsin I and b-catenin. The mRNA expression of BDNF and TrkB was complementarily measured in certain brain locations. We also studied the mTOR intracellular pathway, which has been recently pointed as the main mediator of the effects of fast-acting antidepressants (Cryan et al., 2005; Li et al., 2010).

Accounting for the importance of neurogenesis and neuroplasticity in antidepressant efficacy, and the results on the previous experiments, we performed a study of the influence of CBD treatment in one of the two main regions that undergo neurogenesis in mammalian adult brain, the subventricular zone (SVZ). We analysed the influence of CBD treatment on the morphology and migration process of the neuroblasts generated in the SVZ that migrate along the rostral migratory stream (RMS) towards the olfactory bulb. The influence of eCB system and of BDNF/TrkB upon this process has been previously addressed (Bagley and Belluscio, 2010; Jin et al., 2004; Oudin et al., 2011; Zhou et al., 2015), although this cannabinoid compound with such a mysterious mechanism of action has not been assayed yet.

Finally, pharmacological antagonism studies were performed to better understand the mechanisms implicated in CBD behavioural and neurochemical outcomes.

OBJECTIVES

OBJECTIVES

The main objective of this doctoral thesis consisted in the evaluation of CBD as a potential antidepressant in an animal model of depression, through the study of the behavioural, neurochemical, molecular and cellular effects, as well as its mechanism of action.

The concrete objectives were:

- Behavioural characterization of the OBX model of depression in mice and the selection of the most appropriate housing strategy for the evaluation of antidepressant-like effects of drugs.
- Optimization of the regime of administration of CBD to obtain effective and fast antidepressant-like effects.
- Comprehensive study of the behavioural actions of CBD acute and chronic administration in tests used for antidepressants evaluation.
- Study of CBD effects on 5-HT and glutamate release in vmPFCx after its acute and chronic administration.
- Evaluation of the alterations induced by chronic CBD administration on 5-HT_{1A} and CB₁ receptors functionality in limbic brain areas.
- Study of chronic CBD impact on the expression levels of proteins of signalling pathways associated with depression and antidepressant actions.
- Determination mRNA expression of BDNF and TrkB in several brain areas.
- Analysis of the effects of CBD administration on the morphology and migratory processes of neuroblasts in postnatal brain along the RMS.
- *In vivo* assessment of CBD mechanism of action: pharmacological antagonism of CBD-induced behavioural effects.
- *In vivo* assessment of CBD mechanism of action: pharmacological antagonism of CBD-induced neurotransmitters release (5-HT and glutamate).

MATERIAL AND METHODS

1. Animals

Two mice strains were used in this thesis: C57BL6 for the majority of the experiments and CD1 for the studies of morphology and migration of neuroblasts.

Experiments were conducted with 2-3 month old male C57BL6 mice weighing 25-30 g. All procedures were carried out with the previous approval of the Animal Care Committee of the University of Cantabria and according to the Spanish legislation and the European Communities Council Directive on "Protection of Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes". They were housed in climate controlled rooms with 12h light-12h dark cycle. Food and water were given *ad libitum*. Social isolation procedure was performed during four weeks, starting immediately after OBX/sham surgery, and prior to any behavioural assessment. For this purpose, half of animals were single-housed and the remaining mice were returned to their cages with their littermates (groups of 3-6).

For the experiments of morphology and migration of neuroblasts, CD1 mice (P2 at the beginning of the experiments) of either sex were used (Charles River), which were separated from their progenitors to be sacrificed at the end of the experiments. These studies were conducted in the *Wolfson Centre for Age Related Diseases, King's College London University* (London, UK), in accordance with the UK Home Office Regulations (Animal Scientific Procedures Act, 1986).

2. Experimental groups

The experimental groups were designed based on the aim of each study and the requirements of each technique, and are specified in the results section. The number of animals per experimental group (n) is indicated in the results section.

In general, animals were classified depending on:

- The phenotype: Control (Co), sham-operated (SHAM), bulbectomized (OBX).
- Housing conditions: isolated mice (I) and grouped mice (G)
- Treatment: mice treated with vehicle (VEH), cannabidiol (CBD), WAY100635 (WAY), AM251 (AM), AM251 1mg/kg (AM1), NBQX disodium salt (NBQX).

3. Drugs and treatments

(-)-Cannabidiol, WAY100635, AM251 and NBQX disodium salt were dissolved in vehicle (2% Tween 80®: 5% Propilenglycol: saline).

Acute and chronic administration studies were conducted to investigate the behavioural actions induced by CBD. For the acute approaches, CBD 50 mg/kg, WAY100635 0.3 mg/kg, AM251 0.3 mg/kg, AM251 1mg/kg, NBQX 10 mg/kg were administered intraperitoneally (i.p.). For chronic approaches, CBD 50 mg/kg was administered for 3 days followed by 10 mg/kg for 11 days i.p. once per day (this regime of administration was selected after previous experiments for optimization of CBD antidepressant effects, data not shown). After the 2 weeks CBD treatment, animals were sacrificed and brain samples collected and stored at -80°C for the autoradiographic, western blot and *in situ* hybridization studies. To study neuroblast alterations either vehicle or CBD 50 mg/kg were administered i.p. once a day to the pups for 3 days and for time-lapse imaging of RMS sections, vehicle or CBD 10 µM were added to the culture medium. For the mechanistic studies, CBD 50 mg/kg in combination with antagonists were tested acutely in behavioural and microdialysis studies (vmPFCx).

4. Olfactory Bulbectomy

OBX was performed on mice anesthetized with isoflurane (2%; Schering Plough, United Kingdom). In brief, the head was shaven and a midline sagittal incision was made in the skin overlying the skull. A burr hole was drilled through which both olfactory bulbs were bilaterally aspirated by a suction pump. Finally, the burr hole was filled with bone wax in order to avoid further bleeding. At the end of the experiments, all animals were sacrificed and the lesions were verified. Sham operations were done in the same way, but with the bulbs left intact.

5. Behavioural assessment

Open field Test

Aversive open field test (OFT) was conducted to evaluate the OBX-induced behavioural outcome and to test the antidepressant-like actions measuring hyperactivity and

anxiolytic-like effects reflected in the central ambulation. Both the acute effects of CBD and persistent actions (24 hours post-injection) in the chronic approach were analysed.

The open field apparatus was a brightly lit (350 lux) white wooden box (50 x 50 x 30 cm) with white floor and luminescent walls. Mice were always released in the same area of the apparatus for 5 minutes, and behaviour was video-tracked by a computerized system (Any-maze Video-Tracking software, Stoelting Co., U.S.A.). Some parameters were analyzed depending on each experiment purpose (total distance traveled, distance traveled in the periphery, distance traveled in the center (30 x 30 cm), time spent in the center, number of entries to the central zone and number of rearings).

Novelty suppressed feeding

The NSF is normally used to assess the anxious-like state of animals reflected in the latency to feed and is useful for predicting antidepressant-like efficacy after chronic administration of drugs.

The NSF test was performed after 24 h of food deprivation (water available *ad libitum*). The test was done in a dimly lit (30-50 lux) open arena (50 × 50 x 30 cm) containing clean wood chip bedding and with a home cage food pellet (2 g) placed on the center. Each mouse was removed from the home cage, placed in one corner of the arena. The latency to begin a feeding episode (maximum time was 600 s) as well as the average speed (to evaluate the activity level) were evaluated with the aid of Any-maze Video-Tracking software (Stoelting Co., U.S.A.).

Forced swimming test

The FST measures the despair of the animals under highly stressful conditions and possesses predictive validity of putative antidepressant-like effects. Animals were individually placed in clear plastic cylinders (height 24 cm, internal diameter 12 cm) filled with 22 cm of water at 25–27 °C. Each mouse was videotaped from above for a total of 5 min and the digital video output was analyzed using Any-maze Video Tracking System (Stoelting Co., U.S.A.) to determine the accumulated immobility time (floating in the water without struggling, and making only those movements necessary to keep the head above water). The movement velocity threshold and sensitivity to immobility were chosen based on our validation of the automated system so that these parameters produced immobility

scores similar to those determined from manually scored tapes. The accumulated climbing time (active vigorous movements with the forepaws in and out of the water, usually directed against the cylinder walls) and swimming time (movement usually horizontal throughout the swim chamber) were manually scored by an experienced observer in blind conditions using the videotaped FST sessions.

Sucrose intake test/ Sucrose preference test

OBX-mice anhedonia was assessed in the sucrose intake/preference test as a behavioural marker of depressive-like state and to evaluate antidepressant-like actions.

Sucrose 1% was dissolved in drinking water and animals were trained to drink sucrose solutions during 2 days with free access to water and sucrose in their home cage, and the total fluid consumption per day was measured. Then for the sucrose intake test, they were deprived of any drinking solution for 24 hours and subsequently each animal was given free access to sucrose solutions for 1 hour in its home cage. The milliliters of sucrose consumed by each animal were recorded and the mean sucrose intake of each experimental group was compared. For the sucrose preference test, a choice of sucrose (1%) and water solutions were provided in the home cage and the consumption was quantified and compared. Food consumption and body weight were controlled in parallel when proceeded.

Data analysis

All the values in the figures and text are expressed as mean $\pm$ standard error mean (S.E.M.). The results were analyzed by two-way ANOVA to determine the interaction between two factors (surgery and housing strategy/ surgery and treatment) followed by *post-hoc* Student-Newman-Keuls test to compare the responses among all the groups (GraphPad Prism 5.0). A *p* value of <0.05 was considered significant.

6. Microdialysis studies

Probes were made and used in mice as previously described (Adell and Artigas, 1998). Concentric dialysis probes were implanted in the vmPFCx under sodium pentobarbital (40 mg/kg i.p.) anesthesia, using a stereotaxic apparatus (From Bregma: AP (+2.2), L (-

0.2), DV (-3.4)). Microdialysis experiments were conducted 24 h after surgery in freely moving mice by continuously perfusing probes. After a 180 min stabilization period, dialysate samples of 30 μ l were collected every 20 min, six 20-min fractions were collected to obtain basal values and another six samples after the i.p. administration of drugs (VEH/CBD/WAY/NBQX). Among the six basal samples, the four more stable were selected to calculate the basal mean that would serve for the rest of the calculations. 5-HT concentration in extracellular compartment is very low since the reuptake system is highly efficient. According to Adell et al. 1991, we added citalopram 1 μ M to the artificial cerebrospinal fluid (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.18 mM $MgCl_2$, y 1.26 mM $CaCl_2$) to inhibit the 5-HT reuptake, and thus allow the measurement of the neurotransmitter not altering the pattern of release. 5-HT and glutamate were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrochemical or fluorescent detector respectively. After the microdialysis experiments animals were sacrificed by decapitation. The position of the probes was checked by the infusion of a Fast Green® solution and posterior slicing of the brains in a cryostat. Those animals that had the probe out of the vmPFCx were excluded from the analysis.

A two-three way ANOVA of repeated measures was applied to the microdialysis data followed by a *post-hoc Student-Newman-Keuls*. Surgery, treatment and time were considered as factors. The levels of neurotransmitters were calculated for each sample, transformed into the percentage vs. basal value for each animal, and then the experimental groups were compared. To study the absolute basal levels of neurotransmitters after chronic treatment, the basal values of each animal were compared. We used the Statistica software (Sigma, Statsoft, Inc., USA) to perform the statistical analysis. A $p < 0.05$ was considered significant.

7. Functional autoradiography of G-protein coupled receptors

Stimulated [^{35}S]GTP γ S autoradiography of 5-HT $_{1A}$ receptor

Coronal brain sections (14 μ m) were cut at -20°C using a microtome cryostat, thaw-mounted in Superfrost Plus® slides (Thermo Fisher Scientific, USA) and stored at -80°C until use. [^{35}S]GTP γ S autoradiography was carried out as previously described (Sim et al., 1995) with slight modifications. A 20 min preincubation at 25 °C in buffer (Tris-HCl 50 mM, EGTA 0.2 mM, NaCl 100 mM y $MgCl_2$ 3 mM, GDP 2 mM, DTT 1 mM a pH = 7.4) was performed. Next, a 2 hour incubation was conducted at 25 °C in the same buffer

containing adenosine deaminase (10 mU/ml) and the [35 S]GTP γ S 0.05 nM, in absence (basal) or presence (stimulated) of 5-HT $_{1A}$ selective agonist (8-OH-DPAT). After the incubation, 2 washing steps were carried out at 4 °C for 15 min in buffer followed by a dipping in distilled water and then the slices were dried with cold air. Autoradiographic densities were determined by densitometry using Scion Image software (Scion Corporation, MD, USA) and transformed to nCi/g of tissue. Autoradiographic values of net agonist-stimulated [35 S]GTP γ S binding were calculated by subtracting basal binding from agonist-stimulated binding (using 10 μ M 8-OH-DPAT for stimulated condition) and the data are expressed as percentage of agonist-stimulated binding over basal activity (100%). For the non-specific binding calculation GTP γ S at 10 μ M was used.

Stimulated [35 S]GTP γ S autoradiography of brain CB $_1$ receptor

[35 S]GTP γ S stimulated autoradiography for CB $_1$ receptor procedure was conducted similarly to 5-HT $_{1A}$ assay but with particular modifications previously described (Sim et al., 1997). In this case the buffer contained BSA at 0.5% (pH =7.7) and the selective agonist for the stimulated condition was WIN552122 at 10 μ M.

Data analysis

After developing, images were quantified by densitometry using Scion Image® program and groups were statistically compared by two-way ANOVA (factors: surgery and treatment) followed by a *Student-Newman-Keuls post-hoc* analysis.

8. Western Blot

After behavioural assessment, animals were killed by decapitation, their brains removed from the skulls, PFCx and hippocampus dissected on ice and rapidly stored at -80°C. For total cell lysate, samples were homogenized (1:10) in a solution containing 10 mM HEPES-HCl (pH 7.9), 1.5 mM MgCl $_2$, 10 mM KCl, and the following protease and phosphatase inhibitors: 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ l/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin A, 10 μ g/ml antipain, 10 μ g/ml chymostatin, 5 μ g/ml trypsin inhibitor, 1 mM sodium vanadate, 1 mM NaF, 1 mM cantharidin and 10 μ M E-64. Then, homogenates were sonicated on ice in protein lysis buffer (homogenization

buffer containing 1% Igepal® , 0.1% sodium deoxycholate, 0.2% SDS and 0.1% Triton X-100) for 30 min. Solubilized proteins were recovered in the supernatant after centrifugation at 14,000 x g for 10 min at 4 °C. Protein quantification was performed according to the Lowry method (Lowry et al., 1951).

Twenty micrograms of protein for each sample were loaded into 8.5-15% SDSPAGE gel and transferred to PVDF (non-phosphorylated proteins) or nitrocellulose (phosphorylated proteins) membranes and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. The following primary antibodies were used: rabbit mouse anti-GAPDH (1:2000), anti-pCREB (1:500), rabbit anti-CREB (1:1000), mouse anti-Akt (1:1000), mouse anti-pERK(MAPK) (1:1000), rabbit anti-ERK1/2 (1:3000), rabbit anti-BDNF (1:250), rabbit anti-TrkB (1:1000), anti- β -catenin (1:1000), mouse anti-Synapsin I (1:2000), anti-PSD-95 (1:500), anti-pmTOR (1:500), anti-mTOR(1:1000), anti-pP70 (1:500) anti-P70(1:500), anti-p4EBP1(1:500), anti-4EBP1(1:500). The next day, membranes were washed with a mixture of Tris buffered saline and 0.05% Tween 20 (TBST) and incubated with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat secondary antibodies from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Secondary antibodies were detected with ECL Advance kit (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Germany). Blot quantitation was performed by using NIH ImageJ software, and densitometry values were normalized with respect to the values obtained with the *house-keeping* anti-GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Experimental groups were statistically compared by two-way ANOVA (factors: surgery and treatment) followed by a *Student-Newman-Keuls post-hoc* analysis.

9. *In situ* Hybridization of BDNF and TrkB

For *in situ* hybridization oligonucleotide probes (approximately 50 bp long) complementary to parts of mRNA encoding BDNF and TrkB were synthesized and radiolabeled with $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (desoxiadenosina 5'-[α -thio]trifosfato), using terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT) to a specific activity superior to 10^9 cpm/ μg . The following antisense DNA oligonucleotides were used: BDNF: 5' GGT CTC GTA GAA ATA TTG GTT CAG TTG GCC TTT TGA TAC CGG GAC 3' (bp 642–686); TrkB: CCT TTC ATG CCA AAC TTG GAA TGT CTC GCC AAC TTG AGC AGA AGC. Brain sections (14 μm) were hybridized overnight at 42°C in a humidified chamber, with at least 0.5 ng probe/slide (150.00 cpm/ μl) in a mixture of: 10ml of SSC 20x (sodium chloride 3 M, sodium citrate 0.3 M, pH 7.0), 2.5 ml of sodium phosphate pH 7.0, 5 g of dextran sulfate,

0.5 ml of sodium pirophosphate 0.1 M, 5 ml of Denhardt's solution 50x (5 g of polyvinylpyrrolidone, 5 g of bovine serum albumin, 5 g of Ficoll400 in 500 ml of H₂O-DEPC), 1 ml of salmon sperm DNA 10 mg/ml, 1 ml of poliadenilic acid (poliA) 5 mg/ml, 50 µl of heparin 120 mg/ml and 25 ml of formamide.

Following hybridization, slides were rinsed for 2 x 30 min at 50°C in 2L of washing buffer (200 ml SSC 20x, 8 ml DTT 1M, and H₂O). Next, the following washing steps were carried out at room temperature, 5 min each: SSC 1x, SSC 0,1x, H₂O-DEPC, 80% ethanol; next 96% ethanol 1 min and air dried. The sections were placed in a cassette and apposed to radiosensitive Kodak film and exposed for 4-5 days at room temperature. After developing, images were quantified by densitometry using Scion Image® program and groups were statistically compared by two-way ANOVA (factors: surgery and treatment) followed by a *Student-Newman-Keuls post-hoc* analysis.

10. Postnatal *in vivo* electroporation

Electroporation was performed as previously described (Oudin et al., 2011; Sonogo et al., 2013). P2-3 CD1 mouse pups were anesthetized with isofluorane (0.6 L/min) for 1 minute. Using a pulled glass capillary (diameter 1.5 mm, Clark, UK), 3 µl of 1 µg/µl plasmid DNA pCX-EGFP (donated from Dr Masaru Okabe, Osaka University, Japan), were injected into the right lateral ventricle of the pup. Animals were then subjected to five electrical pulses of 99.9 V for 50 ms with 850 ms intervals using the CUY21SC electroporator (Nepagene) and 7 mm tweezer electrodes coated with conductive gel (CEFAR, France). Animals were then reanimated under oxygen (1 L/min) and returned to their mother. Either CBD or vehicle were administered for 1 or 3 days (50 mg/kg i.p. once per day) before the sacrifice. Pups were sacrificed and brains were collected for analysis 5 days after electroporation.

11. Immunohistochemistry of gelatin embedded sections

Dissected electroporated brains were kept in PBS containing 4% PFA at room temperature on a roller for 3 hours. The brains were then hemisected, and the electroporated right sides were left in 4% PFA at 4°C on a roller overnight. The following day brain hemispheres were embedded in 4% gelatin in PBS, left in 4% PFA overnight at 4°C on a roller and then transferred in PBS with 0.1% of sodium azide. Brains were

cut using a Vibratome (VT10005, Leica) into 75- μ m-thick sagittal slices for immunostaining with an anti-GFP antibody. Slices were blocked for 1 hour in PBS containing 1% BSA, 0.1% Triton-X, and incubated with primary antibody rabbit anti-GFP, (Invitrogen) overnight at 4°C on roller. After washing 3 times for 10 minutes in PBS, slices were incubated with Alexa 488 anti-rabbit IgG secondary antibody (1:1000, Invitrogen) and Hoechst (1:5000, Sigma) for 2 hours at room temperature. After washing, slices were mounted in fluorescent mounting solution (Dako) and covered with a 22 x 50 mm coverslip. Z-stacks images were taken using a confocal microscope (Zeiss LSM 710) with 40x and 63x objectives and lasers: 405 (DAPI), and A488 (Alexa 488).

Whole neuroblasts in each image were analysed (20-80 per image) in various images of each area (2-5 images). For the parameters studied the mean of each animal in the different areas was calculated, and then compared by experimental groups/zone (6-10 animals per group).

12. Time-lapse imaging of brain slices using spinning disk confocal microscopy

Cultured brain slices were transferred into a pre-heated (37°C) chamber of a Perkin Elmer UltraView VoX confocal spinning disk system. Time-lapse imaging of GFP positive cells in the RMS was performed using an inverted Nikon Ti-E microscope with a Nikon CFI Super Plan Fluor ELWD 20x/0.45 objective coupled with a Hamamatsu C10600-10B (ORCA-R2) cooled digital CCD camera every 3 minutes for a total period of 3 hours. Z-stack images were taken every 4 μ m over an interval of 100-150 μ m inside the brain slice in the final part of the RMS1 just before the Elbow. Movies were acquired using the Perkin Elmer Volocity software.

Brain slice movies obtained by spinning disk confocal microscopy were analysed using Volocity software. The dynamics of GFP-labelled neuroblasts was quantitatively analysed by tracking the cell body of each neuroblast present in the field of view throughout the entire duration of imaging. Briefly mention here the parameters analysed. Only cells that had a displacement of at least 10 μ m were considered. Between 15 and 30 neuroblasts were tracked in each movie. At least 5 brain slices per condition were Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using two-tailed Student's t-test with SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc). Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

RESULTS

A. SELECTION OF THE OPTIMAL HOUSING STRATEGY TO ASSESS ANTIDEPRESSANT ACTIVITY

Open Field Test

Four weeks after OBX, both OBX-grouped and OBX-isolated mice exhibited a characteristic hyperactivity in the OFT compared with their respective sham groups, as evidenced by significant increases in the total distance travelled ($p < 0.05$, OBX-grouped vs. sham-grouped; $p < 0.001$, OBX-isolated vs. sham-isolated; Fig. 1a) and in the number of rearings ($p < 0.05$, OBX-grouped vs. sham-grouped; $p < 0.001$, OBX-isolated vs. sham-isolated; Fig. 1b). However, social isolation did not affect in the same way to sham-operated and OBX mice since a two-way ANOVA analysis revealed a significant interaction between surgery and housing conditions in both behavioural parameters ($p < 0.05$, total distance traveled; $p < 0.001$, number of rearings). *Post-hoc* analysis demonstrated significant increases in the locomotor hyperactivity (total distance travelled, $p < 0.01$) and exploratory behaviour (number of rearings, $p < 0.001$) in OBX-isolated mice as compared to OBX-grouped counterparts. By contrast, no differences were detected between sham-grouped and sham-isolated mice in the total distance travelled and the number of rearings.

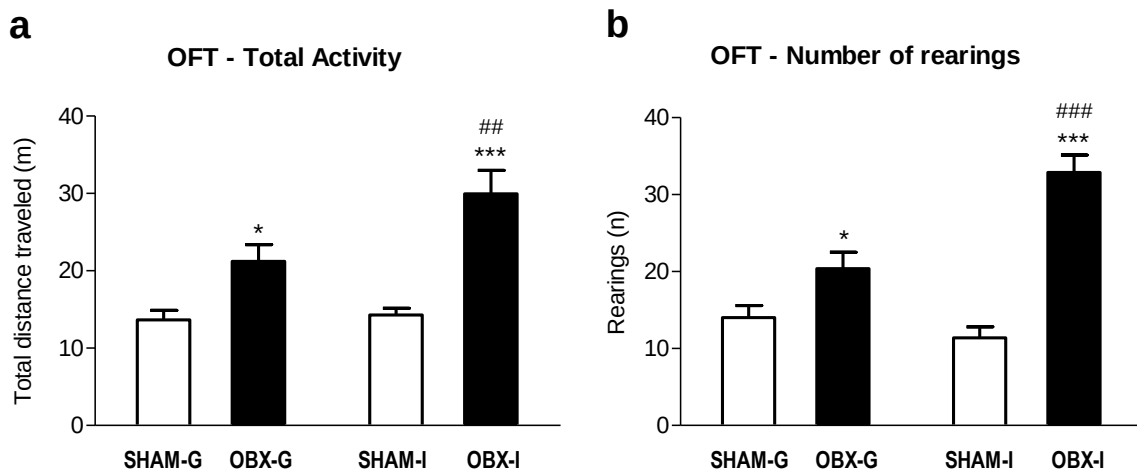


Figure 1. Effect of social isolation on OBX behaviours in the OFT. The typical locomotor hyperactivity (a) and the increased number of rearings (b) induced by OBX were higher in the isolated OBX mice than in the grouped ones. Results expressed as mean $\pm$ SEM of 7-10 animals/group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. respective sham group; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. respective grouped mice.

Regarding the central activity, the percentage of distance travelled (Fig. 2a) and the time in the central zone (Fig. 2b) were analyzed. The interaction between surgery and housing conditions did not achieve a significant value, though a significant effect for each variable were found (surgery: $p < 0.001$; housing: $p < 0.001$). The *post-hoc* analysis indicated that OBX prompted a reduction in the % of central distance (Fig. 2a) in both OBX-grouped (-44%; $p < 0.001$ vs. sham-grouped) and OBX-isolated (-54%; $p < 0.05$ vs. sham-isolated) mice. A significant reduction was also observed in sham (-56%) and OBX (-63%) mice subjected to social isolation when compared with their respective grouped counterparts ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). The time spent in the central zone, was also affected by OBX and social isolation (Fig. 2b), but in this case the two-way ANOVA analysis revealed an interaction between surgery and housing conditions ($p < 0.05$). The *post-hoc* analysis demonstrated that OBX produced a significant decrease only in the grouped mice (-61%; $p < 0.001$ vs. sham-grouped), but not in the isolated group. On the other hand, social isolation caused a significant reduction of the central time only in sham (-69%; $p < 0.001$ vs. sham-grouped) but not in OBX animals.

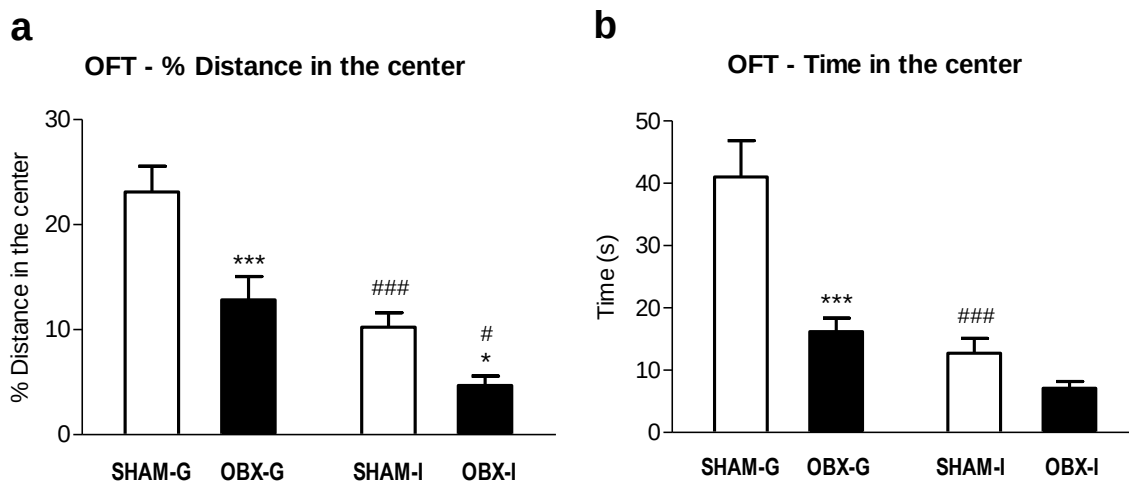


Figure 2. Effect of isolation on the central activity in the OFT in sham and OBX mice. Isolation reduced the % of distance travelled in the center of all animals (a) and the time in the center in sham mice (b). Notice that the anxious-like state of OBX mice was enhanced by isolation as observed in the % of distance travelled in the center. Results expressed as mean $\pm$ SEM of $n = 7-10$ animals/group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. el respective sham group; ### $p < 0.001$ vs. respective grouped mice.

Novelty Suppressed Feeding

We did not find a significant interaction between surgery and housing conditions, although each factor *per se* significantly affected the latency to feeding (Fig. 3) (OBX: $p < 0.001$; and isolation: $p < 0.001$). OBX mice exhibited lower latencies in comparison with their respective sham counterparts (OBX-grouped = 147.5 ± 25.3 s vs. sham-grouped = 319.3 ± 68.4 s, ns; OBX-isolated = 300.3 ± 57.1 s vs. sham-isolated = 588.9 ± 8.47 s, $p < 0.001$) (Fig. 3). Conversely, social isolation led to a significant increase in the latency to feeding of both sham- (+85%; $p < 0.001$ vs. sham-grouped) and OBX-mice (+108%; $p < 0.05$ vs. OBX-grouped). The analysis of the locomotor activity revealed no significant changes among groups in this dimly lit environment (average speed in m/s: sham-grouped = 7.6 ± 1.5 ; OBX-grouped = 6.1 ± 1.4 ; sham-isolated = 6.7 ± 1.5 ; OBX-isolated = 6.8 ± 2.4).

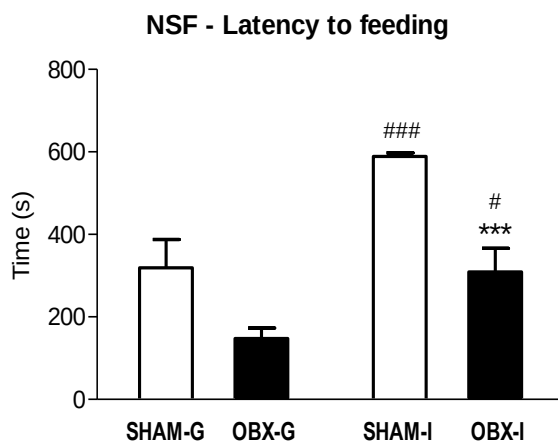


Figure 3. Behavioural effect of the isolation on the sham and OBX mice in the NSF. The latency to feeding was lower in all OBX mice. Isolation induced an increase in the latency both in sham and in OBX mice. Results expressed as mean $\pm$ SEM of n 7-10 animals/group. *** $p < 0.001$ vs. respective sham group; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. respective grouped mice.

Forced Swimming Test

In the two-way ANOVA no interaction was found between surgery and housing conditions in none of the 3 parameters evaluated. However, there was a significant effect of surgery on immobility, climbing and swimming time scores ($p < 0.001$ for all of them), though no influence of the social isolation was observed (Fig. 4). *Post-hoc* test revealed that the immobility time was significantly decreased in all the bulbectomized animals (Fig. 4a) (OBX-grouped = 95.5 ± 9.9 s vs. sham-grouped = 162.3 ± 21.8 s, $p < 0.05$; OBX-isolated = 107.5 ± 5.9 s vs. sham-isolated = 159.4 ± 17.6 s, $p < 0.05$) (Fig. 5A). This outcome was accompanied by a significant increase of the swimming time (Fig. 4b) (OBX-grouped vs.

sham-grouped, $p<0.01$; OBX-isolated vs. sham-isolated, $p<0.001$) (Fig. 5B). On the contrary, OBX induced a dramatic reduction in the climbing behaviour (OBX-grouped vs. sham-grouped, $p<0.05$; OBX-isolated vs. sham-isolated, $p<0.01$) (Fig. 4c).

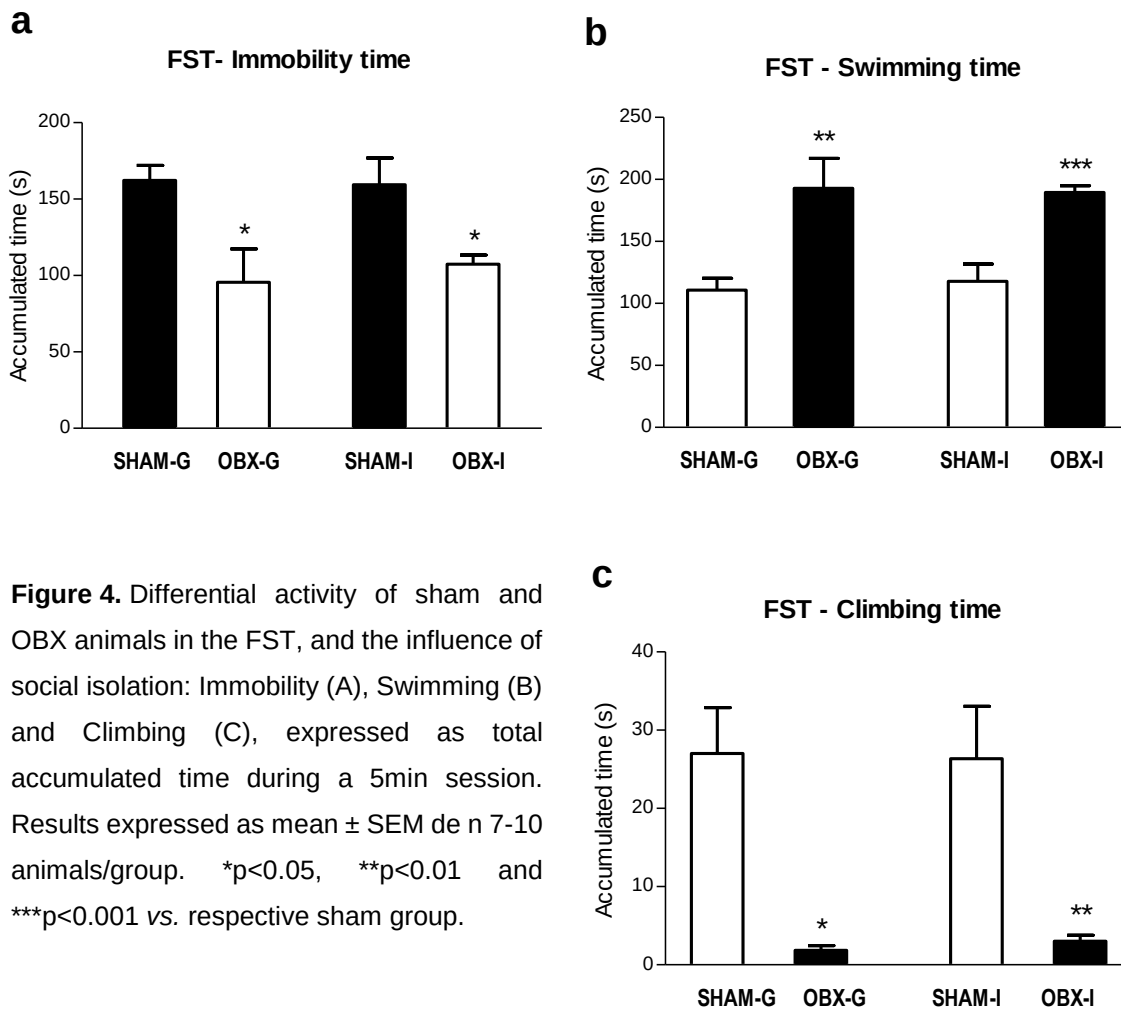


Figure 4. Differential activity of sham and OBX animals in the FST, and the influence of social isolation: Immobility (A), Swimming (B) and Climbing (C), expressed as total accumulated time during a 5min session. Results expressed as mean $\pm$ SEM de n 7-10 animals/group. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs. respective sham group.

Sucrose Intake Test

The two-way ANOVA analysis revealed no interaction between surgery and housing conditions for this parameter. No differences were detected between isolated and grouped animals, while the OBX on its own, significantly affected the sucrose consumption ($p<0.001$). OBX mice exhibited a decrease in the sucrose intake during the test (OBX-grouped= 0.9 ± 0.2 ml vs. sham-grouped= 1.8 ± 0.2 ml, $p<0.01$; OBX-isolated= 0.8 ± 0.1 ml vs. sham-isolated= 1.6 ± 0.2 ml, $p<0.01$) (Fig. 5a). Total liquid consumption was measured during two days before to the test and no relevant differences were found

among groups (Total fluid intake per day: OBX-grouped= 6.2 ± 2.2 ml; sham-grouped= 5.9 ± 1.9 ml; OBX-isolated= 6.3 ± 1.5 ml; sham-isolated= 6.5 ± 1.3 ml).

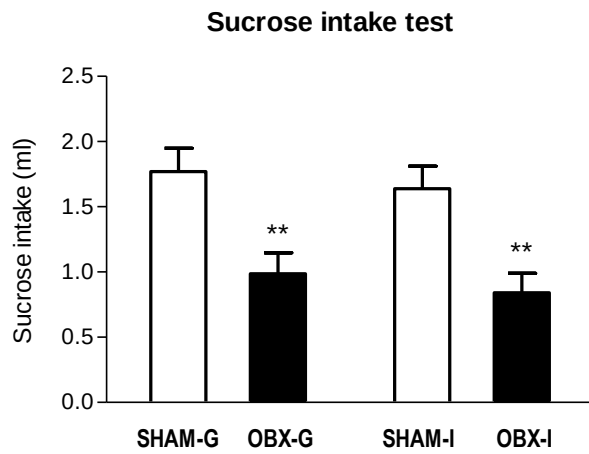
a

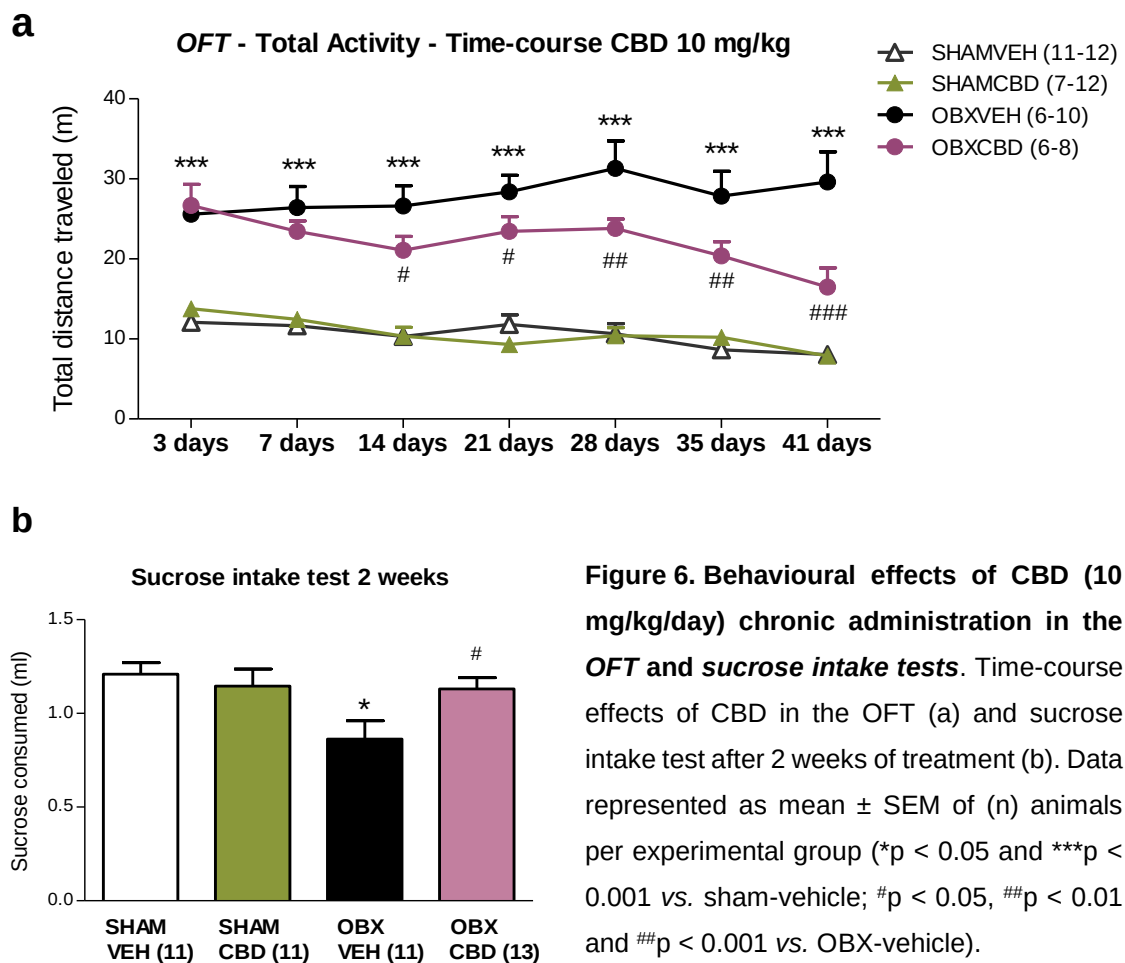
Figure 5. Sucrose intake test during 1 hour. Consumption of 1% sucrose was reduced in OBX-mice compared to sham animals. Note that the anhedonic response of OBX mice was not influenced by isolation $**p < 0.01$ vs. respective sham group.

B. BEHAVIOURAL, NEUROCHEMICAL, MOLECULAR AND CELLULAR EFFECTS OF CANNABIDIOL ASSOCIATED WITH ANTIDEPRESSANT ACTIONS

Optimization of cannabidiol administration regime

Different regimes of administration were initially assayed to choose the most appropriate.

Administration of 10 mg/kg/day CBD produced a significant reversal of OBX-induced hyperactivity after 2 weeks of treatment that was consolidated with the repeated administration (Fig. 6a) (OBX CBD vs. OBX VEH: 14 days $p < 0.05$; 21 days $p < 0.05$; 28 days $p < 0.01$; 35 days $p < 0.01$; 42 days $p < 0.001$). Two way ANOVA analysis revealed a significant interaction between surgery and treatment from the 4th week of treatment on (28 days [$F(1,32) = 5.92$, $p < 0.05$]; 35 days [$F(1,36) = 7.28$, $p < 0.05$]; 41 days [$F(1,35) = 9.56$, $p < 0.01$]).



The anhedonic-like state of OBX mice reflected in a reduced sucrose consumption was improved after 2 weeks treatment with CBD 10 mg/kg (Fig. 6b) (SHAM VEH 1.21 ± 0.061 vs. OBX VEH 0.86 ± 0.10 ; $p < 0.05$; OBX VEH vs. OBX CBD 1.31 ± 0.060 , $p < 0.05$). This effect was also present at the end of the treatment (6 weeks: SHAM VEH 1.34 ± 0.10 vs. OBX VEH 0.79 ± 0.07 , $p < 0.01$; OBX VEH vs. OBX CBD 1.23 ± 0.10 $p < 0.05$, $p < 0.01$). Two way ANOVA analysis evidenced an interaction between surgery and treatment (14 days: $[F(1,42) = 4.47, p < 0.05]$ y 42 days: $[F(1,32) = 4.70, p < 0.05]$).

As detailed in the next section, 50 mg/kg of CBD induced sustained hyperactivity reversal from the first injection. However, it decreased sucrose consumption in half of sham animals (SHAM CBD-RES vs. SHAM VEH: day 1 $p < 0.05$, day 2 $p < 0.01$, day 3 $p < 0.001$) and enhanced it slightly in OBX mice (Fig. 7a). Such behavioural outcome was accompanied by a reduction in food intake (OBX CBD $p < 0.001$ and SHAM CBD $p < 0.001$, vs. VEH-treated animals) (Fig. 7b) and body weight (OBX CBD $p < 0.01$ and SHAM CBD $p < 0.001$, vs. VEH-treated animals) (Fig. 7c), reflecting an anorectic effect of CBD that explained such decreased sucrose preference.

Finally, a regime combining both doses (50 mg/kg for 3 days + 10 mg/kg until the end of treatment) was selected to achieve fast antidepressant-like onset (as shown in the next section) and to maintain this effect avoiding the interference of the anorectic actions.

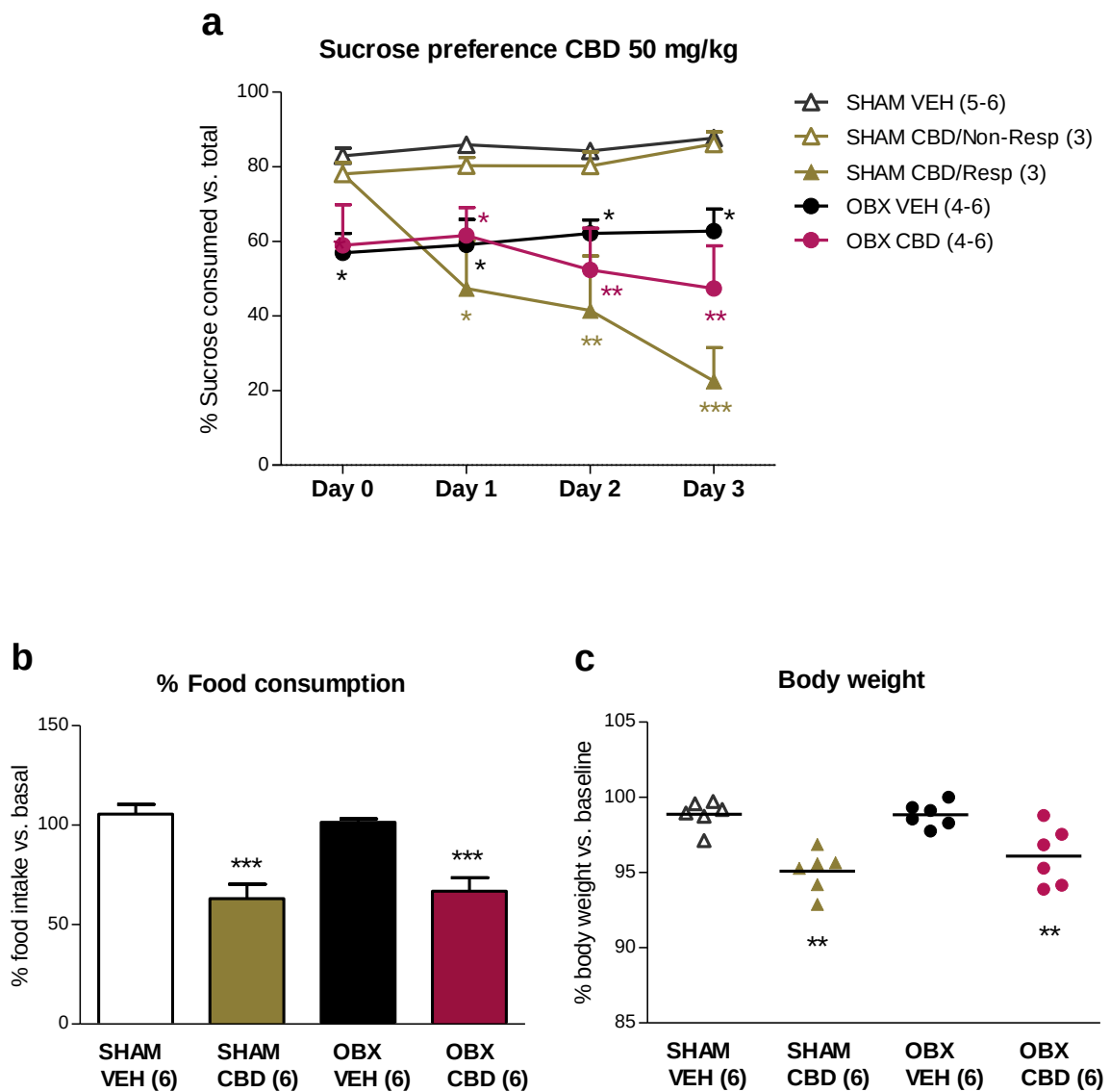


Figure 7. Effects of CBD 50 mg/kg/day administration on sucrose preference (a), food consumption (b) and body weight (c). Results expressed as percentage of sucrose consumed vs. total liquid intake, percentage of food consumption and body weight after VEH/CBD injection compared with basal values of each animal. Data represented as mean $\pm$ SEM of (n) animals per experimental group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. sham-vehicle; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs. OBX-vehicle).

Study of the effects of cannabidiol acute and chronic administration

B.1. Fast and maintained antidepressant-like effects of cannabidiol in behavioural paradigms

Forced swimming test

In the FST, CBD acute injection induced a decrease in the *immobility* of OBX animals (OBX VEH 67.21 ± 15.21 vs. 29.34 ± 9.44 , $p < 0.05$; Fig. 8a), together with an increase in the *swimming* (OBX VEH 227.1 ± 15.22 vs. 263.1 ± 9.81 , $p < 0.05$; Fig. 8b). Regarding the *climbing* a trend to the increment was observed although it did not achieve statistical significance (Fig. 8c). Two way ANOVA revealed a significant interaction between surgery and treatment both for *immobility* and *swimming* ($[F(1,24) = 4.75, p < 0.05]$; $[F(1,25) = 4.48, p < 0.05]$, respectively). In sham mice, no alteration was registered in any of the 3 parameters analysed.

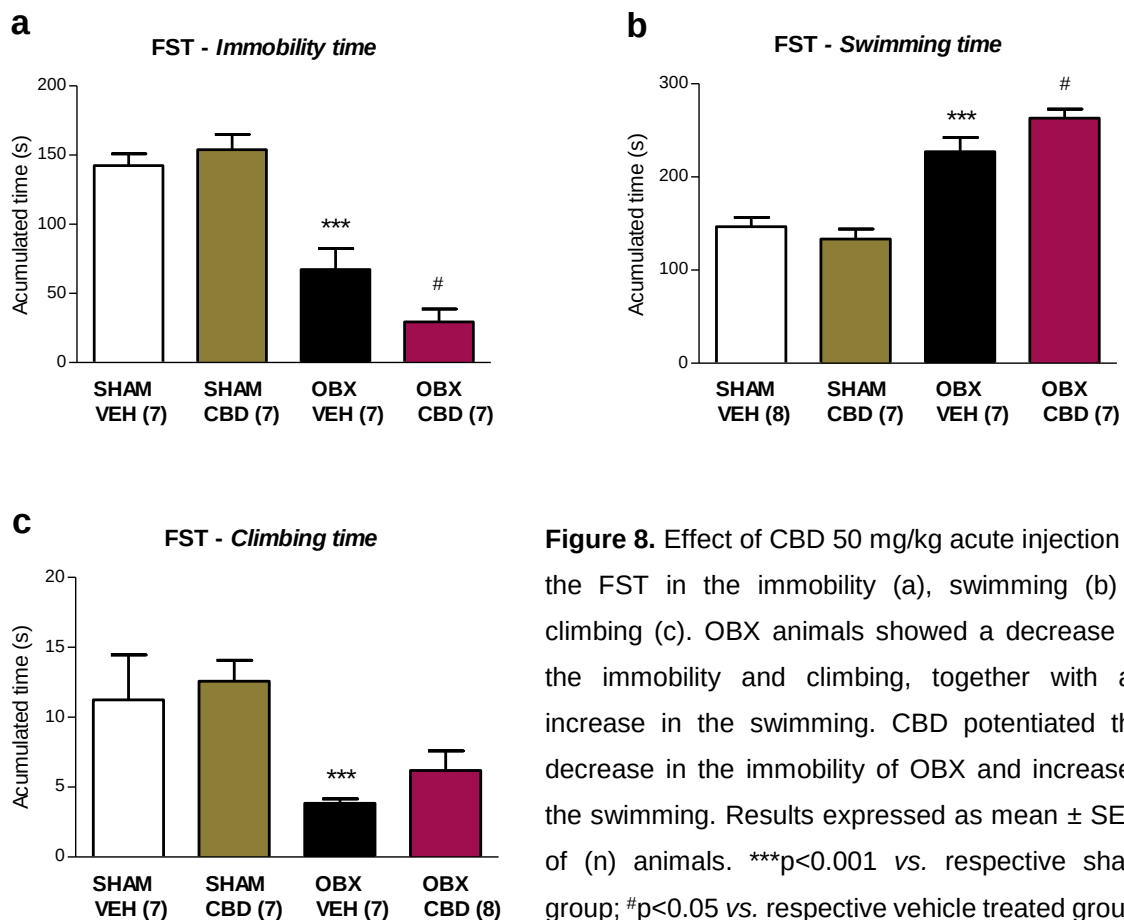


Figure 8. Effect of CBD 50 mg/kg acute injection in the FST in the immobility (a), swimming (b) y climbing (c). OBX animals showed a decrease in the immobility and climbing, together with an increase in the swimming. CBD potentiated the decrease in the immobility of OBX and increased the swimming. Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. *** $p < 0.001$ vs. respective sham group; # $p < 0.05$ vs. respective vehicle treated group.

Open field test

Effects of cannabidiol acute administration

Regarding total distance travelled, two-way ANOVA revealed a significant interaction between surgery and treatment [$F(1,22) = 6.80$, $p < 0.05$], and a significant effect of the treatment [$F(1,22) = 6.76$, $p < 0.05$]. *Post-hoc* comparison indicated that CBD significantly reversed OBX-induced hyperactivity ($p < 0.01$) (Fig. 9a). Acute CBD also improved the diminished central ambulation of OBX mice, as reflected in the higher percentage of distance travelled in the central zone ($p < 0.05$) (Fig. 9b). CBD did not alter basal locomotor activity levels nor central ambulation scores in sham animals.

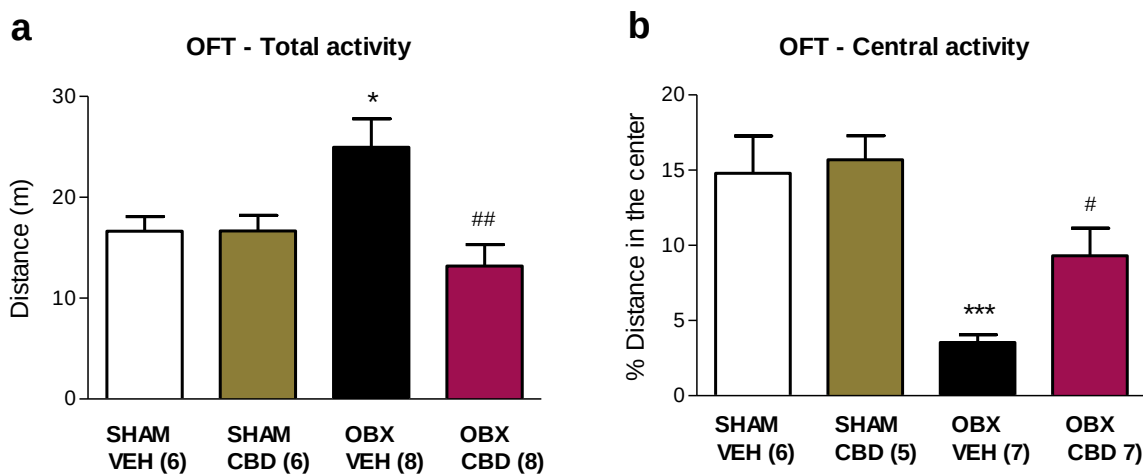


Figure 9. Antidepressant and anxiolytic-like effect of acute CBD administration in the OFT. OBX-induced hyperactivity was completely reversed not altering sham locomotor activity (a). The reduced central ambulation induced by OBX was considerably increased by CBD administration not affecting sham central activity (b). Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. respective sham group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. respective vehicle treated group.

Time-course effects of cannabidiol treatment

Twenty-four hours after the first injection, CBD reversal of OBX-hyperactivity was still preserved (OBX VEH vs. OBX CBD, $p < 0.001$). This hyperactivity attenuation was present at all time-points analysed along the treatment (day 3, $p < 0.01$; day 7, $p < 0.001$; day 14, $p < 0.01$) (Fig. 10). Two-way ANOVA analysis revealed a significant interaction between surgery and treatment ($[F(1,29) = 7.48$, $p < 0.05$] for day 1; $[F(1,25) = 5.20$, $p <$

0.05] for day 3; [F(1,25) = 7.29, $p < 0.05$] for day 7; and [F(1,25) = 5.68, $p < 0.05$] for day 14). Interestingly, CBD did not alter locomotor activity of sham animals.

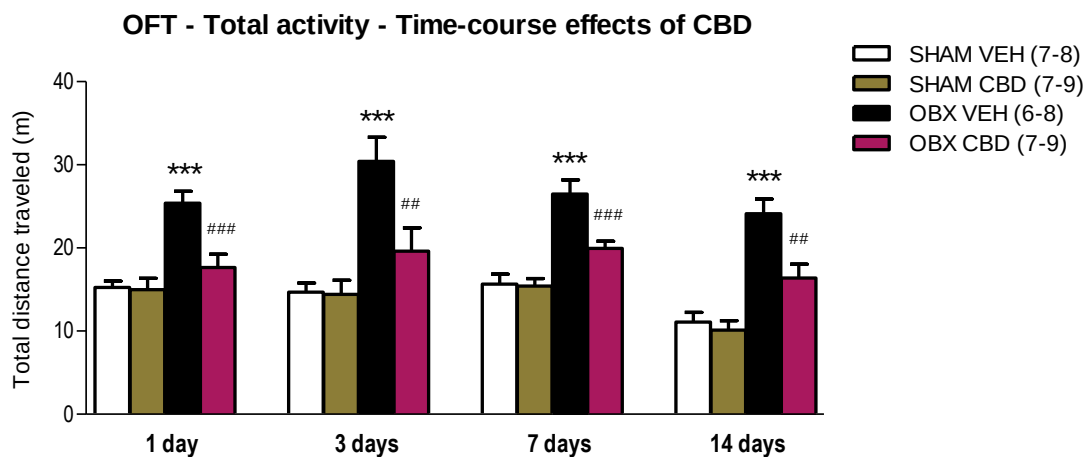


Figure 10. Time-course antidepressant effects of CBD (50+10) in the OFT. OBX-induced hyperactivity was reversed by CBD administration 24 hours after the first injection. The attenuation was maintained also 24 hours after 3, 7 and 14 injections of CBD. Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. *** $p < 0.001$ vs. respective sham group; ## $p < 0.01$ ### $p < 0.001$ vs. respective vehicle-treated group.

Regarding central activity, the anxiolytic-like effect of CBD observed immediately after the first dose injection was not significantly preserved 24 hours later. However, it is noteworthy that, although not significant, a clear trend to increased central ambulation (% central distance) in OBX animals was observed at all the time-points.

Sucrose preference test

As shown in figure 11, OBX animals exhibited anhedonia, as reflected by a lower preference for sucrose solutions than their sham counterparts ($p < 0.01$). The sucrose intake of OBX-mice was totally restored after one week ($p < 0.01$, Fig. 11a) and also after two weeks ($p < 0.01$, Fig. 11b) CBD treatment. At the same time points sham mice did not exhibit any alteration in the sucrose preference. Two-way ANOVA analysis revealed a significant interaction between surgery and treatment ([F(1,27) = 4.30, $p < 0.05$] for day 7; and [F(1,24) = 6.68, $p < 0.05$] for day 14).

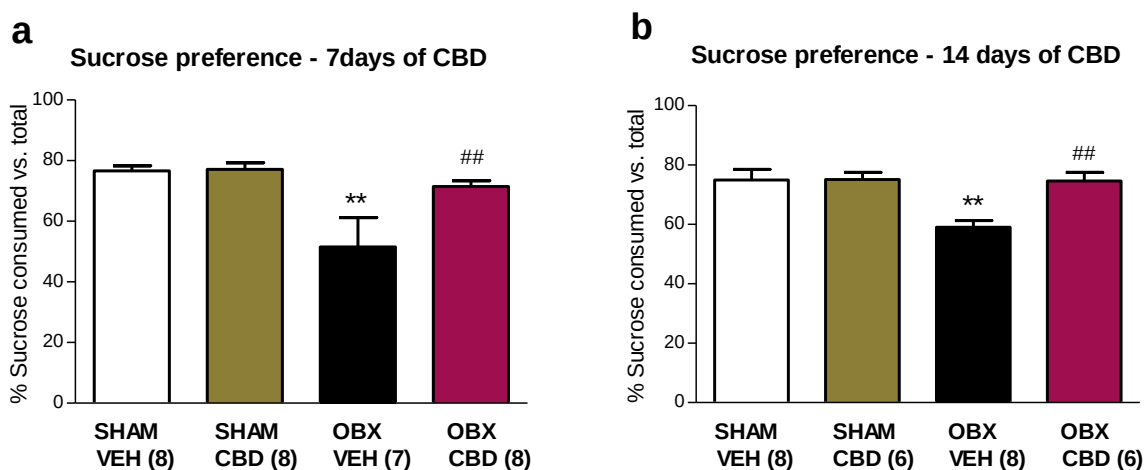


Figure 11. Sucrose preference test after 7 (a) and 14 days (b) of treatment with CBD (50+10). Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. ** $p < 0.01$ vs. respective sham group; ## $p < 0.01$ vs. respective vehicle treated group.

B.2. Differential effects of acute and chronic cannabidiol on serotonin and glutamate release in ventro-medial prefrontal cortex

In order to explore the underpinning mechanism of CBD fast antidepressant-like actions, we evaluated firstly the acute effect of a single dose of CBD (50 mg/kg; i.p) upon the release of 5-HT and glutamate in the vmPFCx of sham and OBX-mice. Then, the effect of a challenge dose of CBD after the 14 days treatment was also assessed in sham and OBX mice, to analyse the possible adaptive changes induced by its chronic administration.

Acute cannabidiol administration

In vivo microdialysis studies showed that acute administration of 50 mg/kg CBD prompted a significant increase in extracellular 5-HT contents in the vmPFCx of OBX-mice ($p < 0.05$ vs. OBX VEH), but not in sham counterparts (Fig. 12a). At the same time, CBD increased extracellular glutamate levels both in sham ($p < 0.01$) and OBX ($p < 0.01$) animals (Fig. 12b) in comparison with their respective vehicle-treated animals.

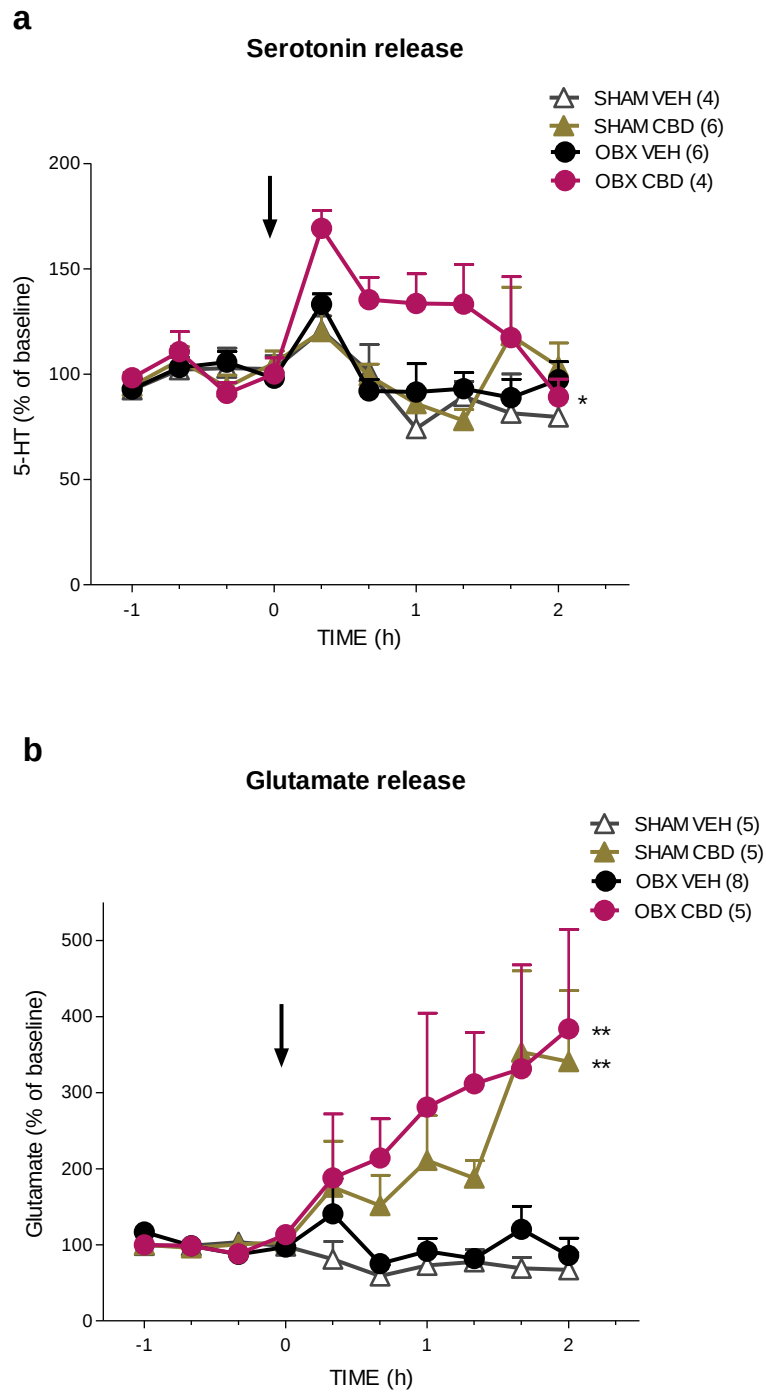
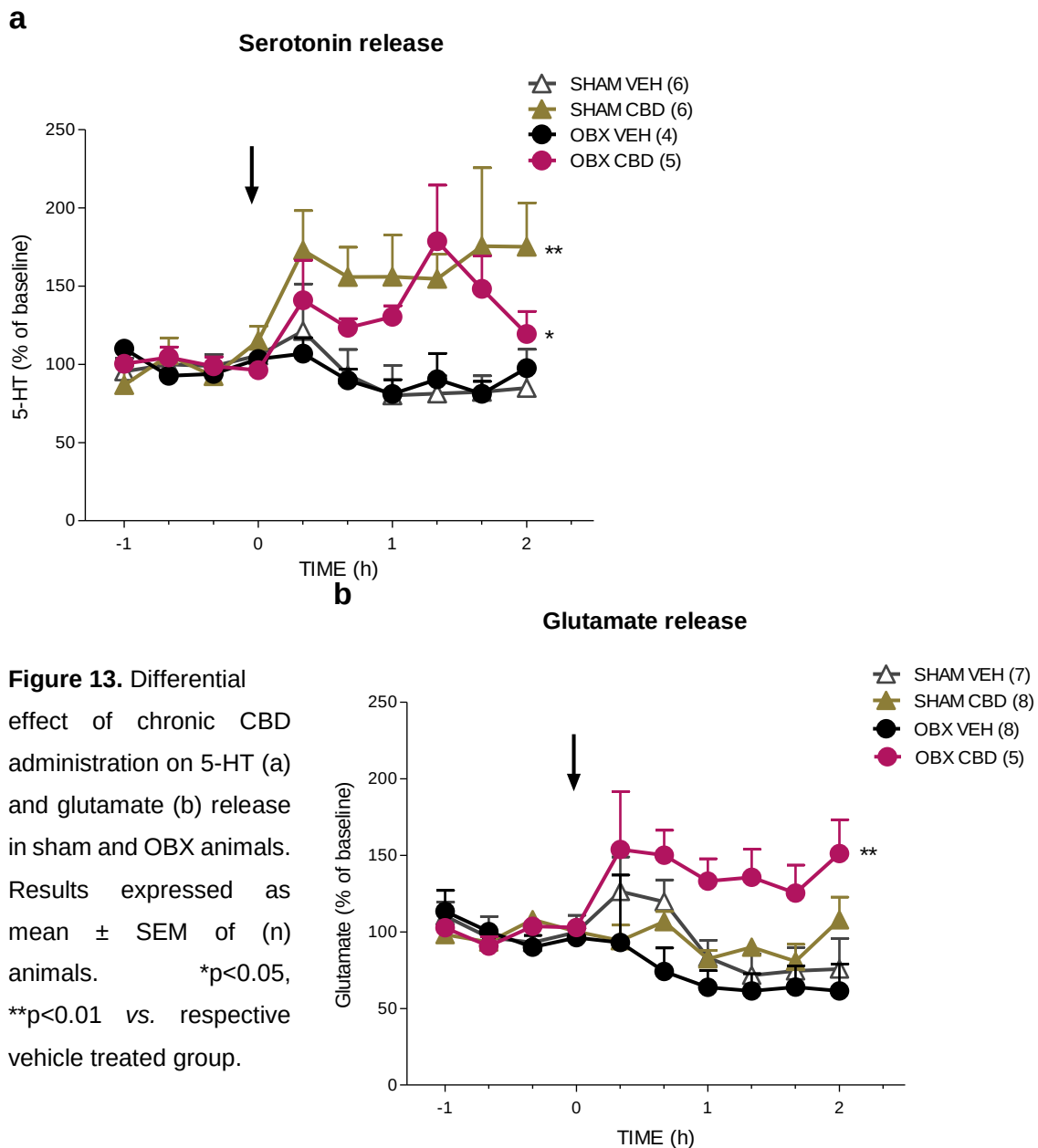


Figure 12. Differential effect of acute CBD administration on 5-HT (a) and glutamate (b) release in sham and OBX animals. Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. respective vehicle treated group.

Chronic cannabidiol treatment

Microdialysis studies after chronic CBD demonstrated alterations in the pattern of neurotransmitters release, comparing to the effects of a single CBD injection. After chronic administration, a CBD challenge dose induced a significant augmentation in extracellular 5-HT in all CBD-treated animals (sham $p < 0.01$; OBX $p < 0.05$) vs. vehicle-treated groups (Fig. 13a). However, the glutamate release was only increased in OBX-mice ($p < 0.01$) since the sham counterparts treated with chronic CBD did not retain the response observed after acute CBD administration (Fig. 13b). Three-way ANOVA of repeated measures revealed interactions between surgery/treatment [$F(1,24) = 7.37$, $p < 0.05$] for glutamate measures.



The comparison among the absolute basal levels of neurotransmitters after the chronic CBD administration revealed a significant elevation in glutamate contents in all CBD treated mice (Fig. 14b), more pronounced in the sham group (OBX CBD vs. OBX VEH $p < 0.05$, SHAM CBD vs. SHAM VEH $p < 0.01$). No significant differences were obtained in the 5-HT absolute basal levels analysis (Fig. 14a).

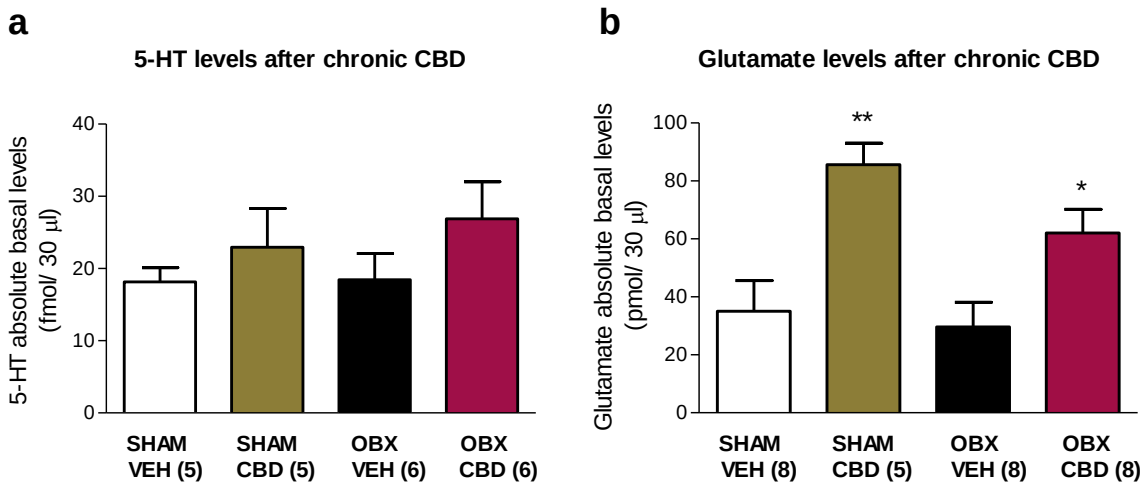


Figure 14. Effect of chronic CBD administration of CBD on extracellular basal levels of 5-HT (a) and glutamate (b) in vmPFCx of sham and OBX mice. Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. respective vehicle treated group.

B.3. Alterations on 5-HT_{1A} receptor functionality induced by chronic cannabidiol

[³⁵S]GTPγS binding assays showed some differences in the functionality of 5-HT_{1A} receptors in limbic areas between vehicle and CBD treated groups. As shown in figure 15, densitometric analysis revealed a decrease in (±)8-(OH)-DPAT-induced stimulation of [³⁵S]GTPγS binding in the DRN (-22 ± 4 % vs. SHAMVEH, $p < 0.05$) of OBX-mice that interestingly was restored after chronic CBD treatment (OBX CBD vs. OBX VEH, $p < 0.05$). A significant interaction between surgery and treatment was found in DRN [$F(1,23) = 5.55$, $p < 0.05$]. In postsynaptic areas such as basolateral amygdala (BLA) and CA1-CA2 fields of the hippocampus we also registered a decrease in the (±)8-(OH)-DPAT-induced stimulation of [³⁵S]GTPγS binding of OBX mice (BLA: -30 ± 2 %, $p < 0.01$; CA1-CA2: -89 ± 14 %, $p < 0.05$; vs. SHAMVEH), that was similarly normalized after chronic

CBD (OBX CBD vs. OBX VEH, $p < 0.05$ for both areas). Two-way ANOVA analysis revealed a significant interaction between surgery and treatment in CA1-CA2 [$F(1,29) = 5.37$, $p < 0.05$]. In medial prefrontal cortex (mPFCx), we did not observe any change in the ($\pm$)8-(OH)-DPAT-induced stimulation of [35 S]GTP γ S binding of OBX mice compared to the sham group, although after chronic treatment an increase was found in all CBD-treated animals ([$F(3,25) = 8.74$, $p < 0.001$]) (SHAM CBD: $+ 42 \pm 12$ %, $p < 0.01$ vs. SHAM VEH; OBX CBD: $+ 40 \pm 7$, $p < 0.01$ vs. OBX VEH), with no interaction between surgery and treatment. Other postsynaptic areas such as lateral prefrontal cortex or hypothalamus were analysed although no significant changes were registered.

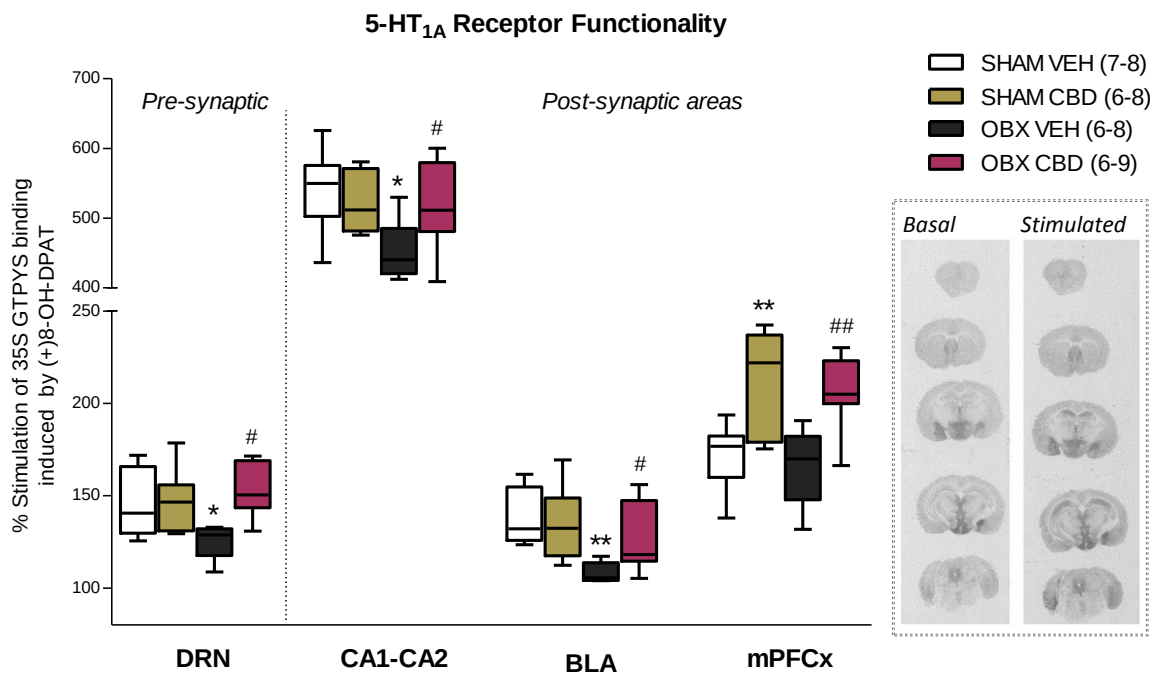


Figure 15. Box and whisker plots of 5-HT_{1A} receptors functionality in different brain areas after CBD chronic treatment. DRN: dorsal raphe nucleus, CA1-CA2: hippocampus CA1-CA2 fields, BLA: basolateral amigdala; mPFCx: medial prefrontal cortex. Results are expressed as percentage of specific ($\pm$)8-(OH)-DPAT-induced stimulation of [35 S]GTP γ S binding over specific basal binding, as mean $\pm$ minimum/maximum. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. respective sham group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. respective vehicle treated group. Figure in the right is illustrating representative autoradiograms of [35 S]GTP γ S binding in basal conditions vs. stimulation with ($\pm$)8-(OH)-DPAT.

B.4. Alterations on CB₁ receptor functionality induced by chronic cannabidiol

WIN552122-induced stimulation of [³⁵S]GTPγS specific binding was increased in the hypothalamus of OBX mice $40 \pm 7 \%$ ($p < 0.05$) that was restored after chronic CBD treatment ($p < 0.05$ vs. OBX VEH) (Fig. 16a). In the mPFCx, a decrease decrease in WIN552122-induced stimulation of [³⁵S]GTPγS binding was observed ($252 \pm 34 \%$, $p < 0.01$), which was also rescued by chronic CBD administration ($p < 0.05$ vs. OBX VEH) (Fig. 16b). The two way ANOVA revealed a significant interaction between surgery and treatment both in the hypothalamus [$F(1,25) = 4.45$, $p < 0.05$] and mPFCx [$F(1,25) = 4.39$, $p < 0.05$].

CB₁ receptor functionality:

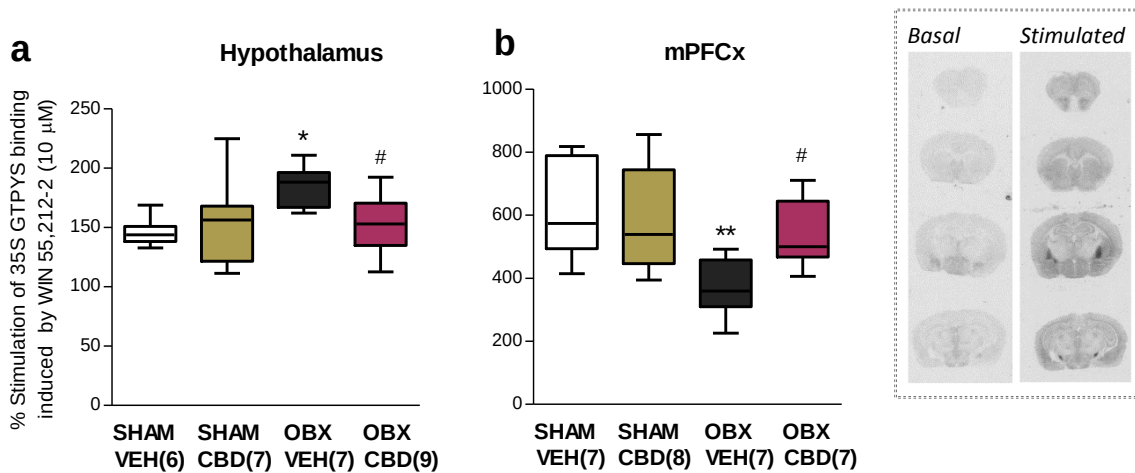


Figure 16. Box and whisker plots of CB₁ receptors functionality in hypothalamus and hippocampus. Results are expressed as percentage of specific WIN552122-induced stimulation of [³⁵S]GTPγS binding over specific basal binding, as mean $\pm$ minimum/maximum. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. respective sham group; # $p < 0.05$ vs. respective vehicle treated group. Figure in the right is illustrating representative autoradiograms of [³⁵S]GTPγS binding in basal conditions vs. stimulation with WIN552122.

B.5. Impact of chronic cannabidiol administration on neuroplasticity intracellular pathways

Some neuroplasticity markers associated with antidepressant efficacy were altered following OBX and after CBD treatment. In prefrontal cortex (PFCx) of OBX mice, mTOR and the downstream element 4EBP1 presented a higher activation (pmTOR/mTOR: OBX VEH 135.7 ± 10.13 %, $p < 0.01$ vs. SHAM VEH; p4EBP1/4EBP1 OBX VEH 142.6 ± 12.26 %, $p < 0.05$ vs. SHAM VEH), whereas the P70 protein activity was lower (pP70/P70 OBX VEH 76.67 ± 4.51 %, $p < 0.05$ vs. SHAM VEH). After the chronic treatment with CBD those alterations in the activation pattern of these 3 elements were total or partially restored though not achieving significant differences with control group (Fig.17). A significant interaction between surgery and treatment for P70 activation was determined $F(1,23) = 7.81$, $p < 0.05$].

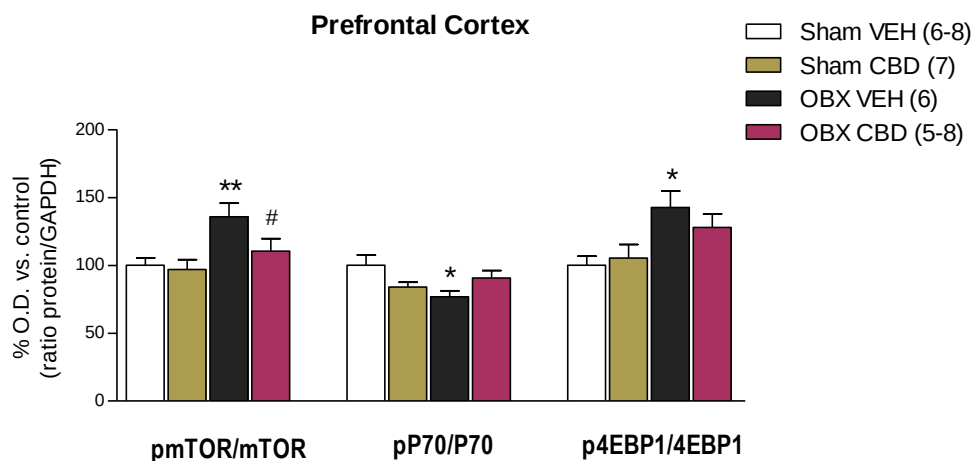


Figure 17. Effect of CBD chronic treatment in protein levels of mTOR intracellular pathway. Results expressed as percentage of optical density over control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. respective sham group; # $p < 0.05$ vs. respective vehicle-treated group.

Among the other neuroplasticity-related proteins analysed (Fig. 18), we found that ERK activation was increased by CBD only in sham mice (pERK/ERK: SHAM CBD 132.6 ± 9.66 %, $p < 0.05$ vs. SHAM VEH). In addition, a marked elevation of BDNF levels in PFCx (OBX VEH 318.0 ± 74.81 %, $p < 0.01$ vs. SHAM VEH) and hippocampus (OBX VEH 417.2 ± 147.6 %, $p < 0.05$ vs. SHAM VEH) of OBX mice were detected. Again, CBD administration led to a restoral of the BDNF levels in both areas (mPFCx: OBX CBD

125.8 ± 16.96 %, $p < 0.01$ vs. OBX VEH; hippocampus: OBX CBD 197.3 ± 48.89 % vs. SHAM VEH, *ns*). The mRNA expression of BDNF and TrkB were complementarily studied by *in situ* hybridization. We found a parallel increase in the mRNA expression of BDNF in mPFCx of OBX mice, but not in hippocampus, that was normalized after chronic CBD. In the piriform cortex a significant increase in the mRNA was encountered in all CBD treated animals. Regarding the BDNF receptor TrkB we observed a complementary increment in the piriform cortex of all CBD treated animals (Fig. 19a). Interestingly, in the SVZ the OBX animals presented a reduction of TrkB mRNA that was restored by CBD chronic administration (Fig. 19b).

Prefrontal Cortex

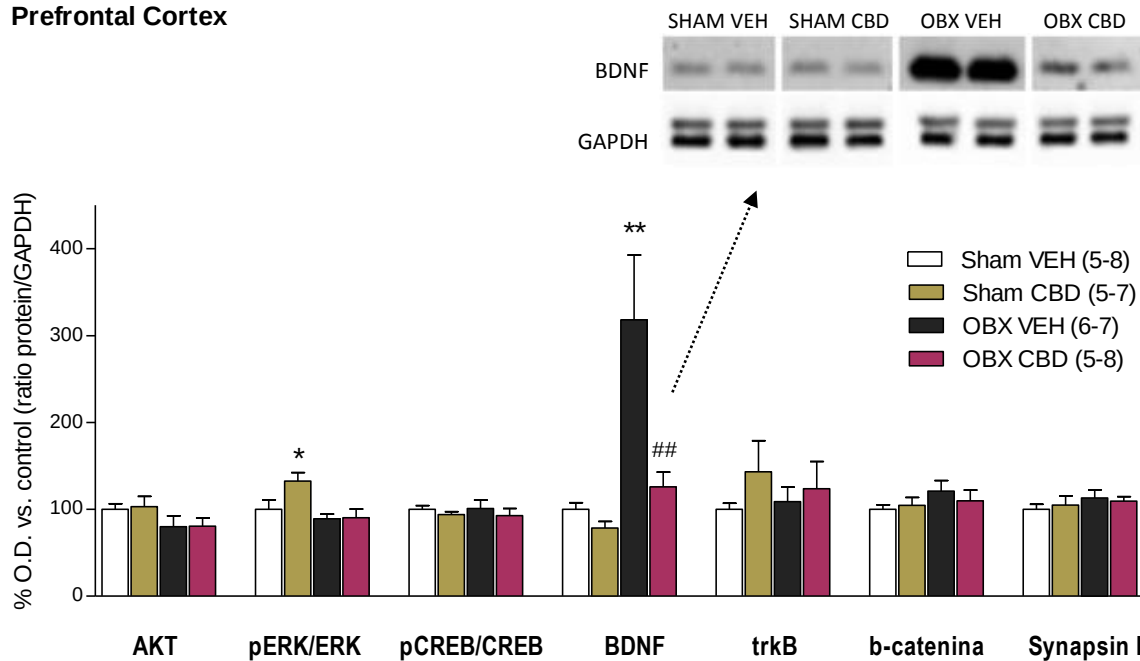


Figure 18. Effect of CBD chronic treatment in protein levels of mTOR intracellular pathway. Results expressed as percentage of optical density over control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. respective sham group; # $p < 0.05$ vs. respective vehicle-treated group. Above a representative image BDNF bands obtained by Western Blot.

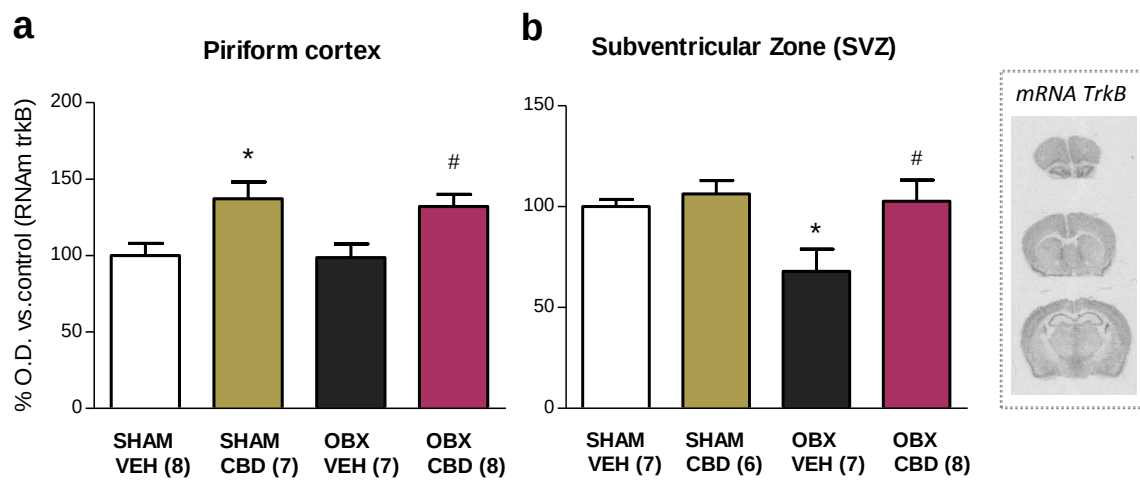
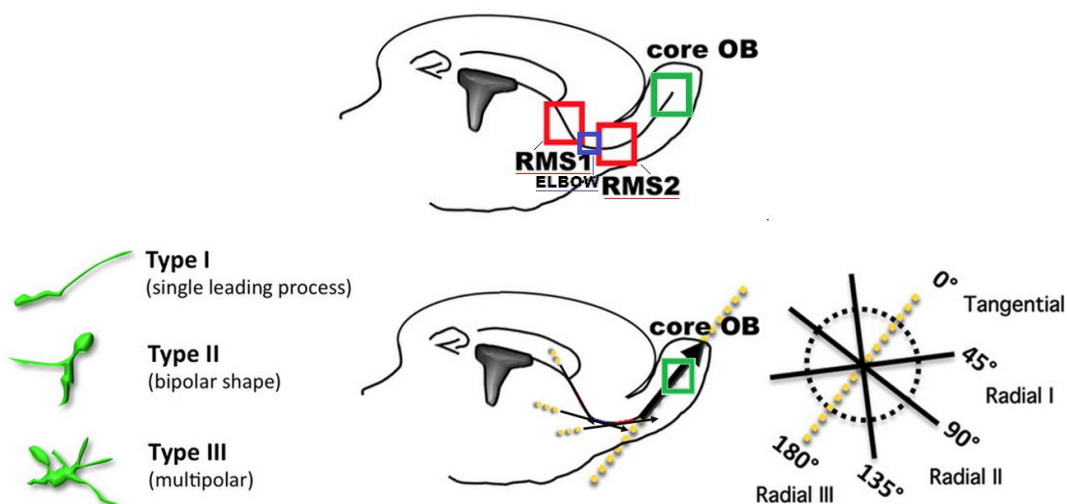


Figure 19. Effect of chronic CBD administration in the expression of mRNA for TrkB in piriform cortex (b) and subventricular zone (SVZ) (c). Results expressed as % of mRNA expression over SHAM VEH measured by optical density. * $p < 0.05$ vs. respective sham group; # $p < 0.05$ vs. respective vehicle-treated group. It is shown a representative image of the *in situ* hybridization of mRNA for TrkB.

B.6. Impact of cannabidiol administration on the morphology and migration process of subventricular zone-derived neuroblasts in postnatal brain

In a first approach, we analysed some parameters related to the morphology and direction of the neuroblasts migrating along the RMS by GFP-immunostaining after 1 or 3 days of treatment with CBD 50 mg/kg (main process length, percentage of non-tangential directed cells, percentage non-unipolar cells and RMS width).

Image modified from Belvindrah et al. (Belvindrah et al., 2011): Picture showing a sagittal section of RMS divided into the three regions that were considered for the analysis (RMS1, Elbow, RMS2). Below a representation of the different types of morphologies (unipolar: type 1; non-unipolar: type 2 and type 3) and of tangential direction of cells in each part of the RMS.



After one injection of CBD no significant alterations were reported in any of the parameters studied. However, some significant modifications were observed when CBD was administered for 3 consecutive days. The main process length was slightly reduced in the CBD treated group in the 3 areas studied (RMS mean: Co-VEH 43.64 ± 1.09 vs. Co-CBD 38.98 ± 1.04 μm , $p < 0.05$; Fig. 20a). The stream width was not significantly modified, and neither the percentage of non-unipolar cells. An increment in the number of cells with a non-tangential direction was registered in RMS1 and RMS2 after CBD treatment (RMS1, Co-VEH 1.13 ± 0.77 vs. Co-CBD 5.31 ± 0.72 , $p < 0.01$; RMS2, Co-VEH 5.61 ± 0.60 vs. Co-CBD 13.26 ± 2.30 , $p < 0.05$; Fig. 20b).

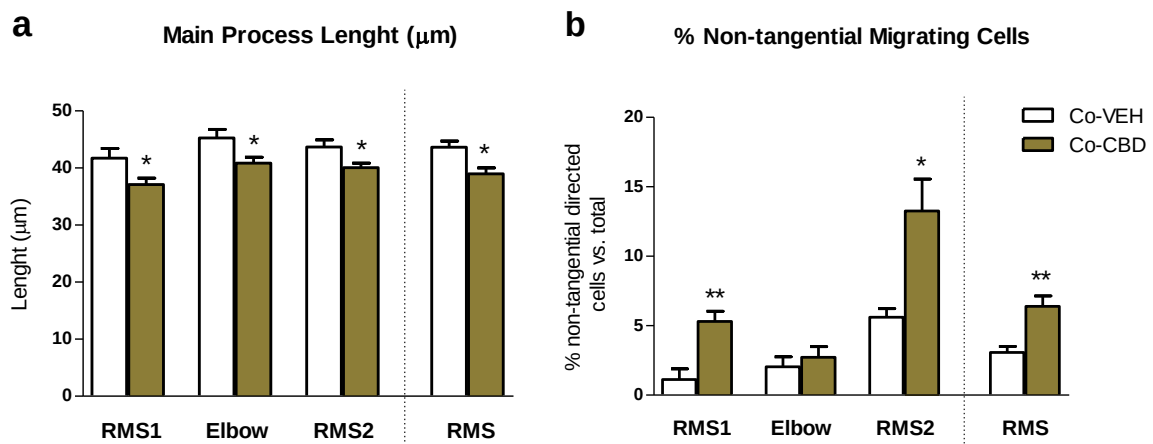
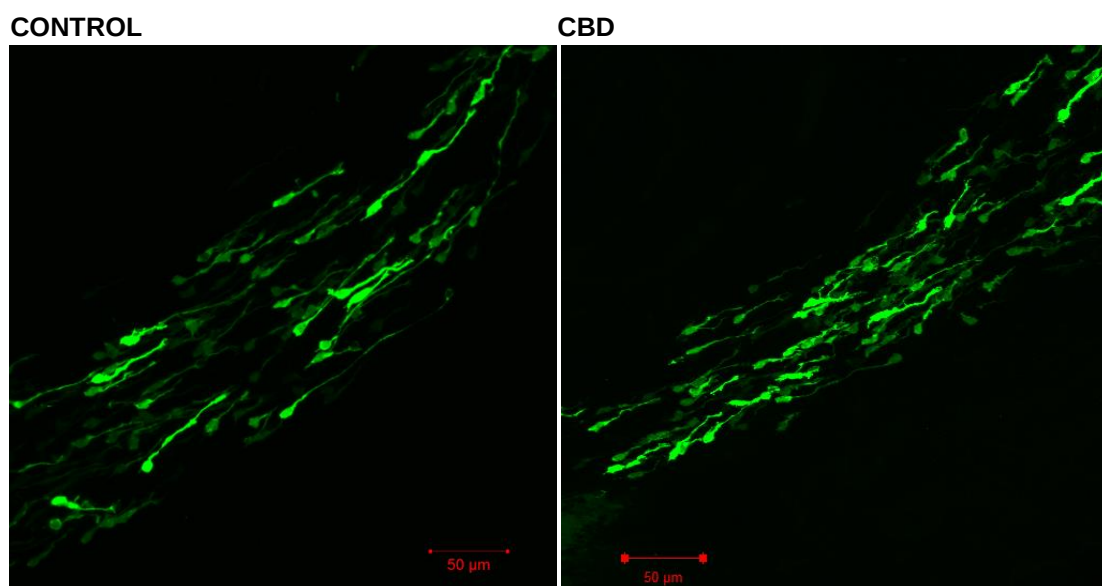


Figure 20. Analysis of morphology and direction of neuroblasts originated in the SVZ migrating along the RMS. Analysed areas: RMS1, Elbow, RMS2, and overall RMS analysis. (a) Main process length (Co-VEH: 6 n, Co-CBD: 9-10 n) (b) % of non-tangential migrating cells (Co-VEH: 6 n, Co-CBD: 9-11 n). Results expressed as mean $\pm$ SEM of each experimental group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Immunohistochemistry of GFP: Confocal Z-stack of a sagittal brain section showing GFP positive cells in the RMS1 area of control and CBD-treated mice (CBD 50 mg/kg for 3 days).



The analysis of the time-lapse imaging performed in brain slices of pups subjected to 3 days CBD treatment, revealed some differences in the migratory process of the neuroblasts. The neuroblasts length was shorter in CBD-treated animals (Co-VEH 205.10 ± 12.41 vs. Co-CBD 167.4 ± 7.73 , $p < 0.05$; Fig. 21a), similarly to the results in the immunostaining assays that showed a reduction in the main process length. A decrease in the velocity of cell migration was registered in mice subjected to CBD (Co-VEH $19.40 \times 10^{-3} \pm 9.5 \times 10^{-4}$ vs. Co-CBD $16.03 \times 10^{-3} \pm 5.6 \times 10^{-4}$, $p < 0.05$; Fig. 21c). Regarding the overall cell displacement, a trend to a reduction was observed in CBD-treated mice although it did not achieve statistical significance (Fig. 21b). No alteration was observed in the meandering index (Fig. 21d). Additionally, the percentage of cells migrating was quantified revealing a higher number of stationary cells in the CBD-treated group (% of migrating cells: Co-VEH 57.40 ± 6.54 vs. Co-CBD 33.40 ± 2.87 , $p < 0.05$; Fig. 21e).

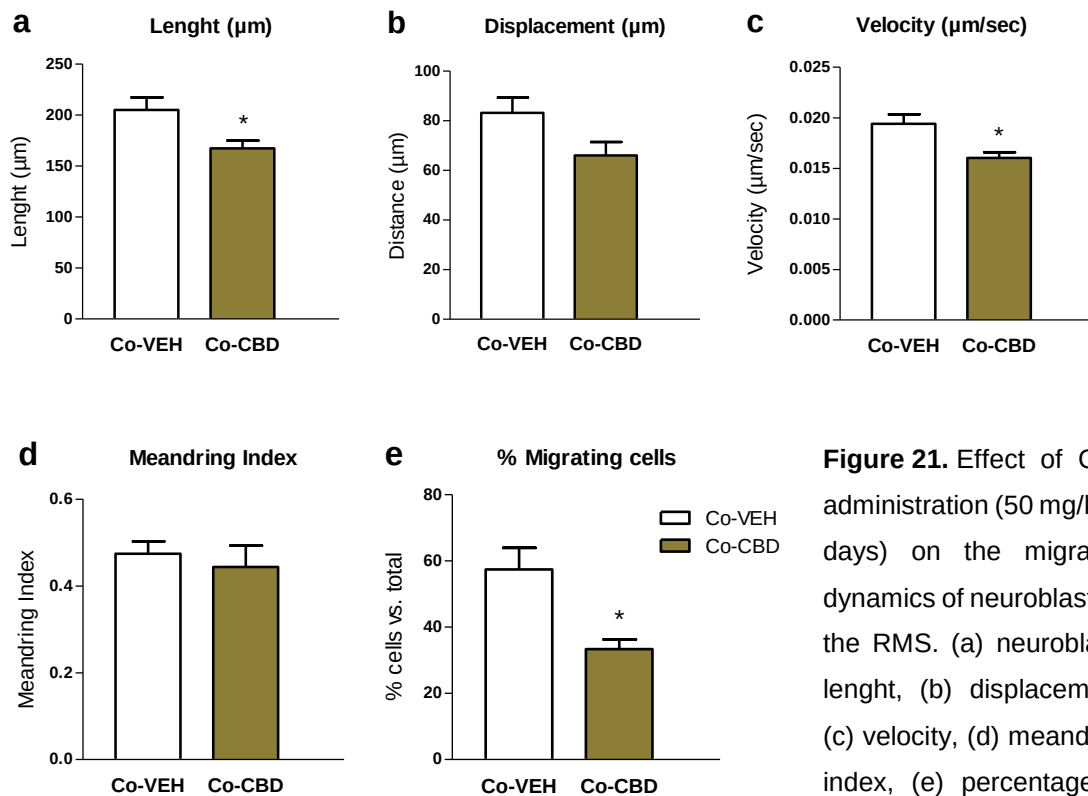


Figure 21. Effect of CBD administration (50 mg/kg/3 days) on the migration dynamics of neuroblasts in the RMS. (a) neuroblasts length, (b) displacement, (c) velocity, (d) meandering index, (e) percentage of

migratory cells. Results expressed as mean ± SEM of (Co-VEH: 5-6 n, Co-CBD: 5 n) animals (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Volocity® movies: Time-lapse imaging in brain slices of neuroblasts migrating along RMS of control (**Video 1**) and CBD-treated (**Video 2**) pups.



C. KEY ROLE OF 5-HT_{1A} RECEPTOR IN THE BEHAVIOURAL AND NEUROCHEMICAL EFFECTS OF CANNABIDIOL

C.1. 5-HT_{1A} receptor-dependent antidepressant-like effects of cannabidiol in the open field test

Selective antagonists of 5-HT_{1A} and CB₁-receptors were used to investigate the neurochemical mechanisms underlying acute CBD effects on the OBX-induced behaviour. Selective antagonists of 5-HT_{1A} (WAY, 0.3 mg/kg) and CB₁ (AM251, 0.3 mg/kg) receptors were coadministered with CBD (50 mg/kg i.p.) 30 min before the behavioural testing in the OFT. At these doses, these antagonists alone did not induce any behavioural alteration in OBX (Fig. 22ab) or sham (data not shown) animals in the parameters studied. A higher dose of AM251 (1mg/kg, i.p.) was also tested but it was discarded since it altered the central activity by itself and it did not reverse the antihyperactive effects of CBD (data not shown).

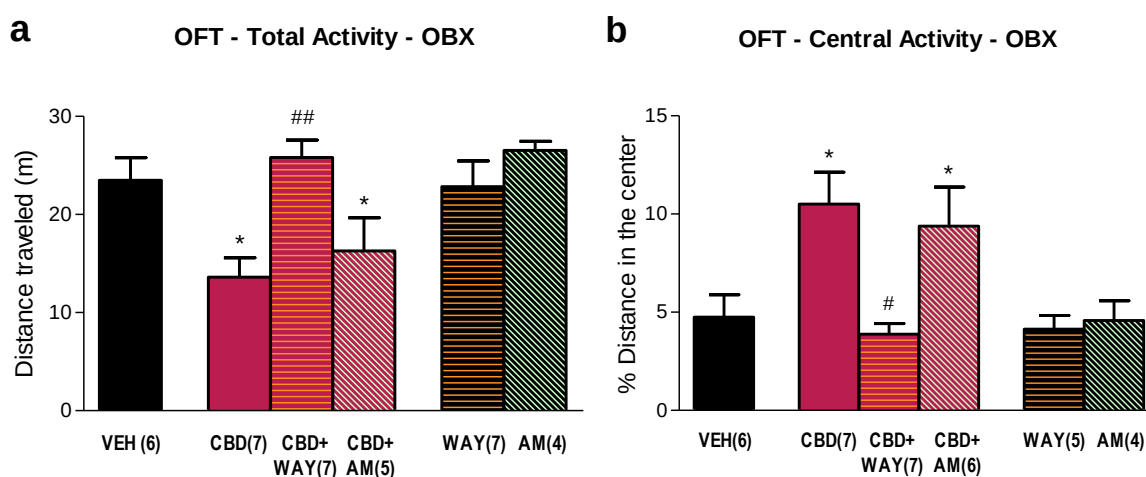


Figure 22. Behavioural effects in the OFT of acute administration of 5-HT_{1A} and CB₁ receptor antagonists together with CBD. (a) Hyperactivity reversal induced by CBD was totally blocked by WAY100635 coadministration. (b) The increase in central activity induced by CBD was also inhibited by WAY100635. Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. *p < 0.05 vs. OBX VEH; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. OBX CBD.

Interestingly, WAY100635 was able to prevent the CBD-induced reversal of OBX-hyperactivity (OBX CBD vs. OBX CBD+WAY, $p < 0.01$) (Fig. 22a). It also inhibited the beneficial effect of CBD on central ambulation scores in these subjects (OBX CBD vs. OBX CBD+WAY, $p < 0.05$) (Fig. 22b), without altering sham mice activity. By contrast, AM251 was not able to counteract the behavioural effects induced by CBD in OBX animals (Fig. 22ab).

C.2. 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of serotonin and glutamate efflux induced by cannabidiol

Since the 5-HT_{1A} receptor blockade abolished the behavioural actions of acute CBD in the OFT, the effect of WAY100635 upon the CBD-induced release of 5-HT and glutamate was studied.

Administration of WAY100635 prevented 5-HT outflow induced by CBD in OBX animals ($p < 0.05$ vs. OBX CBD) (Fig. 23a) in good concordance with the behavioural findings. In sham animals, where CBD alone did not promote any 5-HT efflux alteration, the blockade of 5-HT_{1A} receptors resulted in a significant increase of 5-HT release in sham mice ($p < 0.01$ vs. SHAM CBD) (Fig. 23b). Additionally, WAY100635 blocked the increase of glutamate release induced by acute CBD both in OBX ($p < 0.01$) and sham ($p < 0.05$) mice (Fig. 24a and 24b). No significant alterations were measured upon 5-HT and glutamate levels when WAY100635 was administered alone to sham and OBX mice (data not shown).

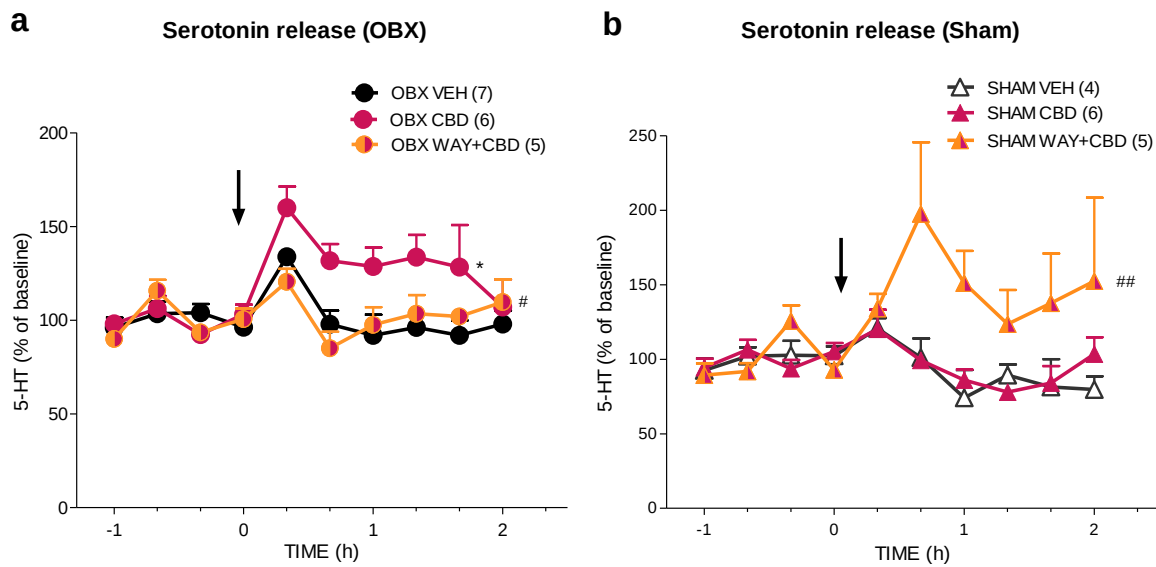


Figure 23. Effect of 5-HT_{1A} receptor blockade with WAY100635 in 5-HT release induced by CBD in vmPFCx of OBX (a) and sham animals (b). Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. * $p < 0.05$, vs. respective vehicle-treated group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. respective CBD-treated group.

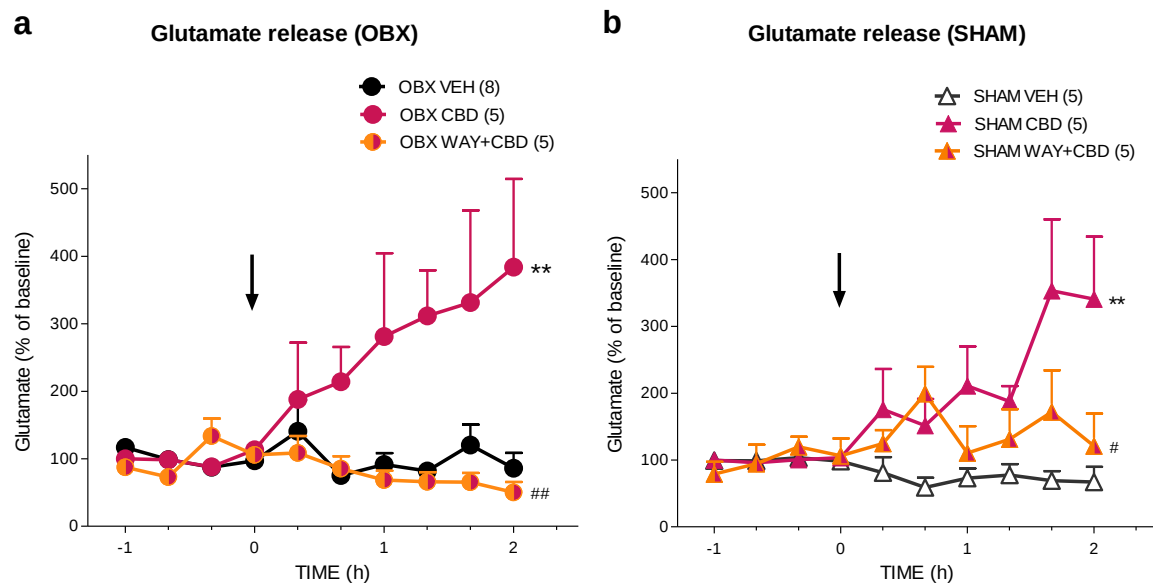


Figure 24. Effect of 5-HT_{1A} receptor blockade with WAY100635 in glutamate release induced by CBD in vmPFCx of OBX (a) and sham animals (b). Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. ** $p < 0.01$, vs. respective vehicle-treated group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. respective CBD-treated group.

Secondly, an AMPA-receptor antagonist was coadministered in order to investigate whether the glutamate release is a consequence of the 5-HTergic enhancement or *vice versa*, given the tight interplay between these two systems in the PFCx. AMPA blockade by NBQX antagonist did not modify the serotonergic response observed in OBX mice treated with CBD (OBX CBD+NBQX $p<0.05$ vs. OBX VEH; Fig. 25a), and neither altered the 5-HT release of sham animals subjected to CBD administration (Fig. 25b). Nevertheless, NBQX administration produced an inhibition of the glutamate release induced by CBD both in OBX ($p<0.01$ vs. OBX CBD) and sham mice ($p<0.001$ vs. SHAM CBD) (Fig 26ab). The administration of NBQX alone did not alter prefrontocortical 5-HT and glutamate release pattern (data not shown).

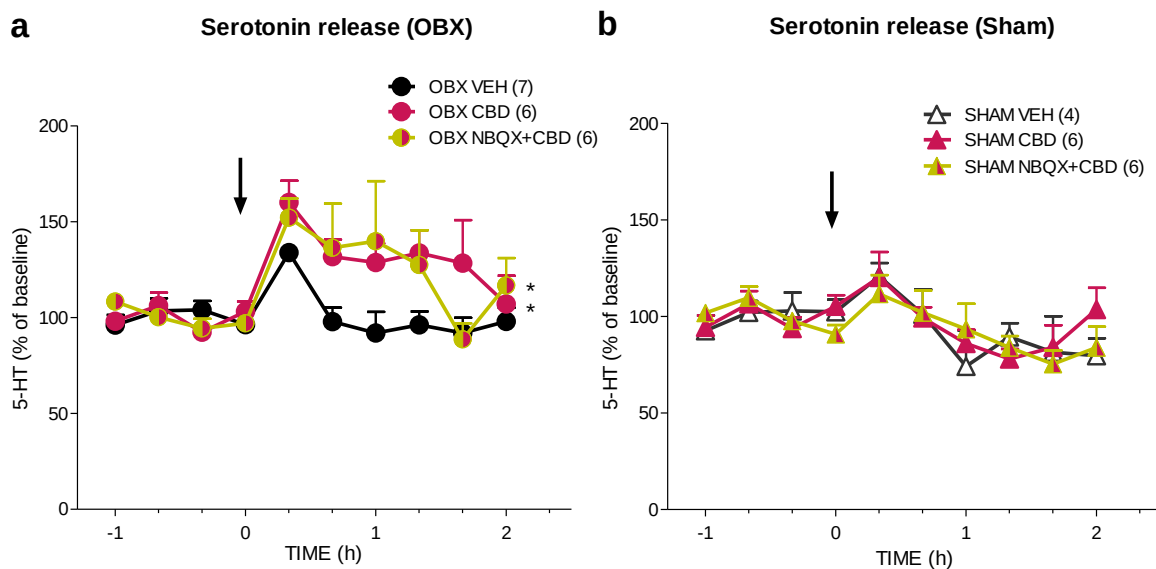


Figure 25. Effect of AMPA receptor blockade with NBQX in 5-HT release induced by CBD in vmPFCx of OBX (a) and sham animals (b). Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. * $p<0.05$, vs. respective vehicle-treated group.

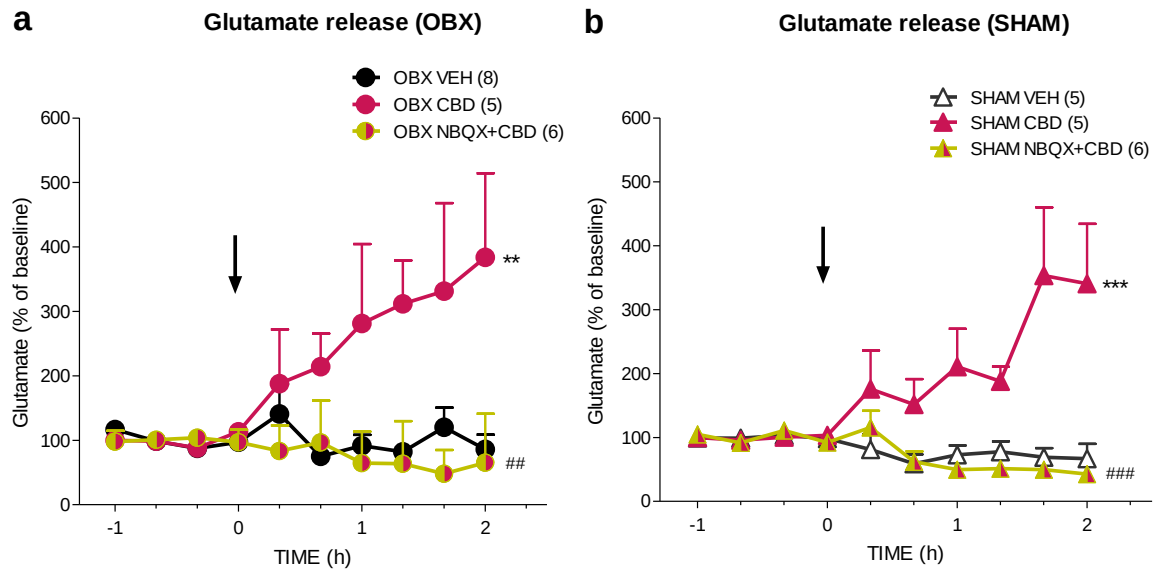


Figure 26. Effect of AMPA receptor blockade with NBQX in glutamate release induced by CBD in vmPFCx of OBX (a) and sham animals (b). Results expressed as mean $\pm$ SEM of (n) animals. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. respective vehicle-treated group; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. respective CBD-treated group.

DISCUSSION

A. SOCIAL ISOLATION DIFFERENTIALLY AFFECTS ANXIETY AND DEPRESSIVE-LIKE RESPONSES OF BULBECTOMIZED MICE

The OBX animal model of depression has been extensively used for the preclinical research of antidepressive and anxiolytic effects of drugs (Kelly et al., 1997; Song and Leonard, 2005), although the influence that housing conditions have on its behavioural manifestations has not yet been studied. Thus, the main aim of this study was to determine the best housing strategy to test the putative antidepressant-like effects of CBD. Our findings clearly demonstrate a differential effect of housing conditions on the depressive and anxiety-like responses exhibited by OBX mice.

The typical hyperactivity and increased exploratory behaviour that characterize the OBX syndrome (Mar et al., 2002; Mucignat-Caretta et al., 2006; Wang et al., 2007) are enhanced when animals are socially isolated. By contrast, the overall level of activity of sham animals is not altered by social isolation what it is in good concordance with other authors' studies (Koike et al., 2009; Voikar et al., 2005). It is noteworthy that the potentiation of the OBX syndrome by isolation leads to more marked behavioural differences between groups, what would allow an easier appreciation of antidepressant-like effects, even using a smaller number of mice.

Regarding anxiety-related responses, both bulbectomized and sham mice are significantly influenced by social isolation. On the one hand, the reduced central activity in the OFT induced by OBX is further decreased following social isolation in good agreement with previous studies demonstrating increased anxiety-like manifestations induced by OBX in rodents (Mucignat-Caretta et al., 2006; Wang et al., 2007; Zueger et al., 2005), as well as those induced by social isolation in mice (Koike et al., 2009; Voikar et al., 2005). Nevertheless, when the OBX model is conducted in combination with individual housing, the elevated anxiety level of sham isolated subjects may hinder the detection of the real anxiogenic effect induced by OBX and vice versa. For that reason, the real magnitude of the anxiolytic effects of a given drug could be underestimated.

On the other hand, social isolation triggered an increase in the latency to feeding of both sham and OBX mice in the NSF indicating a heightened anxious behaviour, which is consistent with those events observed in the OFT. It must be noted that all OBX mice showed a lower time to feeding compared to their sham counterparts, contrary to that expected to be found in a depressive/anxious-like model. As the test was conducted in a dimly lit environment, OBX animals did not display a hyperactive demeanor (Mar et al., 2002). Therefore, this reduced latency might be due to an increased exploratory

behaviour or an enhanced impulsivity of the model as was previously described (Zueger et al., 2005; Saitoh et al., 2006).

Depressive-like responses in sham and OBX mice were assessed in the FST and sucrose intake test. Social isolation did not affect the outcome of sham and OBX mice in any of the FST parameters analysed, in line with previous reports of C57BL6 male mice (Voikar et al., 2005). Interestingly, all bulbectomized mice exhibited lower immobility and higher swimming time scores than their sham counterparts, an unexpected outcome for an animal model of depression. This reduced immobility behaviour has been previously reported (Mucignat-Caretta et al., 2006), and explained on the basis of the hyperactivity that OBX mice exhibit under highly stressful situations. Regarding the climbing behaviour, we found a dramatic decrease of this parameter in OBX animals. We postulate that these reduced escape attempts of bulbectomized mice could be interpreted as a pronounced despair-behaviour, or as incapability to actively face stressful situations. In a differentiation of the behaviors in the FST, it is suggested that swimming involves the serotonergic system and climbing involves the adrenergic neurotransmission (Detke et al., 1995) and interestingly, regional differences in brain levels of NA and 5-HT of OBX animals have been reported (Roche et al., 2012; Xu et al., 2005). Further studies are needed to know whether these neurochemical changes are contributing to this differential behaviour of the OBX animal in the FST. Moreover, it should also be addressed the potential utility of this climbing response to assess the efficacy of antidepressants in this animal model of depression.

In the sucrose intake test, we found that social isolation did not influence the sucrose consumption of OBX mice, and neither in sham animals, in contrast with other author's findings in rats (Brenes and Fornaguera, 2009; Hong et al., 2012; Pisu et al., 2011). As mentioned above, the anxiety induced by social isolation does not affect the response of OBX mice either in the FST or in the sucrose intake test, therefore enabling the discrimination between depressive and anxiety-behaviours, what could be valuable when testing mood regulator compounds.

Taking together, our findings demonstrate that social isolation affects the behavioural response of OBX mice, enhancing the OBX syndrome and presumably making easier to evaluate the effect of antidepressants on some paradigms frequently performed on mice. On the other hand, individual housing increases the anxiety-related baseline values, making more difficult the detection of these pathological responses in OBX mice. Therefore, we conducted the OBX model of depression together with social isolation to test the antidepressant potential of CBD.

B. CANNABIDIOL ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECTS: BEHAVIOURAL, NEUROCHEMICAL, MOLECULAR AND CELLULAR ASPECTS

The second section in this thesis was aimed to evaluate the behavioural, neurochemical molecular and cellular effects of CBD, based on the hypothesis that it could exert antidepressant-like effects derived from several scientific evidences (see introduction).

In this work we demonstrate for the first time that CBD exerts rapid antidepressant-like effects as evidenced in the FST and by the reversal of OBX-induced hyperactivity immediately after the first injection in the OFT. Moreover, its efficacy is maintained and improved with the repeated administration, as the anhedonia was completely relieved after one week of treatment. Our results demonstrate the antidepressant potential of CBD in an animal model of depression, and confirm previous findings in the predictive FST (El-Alfy et al., 2010; Zanelati et al., 2010) and after anxiolytic actions in a chronic stress model (Campos et al., 2013b). Our experiments also showed an antidepressant-like effect in the FST, although in this case in the OBX model, despite the characteristic hyperactivity of this behavioural syndrome.

The dose adjustment appears to be particularly important for the emergence of the antidepressant effects. Hence, we found that 10 mg/kg of CBD exerts antidepressant-like actions after two weeks of treatment. Nevertheless, when a higher dose is administered at the beginning of the treatment (50 mg/kg), the hyperactivity reversal is evident from the first injection and the anti-anhedonic effect appears after only one week administration. It is noteworthy, that during the higher dose administration (50 mg/kg), a reduced sucrose preference was registered in some sham animals in parallel with a decline in food consumption and body weight. In this regard, CB₁ receptor antagonist/inverse agonists like rimonabant or AM251 promote anorectic effects (Colombo et al., 1998; Shearman et al., 2003) and CBD has also been demonstrated to be a CB₁ receptor antagonist (Thomas et al., 2007). Therefore, we assumed that this initial decrease in sucrose consumption is likely caused by an alteration of the appetite rather than to an emotional detriment, since the parallel behavioural assessment revealed an improved emotional response of OBX mice and no decline in sham animals after CBD. Our results reinforce that pharmacological strategies should be accounted to optimize the benefits of CBD treatment (McCarberg and Barkin, 2007).

Regarding anxiety-related behaviours, CBD exhibited acute anxiolytic-like effects in OBX mice, though in the two-week approach the anxiolytic-like trend did not achieve

significant values. Some authors have reported anxiogenic-like effects of CBD in control mice (ElBatsh et al., 2012; Fogaca et al., 2014) accounting for a disruption in serotonergic balance of postsynaptic areas. We did not observe this effect although methodological differences such as the individual housing of the animals, that results in enhanced basal anxiety (Linge et al., 2013) could explain this discrepancy.

In order to analyse the concurrent neurochemical events that may account for the behavioural benefits of CBD, microdialysis studies in vmPFCx were performed after acute and chronic administration. PFCx is a key area in the maladaptive behavioural regulation (Davidson, 2002; Drevets et al., 2008), specifically exhibited by depressed individuals and a typical feature of OBX mice (Fitzgerald et al., 2008; Song and Leonard, 2005). Interestingly, acute CBD induced an increase in 5-HT levels only in OBX animals, a finding that could account for the differential effects of CBD under healthy or pathological conditions. 5-HT augmentation in mPFCx has been described after the chronic (Gardier et al., 1996) but not acute (Beyer et al., 2002) antidepressant therapy, and it has been pointed as the main underpinning mechanism for the behavioural actions of antidepressants, together with adaptive changes in the serotonergic system. In this sense, we found a decreased functionality of somatodendritic 5-HT_{1A} receptors in the DRN of OBX animals. Consequently, this lower inhibitory tone onto the DRN firing would drive an increased 5-HT efflux in the projection areas (Casanovas et al., 1999; Celada et al., 2001), when CBD is administered acutely to OBX mice but not to sham counterparts. Likewise, following chronic administration a challenge dose of CBD induced 5-HT efflux in the vmPFCx, although in this case in both OBX and sham animals, likely indicating adaptive changes in serotonergic system of sham mice. Complementarily, we found that chronic CBD promoted an increase in postsynaptic 5-HT_{1A} receptors functionality in mPFCx, as occurs with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) (Matsuda, 2013). Concomitantly, we expected to find a decreased functionality of somatodendritic DRN 5-HT_{1A} receptors of sham animals, that justified the increased 5-HT efflux induced by chronic CBD, but we did not observe any alteration. However, it should be noted that somatodendritic 5-HT_{1A} receptors desensitization is not always detectable by [³⁵S]GTPγS binding techniques that only measure the G-proteins coupling to the receptor (Rossi et al., 2006). On the other hand, the functional deficits presented by OBX animals in limbic brain areas (DRN, amygdala, and hippocampus) were restored after chronic CBD treatment in parallel with the behavioural normalization, suggesting a crucial role of these receptors in the pharmacodynamics of CBD.

Additionally, we studied the CB₁ receptor functionality after CBD chronic treatment in limbic brain areas, since this receptor could be implicated in CBD mood-related actions. We found relevant alterations in the functionality of CB₁ receptors in the hypothalamus and mPFCx of OBX mice that was corrected after the CBD treatment, together with behavioural improvement. Given the crucial role of hypothalamus in hormonal response to stressful events and the control of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) by CB₁ receptors (Hill and Tasker, 2012), this CBD modulatory effect upon CB₁ receptors activity in hypothalamus could be responsible for modifying hormonal and behavioural responses to stress (Campos et al., 2013a). Indeed, other effective antidepressants such as citalopram induce reduction in the G protein coupling to CB₁ receptors in hypothalamus when the behavioural benefits take place (Hesketh et al., 2008). Other authors have described a decrease in CB₁ receptor density in the hypothalamus together with an increase in the affinity for the agonists (Hill et al., 2008b) in mice subjected to chronic unpredictable stress (CUS), finding that has been associated with a lower control of the HPA axis of stressed mice. This reduction in the CB₁ density could be derived from the increased receptor functionality or *viceversa*. Regarding PFCx, we found a reduction in the CB₁ functionality in our depressive-like model similarly to other authors finding in stress models (Llorente-Berzal et al., 2013). However, an increase of the G coupling was reported for other models as the OBX in rats (Rodriguez-Gaztelumendi et al., 2009) or in suicide victims (Hungund et al., 2004). The most accepted hypothesis supports that chronic stress promotes a reduction of CB₁ receptors coupling to G proteins in PFCx, in the same manner that the antagonist administration aggravates of depressive-like behaviours (McLaughlin et al., 2013). Nevertheless, an adaptive compensatory mechanism consisting in the increase of the number of receptors to keep a proper function, could lead to maladaptive pathological responses by itself (McLaughlin et al., 2014). This hypothesis supporting a defensive adaptive role of eCB system has been strengthened by several evidences, as for instance the increase in CB₁ receptors functionality in PFCx after antidepressant treatments (Mato et al., 2010), that is consistent with our findings for CBD. Thereby, CB₁ receptor seems to play a key role in the pathology of depression and the effects of CBD treatment, similarly to 5-HT_{1A} receptor and that could result from the interplay between 5-HT/eCB systems (Mato et al., 2010).

Interestingly, an effect of CBD through 5-HT_{1A} or CB₁ receptors could modulate not only serotonergic transmission but also glutamatergic. Microdialysis studies in vmPFCx revealed that acute CBD promoted also a marked glutamate elevation both in sham and in OBX mice. In the chronic approach, by contrast, the increase of glutamate efflux

induced by CBD was only observed in OBX mice. It is noteworthy that after the chronic treatment, basal levels of glutamate were elevated in sham and OBX mice though in a lower magnitude in the latter group. This finding could explain that, after chronic administration, an injection of CBD did not drive a relative glutamate increment in sham animals in contrast to OBX mice. Nonetheless, the magnitude of the elevation was definitively lower than in the acute approach. A minor increase in sustained glutamatergic tone of OBX animals in response to chronic CBD comparing to sham mice, could be related to a dysfunction in glutamatergic system, what has been described in OBX animals and also in depressed patients (Hashimoto, 2009; Webster et al., 2000). In this regard, the facilitation of glutamatergic neurotransmission, through an AMPAR-mediated mechanism has been associated with fast antidepressant efficacy of ketamine (Maeng et al., 2008). Thus, we suggest that the increased efflux of glutamate triggered by CBD from the first injection here described could lie behind the rapid antidepressant-like effects of CBD, while the sustained increment of glutamate might favour the maintained ones.

Apart from the neurochemical actions of CBD treatment, we analysed the modifications induced in intracellular neuroplasticity markers, which are associated with depression or antidepressant efficacy according to the neurotrophic-neuroplastic hypothesis. We found that CBD alters the activation pattern of mTOR pathway elements (mTOR, P70 and 4EBP1) although the results appear to be paradoxical. Namely, mTOR protein activation is increased in the OBX model, possibly because of the brain remodelling process after surgery insult. CBD promotes a restoral to control values after chronic administration contrary to that expected for a fast antidepressant. However, this result cannot be directly compared with studies on fast antidepressants since our studies are focused on chronic and maintained actions (24h after last injection) of CBD and not in the immediate signalling actions (Li et al., 2010).

Among the rest of the markers analysed, BDNF exhibited a dramatic increment in the OBX model which has been attributed to the proliferative increase after surgical damage as well. Again, CBD chronic administration almost normalized this protein levels in mPFCx and hippocampus and also the augmented mRNA expression in mPFCx. The reversal in increased neuroproliferative markers here described could be a consequence of the anti-inflammatory and pro-autophagic properties of CBD (Fernandez-Ruiz et al., 2013; Shrivastava et al., 2011).

Interestingly, we found a decrease in the mRNA expression of TrkB receptor in SVZ of OBX mice that was rescued after CBD treatment. SVZ is one of the few areas where

adult neurogenesis can be observed, so we were interested in exploring whether CBD could affect this process. The studies of morphology and migratory dynamics of neuroblasts along the RMS revealed a slight shortening of the main process length after CBD and in the number of cells migrating in altered direction, together with an increase in the stationary cells. These effects could be derived from the CB₁ antagonist properties of CBD, according to the findings of Oudin and collaborators, where the blockade of CB₁ receptor produced similar fate (Oudin et al., 2011). Another possible explanation would ascribe these effects to an indirect effect of CBD on BDNF and TrkB, which has been demonstrated to play a crucial role in the control of neuroblast migration process (Bagley and Belluscio, 2010; Chiaramello et al., 2007; Zhou et al., 2015). On the other hand both 5-HT levels and chronic treatment with 5-HT_{1A} receptor agonists strongly influence the neurogenesis and migration of neuroblasts from SVZ (Soumier et al., 2009; Tong et al., 2014). Although some significant modifications after CBD were registered in these experiments, they were subtle. Further studies would be necessary to determine the importance of the relation between the effects driven by CBD upon the morphology and migration of neuroblasts, and its antidepressant/anxiolytic actions.

C. 5-HT_{1A} RECEPTOR-MEDIATED FAST ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFICACY OF CANNABIDIOL

To gather more information about CBD mechanism of action, we initially assayed the implication of the two main targets of this compound, 5-HT_{1A} and CB₁ receptors, as both are crucial elements in the behavioural responses to stress and also for controlling 5-HT and glutamate release (see introduction). For that purpose we administered antagonists of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors together with CBD and analysed the acute effects of CBD in the OFT under these receptors blockade. Our findings revealed a crucial role of 5-HT_{1A} receptors in the behavioural effects of CBD, since WAY100635 but not AM251, prevented both the reversal of OBX-hyperactivity and the anxiolytic-like effects displayed by CBD. These findings are in good agreement with previous data published by other researchers where CBD decreased immobility in the FST (Zanelati et al., 2010) and anxiety/panic responses in a 5-HT_{1A} receptor-dependent manner (Campos et al., 2013a; Campos and Guimaraes, 2008; Fogaca et al., 2014; Soares Vde et al., 2010). However, it has been also described that some acute and chronic anxiolytic-like effects of CBD requires CB₁ receptors to occur (Campos and Guimaraes, 2008; Campos et al., 2013b; Casarotto et al., 2010; Do Monte et al., 2013). As anxiety is a complex syndrome affected by different brain processes (Davidson, 2002; Kheirbek et al., 2012), these two receptors could be implicated in the anxiety outcome at different levels. Nevertheless, in our work the blockade of CB₁ receptors did not prevent the behavioural antidepressant-like effects of CBD and they were neither mimicked by AM251 when administered alone, so eCB modulation do not seem to be initiating CBD antidepressant-like effects.

Our results indicate that 5-HT_{1A} receptor mediates CBD antidepressant-like effects and herein a putative mechanism is proposed. We postulate that CBD enhancing 5-HT_{1A} receptors function can induce 5-HT/glutamate release to the vmPFCx, which ultimately mediates the fast antidepressant-like actions of CBD. To test this hypothesis we conducted microdialysis studies in the presence of the 5-HT_{1A} receptors blockade. Interestingly, not only CBD-induced 5-HT increment but also glutamate increases were prevented by WAY100635 administration, what could explain the behavioural findings in the antagonism studies. Although this result confirms our proposal, further investigation is still required to elucidate how CBD acting on 5-HT_{1A} receptors induces the boost of 5-HT and glutamate.

Finally, we conducted an additional microdialysis experiment of CBD, but in this occasion under the blockade of AMPA glutamatergic receptors. We chose an AMPA receptor

antagonist since the fast antidepressant effects described for other drugs such as ketamine, act precisely through the activation of these receptors (Maeng et al., 2008). The aim of this experiment was elucidating if the 5-HT and glutamate release induced by CBD were enchainned and due to the activation of the mPFCx-DRN loop (Celada et al., 2013; Soiza-Reilly and Commons, 2011), or by contrast, they occurred concomitantly and independently. The glutamatergic transmission blockade by NBQX inhibited the glutamate release induced by CBD, although it does not avoid the cortical 5-HT release in OBX mice. This finding supports that the increments in 5-HT and glutamate are initiated independently, although through a 5-HT_{1A} receptor-mediated mechanism, as previously demonstrated. This issue does not rule out the possibility that a posterior stimulation of the mPFCx-DRN loop could be responsible for the maintained behavioural effects of CBD, still evident 24 hours after administration. Since the 5-HT_{1A} receptor is inhibitory in pyramidal cells, probably an inhibitory effect upon GABAergic interneurons, reducing the glutamate release blockade, would be the most reasonable mechanism explaining glutamatergic enhancement by CBD.

Based on all the findings of this thesis, we propose a hypothesis to explain the mechanism of action underlying CBD antidepressant-like effects (Fig. 27). In line with the 5-HT_{1A} allosteric modulation of CBD proposed by Rock and colleagues (Rock et al., 2012), we consider that cannabidiol acts enhancing 5-HT_{1A} receptor signalling. Therefore, CBD would potentiate the inhibitory function of 5-HT_{1A} receptors upon GABAergic interneurons (Celada et al., 2001), leading to a decrease of the GABA/glutamate balance and favouring glutamate signalling in postsynaptic areas. This glutamate facilitation in PFCx, through the descending projections to DRN, would stimulate the DRN firing and thus resulting in a cortical 5-HT increase (Celada et al., 2001). Other authors have described that 5-HT_{1A} receptor agonists enhance pyramidal cell firing in prefrontal cortex through a preferential action on GABA interneurons (Llado-Pelfort et al., 2012). In addition, CBD acting in the 5-HT_{1A} receptors of DRN local interneurons (Bonnavion et al., 2010; Day et al., 2004) would also cause DRN firing disinhibition. As in OBX animals 5-HT_{1A} receptors functionality in DRN is decreased, a lower inhibitory feedback would allow a strong 5-HT boost in projection areas. Whilst in sham animals, cortical 5-HT levels would not be considerably increased by CBD unless 5-HT_{1A} receptors were blocked. Our hypothesis is confirmed in microdialysis studies, where the administration of CBD together with WAY100635 produced a 5-HT enhancement in vmPFCx of sham animals, which was not registered when CBD was administered alone.

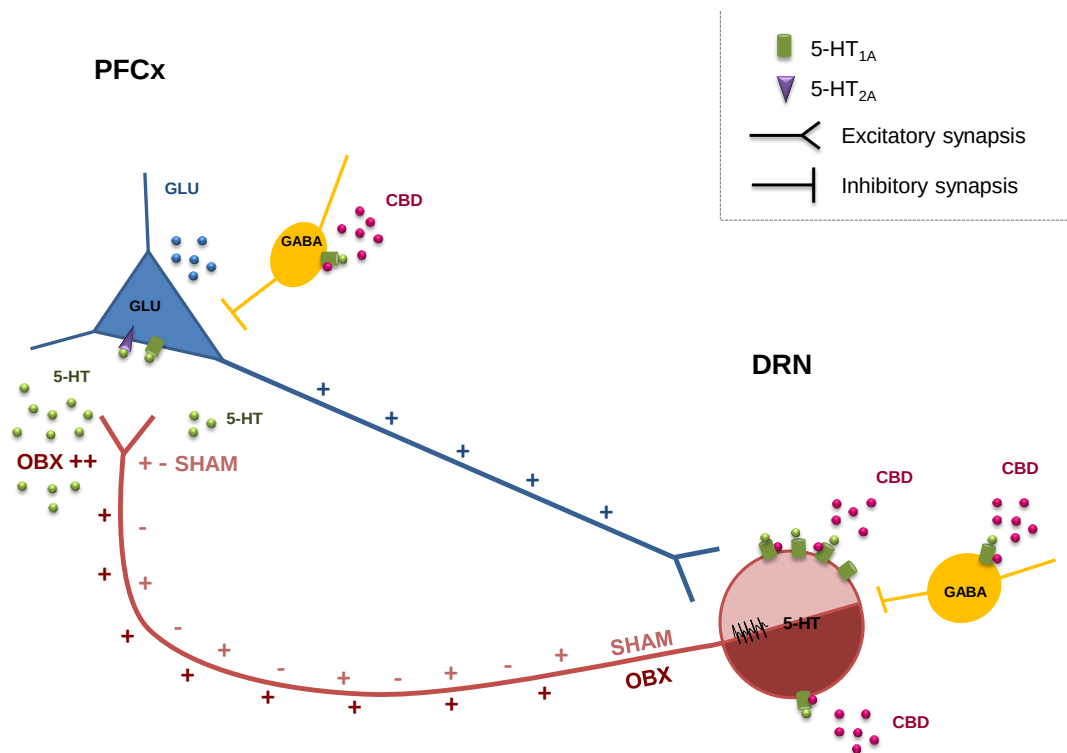


Figure 27. Schematic depiction of fast neurochemical effects of CBD and the proposed mechanism of action as a positive allosteric modulator of 5-HT_{1A} receptors. In the picture, we observe that CBD administration promoted a glutamate increase in mPFCx, which could result from the enhancement of the 5-HT_{1A} receptor-inhibitory actions on GABAergic interneurons. This enhancement of glutamatergic transmission, through pyramidal descending projections to DRN, might stimulate the neuronal firing of serotonergic neurons, and thus drive a 5-HT increase in mPFCx. Additionally, CBD acting on the local interneurons in DRN would reduce their inhibitory effect upon DRN discharge rates and therefore contribute to a stimulatory output. Nevertheless, the concurrent activation of somatodendritic 5-HT_{1A} receptors in DRN serotonergic somas would exert an inhibitory input, controlling the cortical 5-HT release in sham animals. Whilst, the decreased 5-HT_{1A} receptor functionality in DRN of OBX mice, that we have herein described, might explain a strong 5-HT release in mPFCx after CBD due to a lower inhibitory feedback. Finally, 5-HT increased efflux in mPFCx of OBX mice after CBD might also modulate pyramidal neurons activity through the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} membrane receptors. Both serotonergic and glutamatergic potentiation through allosteric modulation of 5-HT_{1A} receptor might underlie antidepressant fast antidepressant-like effects of CBD in the OBX model of depression.

To summarize, the enhancement of glutamatergic transmission together with the serotonergic potentiation in OBX mice immediately after the first CBD injection might lie behind the quick antidepressant-like responses observed in OBX animals. The stimulation of the loop between mPFCx-DRN could be responsible for the short-term maintained behavioural effects of CBD (24 hours post-injection). Likewise, the sustained increase in prefrontocortical glutamate contents after chronic administration of CBD, together with serotonergic increases and the adaptive changes in 5-HT_{1A} receptors functionality, might drive the consolidation and improvement of the antidepressant-like effects of chronic CBD (including anti-anhedonic actions). Although the herein proposed mechanism for CBD seems to be the most feasible accounting for our results, we do not discard the additional involvement of other receptors and/or the crosstalk among systems in the overall observed effects, as indicates for instance, the results regarding the CB₁ functionality modulation or the effects on the neurotrophic-related processes. In all, CBD is a multitarget drug that can modulate a variety of systems implicated in mood control and therefore, result in a great value from a clinical point of view.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

- Social isolation promotes behavioural alterations in bulbectomized animals facilitating the characterization of depressive-like states and, by contrast, hindering the evaluation of anxious-like behaviours.
- Cannabidiol exerts fast antidepressant-like effects in an animal model of depression that are maintained and consolidated with repeated administration.
- Cannabidiol administration induces neurochemical events associated with its fast antidepressant efficacy in the OBX model, such as the enhancement of glutamatergic transmission and the serotonergic augmentation in the prefrontal cortex.
- Chronic administration of cannabidiol restores the altered receptor functionality detected in the serotonergic and endocannabinoid systems induced by the bulbectomy.
- Chronic cannabidiol administration induces the normalization of certain neuroplasticity markers which are altered in the bulbectomy model and which are associated with etiopathology and treatment of depression.
- Cannabidiol administration promoted a slight modification in neuroblasts derived from the subventricular zone neurogenic origin in adult brain, affecting their morphology and migratory processes along the rostral migratory stream.
- 5-HT_{1A} receptor plays a key role in the mediation of fast antidepressant-like effects of cannabidiol, both in behavioural and neurochemical aspects.
- Cannabidiol could represent a new alternative for the treatment of depression that would solve many limitations of current therapies due to its fast onset of action, the simultaneous anxiolytic effects, the broad range for therapeutic dosage and the lack of psychotomimetic effects.
- A novel pharmacological strategy consisting in the dual enhancement of the serotonergic and glutamatergic transmission could bring new light to the discovery of new fast and effective antidepressant therapies.

REFERENCES

REFERENCES

- Adell, A., Artigas, F., 1998. A microdialysis study of the in vivo release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. *British journal of pharmacology* 125, 1361-1367.
- Bagley, J.A., Belluscio, L., 2010. Dynamic imaging reveals that brain-derived neurotrophic factor can independently regulate motility and direction of neuroblasts within the rostral migratory stream. *Neuroscience* 169, 1449-1461.
- Bambico, F.R., Katz, N., Debonnel, G., Gobbi, G., 2007. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 27, 11700-11711.
- Belvindrah, R., Nissant, A., Lledo, P.M., 2011. Abnormal neuronal migration changes the fate of developing neurons in the postnatal olfactory bulb. *J Neurosci* 31, 7551-7562.
- Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H., Chagas, M.H., de Oliveira, D.C., De Martinis, B.S., Kapczinski, F., Quevedo, J., Roesler, R., Schroder, N., Nardi, A.E., Martin-Santos, R., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., 2011. Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology* 36, 1219-1226.
- Beyer, C.E., Boikess, S., Luo, B., Dawson, L.A., 2002. Comparison of the effects of antidepressants on norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study. *J Psychopharmacol* 16, 297-304.
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., Di Marzo, V., 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134, 845-852.
- Bonnavion, P., Bernard, J.F., Hamon, M., Adrien, J., Fabre, V., 2010. Heterogeneous distribution of the serotonin 5-HT(1A) receptor mRNA in chemically identified neurons of the mouse rostral brainstem: Implications for the role of serotonin in the regulation of wakefulness and REM sleep. *J Comp Neurol* 518, 2744-2770.
- Brenes, J.C., Fornaguera, J., 2009. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav Brain Res* 198, 199-205.
- Brown, T.M., Brotchie, J.M., Fitzjohn, S.M., 2003. Cannabinoids decrease corticostriatal synaptic transmission via an effect on glutamate uptake. *J Neurosci* 23, 11073-11077.
- Campos, A.C., de Paula Soares, V., Carvalho, M.C., Ferreira, F.R., Vicente, M.A., Brandao, M.L., Zuardi, A.W., Zangrossi, H., Jr., Guimaraes, F.S., 2013a. Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 226, 13-24.
- Campos, A.C., Guimaraes, F.S., 2008. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 199, 223-230.
- Campos, A.C., Ortega, Z., Palazuelos, J., Fogaca, M.V., Aguiar, D.C., Diaz-Alonso, J., Ortega-Gutierrez, S., Vazquez-Villa, H., Moreira, F.A., Guzman, M., Galve-Roperh, I., Guimaraes, F.S., 2013b. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 1407-1419.

- Casanovas, J.M., Vilaro, M.T., Mengod, G., Artigas, F., 1999. Differential regulation of somatodendritic serotonin 5-HT_{1A} receptors by 2-week treatments with the selective agonists alnespirone (S-20499) and 8-hydroxy-2-(Di-n-propylamino)tetralin: microdialysis and autoradiographic studies in rat brain. *J Neurochem* 72, 262-272.
- Casarotto, P.C., Gomes, F.V., Resstel, L.B., Guimaraes, F.S., 2010. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB₁ receptors. *Behav Pharmacol* 21, 353-358.
- Celada, P., Puig, M.V., Artigas, F., 2013. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Front Integr Neurosci* 7, 25.
- Celada, P., Puig, M.V., Casanovas, J.M., Guillozo, G., Artigas, F., 2001. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21, 9917-9929.
- Colombo, G., Agabio, R., Diaz, G., Lobina, C., Reali, R., Gessa, G.L., 1998. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci* 63, PL113-117.
- Costa, B., Giagnoni, G., Franke, C., Trovato, A.E., Colleoni, M., 2004. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol* 143, 247-250.
- Cryan, J.F., Page, M.E., Lucki, I., 2005. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 182, 335-344.
- Chiaramello, S., Dalmasso, G., Bezin, L., Marcel, D., Jourdan, F., Peretto, P., Fasolo, A., De Marchis, S., 2007. BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci* 26, 1780-1790.
- Davidson, R.J., 2002. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiatry* 51, 68-80.
- Day, H.E., Greenwood, B.N., Hammack, S.E., Watkins, L.R., Fleshner, M., Maier, S.F., Campeau, S., 2004. Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 474, 364-378.
- Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121, 66-72.
- Do Monte, F.H., Souza, R.R., Bitencourt, R.M., Kroon, J.A., Takahashi, R.N., 2013. Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB₁ receptors. *Behav Brain Res* 250, 23-27.
- Drevets, W.C., Price, J.L., Furey, M.L., 2008. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct* 213, 93-118.
- Du, J., Machado-Vieira, R., Maeng, S., Martinowich, K., Manji, H.K., Zarate, C.A., Jr., 2006. Enhancing AMPA to NMDA throughput as a convergent mechanism for antidepressant action. *Drug Discov Today Ther Strateg* 3, 519-526.
- El-Alfy, A.T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D., Khan, I., ElSohly, M., Ross, S., 2010. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav* 95, 434-442.

- ElBatsh, M.M., Assareh, N., Marsden, C.A., Kendall, D.A., 2012. Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 221, 239-247.
- Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G.I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratu, M.R., Iuvone, T., Steardo, L., 2011. Cannabidiol reduces Abeta-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARgamma involvement. *PLoS One* 6, e28668.
- Fernandez-Ruiz, J., Sagredo, O., Pazos, M.R., Garcia, C., Pertwee, R., Mechoulam, R., Martinez-Orgado, J., 2013. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br J Clin Pharmacol* 75, 323-333.
- Fitzgerald, P.B., Laird, A.R., Maller, J., Daskalakis, Z.J., 2008. A meta-analytic study of changes in brain activation in depression. *Hum Brain Mapp* 29, 683-695.
- Fogaca, M.V., Reis, F.M., Campos, A.C., Guimaraes, F.S., 2014. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 410-419.
- Fone, K.C., Porkess, M.V., 2008. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 1087-1102.
- Gardier, A.M., Malagie, I., Trillat, A.C., Jacquot, C., Artigas, F., 1996. Role of 5-HT1A autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol* 10, 16-27.
- Gordon, J.A., Hen, R., 2004. The serotonergic system and anxiety. *Neuromolecular Med* 5, 27-40.
- Gresack, J.E., Risbrough, V.B., Scott, C.N., Coste, S., Stenzel-Poore, M., Geyer, M.A., Powell, S.B., 2010. Isolation rearing-induced deficits in contextual fear learning do not require CRF(2) receptors. *Behav Brain Res* 209, 80-84.
- Guimaraes, F.S., Chiaretti, T.M., Graeff, F.G., Zuardi, A.W., 1990. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100, 558-559.
- Hashimoto, K., 2009. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* 61, 105-123.
- Heidbreder, C.A., Weiss, I.C., Domeney, A.M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou, G., Feldon, J., Moran, M.C., Nelson, P., 2000. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100, 749-768.
- Hesketh, S.A., Brennan, A.K., Jessop, D.S., Finn, D.P., 2008. Effects of chronic treatment with citalopram on cannabinoid and opioid receptor-mediated G-protein coupling in discrete rat brain regions. *Psychopharmacology (Berl)* 198, 29-36.
- Hill, M.N., Carrier, E.J., Ho, W.S., Shi, L., Patel, S., Gorzalka, B.B., Hillard, C.J., 2008a. Prolonged glucocorticoid treatment decreases cannabinoid CB1 receptor density in the hippocampus. *Hippocampus* 18, 221-226.
- Hill, M.N., Carrier, E.J., McLaughlin, R.J., Morrish, A.C., Meier, S.E., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2008b. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem* 106, 2322-2336.
- Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2005. Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav Pharmacol* 16, 333-352.

- Hill, M.N., Tasker, J.G., 2012. Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 204, 5-16.
- Hong, S., Flashner, B., Chiu, M., ver Hoeve, E., Luz, S., Bhatnagar, S., 2012. Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. *Physiol Behav* 105, 269-275.
- Hungund, B.L., Vinod, K.Y., Kassir, S.A., Basavarajappa, B.S., Yalamanchili, R., Cooper, T.B., Mann, J.J., Arango, V., 2004. Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTPgammaS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Mol Psychiatry* 9, 184-190.
- Ibi, D., Takuma, K., Koike, H., Mizoguchi, H., Tsuritani, K., Kuwahara, Y., Kamei, H., Nagai, T., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Yamada, K., 2008. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J Neurochem* 105, 921-932.
- Jarosik, J., Legutko, B., Unsicker, K., von Bohlen Und Halbach, O., 2007. Antidepressant-mediated reversal of abnormal behavior and neurodegeneration in mice following olfactory bulbectomy. *Exp Neurol* 204, 20-28.
- Jin, K., Xie, L., Kim, S.H., Parmentier-Batteur, S., Sun, Y., Mao, X.O., Childs, J., Greenberg, D.A., 2004. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 66, 204-208.
- Kelly, J.P., Wrynn, A.S., Leonard, B.E., 1997. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther* 74, 299-316.
- Kheirbek, M.A., Klemenhagen, K.C., Sahay, A., Hen, R., 2012. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci* 15, 1613-1620.
- Koike, H., Ibi, D., Mizoguchi, H., Nagai, T., Nitta, A., Takuma, K., Nabeshima, T., Yoneda, Y., Yamada, K., 2009. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav Brain Res* 202, 114-121.
- Lapiz, M.D., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., Marsden, C.A., 2003. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci Behav Physiol* 33, 13-29.
- Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C., Klosterkotter, J., Hellmich, M., Koethe, D., 2012. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2, e94.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y., Aghajanian, G., Duman, R.S., 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329, 959-964.
- Linge, R., Pazos, A., Diaz, A., 2013. Social isolation differentially affects anxiety and depressive-like responses of bulbectomized mice. *Behav Brain Res* 245, 1-6.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Llado-Pelfort, L., Santana, N., Ghisi, V., Artigas, F., Celada, P., 2012. 5-HT1A receptor agonists enhance pyramidal cell firing in prefrontal cortex through a preferential action on GABA interneurons. *Cereb Cortex* 22, 1487-1497.
- Llorente-Berzal, A., Assis, M.A., Rubino, T., Zamberletti, E., Marco, E.M., Parolaro, D., Ambrosio, E., Viveros, M.P., 2013. Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and

immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure. *Pharmacol Res* 74, 23-33.

Maeng, S., Zarate, C.A., Jr., Du, J., Schloesser, R.J., McCammon, J., Chen, G., Manji, H.K., 2008. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* 63, 349-352.

Magen, I., Avraham, Y., Ackerman, Z., Vorobiev, L., Mechoulam, R., Berry, E.M., 2010. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT1A receptor activation. *Br J Pharmacol* 159, 950-957.

Malfait, A.M., Gallily, R., Sumariwalla, P.F., Malik, A.S., Andreaskos, E., Mechoulam, R., Feldmann, M., 2000. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9561-9566.

Mar, A., Spreekmeester, E., Rochford, J., 2002. Fluoxetine-induced increases in open-field habituation in the olfactory bulbectomized rat depend on test aversiveness but not on anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 703-712.

Markou, A., Chiamulera, C., Geyer, M.A., Tricklebank, M., Steckler, T., 2009. Removing obstacles in neuroscience drug discovery: the future path for animal models. *Neuropsychopharmacology* 34, 74-89.

Mato, S., Vidal, R., Castro, E., Diaz, A., Pazos, A., Valdizan, E.M., 2010. Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms. *Mol Pharmacol* 77, 424-434.

Matsuda, T., 2013. Neuropharmacologic studies on the brain serotonin1A receptor using the selective agonist osetozotan. *Biol Pharm Bull* 36, 1871-1882.

McCarberg, B.H., Barkin, R.L., 2007. The future of cannabinoids as analgesic agents: a pharmacologic, pharmacokinetic, and pharmacodynamic overview. *Am J Ther* 14, 475-483.

McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Bambico, F.R., Stuhr, K.L., Gobbi, G., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2012. Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. *Eur Neuropsychopharmacol* 22, 664-671.

McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Dang, S.S., Wainwright, S.R., Galea, L.A., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2013. Upregulation of CB(1) receptor binding in the ventromedial prefrontal cortex promotes proactive stress-coping strategies following chronic stress exposure. *Behav Brain Res* 237, 333-337.

McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2014. A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 42, 116-131.

McLaughlin, R.J., Hill, M.N., Morrish, A.C., Gorzalka, B.B., 2007. Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect. *Behav Pharmacol* 18, 431-438.

McPartland, J.M., Duncan, M., Di Marzo, V., Pertwee, R.G., 2015. Are cannabidiol and Delta(9) -tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br J Pharmacol* 172, 737-753.

Mendiguren, A., Pineda, J., 2009. Effect of the CB(1) receptor antagonists rimonabant and AM251 on the firing rate of dorsal raphe nucleus neurons in rat brain slices. *Br J Pharmacol* 158, 1579-1587.

- Mucignat-Caretta, C., Bondi, M., Caretta, A., 2006. Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice. *Physiol Behav* 89, 637-643.
- Naert, A., Callaerts-Vegh, Z., D'Hooge, R., 2011. Nocturnal hyperactivity, increased social novelty preference and delayed extinction of fear responses in post-weaning socially isolated mice. *Brain Res Bull* 85, 354-362.
- Navarrete, M., Araque, A., 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57, 883-893.
- Oudin, M.J., Gajendra, S., Williams, G., Hobbs, C., Lalli, G., Doherty, P., 2011. Endocannabinoids regulate the migration of subventricular zone-derived neuroblasts in the postnatal brain. *J Neurosci* 31, 4000-4011.
- Parks, C.L., Robinson, P.S., Sibille, E., Shenk, T., Toth, M., 1998. Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10734-10739.
- Pazos, M.R., Mohammed, N., Lafuente, H., Santos, M., Martinez-Pinilla, E., Moreno, E., Valdizan, E., Romero, J., Pazos, A., Franco, R., Hillard, C.J., Alvarez, F.J., Martinez-Orgado, J., 2013. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT(1A) and CB2 receptors. *Neuropharmacology* 71, 282-291.
- Pisu, M.G., Dore, R., Mostallino, M.C., Loi, M., Pibiri, F., Mameli, R., Cadeddu, R., Secci, P.P., Serra, M., 2011. Down-regulation of hippocampal BDNF and Arc associated with improvement in aversive spatial memory performance in socially isolated rats. *Behav Brain Res* 222, 73-80.
- Resstel, L.B., Tavares, R.F., Lisboa, S.F., Joca, S.R., Correa, F.M., Guimaraes, F.S., 2009. 5-HT1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 156, 181-188.
- Rock, E.M., Bolognini, D., Limebeer, C.L., Cascio, M.G., Anavi-Goffer, S., Fletcher, P.J., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., Parker, L.A., 2012. Cannabidiol, a non-psychoactive component of cannabis, attenuates vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT(1A) somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus. *Br J Pharmacol* 165, 2620-2634.
- Roche, M., Kerr, D.M., Hunt, S.P., Kelly, J.P., 2012. Neurokinin-1 receptor deletion modulates behavioural and neurochemical alterations in an animal model of depression. *Behav Brain Res* 228, 91-98.
- Rodriguez-Gaztelumendi, A., Rojo, M.L., Pazos, A., Diaz, A., 2009. Altered CB receptor-signaling in prefrontal cortex from an animal model of depression is reversed by chronic fluoxetine. *J Neurochem* 108, 1423-1433.
- Rossi, D.V., Valdez, M., Gould, G.G., Hensler, J.G., 2006. Chronic administration of venlafaxine fails to attenuate 5-HT1A receptor function at the level of receptor-G protein interaction. *Int J Neuropsychopharmacol* 9, 393-406.
- Santana, N., Bortolozzi, A., Serrats, J., Mengod, G., Artigas, F., 2004. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14, 1100-1109.
- Sato, H., Skelin, I., Debonnel, G., Diksic, M., 2008. Chronic buspirone treatment normalizes open field behavior in olfactory bulbectomized rats: assessment with a quantitative autoradiographic evaluation of the 5-HT1A binding sites. *Brain Res Bull* 75, 545-555.
- Shearman, L.P., Rosko, K.M., Fleischer, R., Wang, J., Xu, S., Tong, X.S., Rocha, B.A., 2003. Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. *Behav Pharmacol* 14, 573-582.

- Shrivastava, A., Kuzontkoski, P.M., Groopman, J.E., Prasad, A., 2011. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther* 10, 1161-1172.
- Sim, L.J., Selley, D.E., Childers, S.R., 1995. In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7242-7246.
- Sim, L.J., Selley, D.E., Childers, S.R., 1997. Autoradiographic visualization in brain of receptor-G protein coupling using [35S]GTP gamma S binding. *Methods Mol Biol* 83, 117-132.
- Soares Vde, P., Campos, A.C., Bortoli, V.C., Zangrossi, H., Jr., Guimaraes, F.S., Zuardi, A.W., 2010. Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT1A receptors. *Behav Brain Res* 213, 225-229.
- Soiza-Reilly, M., Commons, K.G., 2011. Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat* 41, 247-255.
- Sonego, M., Zhou, Y., Oudin, M.J., Doherty, P., Lalli, G., 2013. In vivo postnatal electroporation and time-lapse imaging of neuroblast migration in mouse acute brain slices. *J Vis Exp*.
- Song, C., Leonard, B.E., 2005. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 627-647.
- Soumier, A., Banasr, M., Lortet, S., Masméjean, F., Bernard, N., Kerkerian-Le-Goff, L., Gabriel, C., Millan, M.J., Mocaer, E., Daszuta, A., 2009. Mechanisms contributing to the phase-dependent regulation of neurogenesis by the novel antidepressant, agomelatine, in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34, 2390-2403.
- Tadano, T., Hozumi, S., Yamadera, F., Murata, A., Nijima, F., Tan-No, K., Nakagawasai, O., Kisara, K., 2004. Effects of NMDA receptor-related agonists on learning and memory impairment in olfactory bulbectomized mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26, 93-97.
- Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., Pertwee, R.G., 2007. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 150, 613-623.
- Tong, C.K., Chen, J., Cebrian-Silla, A., Mirzadeh, Z., Obernier, K., Guinto, C.D., Tecott, L.H., Garcia-Verdugo, J.M., Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., 2014. Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell* 14, 500-511.
- Valzelli, L., 1973. The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia* 31, 305-320.
- Voikar, V., Polus, A., Vasar, E., Rauvala, H., 2005. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav* 4, 240-252.
- Wang, D., Noda, Y., Tsunekawa, H., Zhou, Y., Miyazaki, M., Senzaki, K., Nabeshima, T., 2007. Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety. *Behav Brain Res* 178, 262-273.
- Webster, H.H., Flores, G., Marcotte, E.R., Cecyre, D., Quirion, R., Srivastava, L.K., 2000. Olfactory bulbectomy alters NMDA receptor levels in the rat prefrontal cortex. *Synapse* 37, 159-162.
- Xu, Y., Ku, B.S., Yao, H.Y., Lin, Y.H., Ma, X., Zhang, Y.H., Li, X.J., 2005. Antidepressant effects of curcumin in the forced swim test and olfactory bulbectomy models of depression in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82, 200-206.

Zanelati, T.V., Biojone, C., Moreira, F.A., Guimaraes, F.S., Joca, S.R., 2010. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol* 159, 122-128.

Zhou, Y., Oudin, M.J., Gajendra, S., Sonogo, M., Falenta, K., Williams, G., Lalli, G., Doherty, P., 2015. Regional effects of endocannabinoid, BDNF and FGF receptor signalling on neuroblast motility and guidance along the rostral migratory stream. *Molecular and Cellular Neuroscience* 64, 32-43.

Zueger, M., Urani, A., Chourbaji, S., Zacher, C., Roche, M., Harkin, A., Gass, P., 2005. Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. *Neurosci Lett* 374, 142-146.

ANNEX

ANNEX

Drugs ad Reactives	Provider
(-)Cannabidiol	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
WAY100635	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
NBQX disodium salt	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
AM251	Abcam, Cambridge, UK
AM630	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
WAY100635	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
LY341495	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
MDL11939	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
Ketanserina	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
WIN552122	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
(±)8-OH-DPAT	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
(+)8-(OH)-DPAT	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
Fluoxetine	Fagron group, B.V., Rotterdam, The Netherlands
Paroxetine	FAES FARMA S.A., Leioa, Bizkaia, España
Sodium Pentobarbital	Boeringher Ingelheim (Germany)
Citalopram	FAES FARMA S.A., Leioa, Bizkaia, España
[3H]citalopram	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Tween 80®	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Propilenglycol®	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Isoflurane	Schering Plough, United Kingdom
Sucrose	Scharlau Chemie S.A., Spain
[35S]-GTPγS	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
GDP	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
DTT	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Adenosin deaminase	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
GTPγS	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
BSA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
KCl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Paraformaldehyde (PFA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PBS	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
DEPC	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
TEA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ácetic anhidre	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
α35S-dATP (desoxiadenosina 5'-[α-thio]trifosfato, [35S])	New Research Products, Dupont
Terminal transferase (TdT)	Promega Biotech Ibérica S.L., Madrid, España
Sodium citrate	Panreac, Barcelona, España
Sodium phosphate	Panreac, Barcelona, España
Dextran sulfate	Panreac, Barcelona, España
Sodium pirophosphate	Panreac, Barcelona, España

Polyvinylpyrrolidone	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ficoll	Panreac, Barcelona, España
Salmon DNA sperm	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Polyadenylic acid (poliA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Heparine	Panreac, Barcelona, España
Formamide deionized	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Hepes-HCl	USB, Buckinghamshire, UK
MgCl ₂	Scharlab S.L., Barcelona, España
KCl	Panreac, Barcelona, España
Igepal	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Sodium deoxycolate	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
SDS	USB, Buckinghamshire, UK
Tween-20®	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Leupeptin	Amersham, Buckinghamshire, UK
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Antipain	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Quimostatin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Sodium vanadate	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Sosim phosphate	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Cantaridin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
E-6410	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Acrilamide-bis	Bio-Rad, California, USA
Amonium persulphate (APS)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Phenol red	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Glicine	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Methanol	Scharlab S.L., Barcelona, España
CaCl ₂	Panreac, Barcelona, España
Acid 1-octanosulphonic sodium salt	Panreac, Barcelona, España
Na ₂ -EDTA	Panreac, Barcelona, España
Phosphoric acid	Panreac, Barcelona, España
Glucose	Invitrogen
B27 supplement	Invitrogen
L-glutamine	Invitrogen
HEPES	Invitrogen
Penicilin/streptomycin	Invitrogen
Foetal calf serum (FCS)	Invitrogen
Phenol red-free DMEM	Invitrogen
PBS tablets	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Sodium azide	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PFA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Gelatine	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Triton-X	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

PUBLICACIONES-ARTÍCULOS

Linge R., Pazos Á, Díaz Á. *Social isolation differentially affects anxiety and depressive-like responses of bulbectomized mice.* (2013) Behav Brain Res. May 15; 245:1-6

[DOI: 10.1016/j.bbr.2013.01.041](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.041)

Pilar-Cuéllar F., Vidal R., Díaz A., Castro E., dos Anjos S., Pascual-Brazo J., Linge R., Vargas V., Blanco H., Martínez-Villayandre B., Pazos Á., Valdizán E.M. *Neural plasticity and proliferation in the generation of antidepressant effects: hippocampal implication.* (2013) Neural Plast.; 2013:537265.

[DOI: 10.1155/2013/537265](https://doi.org/10.1155/2013/537265)

Vidal R., Pilar-Cuéllar F., dos Anjos S., Linge R., Treceño B., Vargas V., Rodríguez-Gaztelumendi A., Mostany R., Castro E., Díaz A., Valdizán E.M., Pazos A. *New strategies in the development of antidepressants: towards the modulation of neuroplasticity pathways.* (2011) Curr Pharm Des.; 17(5):521-33.

[DOI: 10.2174/138161211795164086](https://doi.org/10.2174/138161211795164086)

Vidal R., Castro E., Pilar-Cuéllar F., Pascual-Brazo J., Díaz A., Rojo M.L., Linge R., Martín A., Valdizán E.M., Pazos A. *Serotonin 5-HT₄ receptors: A new strategy for developing fast acting antidepressants?* (2014) Curr Pharm Des.;20(23):3751-62.

[DOI: 10.2174/13816128113196660734](https://doi.org/10.2174/13816128113196660734)