



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

Corso di Dottorato in Neurobiologia XXVI ciclo

Coordinatore Prof.ssa Daniela Parolaro

**EFFETTI DEL TRATTAMENTO CRONICO CON
NANDROLONE DECANOATO IN RATTI MASCHI
ADOLESCENTI ED ADULTI SUL COMPORTAMENTO
EMOTIVO ED INTERAZIONE CON IL SISTEMA
ENDOCANNABINOIDE**

Tutor: Dott.ssa Tiziana Rubino

Tesi di dottorato di:

SIMONA SPEZIALI

Matricola n. 616297

Anno Accademico: 2012/2013

I dati riportati nella presente tesi di dottorato sono stati ottenuti presso il Laboratorio di Neuropsicofarmacologia del Dipartimento di Scienze Teoriche ed Applicate (Dista) –Sede di Busto Arsizio (Università degli Studi dell’Insubria).

La collaborazione con la Prof.ssa Romualdi (Alma Mater Studiorum Università di Bologna) ha permesso di effettuare dosaggi radioimmunologici della dinorfina A.

Gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati condotti in collaborazione con la Dott.ssa Gobbi (McGill University, Montreal)

INDICE

INDICE	3
RIASSUNTO.....	8
INTRODUZIONE	11
Gli steroidi androgeni anabolizzanti (SAA)	11
Utilizzo clinico di SAA.....	13
Abuso di SAA.....	13
Un po' di storia.....	13
Gli utilizzatori	14
Modalità di assunzione	15
SAA e dipendenza	16
Abuso di SAA e salute	17
Effetti fisici.....	18
Effetti comportamentali.....	18
Abuso di SAA negli adolescenti.....	20
Gli SAA e l'adolescenza	22
SAA e modelli animali	23
Il sistema degli endocannabinoidi	24
I recettori cannabici	24
Gli endocannabinoidi	25
Sistema endocannabinoide e depressione.....	26
Co-abuso di SAA e cannabinoidi	28
SCOPO	30
MATERIALI E METODI	33
Animali	33
Farmaci.....	33
Test comportamentali	34

Test del nuoto forzato.....	34
Test di preferenza al saccarosio.....	34
Test dell'Open Field.....	35
Test dell'Elevated Plus-Maze	35
Test del riconoscimento del nuovo oggetto	37
Saggi biochimici.....	39
Estrazione Proteica.....	39
Prelievo del tessuto e raccolta delle aree cerebrali	39
Preparazione degli estratti citoplasmatici e nucleari	39
Dosaggio Proteico Pierce: metodo del BCA.....	40
Valutazione dei livelli di pCREB: saggio ELISA	40
Livelli di Dinorfina: dosaggio radioimmunologico.....	41
Livelli di BDNF.....	43
Tecniche immunoistochimiche	44
Preparazione di sezioni cerebrali	44
Rilevazione cellule BrdU positive tramite immunoistochimica	45
Quantificazione delle cellule BrdU positive	46
Calcolo dei volumi ippocampali	46
Rilevazione cellule pCREB immunoreattive tramite saggio immunoistochimico	47
Acquisizione delle immagini e analisi delle cellule pCREB immunoreattive.....	47
Studi elettrofisiologici	48
Registrazioni elettrofisiologiche in vivo dei neuroni serotonergici e noradrenergici.....	48
Attività spontanea a single-spike e burst firing dei neuroni serotoninergici.....	49
Attività spontanea ed evocata a single-spike e burst firing dei neuroni noradrenergici.....	50
Binding in autoradiografia	50
Prelievo del tessuto e raccolta delle sezioni cerebrali.....	50
Binding del recettore cannabico CB1 in autoradiografia.....	51
Binding del [³⁵ S]GTPγS stimolato dall'agonista CP 55,940 in autoradiografia.....	51
Analisi densitometrica delle lastre autoradiografiche.....	51
Analisi statistica	52
RISULTATI	53

1. L'esposizione al nandrolone decanoato in adolescenza induce lo sviluppo di un fenotipo simil-depressivo	53
1.1 Analisi comportamentale	53
1.1a Quadro comportamentale presente 24 ore dopo la fine del trattamento con nandrolone.....	53
1.1b Quadro comportamentale presente 7 giorni dopo la fine del trattamento con nandrolone.....	54
1.1c Quadro comportamentale presente 14 giorni dopo la fine del trattamento con nandrolone.....	55
1.1d Quadro comportamentale presente 21 giorni dopo la fine del trattamento con nandrolone.....	58
1.1e Riassunto analisi comportamentale	59
1.2 Analisi biochimiche	60
1.2a CREB e proteine correlate in corteccia prefrontale.....	60
1.2b CREB e proteine correlate nel nucleus accumbens	61
1.2c CREB e proteine correlate in amigdala	61
1.2d Analisi biochimica in ippocampo	61
1.3 Analisi elettrofisiologica	63
1.3a Analisi della funzionalità della neurotrasmissione serotoninergica.....	63
1.3b Analisi della funzionalità della neurotrasmissione noradrenergica	64
2. Coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel fenotipo simil-depressivo indotto dall'esposizione adolescenziale a nandrolone decanoato	64
2.1 Analisi del recettore CB1 e della sua funzionalità.....	64
3. L'esposizione al nandrolone decanoato in età adulta non altera il comportamento emotivo degli animali	65
3.1 Analisi comportamentale	65
4. Coinvolgimento del sistema endocannabinoide nell'esposizione a nandrolone decanoato durante l'età adulta	66
4.1 Analisi del recettore CB1 e della sua funzionalità.....	67

5. Effetto della manipolazione del sistema endocannabinoide sul fenotipo simil-depressivo indotto dall'esposizione adolescenziale al nandrolone decanoato	67
5.1 Analisi comportamentale	68
5.1a Analisi comportamentale una settimana dopo trattamento con URB597.....	68
5.1b Analisi comportamentale due settimane dopo trattamento con URB597	70
5.1c Analisi comportamentale tre settimane dopo trattamento con URB597	73
5.1d Effetto anti-depressivo dell'URB597 dopo quattro settimane dalla sospensione del trattamento.....	73
5.1e Riassunto analisi comportamentale	74
5.2 Analisi biochimica.....	75
5.2a Analisi dei livelli del fattore di trascrizione p-CREB e delle proteine ad esso correlate.....	75
5.2b Analisi della proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo e del suo volume	76
5.3 Analisi elettrofisiologica	76
6. Effetti del co-abuso nandrolone decanoato/THC in ratti maschi adolescenti	77
6.1 Analisi comportamentale	78
6.1a Effetti del co-trattamento ND/THC sul comportamento emotivo	78
6.2 Analisi biochimica.....	79
6.2a Effetti del co-trattamento ND/THC sulla proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo	79
6.2b Effetti del co-trattamento ND/THC sull'espressione di pCREB	80
DISCUSSIONE.....	81
Il trattamento cronico con nandrolone decanoato in adolescenza induce un complesso fenotipo simil-depressivo	81
Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato sul sistema degli endocannabinoidi	88
Il trattamento con URB597 recupera il fenotipo simil-depressivo indotto dall'esposizione cronica a nandrolone decanoato in adolescenza	89

Il co-trattamento con nandrolone decanoato e THC previene la comparsa del fenotipo simil-depressivo indotto dal nandrolone decanoato.	92
CONCLUSIONI.....	94
BIBLIOGRAFIA.....	95

RIASSUNTO

Negli ultimi tempi, l'abuso di steroidi androgeni anabolizzanti (SAA) non è più confinato soltanto al mondo degli atleti professionisti, ma è ampiamente diffuso anche tra la popolazione comune, soprattutto tra body builders e frequentatori di palestre che sono alla ricerca di un modo facile e veloce per aumentare la massa muscolare e scolpire il proprio fisico. Inoltre, dati recenti indicano che l'utilizzo di SAA è un fenomeno in espansione soprattutto tra gli adolescenti, dove si assiste ad una prevalenza d'uso di circa il 4-6%. A dispetto di ciò, gli studi che valutano l'associazione tra l'utilizzo di SAA ed il successivo sviluppo di disturbi psichiatrici, soprattutto a lungo termine, sono ancora pochi ed inconclusivi, anche a causa delle intrinseche limitazioni degli studi osservazionali sull'uomo.

Sulla base di queste premesse, nella presente tesi ci siamo proposti di valutare in modo approfondito gli effetti di un trattamento cronico con nandrolone decanoato, uno tra i più noti e abusati SAA, sul comportamento emotivo in un modello animale. Per valutare l'esistenza di una maggiore vulnerabilità agli SAA nell'adolescenza, gli esperimenti sono stati condotti sia su animali adulti (70 PND) che adolescenti (40 PND). A tale scopo, ratti maschi Sprague-Dawley sono stati trattati per 14 giorni consecutivi con nandrolone decanoato (15mg/kg) o con rispettivo veicolo. A differenti intervalli di tempo dall'ultimo trattamento (24 ore, 7, 14 e 21 giorni) sono poi stati condotti diversi test comportamentali come il test del nuoto forzato, il test di preferenza al saccarosio, l'open field test e l'elevated plus maze test per valutare la presenza di alterazioni nel comportamento emotivo, ed il test di riconoscimento del nuovo oggetto per identificare la presenza di deficit cognitivi.

Negli animali trattati con nandrolone durante l'adolescenza si riscontrano alterazioni comportamentali che riguardano sia la sfera emotiva che cognitiva, a suggerire la presenza di un complesso fenotipo simil-depressivo. Sono presenti infatti disperazione comportamentale ed anedonia, comportamenti ansiosi ed un deficit nella memoria di riconoscimento. Alcuni segni compaiono immediatamente dopo la sospensione del trattamento, altri si presentano alle tempistiche successive. Il fenotipo presenta la maggiore intensità 14 giorni dopo l'ultimo trattamento e poi si riduce senza mai scomparire completamente. Le indagini biochimiche sono state condotte nel periodo di

maggiore intensità, cioè 14 giorni dopo l'ultima somministrazione. In particolare abbiamo monitorato markers cellulari/molecolari coinvolti nella modulazione del comportamento emotivo quali i livelli di p-CREB, BDNF e dinorfina A in aree cerebrali importanti per le emozioni e la memoria, quali corteccia prefrontale, nucleus accumbens, ippocampo ed amigdala. Abbiamo inoltre valutato la presenza di alterazioni nella proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo e nel volume dell'ippocampo dorsale, parametri ritrovati alterati sia in modelli animali di depressione che in pazienti depressi. Infine, è stata valutata la presenza di alterazioni a carico dei sistemi neurotrasmettitoriali serotonergico e noradrenergico.

I correlati biochimici del quadro simil-depressivo presente negli animali adolescenti esposti al nandrolone decanoato sono rappresentati da un incremento dei livelli di p-CREB nel nucleus accumbens, nell'amigdala e nell'ippocampo dorsale. E' presente inoltre una significativa riduzione della proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo accompagnato da una riduzione del volume dell'ippocampo. Infine l'analisi dell'attività monoaminergica ha mostrato una riduzione dell'attività dei neuroni serotonergici ed un incremento dell'attività dei neuroni noradrenergici.

Questo complesso fenotipo simil-depressivo non si evidenzia invece quando il trattamento con nandrolone decanoato viene eseguito in età adulta, a suggerire una specifica vulnerabilità del cervello adolescente agli effetti avversi dello steroide.

Poiché recentemente è stato dimostrato il coinvolgimento del sistema degli endocannabinoidi nell'eziopatogenesi della depressione e dei disturbi d'umore, il secondo scopo della presente tesi è stato quello di valutare possibili alterazioni in alcuni componenti di tale sistema dopo trattamento cronico con nandrolone decanoato. In particolare, sono stati effettuati saggi di binding per evidenziare alterazioni nella densità e funzionalità del recettore cannabinoide CB1 nelle aree cerebrali in cui è maggiormente espresso. Il trattamento con nandrolone in adolescenza induce una riduzione della densità recettoriale nella VTA e nel cervelletto, e della sua funzionalità nel nucleus accumbens e cervelletto, suggerendo quindi la presenza di un ipotono endocannabinoidergico in queste aree cerebrali. Quando lo stesso trattamento viene eseguito in età adulta, non si riscontrano alterazioni nella funzionalità del recettore CB1 in nessuna delle aree considerate, ma solo una lieve riduzione di densità nella VTA e nell'amigdala.

Data la presenza di un ipotono del sistema endocannabinoide nel fenotipo simil-depressivo indotto dal trattamento con nandrolone in adolescenza, abbiamo voluto valutare se incrementando i livelli di anandamide, uno dei principali endocannabinoidi, fosse possibile recuperare tale fenotipo. A tale scopo, ratti maschi adolescenti, alla fine del trattamento con nandrolone, sono stati trattati per 3 settimane con URB597, inibitore dell'enzima FAAH, principale enzima degradativo dell'anandamide, alla dose di 0.3 mg/kg. A partire dalla seconda settimana di trattamento con URB597, gli animali sono poi stati monitorati dal punto di vista comportamentale. Il trattamento con URB597 recupera completamente le alterazioni comportamentali indotte dallo steroide. Diversamente, i parametri biochimici ed elettrofisiologici alterati dal trattamento con nandrolone vengono recuperati solo parzialmente.

Infine, poiché la *Cannabis* è la sostanza illegale più abusata dagli adolescenti, è molto probabile un concomitante uso di SAA e *Cannabis* nella popolazione adolescenziale. Ultimo scopo della presente tesi è stato quindi quello di studiare l'effetto di un co-abuso tra nandrolone e THC, il principale ingrediente psicoattivo della *Cannabis*, in ratti maschi adolescenti. Gli animali sono stati esposti ad un co-trattamento con nandrolone decanoato alla dose di 15 mg/kg (i.m) e THC alla dose di 5 mg/kg (i.p.) per 14 giorni consecutivi. Ventiquattro ore dopo la fine del co-trattamento i ratti sono stati sottoposti al test del nuoto forzato ed al test dell'elevated plus maze per valutare la presenza di alterazioni nel comportamento emotivo. I risultati ottenuti indicano che quando lo steroide viene co-somministrato con THC si assiste al recupero dei comportamenti simil-depressivi ed ansiosi indotti dal solo nandrolone. Le analisi a livello biochimico hanno evidenziato solo un probabile recupero, da parte del THC, di una tendenza all'incremento nel numero di cellule pCREB immunoreattive nel nucleus accumbens indotto dal nandrolone.

La presente tesi dimostra che l'esposizione cronica a nandrolone decanoato in età adolescenziale porta all'instaurarsi di un complesso fenotipo simil-depressivo caratterizzato da severe alterazioni comportamentali, biochimiche ed elettrofisiologiche. Il sistema endocannabinoide sembra essere coinvolto nella espressione di questo fenotipo ed infatti la sua modulazione è in grado di recuperare le alterazioni comportamentali indotte dall'esposizione allo steroide, anche se rimane tutt'ora da chiarire attraverso quali meccanismi molecolari.

INTRODUZIONE

Gli steroidi androgeni anabolizzanti (SAA)

Gli steroidi androgeni anabolizzanti (SAA) sono sostanze sintetiche derivate dall'ormone maschile testosterone. Gli SAA presentano sia effetti anabolici ovvero provocano la crescita dell'apparato muscolo-scheletrico, sia effetti androgeni come lo sviluppo di caratteristiche sessuali maschili. E' stato necessario un lungo periodo di studi e ricerche per chiarire la loro natura, origine e meccanismo d'azione. Nel 1889, il fisiologo e medico Charles E. Brown-Séguard (1818–1894) riportò la prima evidenza indiretta dell'azione androgenica a seguito di auto-iniezioni di estratti testicolari di cane e porcellino d'india (Brown-Séguard, 1889). Solo 50 anni più tardi però, nel 1935, venne per la prima volta isolato e caratterizzato il testosterone (David et al., 1935). Nello stesso anno Butenet e Ruzicka, indipendentemente, sintetizzarono il testosterone. Entrambi ricevettero il Nobel per la chimica nel 1939 per il loro lavoro.

Il testosterone è il principale erogeno circolante nell'organismo, è una molecola formata da 19 atomi di carbonio disposti in 4 anelli idrocarburici ed è sintetizzato per il 95% nelle cellule di Leydig a partire dal colesterolo. La sua sintesi coinvolge diversi passaggi, il primo dei quali consiste nel trasferimento del colesterolo nella membrana mitocondriale interna da parte della proteina regolatrice della steroidogenesi acuta (StAR) ed il successivo clivaggio della catena laterale da parte del citocromo P450_{scc} (Stocco et al., 1996). Questa conversione porta alla sintesi del pregnolone. Passaggi successivi richiedono diversi enzimi incluso la 3 β -idrossisteroide deidrogenasi, la 17 α -idrossilasi/C17-20-liasi e la 17 β -idrossisteroide idrogenasi di tipo 3 (Rommerts., 2004).

Il testosterone può essere inoltre convertito in un metabolita più attivo in specifici tessuti come le ghiandole surrenali: il 5 α -diidrotestosterone (DHT). Questa conversione irreversibile a 5 α -diidrotestosterone è catalizzata dall'enzima mitocondriale 5 α -riduttasi di tipo 2 (SRD5A2), è NADPH dipendente e permette un legame ad alta affinità con il recettore per gli androgeni (AR) (Russel et al., 1994). La sua conversione in estradiolo ad opera dell'aromatasi invece permette il legame con il recettore per gli estrogeni (ER) (Kicman, 2008).

Gli androgeni hanno effetti biologici su molti tessuti dell'organismo: durante il periodo fetale stimolano lo sviluppo dell'apparato riproduttore, in particolare i dotti Wolffiani

(epididimo, vasi deferenti, vescicole seminali e dotto eiaculatorio) ed i genitali maschili esterni (pene, uretra e scroto) (Wilson et al., 1981).

Durante la pubertà l'attività androgenica risulta nell'incremento della stereogenesi testicolare e nell'ingrossamento dei testicoli, dei genitali esterni e delle ghiandole maschili riproduttive accessorie (prostata, vescicole seminali e bulbouretrali). Gli androgeni inoltre regolano lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari come l'allargamento della laringe responsabile del caratteristico cambio di voce e la comparsa di peli nella zona pubica, ascellare e facciale, provocano un aumento delle secrezioni da parte delle ghiandole sebacee ed hanno effetti sul sistema nervoso centrale (aumento della libido e dei comportamenti aggressivi) (Kicman, 2008).

Nell'uomo adulto, i livelli di testosterone e degli altri androgeni hanno un ruolo fondamentale per quanto riguarda la fertilità, in quanto agiscono sulla maturazione degli spermatozoi nei testicoli e sulla produzione di sperma da parte delle vie seminali e della prostata.

Oltre a questi effetti androgenici, questi ormoni promuovono anche importanti effetti anabolizzanti come l'aumento della massa muscolare scheletrica e l'aumento della massa ossea, soprattutto in età puberale, principalmente attraverso una stimolazione della sintesi proteica (Kicman, 2008).

Il loro effetto anabolizzante si manifesta anche a livello di altri tessuti come fegato, reni, sistema immunitario e sistema ematopoietico (Kicman, 2008), sia durante la pubertà che nell'età adulta.

Il ruolo centrale del testosterone nello sviluppo dei caratteri maschili, nel sostentamento delle funzioni riproduttive, nel mantenimento della muscolatura scheletrica e del tessuto osseo, nelle funzioni cognitive e nel senso del benessere ha portato alla ricerca di alternative sintetiche che avessero un profilo farmacologico migliore, ovvero una maggiore biodisponibilità (Talih et al., 2007; Thevis et al., 2010). Infatti, già a seguito della sua scoperta, divenne evidente come la biodisponibilità orale fosse limitata. Vennero da subito considerate differenti opzioni di somministrazione parenterale (iniezione intramuscolare, intravenosa o somministrazione transdermica ma anche sublinguale); più successo ebbe però lo sviluppo dei derivati chimici (Gooren e Bunck, 2004).

Molti SAA vennero sviluppati negli anni '50 quando i chimici tentarono senza successo di separare le proprietà anaboliche ed erogene dei derivati del testosterone (Hoberman e

Yesalis, 1995). Il nandrolone decanoato, ovvero l'analogo 19-nor del testosterone, fu invece il primo SAA con una sufficiente dissociazione tra proprietà anaboliche ed androgeniche ed una maggiore biodisponibilità del testosterone tanto da giustificare l'introduzione nella pratica clinica durante gli anni '50 (Hershberger et al., 1953).

Utilizzo clinico di SAA

Al giorno d'oggi il testosterone ed i suoi derivati vengono utilizzati clinicamente in due modi distinti, come terapia androgenica sostitutiva (ART) e come terapia androgenica farmacologica (PAT).

La terapia androgenica sostitutiva può essere utile nel caso di disordini legati all'asse Ipotalamico-Pituitario-Testicolare (HPTA).

La terapia androgenica farmacologica utilizza gli androgeni come ogni altro farmaco, basandosi in particolar modo su sicurezza ed efficacia (Basaria et al., 2001). Gli steroidi androgeni anabolizzanti sembrano essere particolarmente indicati nel trattamento di cachessia o anoressia, gravi forme di deperimento organico caratterizzate da debolezza e dimagrimento spesso associate ad AIDS (Grinspoon et al., 2003; Bhasin et al., 2000), a malnutrizioni legate ad epatiti (Mendenhall et al., 1984; Mendenhall et al., 1995), a gravi ustioni (Dolecek et al., 1983; Demling et al., 2000) e vari tipi di cancro (Azen et al., 1977; Cunningham et al., 1979).

Abuso di SAA

Un po' di storia

Sebbene gli steroidi androgeni anabolizzanti abbiano trovato importanti applicazioni in campo clinico, queste sostanze sono meglio conosciute per il loro utilizzo illegale all'interno del mondo dello sport (Pope et al., 2012; Santos et al., 2011).

La diffusione di questi composti è iniziata già a partire dagli anni 50' tra gli atleti professionisti di diverse discipline sportive, con lo scopo di aumentare la massa e la forza muscolare, assicurare così prestazioni fisiche migliori durante le competizioni (Kicman., 2008; Kanayama et al., 2010).

Nel 1954 infatti fu scoperto l'utilizzo illecito di SAA tra gli atleti della Nazionale Russa che parteciparono al campionato mondiale di sollevamento pesi tenutosi a Vienna (Kanayama et al., 2010), in breve tempo il loro uso diventò però comune nell'ambito delle

competizioni internazionali della maggior parte degli sport (Talih et al., 2007; Kanayama et al., 2010).

In occasione dei Giochi Olimpici di Montreal del 1976, gli steroidi anabolizzanti sono stati inseriti dal CIO (Comitato Internazionale Olimpico) nell'elenco delle sostanze proibite (Talih et al., 2007; Wood et al., 2008), in base a motivazioni di ordine etico e medico: l'uso di questi farmaci è infatti contrario a quel principio di lealtà che dovrebbe essere alla base di ogni competizione sportiva e, nelle dosi di solito impiegate dagli atleti, è inoltre rischioso per la salute.

Nel 1988 destò molto scalpore il caso dell'atleta Ben Johnson, vincitore dei 100 m piani col primato del mondo alle Olimpiadi di Seoul, risultato positivo allo stanazolo e pertanto squalificato; proprio questa vicenda spronò il Congresso degli Stati Uniti a pubblicare l'Anabolic Steroid Control Act (1991) dove si dichiaravano gli steroidi "sostanze controllate" (Talih et al., 2007; Wood et al., 2008).

Nel 1998 vi fu lo scandalo del ritrovamento di una gran quantità di sostanze proibite (tra le quali una grande percentuale di steroidi) durante un controllo della polizia francese al Tour de France. Il clamore di questo episodio sottolineò l'esigenza di un'agenzia internazionale indipendente che unificasse gli standard per la lotta antidoping e coordinasse gli sforzi delle autorità sportive e governative.

Nel novembre del 1999 fu infatti fondata la WADA (Agenzia Mondiale Anti Doping) con lo scopo di organizzare misure di controllo sulle sostanze dopanti, in particolare sugli steroidi, nell'ambito delle principali federazioni sportive (Wood et al., 2008).

Negli ultimi anni però, l'abuso di steroidi anabolizzanti è drammaticamente aumentato anche tra la popolazione comune, in particolar modo ha trovato diffusione anche tra gli adolescenti (Stilger et al., 1999; Uzych, 1992).

Gli utilizzatori

I maggiori utilizzatori di queste sostanze sono certamente i body builders, sollevatori di pesi e frequentatori di palestre durante periodi di intensi programmi di allenamento, attraverso prolungati cicli di assunzione (Talih et al., 2007). Ultimamente però, l'assunzione di queste sostanze non sembra esclusivamente legata all'effetto dopante per essere maggiormente competitivi durante l'attività sportiva (Wu, 1997; Trenton e Currier, 2005; Pope e Brower, 2009;), bensì al raggiungimento di una forma fisica esteticamente consona a quella dei canoni moderni (Salas-Ramirez et al., 2010).

La diffusione degli steroidi androgeni anabolizzanti tra la popolazione comune ha avuto inizio negli anni '80, ed è stata subito promossa da una serie di guide non autorizzate come la "Underground Steroid Handbook" o la "Phillips' Anabolic Reference Guide" del 1991, che offrivano dettagli precisi circa le dosi "raccomandate", gli effetti collaterali e le possibili vie di assunzione.

Molti fattori culturali possono aver poi incentivato l'abuso di steroidi anabolizzanti: nelle società moderne sembrano essere sempre più importanti l'apparenza fisica nonché la mascolinità costantemente promossa dai media (Kanayama et al., 2010). Un notevole contributo alla diffusione di queste sostanze tra la popolazione comune è da attribuire inoltre alla loro continua produzione in laboratori clandestini di tutto il mondo e alla loro illegale promozione e facile reperibilità di acquisto attraverso le sempre più numerose farmacie on-line (Lumia et al., 2010), i blog ed i siti internet (Wood et al., 2008), accessibili e utilizzati soprattutto dai più giovani.

Modalità di assunzione

La maggior parte di coloro che abusano di SAA non si limita ad assumere un singolo tipo di steroide. Generalmente atleti e body builders sono soliti assumere queste sostanze combinando differenti steroidi (pratica chiamata "stacking") in cicli pianificati di dosi crescenti e decrescenti, conosciuti come "cicli piramidali" (Wood et al., 2008; Kanayama et al., 2009). I cicli di assunzione degli anabolizzanti durano solitamente dalle 8 alle 16 settimane e sono separati da periodi di non assunzione definiti "drug free" (Wood et al., 2008; Kanayama et al., 2009), che coprono un intervallo di tempo di circa 10-13 settimane. Questo tipo di organizzazione in cicli è stata formulata per evitare una prolungata soppressione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Testicolo (HPTA) e di conseguenza per evitare una ridotta produzione di testosterone endogeno che si ha in seguito alle prolungate somministrazioni esogene di steroidi anabolizzanti: nel periodo tra due cicli infatti si assiste alla riattivazione dell'asse e ad una fisiologica produzione di testosterone (Reyes-Fuentes et al., 1993; Swerdloff et al., 2002).

Il progressivo incremento della dose di steroidi nel corso di un ciclo ed il successivo decremento graduale ("piramidalizzazione") vengono invece effettuati con lo scopo di contrastare lo sviluppo di tolleranza e minimizzare i sintomi da astinenza nel periodo di sospensione, massimizzando così il rapporto tra gli effetti "positivi" (anabolizzanti) e gli effetti avversi di questi composti (Summers, 2003), e spesso anche con il fine di eludere i

numerosi test anti-doping che vengono effettuati durante le manifestazioni sportive di alto livello (Taylor, 2002).

Lo “stacking” invece si basa sull’idea che combinando due o più steroidi di natura diversa, con proprietà contrastanti (come ad esempio la breve o lunga durata d’azione o la via di somministrazione orale o parenterale) si possa raggiungere un effetto sinergico (Yesalis., 2002). Convinzione comune di chi abusa di steroidi è infatti quella che attraverso l’assunzione di composti diversi si possano “attivare più siti recettoriali” (Summers., 2003). Molti “stacking” includono inoltre anche composti non androgeni, come ad esempio composti che contrastino gli effetti collaterali dei SAA (inibitori dell’aromatasi, antagonisti dei recettori degli estrogeni), composti che incentivino la perdita di peso attraverso la perdita di massa grassa e acqua (diuretici, ormoni steroidei, agonisti beta-adrenergici) e composti che riattivino la produzione di steroidi androgeni endogeni dopo la fine del ciclo (gonadotropine) (Summers., 2003).

Le modalità di assunzione degli steroidi anabolizzanti più utilizzate sono l’assunzione per via orale o per via intramuscolare. Il tipo di via di somministrazione dipende dalla natura del composto e più precisamente dal tipo e dalla posizione della modificazione chimica apportata alla molecola del testosterone. Gli steroidi ingeriti per via orale vengono assorbiti a livello dello stomaco e sono generalmente più tossici a livello epatico degli steroidi iniettabili per via intramuscolare, che invece sono caratterizzati da una ridotta eliminazione (qualità che consente un aumento della possibilità di determinazione con i test anti-doping per il più lungo periodo di permanenza nell’organismo) (Brower., 1992; Mottram et al., 2000).

SAA e dipendenza

E’ ormai noto che le sostanze d’abuso classiche causano dipendenza attraverso comuni pathways neuronali (Kalivas e Volkow, 2005). L’effetto acuto della sostanza è modulato dall’attività dopaminergica nel nucleo accumbens ed è seguito da un processo cronico di adattamento cellulare caratterizzato da un minor controllo cognitivo e da azioni guidate dall’assunzione della sostanza. Questo modello è però basato su sostanze come ad esempio cocaina ed oppiacei che, quando somministrate, portano ad un immediato effetto euforico (Wood et al. 2004) . Gli SAA, al contrario, non producono euforia

nell'immediato (Kanayama et al., 2009) e quindi probabilmente inducono dipendenza attraverso processi molto più complessi.

Brower ha recentemente proposto un modello di dipendenza caratterizzato da due stadi: l'effetto anabolizzante degli SAA potrebbe promuovere l'iniziale motivazione a continuare ad abusarne, mentre il successivo uso cronico favorirebbe lo sviluppo di una vera e propria dipendenza fisica e psicologica, che renderebbe difficile smettere di assumere queste sostanze (Brower., 2002).

Molti studi osservazionali si sono focalizzati su questa problematica, rilevando nei consumatori di steroidi molti sintomi di dipendenza, come l'uso continuo nonostante la comparsa di effetti collaterali ed il manifestarsi di sintomi di astinenza nei periodi di non-assunzione del ciclo (Brower et al., 1989, 1990, 1991; Cicero et al., 1990; Gruber et al., 2000; Malone et al., 1994), confermando quindi l'ipotesi che un abuso di queste sostanze possa portare ad esserne fisicamente e psicologicamente dipendenti.

E' ormai chiaro che l'abuso di SAA ha in comune molte delle conseguenze negative sulla salute e dal punto di vista sociale delle altre più comuni sostanze d'abuso, risulta però più difficile scindere nell'uomo l'effetto psicoattivo dalla dipendenza psicologica da SAA. Per questo motivo, è risultato molto utile l'utilizzo di animali da laboratorio per valutare il rinforzo degli androgeni.

Studi condotti in roditori attraverso test d'elezione quali il conditioned place preference (CPP) e la self-administration (SA) mostrano rispettivamente una significativa tendenza negli animali a spendere il loro tempo in un ambiente dove avevano precedentemente ricevuto dosi di SAA o ad autosomministrarsi testosterone per via orale o venosa, rafforzando l'ipotesi che gli steroidi anabolizzanti possano creare anche una dipendenza fisica, che va al di là della dipendenza psicologica provocata dagli effetti anabolizzanti su massa e forza muscolare e di miglioramento sulle performance atletiche (Wood et al., 2008; Kanayama et al., 2009).

Abuso di SAA e salute

Gli effetti avversi derivanti dalla somministrazione di SAA sono stati ampiamente studiati. Per quanto riguarda la pratica clinica, la somministrazione di tali sostanze è legata al beneficio terapeutico e può essere considerata ragionevolmente sicuro. Diversamente, chi abusa di queste sostanze può incorrere in una grande varietà di effetti secondari

negativi che spaziano da alcuni che sono fisicamente poco attraenti come l'acne e lo sviluppo del seno negli uomini, ad altri che mettono seriamente in pericolo la vita, come attacchi di cuore e cancro del fegato. La maggioranza di questi effetti sono reversibili se la persona che abusa di tali sostanze smette di prenderle, ma alcuni sono permanenti.

La maggioranza dei dati sugli effetti a lungo termine degli steroidi anabolizzanti negli umani provengono da relazioni di casi invece che da studi epidemiologici formali. Dalle relazioni di casi, sembra che l'incidenza di effetti potenzialmente mortali sia bassa, ma è possibile che non si riconoscano o non si contengano tutti gli effetti avversi seri. I dati di studi su animali sembrano convalidare questa possibilità.

Effetti fisici

Per quanto riguarda gli effetti collaterali a livello fisico, numerosi casi clinici, analisi post mortem e modelli animali hanno evidenziato problemi a livello cardiovascolare come trombosi, ischemie, ipertensione (Talih et al., 2007; Kanayama et al., 2008; Achar et al., 2010; Buttner e Thieme, 2010), anormalità a livello epatico, come ittero e masse abnormi del fegato e complicanze a livello endocrino (Cohen e Hickman, 1987; Graham e Kennedy, 1990). Gli effetti collaterali riscontrati riguardano anche l'apparato riproduttivo, sono comuni infatti casi di ginecomastia (Brower et al. 2002; Evans, 2004; Hartgens e Kuipers, 2004; Talih et al., 2007; Pope e Brower, 2009), atrofia dei testicoli, azoospermia ed infertilità (Thevis et al., 2010).

Effetti comportamentali

Gli effetti psichici provocati da un abuso di SAA sono complicati da studiare per una serie di motivi (Talih et al., 2007). I trials clinici sono difficili da attuare a causa delle questioni etiche inerenti al testare sostanze a dosi potenzialmente pericolose su volontari sani. La maggior parte degli studi che sono stati condotti sull'uomo sono quindi di tipo osservazionale (Talih et al., 2007). I dati sono stati raccolti attraverso interviste e questionari condotti su un campione rappresentativo di body builders, sollevatori di pesi ed atleti professionisti con lo scopo di indagare le possibili alterazioni nella sfera emotiva e nel comportamento durante e dopo l'utilizzo di tali composti.

Poiché l'utilizzo di questi composti è illegale se non regolarmente prescritto dal medico curante, i dati raccolti risultano spesso poco attendibili. Succede infatti che individui considerati "drug-free" facciano in realtà uso di steroidi androgeni anabolizzanti oppure

che le dosi di utilizzo dichiarate non siano quelle effettive. (Galligani et al., 1996; Talih et al., 2007).

Un'altra rilevante problematica consiste nel fatto che una grande percentuale di atleti e body builders è solita assumere, in concomitanza con gli steroidi, altre sostanze dopanti e supplementi dietetici: questo rende difficile capire se un possibile effetto psichico riscontrato sia attribuibile davvero soltanto all'abuso di SAA o dovuto all'associazione con altri composti (Talih et al., 2007).

Nonostante le difficoltà incontrate nella raccolta di questa tipologia di dati, diversi studi dimostrano che dosi soprafisiologiche di questi composti comportano severi effetti psichici e disturbi nel comportamento (Kanayama et al. 2008; Pope e Brower, 2009; Hall Hall, 2005; Hartgens e Kuipers, 2004; Talih et al. 2007; Trenton e Currier, 2005).

L'effetto che è stato meglio caratterizzato è la cosiddetta "*roid rage*", ovvero la "*rabbia da steroidi*", una rabbia indiscriminata che si manifesta senza bisogno di provocazioni attraverso comportamenti aggressivi che sfociano nella violenza, nell'ostilità e nel comportamento antisociale (Galligani et al., 1996; Pope et al. 2000; Pope Jr e Katz, 1994).

Gli studi osservazionali condotti su individui adulti non sono però di facile interpretazione: i risultati ottenuti si sono infatti rivelati contraddittori.

Alcuni studi condotti su individui adulti, per la maggior parte body builders ed atleti professionisti, mostrano una maggiore tendenza a comportamenti aggressivi ed all'impulsività da parte di coloro che abusano di steroidi androgeni anabolizzanti rispetto a coloro che dichiarano di non averne mai fatto uso (Galligani et al., 1996; Pope et al., 1996; Perry et al., 2003). Altri studi supportano questa ipotesi rivelando che la tendenza all'ostilità da parte di coloro che abusano di questi composti si manifesta soprattutto attraverso un incremento dell'aggressività verbale (Cooper et al., 1996). Dati ottenuti attraverso interviste e questionari a detenuti o ex-detenuti mostrano inoltre l'esistenza di una relazione tra l'abuso di steroidi e la criminalità, con una tendenza alla violenza nei confronti delle donne (Choi e Pope, 1994), specie se accompagnato dal consumo di altre sostanze stupefacenti o dall'alcool (Pope et al., 1996; Skårberg et al., 2010; Klötz et al., 2010).

Accanto a questi studi osservazionali che suggeriscono un'associazione tra abuso di steroidi ed aggressività, sono stati riportati anche studi che non hanno mostrato una significativa tendenza a comportamenti aggressivi e di ostilità in atleti e body builders che

abusano di steroidi androgeni anabolizzanti, rispetto a coloro che non ne usano (Malone et al., 1995; Midgley et al., 2001).

Anche nei trials clinici sono emersi risultati contraddittori. In esperimenti condotti dal gruppo di ricerca di Kuori, il testosterone cipionato, un particolare steroide, ha indotto la comparsa di comportamenti ostili e aggressivi in volontari che avevano assunto lo steroide, rispetto a chi non lo aveva assunto (Kuori et al., 1995). Tricker e collaboratori, al contrario, hanno osservato che dosi soprafisiologiche di testosterone enantato (600 mg alla settimana) non hanno portato ad un'incrementata aggressività (Tricker et al., 1996).

Oltre alla "rabbia da steroidi" sono stati osservati altri disturbi psichici, come *ipomania*, *mania* e *depressione*, effetti collaterali meno studiati per via del loro esordio tardivo.

La maggior parte degli studi osservazionali condotti ha mostrato frequenti casi di disturbi dell'umore in atleti professionisti e non professionisti che facevano uso di steroidi anabolizzanti rispetto a coloro che non ne usavano (Malone et al., 1995; Pope e Katz., 1988; Perry et al., 2003).

Tra questi, il disturbo più comune è la depressione, che insorge tipicamente nella fase di astinenza del ciclo di assunzione degli steroidi (Brower., 2002; Kashkin e Kleber, 1989; Malone e Dimeff, 1992; Malone et al. 1995). Di particolare importanza è inoltre il fatto che diversi studi hanno riportato casi di depressione sfociati in suicidio (Brower et al, 1989; Papazisis et al., 2007; Thiblin et al., 1999). Studi sperimentali su volontari sani hanno però portato a risultati differenti: non si sono infatti riscontrati effetti significativi nel comportamento di coloro che hanno ricevuto dosi crescenti di steroidi androgeni anabolizzanti come testosterone cipionato o metiltestosterone rispetto ai gruppi nei quali è stato somministrato soltanto il placebo (Pope et al., 2000; Kuori et al., 1995), probabilmente perché la comparsa di alterazioni a livello emotivo e dell'umore richiede un elevato consumo di queste sostanze, non raggiungibile negli studi sperimentali per ovvie questioni etiche.

In generale, si può affermare che un abuso di SAA potrebbe portare all'insorgenza di depressione (Kanayama et al., 2008).

Abuso di SAA negli adolescenti

L'utilizzo di steroidi androgeni anabolizzanti è un fenomeno in espansione soprattutto tra gli adolescenti. In questa popolazione ha infatti una prevalenza di circa il 4-12% (Mc Cabe

et al., 2007; Lumia et al., 2010) e, secondo il National Household Survey On Drug Use del 1994, l'abuso di queste sostanze ha un picco nella tarda adolescenza, ovvero intorno ai 18 anni di età (SAMHSA, 1994).

Dal sondaggio "Monitoring The Future" condotto nel 2002 è risultato che l'incidenza dell'uso di steroidi anabolizzanti tra i ragazzi delle scuole superiori statunitensi (4%) è comparabile a quella della cocaina sottoforma di crack (3,8%) o dell'eroina (1,7%) (Johnston et al., 2002), dati confermati anche dallo studio "Youth Risk Behavior Surveillance System" condotto nel 2005 (Eaton et al., 2005). E' tuttavia difficile fare una stima della prevalenza esatta dell'uso di steroidi negli Stati Uniti a causa delle numerose fonti di dati che valutano l'uso di sostanze senza includere gli steroidi.

Per quanto riguarda invece la prevalenza dell'abuso di SAA nei paesi europei esistono pochissimi studi. Ricerche condotte in Svezia stimano che la percentuale d'uso negli adolescenti vari dal 2.8% al 5.8% (Nilsson et al., 2001). Uno studio condotto in Francia sugli studenti del primo anno di scuola media tra il 2001-2002, proseguito per quattro anni, ha stimato una prevalenza d'uso, riferito agli ultimi sei mesi, pari all'1,2%. Dopo quattro anni, nel 2006, si era registrato un incremento più che doppio pari al 3%. Rispetto al 2001, aumenta l'uso quotidiano passando dal 23% al 24%, l'uso almeno una volta la settimana dal 15% al 38%, mentre diminuisce l'uso riferito all'ultimo mese (dal 62% al 28%).

Uno studio condotto in Norvegia su 8877 giovani di età compresa tra i 15-22 anni, conferma quanto osservato negli studi precedenti, ovvero che il consumo di steroidi anabolizzanti sta assumendo sempre più le caratteristiche di un comportamento problematico, facendo passare in secondo piano l'obiettivo di migliorare le performance sportive.

Nell'indagine ESPAD 2006 condotta in Italia sugli studenti delle scuole medie superiori emerge come, in generale, gli studenti di sesso maschile consumano più spesso sostanze anabolizzanti rispetto alle coetanee. La prevalenza d'uso nell'ultimo anno tra le studentesse è sostanzialmente costante attorno allo 0,2%, nelle fasce d'età 15-19 anni. Nei maschi invece la prevalenza d'uso aumenta in proporzione all'età passando dallo 0,4% nei quindicenni, allo 0,7% nei diciannovenni. Tuttavia, nel 2003 l'incremento era sensibilmente superiore, passando dallo 0,1% dei quindicenni all'1,2% dei diciannovenni. Se ne deduce che dal 2003 al 2006 la percentuale d'uso degli anabolizzanti nella fascia

d'età 18-19 anni si è dimezzata. La più alta concentrazione di studenti che dichiarano l'utilizzo di anabolizzanti si registra in Piemonte (0,45%), seguito dalla Sicilia (0,32%).

Gli SAA e l'adolescenza

La produzione degli ormoni puberali coincide con il periodo dell'adolescenza che, nell'uomo, ha luogo approssimativamente tra i 12 e 20 anni d'età. Questi ormoni agiscono non solo sui tessuti periferici portando alla manifestazione dei caratteri sessuali secondari, ma anche a livello centrale influenzando sia il rimodellamento del cervello adolescenziale sia la maturazione comportamentale.

E' ormai risaputo che l'adolescenza è un periodo di intenso rimodellamento neuronale durante il quale i circuiti comportamentali vengono rimodellati e definiti. Anche se il cervello di un bambino di 5 anni è già al 90% della forma adulta (Dekaban, 1978) deve ancora avvenire un significativo rimodellamento. Questo concetto è stato ampiamente dimostrato dai ricercatori sia nell'uomo che nell'animale i quali hanno verificato che molti dei processi alla base dello sviluppo cerebrale perinatale vengono implementati e rifiniti durante l'adolescenza. Questi processi includono la neurogenesi (Eckenhoff e Rakic, 1988; Pinos et al., 2001; Rankin et al., 2003), la morte cellulare programmata (Nunez et al., 2001, 2002), l'elaborazione ed il taglio delle arborizzazioni dendritiche e delle sinapsi (Huttenlocher e Dabholkar, 1997; Lenroot e Giedd, 2006; Sowell et al., 2004), e la differenziazione sessuale (Chung et al., 2002; Davis et al., 1996).

Durante la pubertà, questi eventi di riorganizzazione, rimodellamento ed attivazione neuronale sono anche influenzati dall'incremento fisiologico di ormoni sessuali maschili quali il testosterone (Lumia et al., 2010; Salas-Ramirez et al., 2008; Salas-Ramirez et al., 2010). Il fatto che l'adolescenza sia un periodo di sviluppo delicato e per gran parte dipendente da un controllo ormonale, sottolinea come un'esposizione agli steroidi androgeni anabolizzanti in questa fase della vita possa potenzialmente portare ad una serie di severe conseguenze biologiche e comportamentali a lungo termine.

A conferma di ciò, sono stati condotti studi osservazionali che evidenziano una maggiore predisposizione alla depressione, all'aggressività e ad altri disturbi emotivi in adolescenti che abusano di steroidi androgeni anabolizzanti rispetto ai coetanei che invece non ne fanno uso (Burnett e Kleiman., 1994). Una recente ricerca basata su dati del National Longitudinal Study Of Adolescent Health ha esaminato inoltre la relazione tra un uso di

steroidi e la violenza in un vasto campione di adolescenti, rilevandone un significativo grado di associazione (Beaver., 2008). L'insieme di questi dati sembrano quindi deporre a favore di una incrementata pericolosità dell'abuso di SAA in età adolescenziale.

SAA e modelli animali

Dal momento che i dati raccolti tramite gli studi osservazionali sono spesso risultati poco attendibili e non conclusivi, sono stati utilizzati modelli animali con lo scopo di caratterizzare maggiormente le conseguenze di un abuso di steroidi androgeni anabolizzanti.

Diversi sono infatti gli studi condotti su modelli animali di roditore, allo scopo di chiarire l'aggressività associata all'abuso di steroidi che nell'uomo sembra manifestarsi in modo indiscriminato e senza bisogno di provocazioni. (McGinnis et al., 2004; Pinna et al., 2008; Lumia et al., 2010; Kaliris et al., 2010;).

Test condotti su roditori adolescenti e adulti esposti a questi composti, sembrano suggerire un aumento di comportamenti aggressivi soltanto quando l'animale viene direttamente provocato (Lumia et al., 2010). L'aggressività nei ratti inoltre sembra anche essere influenzata da fattori ambientali: la maggior parte dei comportamenti di ostilità verso un avversario sono stati osservati infatti quando il test veniva condotto nella gabbia dello stesso animale, rispetto ad un ambiente neutro o familiare all'avversario (Lumia et al., 2010).

L'impatto sul comportamento sembra dipendere anche dalla natura dello steroide anabolizzante: il testosterone è stato associato in modo significativo a comportamenti aggressivi, mentre si è evidenziata una minor o nulla tendenza all'ostilità in seguito ad esposizione ad altri steroidi come nandrolone decanoato o stanozolo (Pinna et al., 2008; Lumia et al., 2010).

Altri studi hanno invece verificato come in animali esposti agli steroidi siano presenti deficit cognitivi. In particolare i deficit che si riscontrano riguardano principalmente la memoria spaziale, come verificato tramite il Morris Water Maze in uno studio in cui ratti maschi adulti venivano trattati con dosi soprafisiologiche di testosterone (Naghdi et al., 2003). In un lavoro di Kouvelas e collaboratori inoltre i ratti cronicamente esposti a dosi elevate di nandrolone decanoato mostravano una performance peggiore nell'Olfactory Social Memory Test (Kouvelas et al., 2008).

L'instaurarsi di uno stato ansioso negli animali trattati con steroidi androgeni anabolizzanti risulta invece meno definito. I dati presenti in letteratura sono infatti spesso contraddittori. Il gruppo di ricerca di Rocha pubblicò nel 2007 un lavoro in cui venne dimostrato che il trattamento cronico con nandrolone decanoato riduce il tempo speso nei bracci aperti nell'Elevated Plus Maze Test indicando la presenza di uno stato ansioso in questi animali (Rocha et al., 2007). Contrariamente, i dati pubblicati da Kouvelas nell'anno successivo indicavano una disinibizione nello stesso test comportamentale (Kouvelas et al., 2008).

Dai dati presenti in letteratura si desume quindi come sia i disordini della sfera emotiva, sia i deficit nell'area cognitiva siano scarsamente esplorati anche nei modelli animali e comunque, fatta esclusione per alcune eccezioni (Salas-Ramirez et al. 2010, Pinna et al. 2008, Lumia et al. 2010), confinati all'età adulta.

In particolare, nonostante le osservazioni fatte a livello umano, non esistono studi sul possibile effetto pro-depressivo dell'abuso di steroidi androgeni anabolizzanti in adolescenza, ne tantomeno sul suo possibile recupero terapeutico.

Il sistema degli endocannabinoidi

Con il termine "sistema endocannabinoide" ci si riferisce a specifici recettori, ai loro ligandi endogeni (endocannabinoidi) ed a tutte quelle proteine che ne regolano la sintesi, il trasporto e la degradazione.

I recettori cannabici

Il recettore CB1 (CB1R) appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G, presenta quindi la tipica struttura con sette domini transmembrana, la porzione N-terminale extracellulare in grado di legare il ligando e quella C-terminale intracellulare che interagisce con una proteina trimerica composta da una subunità alfa, una subunità beta e una subunità gamma (Howlett et al., 1991).

Attraverso le G proteine di tipo inibitorio (Gi/o), i recettori CB1 trasducono il segnale agendo su diversi effettori cellulari. In particolare i CB1R inibiscono l'adenilatociclastasi, i canali del calcio di tipo N e P/Q, attivano i canali del potassio rettificanti entranti e stimolano la via delle MAP kinasi (Amery, 1998).

I recettori CB1 sono localizzati principalmente a livello del Sistema Nervoso Centrale, sono particolarmente abbondanti nei gangli della base (sostanza nigra, globo pallido, nucleo

entopeduncolare e caudato-putamen laterale), nel cervelletto, nell'ippocampo e nella corteccia. Sebbene in minor densità, i CB1R sono rilevabili anche in aree limbiche, quali l'accumbens e l'amigdala, nell'ipotalamo, nel mesencefalo, nel midollo allungato e nel midollo spinale (Herkenham et al., 1991). Discrete densità recettoriali sono state successivamente identificate anche in tessuti periferici quali il tessuto adiposo, il fegato, gli organi riproduttivi, il cuore, l'intestino, il tessuto vascolare e quello osseo (Amery, 1998).

Nel sistema Nervoso Centrale i CB1R sono prevalentemente presinaptici, e la loro attivazione inibisce il rilascio dei neurotrasmettitori dagli assoni terminali (Tsou et al., 1998). Essi sono infatti espressi in neuroni che rilasciano glutammato, GABA, acetilcolina, serotonina e noradrenalina (Nakazi et al., 2000).

Il recettore CB2 (CB2R) possiede un'omologia del 48% con il recettore CB1 (Munro et al., 1993) ed è prevalentemente localizzato nel sistema immunitario, in particolare nella zona marginale della milza, nelle tonsille e nelle cellule immunocompetenti (Klein et al., 1995; Schatz et al., 1997). I CB2R sono localizzati anche a livello dell'endotelio polmonare, del tratto gastrointestinale, negli adipociti e nel tessuto cardiaco ed osseo. Studi più recenti, infine, dimostrano la loro presenza nella microglia durante processi infiammatori e neurodegenerativi (Carrier et al., 2004; Ehrhart et al., 2005), mentre le evidenze di una loro espressione neuronale in alcune aree cerebrali sono ancora in discussione.

Anche il recettore CB2 trasduce il segnale mediante G proteine, ma conosce effettori solo parzialmente sovrapponibili a quelli del CB1: in particolare, non è in grado di modulare i canali ionici, mentre, come il recettore centrale, è negativamente accoppiato all'adenil ciclasi ed è in grado di attivare le MAP kinasi (Amery, 1998).

Gli endocannabinoidi

La presenza di ligandi endogeni (endocannabinoidi) in grado di legare i recettori è stata dimostrata subito dopo la caratterizzazione di questi. Gli endocannabinoidi meglio caratterizzati sono l'anamide (AEA) e il 2-arachidonilglicerolo (2-AG). Queste sostanze agiscono come mediatori lipidici in grado di attivare i recettori cannabinoidi. Nel sistema nervoso centrale, gli endocannabinoidi vengono rilasciati "su richiesta" dalle cellule post-sinaptiche, attraversano le sinapsi come messaggeri retrogradi e si legano ai CB1R espressi pre-sinapticamente inibendo il rilascio dei neurotrasmettitori. Dopo aver agito, questi ligandi endogeni sono rapidamente disattivati da un processo di idrolisi per via

enzimatica, che segue ad un efficiente sistema di reuptake mediato da specifici carrier (Amery, 1998; Giuffrida et al., 2001). Su tale base, il sistema endocannabinoide può essere considerato un importante modulatore dell'attività dei principali neurotrasmettitori e partecipa quindi alla regolazione della plasticità sinaptica

L'aneamide (AEA) fu il primo ligando endogeno ad essere stato identificato, è un mediatore altamente distribuito sia a livello cerebrale che periferico (Devane et al., 1992) ed è in grado di legare sia il recettore CB1 che il recettore CB2, seppur con affinità minore.

Il processo di biosintesi dell'AEA è innescato dalla depolarizzazione della membrana cellulare e il successivo ingresso di ioni calcio all'interno della cellula nervosa; questi attivano l'enzima N-acil-fosfatidiletanolamina (fosfolipasi D) che catalizza l'idrolisi dell'N-arachidonilfosfatidiletanolamina (NArPE) prodotta dai fosfolipidi di membrana acido arachidonico e fosfatidiletanolamina.

Il 2-arachidonilglicerolo (2-AG) fu scoperto nel 1995 (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995) ed è una sostanza particolarmente presente a livello del sistema nervoso centrale, dove si trova in concentrazioni maggiori rispetto all'AEA (Sugiura et al., 1995). Anche la sintesi di questo composto è promossa dalla depolarizzazione della membrana plasmatica neuronale che causa attivazione della fosfolipasi C. Questo enzima è in grado di idrolizzare un particolare fosfolipide di membrana, il fosfatidilinositolo 4-5 bifosfato, producendo diacilglicerolo (DAG): questo composto è successivamente convertito a 2-AG dall'enzima 1,2 – diacilglicerolo lipasi (De Petrocellis et al., 1997; Di Marzo et al., 1998).

Espletata la loro azione biologica gli endocannabinoidi vengono rapidamente ricaptati per diffusione passiva attraverso la membrana cellulare oppure per diffusione mediata da carrier specifici come l'AMT (AEA Membrane Transport) valido sia per AEA che per 2-AG. Successivamente l'AEA viene degradata a etanolamina ed acido arachidonico per effetto dell'azione dell'enzima Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) (Stella et al., 1997; Di Marzo et al., 2002; Bracey et al., 2002), mentre il 2-AG viene degradato principalmente dall'enzima specifico MAGL (Mono Acyl Glycerol Lipasi) (Cravatt et al., 1996; Giuffrida et al., 2001).

Sistema endocannabinoide e depressione

Il primo studio di rilevanza scientifica sul possibile ruolo del sistema degli endocannabinoidi nella neurobiologia della depressione è piuttosto recente, risale infatti

al 2005 (Hill e Gorzalka, 2005). Da allora in letteratura si sono accumulate numerose evidenze sulle alterazioni nella funzionalità di questo sistema come possibili elementi molecolari presenti e coinvolti nei disturbi dell'umore.

I risultati più significativi provengono da studi su topi knockout per il recettore CB1. I dati raccolti dimostrano che questi topi in seguito a stress cronico sviluppano anedonia, ovvero incapacità di provare piacere in seguito a stimoli gratificanti, più velocemente rispetto ai topi wild-type, dimostrando di possedere una maggiore vulnerabilità allo stress (Martin et al., 2002). Quando testati in due classici test sperimentali di depressione, quali il Test del Nuoto Forzato (Forced Swim Test) e il Test della Sospensione della Coda (Tail Suspension Test), i topi knockout per il recettore CB1 sviluppano comportamenti simil-depressivi, ovvero un aumento dei comportamenti passivi a discapito di quelli attivi (Aso et al., 2008). I topi knockout per il recettore CB1, in risposta allo stress, presentano inoltre livelli di corticosterone nel siero più elevati dei topi wild-type, questo suggerisce un'iperattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), che rappresenta uno dei sintomi caratteristici nella depressione (Uriguén et al., 2004).

In accordo con questi risultati, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato in ratti femmina come un'alterazione duratura nella funzionalità dei recettori CB1 provocata da un abuso di THC in adolescenza, il principio attivo della cannabis, conduce in età adulta allo sviluppo di un fenotipo simil-depressivo, caratterizzato da presenza di comportamenti passivi nel FST e di deficit cognitivi, altri disturbi caratteristici nella depressione (Rubino et al., 2008, 2009). Questo quadro comportamentale è accompagnato anche da alterazioni di alcuni parametri biochimici specifici della depressione, come variazioni nei livelli di CREB in specifiche aree cerebrali, diminuzione nei livelli di marcatori di neuroplasticità e presenza di sinapsi meno attive nella corteccia prefrontale (Rubino et al., 2008, 2009).

L'insieme di questi risultati suggerisce quindi che una duratura riduzione di attività dei recettori CB1 (topi knockout e modello di depressione indotto dal THC in adolescenza) può rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di un fenotipo simil-depressivo.

A favore di questa ipotesi vi è la recente dimostrazione che il trattamento cronico con l'antagonista CB1 Rimonabant induce un fenotipo simil-depressivo nel ratto (Beyer et al., 2010). Nell'uomo inoltre, l'uso cronico di questo farmaco come farmaco antiobesità causa effetti collaterali psichiatrici indesiderati, in modo particolare sintomi depressivi e, per questa ragione, è stato ritirato dal commercio (Nissen et al., 2008). Recenti risultati

suggeriscono inoltre che nell'uomo variazioni genetiche nel recettore CB1 possono indurre l'insorgenza di sintomi depressivi in risposta allo stress o più in generale, possono predisporre alla depressione (Juhász et al., 2009). Infine, ridotte concentrazioni sieriche di AEA e 2-AG sono stati rilevati nelle donne con depressione maggiore rispetto ai soggetti non depressi (Hill et al., 2009).

Dal momento che numerose evidenze supportano un importante ruolo del sistema endocannabinoide nella fisiopatologia della depressione, la manipolazione del suo tono potrebbe aiutare sia a chiarire il meccanismo alla base dei disturbi dell'umore sia a recuperare il quadro depressivo. La convinzione generale è che un aumento del tono endocannabinoide potrebbe essere utile per il recupero dei sintomi depressivi.

Recenti dati sperimentali hanno dimostrato che il trattamento acuto o cronico con diversi agonisti diretti o indiretti del recettore CB1 è in grado di antagonizzare il comportamento simil-depressivo identificato nel test del nuoto forzato e nel test di sospensione della coda (Bambico et al., 2007; Gobbi et al., 2005; Hill e Gorzalka, 2005; Jiang et al., 2005; Morrish et al., 2009). È stato osservato un effetto antidepressivo nel test del nuoto forzato anche dopo trattamento cronico con agonisti del recettore CB1 (Gobbi et al., 2005). In particolare, interessante sembra essere il farmaco URB597, un inibitore dell'enzima responsabile della degradazione dell'anandamide. L'URB597 esercita un effetto antidepressivo nei ratti esposti ad un protocollo di stress cronico moderato (Bortolato et al., 2007) ed il trattamento cronico con questo farmaco riduce alcuni dei sintomi simil-depressivi presenti in animali adulti in seguito ad esposizione adolescenziale al THC (Rubino et al., 2008; Realini et al., 2011).

L'analisi globale dei dati sperimentali è dunque a favore dell'ipotesi che gli agonisti cannabinici diretti o indiretti possiedono effetti antidepressivi per lo meno nei test condotti su roditori.

Co-abuso di SAA e cannabinoidi

Diversi studi suggeriscono l'esistenza di un'associazione tra l'utilizzo di steroidi androgeni anabolizzanti e il consumo di alcool, tabacco e droghe illecite quali cannabis, oppiacei, amfetamine ed ecstasy (Durant et al., 1993; Yesalis e Bahrke, 1995; Kindlundh et al., 1999; Kanayama et al., 2003). La cannabis sativa è la droga più diffusa tra i giovani in quanto è facilmente reperibile e poco costosa e negli ultimi anni si è osservata una

notevole riduzione dell'età del primo consumo (Monshouwer et al., 2005). È stato riportato che il 23% degli adolescenti, tra i 12 e i 19 anni, ha provato marijuana e i maschi ne fanno maggior uso rispetto alle femmine. Essendo quindi la cannabis, il cui principale componente psicoattivo è il delta-9-tetraidrocannabinolo (THC), la droga maggiormente consumata al mondo, è molto probabile la presenza di un utilizzo concomitante di steroidi androgeni e cannabis, specialmente durante l'adolescenza. In accordo con questa possibilità, Wichstrøm e Pedersen (2001) hanno riportato un'associazione tra utilizzo di SAA e abuso di marijuana in adolescenti norvegesi.

A dispetto di ciò ad oggi gli studi nei modelli animali si limitano a valutare l'interazione tra gli ormoni sessuali ed il sistema endocannabinoide nel sistema endocrino e riproduttivo (Gonzalez et al., 2000; Maccarrone et al., 2000; Corchero et al., 2001), mentre la possibile influenza di tale associazione sulla risposta comportamentale mediata dal sistema nervoso centrale risulta ancora da chiarire. Non esistono studi preclinici riguardo l'interazione tra SAA e cannabinoidi, ad eccezione di un lavoro pubblicato nel 2006 dal gruppo di Maldonado (Célérier et al., 2006). In questo lavoro gli autori dimostrano che il pretrattamento con nandrolone non altera la comparsa di alcuni effetti acuti del THC quali l'analgesia, l'ipotermia e la riduzione dell'attività locomotoria, nonché lo sviluppo di tolleranza in seguito a somministrazione cronica di THC. Al contrario, la pre-esposizione al nandrolone blocca l'effetto gratificante indotto dal THC o dal cibo, aumenta le manifestazioni somatiche dell'astinenza da THC e attenua l'effetto ansiolitico di una bassa dose di THC. I meccanismi neuronali alla base di questa interazione sono ancora sconosciuti. Considerata la scarsità di studi sperimentali, appare prioritario l'approfondimento dello studio riguardante le possibili interazioni tra steroidi androgeni anabolizzanti e cannabinoidi, in particolare per l'aspetto che riguarda il comportamento emotivo in seguito al co-abuso in adolescenza.

SCOPO

Studi osservazionali condotti principalmente su atleti professionisti e bodybuilders hanno evidenziato che l'abuso di steroidi androgeni anabolizzanti (SAA) porta ad alterazioni a livello fisico e psicologico. Mentre gli effetti avversi a livello fisico sono stati ampiamente studiati, gli effetti a livello psichiatrico, specialmente quelli a lungo termine, sono meno caratterizzati. I lavori presenti in letteratura sono incentrati sull'aspetto forse più noto ovvero il "roid rage" o "rabbia da steroidi" (Pope et al., 2000; Galligani et al., 1996; Pope Jr e Katz, 1994), comportamento che spesso è presente durante l'abuso ma tende a scomparire quando queste sostanze non vengono più assunte. Diversamente, altri disturbi psichiatrici come ipomania, mania e depressione sembrano comparire solo dopo lunghi periodi di sospensione dell'assunzione di SAA, e forse proprio a causa di questo motivo sono anche i meno studiati (Brower, 2002; Malone et al., 1995; Malone e Dimeff, 1992; Kashkin e Kleber, 1989). Inoltre, un numero crescente di maschi adolescenti fa uso di SAA. L'utilizzo di queste sostanze infatti non è più ristretto soltanto agli atleti professionisti, ma è ampiamente diffuso anche tra i frequentatori di palestre e sportivi in genere, che ricercano un modo più rapido e semplice per perdere peso ed incrementare la massa muscolare. Il fatto che l'adolescenza sia un periodo fondamentale per lo sviluppo e che per gran parte dipenda dal controllo ormonale, sottolinea che un abuso di steroidi androgeni anabolizzanti in questo periodo possa potenzialmente portare a importanti conseguenze comportamentali nel lungo periodo.

Il primo scopo della presente tesi sarà quindi quello di indagare in modo approfondito gli effetti di un trattamento cronico con nandrolone decanoato, uno tra i più noti e abusati SAA, sul comportamento emotivo in un modello animale. Per valutare l'esistenza di una maggiore vulnerabilità agli SAA se l'esposizione avviene nel periodo adolescenziale, gli esperimenti saranno condotti sia su animali adulti (70 PND) che su ratti adolescenti (40 PND). Inoltre, il quadro comportamentale verrà completato con studi biochimici volti a definire anche da un punto di vista molecolare il fenotipo indotto dall'assunzione di SAA.

A questo scopo ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley verranno trattati per 14 giorni consecutivi con nandrolone decanoato (i.m.) alla dose di 15 mg/kg/die. A differenti time-points dalla fine del trattamento verranno effettuati test comportamentali quali il test del nuoto forzato per valutare la presenza di disperazione comportamentale, il test di

preferenza al saccarosio per valutare la presenza di anedonia, il test dell'open field e dell'elevated plus maze per valutare la presenza di ansia e il test di riconoscimento del nuovo oggetto per valutare la presenza di deficit cognitivi. Le analisi biochimiche verranno eseguite alla tempistica in cui il quadro comportamentale è maggiormente alterato. Inizialmente saranno monitorati tramite test ELISA i livelli di p-CREB (phosphorylated cAMP response element binding protein), un fattore di trascrizione coinvolto nella modulazione dei comportamenti emotivi, in aree cerebrali quali corteccia prefrontale, nucleus accumbens, ippocampo ed amigdala. Successivamente verranno considerati i livelli di due tra le più note proteine regolate dall'attivazione di CREB, quali BDNF (brain-derived neurotrophic factor) ed il peptide oppioide dinorfina A, nelle stesse aree cerebrali precedentemente investigate. Saranno inoltre utilizzate tecniche di immunisto chimica per valutare alterazioni nella proliferazione cellulare del giro dentato dell'ippocampo e nel volume dell'ippocampo dorsale, parametri ritrovati alterati sia in modelli animali di depressione che in pazienti depressi. Infine, valuteremo l'eventuale presenza di alterazioni funzionali a carico del sistema serotonergico e noradrenergico.

Il secondo scopo della presente tesi sarà di valutare la presenza di una relazione tra le alterazioni emotive indotte dal trattamento cronico con nandrolone decanoato e sistema endocannabinoide. E' stato infatti recentemente dimostrato che il sistema degli endocannabinoidi sembra essere coinvolto nell'eziopatogenesi della depressione e dei disturbi d'umore e che una sua modulazione potrebbe rappresentare una valida terapia antidepressiva (Micale et al., 2013; Gorzalka e Hill, 2011; Serra e Fratta, 2007). Negli animali trattati cronicamente con nandrolone decanoato si valuterà quindi la presenza di possibili alterazioni a carico della densità e della funzionalità del recettore cannabinoide CB1 mediante saggi di binding in autoradiografia. Inoltre, poiché recenti lavori sperimentali hanno dimostrato che il composto URB597, inibitore dell'enzima FAAH, principale enzima degradativo dell'anandamide, ha un effetto anti-depressivo e ansiolitico (Kathuria et al., 2003; Gobbi et al., 2005; Rubino et al., 2008; Realini et al., 2011), sarà nostro interesse verificare se un trattamento cronico con URB597 sia efficace nel recuperare i comportamenti ed i parametri biochimici alterati dall'esposizione al nandrolone decanoato. I ratti maschi saranno trattati per 3 settimane con URB597 alla dose di 0.3 mg/kg subito dopo il trattamento con nandrolone decanoato. Anche in questi

esperimenti la stessa batteria di test comportamentali sopracitata verrà ripetuta a differenti tempistiche a partire dalla seconda settimana di trattamento con URB597.

Infine, poiché nell'uomo spesso si assiste al consumo di più sostanze contemporaneamente ed il co-abuso di steroidi androgeni anabolizzanti e cannabinoidi sembra essere piuttosto diffuso, ultimo scopo di questa tesi sarà quindi quello di studiare l'effetto di un co-abuso SAA e THC in ratti maschi adolescenti. La *Cannabis sativa* infatti rappresenta la sostanza illecita più usata tra gli adolescenti e ciò depone a favore di un'alta probabilità di una sua co-assunzione con gli steroidi androgeni anabolizzanti. A tale scopo gli animali saranno esposti ad un co-trattamento con nandrolone decanoato alla dose di 15 mg/kg (i.m) e THC alla dose di 5 mg/kg (i.p.) per 14 giorni consecutivi. Ventiquattro ore dopo l'ultima somministrazione gli animali verranno sottoposti a test comportamentali per verificare se il co-trattamento ha indotto alterazioni nel comportamento emotivo. In particolare, in questi esperimenti valuteremo la disperazione comportamentale in una versione modificata del test del nuoto forzato e la presenza di comportamenti ansiogeni nel test dell'elevated plus maze. Infine a completamento del quadro comportamentale verranno valutati aspetti biochimici quali alterazioni nell'espressione di pCREB in diverse aree cerebrali e nella proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo.

Nel loro insieme i risultati ottenuti nella presente tesi ci permetteranno di valutare la presenza di una maggiore vulnerabilità del cervello adolescente agli effetti dell'abuso di SAA sul comportamento emotivo. Inoltre i risultati relativi alla possibile interazione tra l'abuso di SAA e sistema degli endocannabinoidi potrebbero fornire utili spunti per studiare una terapia atta a recuperare le alterazioni emotive indotte dall'esposizione a SAA.

MATERIALI E METODI

Animali

Le sperimentazioni sono state eseguite usando ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley (Charles River, Calco, Italy), acquistati al trentacinquesimo giorno di vita (Post Natal Day, 35 PND) o al settantesimo (70 PND).

All'arrivo, gli animali sono stati stabulati in gabbie da tre o quattro, in condizioni standard di temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) ed umidità ($50 \pm 10\%$) con libero accesso ad acqua e cibo in pellets ed un ciclo luce-buio diviso in dodici ore di luce e dodici di buio. Gli esperimenti hanno avuto inizio cinque giorni dopo l'arrivo degli animali in modo da lasciarli abituare al nuovo ambiente e sono stati svolti durante la fase di luce del ciclo luce-buio. Gli esperimenti sono stati eseguiti in accordo con i protocolli sperimentali approvati dal Ministero Italiano della Salute (D.L. 116/92) (D.L. 111/94-B) e rispettando le disposizioni imposte dalla Comunità Europea che regolano gli studi preclinici sugli animali (88/609/EEC).

Farmaci

Per gli studi della presente tesi sono stati utilizzati:

- Nandrolone decanoato (ND) (Deca-Durabolin, Organon), acquistato presso La Farmaceutica Castronno, VA) in siringhe preriempite da 50 mg/ml oppure fiale da 25 mg/ml, il cui contenuto è stato diluito con olio di arachidi alla dose desiderata. La somministrazione è avvenuta per via intramuscolare (i.m.) alla dose di 15 mg/kg. L'iniezione è stata eseguita alternando la zampa posteriore destra e sinistra.
- URB597 (Alexis Biochemical, San Diego, CA) è stata disciolta in DMSO, Tween-80 e fisiologica in rapporto 1:1:8. La sostanza è stata somministrata per via intraperitoneale (i.p.) alla dose di 0.3 mg/kg.
- BrdU (Sigma Aldrich) è stata disciolta in fisiologica, ed utilizzata alla concentrazione di 150 mg/kg somministrata intraperitonealmente.
- Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC) è stato generosamente donato dalla GW Pharmaceutical (Salisbury, UK) disciolto in etanolo, Cremophor e soluzione fisiologica in rapporto 1: 1: 18. La somministrazione è avvenuta per via intraperitoneale (i.p.) alla dose di 5 mg/kg.

Test comportamentali

Test del nuoto forzato

Il test del nuoto forzato impiegato in questi esperimenti è una versione modificata del Porsolt Test (Zamberletti et al., 2012; Realini et al., 2011) che consiste in una unica sessione di nuoto della durata di 15 minuti. Il test del nuoto forzato risulta essere uno dei test più validati per valutare la presenza di stati simil-depressivi nei roditori ed è basato sul principio che, l'animale posto in una situazione che non offre via di scampo assume una postura di immobilità conosciuta anche come disperazione comportamentale, indice di uno stato depressivo.

L'apparecchiatura usata per l'esecuzione del test del nuoto forzato consiste in un cilindro di plexiglass trasparente alto 50 cm e avente un diametro di 20 cm, il cilindro viene riempito con 30cm di acqua alla temperatura di 25°C.

Come già anticipato la versione modificata di questo test consiste in un' unica sessione di nuoto della durata di 15 minuti: i ratti sono posti singolarmente nel cilindro e quindi obbligati a nuotare per 15 minuti in un ambiente dal quale è impossibile scappare. Tipicamente in un primo momento gli animali tentano disperatamente di arrampicarsi sulle pareti del cilindro per uscire dall'acqua. Successivamente assumono una postura di immobilità mantenendo solo la testa fuori dall'acqua.

I parametri comportamentali che vengono osservati e registrati sono quindi:

- *Immobilità: minimi movimenti dell'animale necessari per tenere la testa fuori dall'acqua.*
- *Climbing: movimenti attivi dell'animale atti a cercare di arrampicarsi alle pareti del cilindro.*
- *Nuoto: l'animale nuota attivamente immergendosi o attraversando il cilindro.*

Alla fine della sessione di nuoto forzato i ratti vengono estratti dal cilindro, asciugati e riposti nelle proprie gabbie. Il cilindro viene svuotato, pulito e riempito nuovamente con acqua pulita dopo ogni animale.

Test di preferenza al saccarosio

Il test di preferenza al saccarosio consente di valutare l'anedonia, ovvero la ridotta risposta agli stimoli di piacere, nei roditori. Viene testata la preferenza dei ratti a bere una soluzione al 1% di saccarosio rispetto a della comune acqua utilizzando una procedura

che prevede la possibilità di scelta tra entrambe le alternative (Monteggia et al., 2007, Realini et al., 2011).

Gli animali sono stati posti in gabbie singole durante la notte, con la possibilità di accedere liberamente alle due bottiglie, una contenente appunto la soluzione zuccherina all'1% di saccarosio e l'altra contenete acqua comune. Il mattino seguente è stata valutata la quantità di soluzione zuccherina e quella di acqua comune consumata durante la notte. Il consumo sia della soluzione zuccherina, sia dell'acqua comune è stato esplicitato in grammi. La preferenza al saccarosio è stata calcolata con la seguente formula:

$$\text{Indice di preferenza al saccarosio} = (\text{Consumo di saccarosio} / \text{Consumo totale}) \times 100$$

Test dell'Open Field

Il test dell'Open Field permette di verificare la presenza di alterazioni nell'attività locomotoria degli animali ed avere indicazioni circa il loro stato ansioso poiché si basa sul bilancio di due innate tendenze dell'animale: quella esplorativa di un ambiente non familiare e quella difensiva che lo porta a non esporsi in ambienti aperti.

Il test viene condotto in un'arena di plexiglass chiamata appunto open field dalle dimensioni di 60 cm di lunghezza x 60 cm di larghezza x 60 cm di altezza (Ugo Basile, Varese, Italia) e priva di coperchio, virtualmente divisa in quattro quadranti e in un'area centrale dalle dimensioni di 15 cm x 15 cm.

Sopra l'arena viene montata una videocamera collegata ad un computer, capace di videoregistrare il test e di registrare il numero di entrate ed il tempo speso dell'animale nell'area centrale dell'arena.

All'inizio di ogni sessione del test, ogni ratto è posto in un angolo dell'open field e lasciato libero di esplorare l'arena per dieci minuti. Il test viene videoregistrato e vengono annotati il numero dei passaggi per il centro, il tempo speso nel centro e la distanza totale percorsa. Dopo ogni sessione, l'arena viene pulita con acqua contenente lo 0,1% di acido acetico in modo tale da eliminare ogni traccia dell'animale precedentemente sottoposto al test.

Test dell'Elevated Plus-Maze

Il test dell'Elevated Plus-Maze viene definito un test comportamentale di emersione e si basa sul conflitto provato dagli animali tra la curiosità di esplorare un ambiente nuovo e la riluttanza all'esplorazione a causa delle sue caratteristiche aversive.

L'Elevated Plus-Maze consiste in uno strumento di metallo costruito come specificato nei *Current Protocols in Pharmacology* (2005). L'apparecchio, sollevato 50 cm dal pavimento, è costituito da una piattaforma centrale quadrata di 10 cm per lato dalla quale si dipartono 4 bracci disposti a croce: 2 bracci opposti aperti (50 cm x 10 cm) e gli altri due, della stessa misura, chiusi sul perimetro da pareti (50 cm x 10 cm x 40 cm). Il labirinto è posto in una stanza (3m x 4m) illuminata da una luce al neon (circa 30 lux), priva di riferimenti visivi che possano influenzare il comportamento degli animali.

Un'ora prima dell'inizio dell'esperimento gli animali sono stati portati nella stanza dove saranno sottoposti al test per favorirne l'ambientamento e lasciarli in condizioni di tranquillità e valutare nel migliore dei modi il loro comportamento. All'inizio del test ogni ratto è stato posizionato con delicatezza al centro della piattaforma del labirinto, con il muso rivolto verso uno dei due bracci aperti. Da questo momento, gli animali sono stati lasciati liberi di esplorare il labirinto per 5 minuti e il loro comportamento è stato osservato da due sperimentatori situati all'interno della stanza dell'esperimento in una posizione tale da non influenzare la spontanea attività dell'animale.

I parametri convenzionali registrati sono stati i seguenti:

- *Tempo trascorso nei bracci aperti*
- *Tempo trascorso nei bracci chiusi*
- *Numero di entrate nei bracci aperti*
- *Numero di entrate nei bracci chiusi*

Come convenzionalmente stabilito, è stata considerata ogni entrata in un braccio l'attraversamento dell'animale della linea che indica il passaggio dalla piattaforma ai bracci con tutte e quattro le zampe; è stata invece considerata un'uscita dal braccio l'attraversamento con solo due zampe della linea che delimita il passaggio dai bracci alla piattaforma.

Come suggerito da lavori in letteratura (Rodgers et al., 2005) con lo scopo di valutare meglio il profilo ansiolitico/ansigenico, sono stati inoltre osservati alcuni parametri etologici:

- *Head-dips HD (movimenti esploratori della testa dell'animale in un'area esterna al braccio aperto)*
- *Stretch attended posture SAP (postura esploratoria in cui il corpo dell'animale o la*

sola testa è teso verso il braccio aperto ma viene ritratto alla posizione originaria senza alcun attraversamento delle diverse aree del labirinto)

- *Closed-arm returns CAR (uscita dal braccio chiuso con le zampe anteriori e ritorno rapido nello stesso braccio)*

Sebbene questi parametri non siano comunemente riportati in letteratura, i CAR sono stati originariamente identificati da Moser (1989) e conseguentemente il loro incremento è stato considerato da R.J. Rodgers un indice di ansiogenesi. I SAP e gli HD sono stati considerati relativamente al braccio aperto in quanto l'atteggiamento dell'animale verso l'area non protetta permette di valutare più accuratamente il profilo ansiolitico o ansiogenico delle sostanze esaminate. L'incremento degli HD è stato considerato un indice di ansiolisi.

Al termine di ogni test, il labirinto è stato pulito con acqua contenente 0.1% di acido acetico in modo da eliminare ogni traccia dell'animale precedentemente sottoposto al test.

Test del riconoscimento del nuovo oggetto

Il test del riconoscimento dell'oggetto è stato messo a punto per valutare eventuali alterazioni nella sfera cognitiva e più precisamente nella memoria di riconoscimento. Esso si basa sulla naturale e spontanea tendenza degli animali ad esplorare oggetti e/o ambienti non familiari (nuovi) interagendo maggiormente con questi piuttosto che con quelli familiari e quindi già noti.

Il test è stato condotto all'interno di un'arena in plexiglass di forma quadrata e dalle dimensioni di 43 cm di lunghezza x 43 cm di larghezza x 32 cm di altezza (Ugo Basile, Varese, Italia), priva di coperchio e posta in una camera insonorizzata in modo tale che durante l'esperimento l'attenzione dell'animale fosse focalizzata solo ed unicamente verso i due oggetti presenti nell'arena.

Sono stati usati i seguenti oggetti:

- *1° trial (fase di familiarizzazione): due oggetti identici per forma, colore e dimensione.*
- *2° trial (fase di test): un oggetto identico a quelli usati nel primo trial e un oggetto nuovo, differente per colore, forma e dimensione rispetto a quello usato nel primo trial.*

Tutti gli animali sono stati sottoposti ad un singolo test suddiviso in due trial ciascuno della durata di 5 minuti con un intervallo di 3 minuti tra un trial e l'altro.

Prima dell'inizio di ciascun trial, e quindi tra un animale e l'altro, l'arena e gli oggetti sono stati accuratamente puliti con acqua contenente lo 0,1% di acido acetico in modo tale da eliminare ogni traccia dell'animale precedentemente sottoposto al test. Successivamente sono stati posizionati all'interno dell'arena, ad una medesima distanza dalle pareti di questa, due oggetti identici. L'animale è stato quindi posizionato all'interno dell'arena e lasciato libero di esplorare i due oggetti per un periodo di 5 minuti. Al termine del primo trial gli animali sono stati riposti nella propria gabbia, mentre un operatore ha sostituito uno dei due oggetti presenti nell'arena con un oggetto nuovo. Trascorsi 3 minuti dal primo trial, gli animali sono stati nuovamente posizionati nell'arena dove sono stati lasciati liberi di esplorare gli oggetti per altri 5 minuti, al termine dei quali sono stati

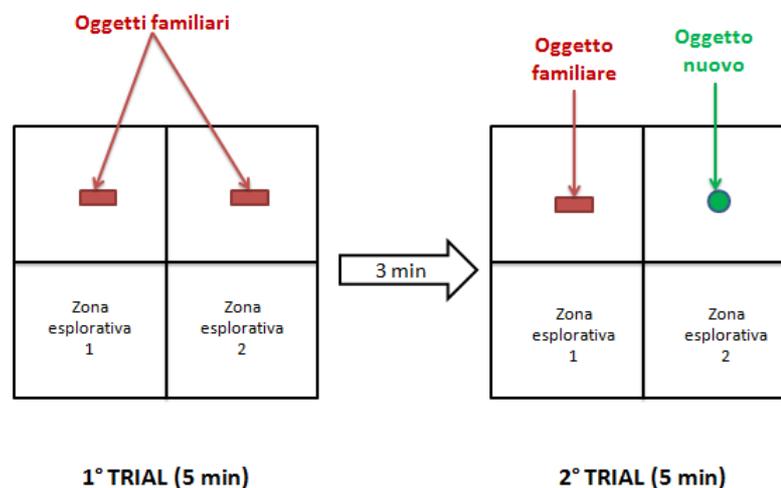


Fig. A: Trials del test di riconoscimento del nuovo oggetto

definitivamente collocati nella propria gabbia. In **Fig. A** sono schematizzate le fasi del test. E' stata considerata come esplorazione solo l'interazione diretta e volontaria dell'animale con l'oggetto; mentre non sono stati considerati come esplorazione gli scavalcamenti dell'oggetto da parte dei ratti. Il tempo di esplorazione di ciascun oggetto (in entrambi i trials), espresso in secondi, è stato valutato per mezzo di due cronometri da due sperimentatori.

E' stato poi calcolato per ogni animale il tempo totale di esplorazione dei due oggetti familiari nel primo trial, il tempo di esplorazione dei due oggetti (familiare e nuovo) nel secondo trial ed infine l'indice di discriminazione calcolato come segue:

$$[(En \times Ef)/(En + Ef)] \times 100$$

dove:

Ef: tempo di esplorazione dell'oggetto familiare

En: tempo di esplorazione dell'oggetto nuovo

Saggi biochimici

Estrazione Proteica

Prelievo del tessuto e raccolta delle aree cerebrali

I ratti vengono sacrificati per decapitazione, i cervelli rapidamente rimossi e le varie aree cerebrali su cui si effettueranno i saggi biochimici (corteccia prefrontale, nucleus accumbens, amigdala e ippocampo), vengono prelevate mediante dissezione regionale seguendo la metodica di Hofer e collaboratori (1990) utilizzando un blocchetto in alluminio (*Rodent Brain Matrix*, ASI instrument, Warren, MI USA) che permette di ottenere sezioni cerebrali di 1 mm di spessore, secondo le coordinate dell'atlante di Paxinos e Watson (Paxinos G. e Watson C. 1986). Le aree così ottenute vengono poi congelate in N₂ liquido e conservate a -80°C fino all'utilizzo.

Preparazione degli estratti citoplasmatici e nucleari

Il giorno dell'estrazione le aree prescelte vengono poste in un'adeguata quantità di buffer di lisi (1:10 w/v) mantenuto in ghiaccio, così composto: 10mM Hepes pH 7.5, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM Na ortovanadato, 50 mM NaF, 10 mM Na pirofosfato, 0.5 % Triton, 5 mg/mL aprotinina e 5 mg/mL leupeptina.

Si procede quindi ad omogenare mediante un potter di vetro/teflon; l'omogenato viene poi trasferito in una microprovetta e centrifugato a 13000 rpm a 4°C per 3 minuti. Il surnatante è stato usato per preparare gli estratti citoplasmatici ed il pellet per gli estratti nucleari. Il pellet è stato risospeso in un appropriato volume di buffer a 4°C (20 mM Hepes pH 7.5, 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 10 µM Na₂MoO₄, 0.1 mM EDTA, 1 mM Na ortovanadato, 10 mM PNPP, 10 mM β-glicerofosfato, 20% glicerolo, 2 mM DTT ed inibitori delle proteasi). Dopo 30 minuti di incubazione in ghiaccio con leggera agitazione, i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm a 4°C per 10 minuti ed il surnatante è stato prelevato ed utilizzato come estratto nucleare. Le concentrazioni proteiche nelle frazioni sono state determinate usando il Micro-BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

Dosaggio Proteico Pierce: metodo del BCA

Il saggio utilizzato è una formulazione detergente-compatibile basato su un acido bicinconico (BCA) per la determinazione colorimetrica e la quantificazione delle proteine totali. Questo metodo combina la riduzione del rame (Cu^{+2} Cu^{+1}) effettuata dalla proteina in un mezzo alcalino (reazione del biureto) con la determinazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva del catione Cu^{+1} usando un unico reagente contenente BCA. La reazione colorimetrica è data dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rame. Questo complesso idrosolubile esibisce una forte assorbanza a 562nm, che è lineare con l'aumento della concentrazione proteica all'interno di un ampio spettro che va dai 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ai 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

In questo saggio è stato preparato un set di proteine standard a concentrazione nota diluendo la confezione stock di BSA standard (Bovine Serum Albumin, 2 mg/ml; Pierce). Le concentrazioni usate per dosare i campioni devono ricadere nel set delle proteine standard scelto opportunamente in relazione alle concentrazioni dei campioni stessi. Nei pozzetti di un'apposita piastra sono stati pipettati 10 μl di ogni standard e del campione da dosare opportunamente diluito. Per il bianco sono stati usati uguali quantità di acqua distillata. E' stata preparata la soluzione "Working Reagent" miscelato 50 parti di Reagente A (reagente base contenente Sodio Carbonato, Sodio Bicarbonato, reagente per la detenzione della BSA e Sodio Tartrato in NaOH 0.2 N) con una parte di reagente B (soluzione di solfato di Rame al 4%).

In ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 μl della "Working Reagent" e la piastra è stata incubata per 30 minuti a 37 °C. Si è poi misurata l'assorbanza di ogni campione a 562 nm. Sottraendo l'assorbanza del bianco dal valore trovato per gli standard si sono ricavati i valori di assorbanza netta che sono stati messi in grafico contro le diverse concentrazioni proteiche degli standard di BSA. Mediante analisi di regressione lineare eseguita al computer (Graph Pad Prism 4.0), si è calcolata l'equazione della retta da cui ricavare le concentrazioni proteiche dei singoli campioni espresse in microgrammi di proteine/microlitro ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) di omogenato tissutale.

Valutazione dei livelli di pCREB: saggio ELISA

I livelli di CREB attivato sono stati valutati negli estratti nucleari uso un kit commerciale (Active Motif Europe, Rixensart, Belgium) basato su un saggio ELISA.

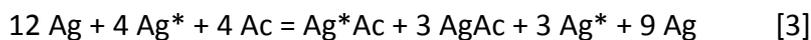
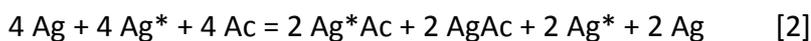
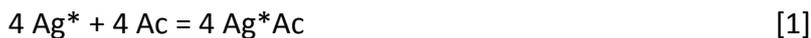
Oligonucleotidi contenenti un cAMP responsive element (CRE) sono stati immobilizzati su una piastra a 96 pozzetti. CREB fosforilato contenuto negli estratti nucleari si lega specificatamente a questo nucleotide. Usando un anticorpo diretto verso CREB fosforilato (pCREB), si individuano i dimeri di CREB che si legano all'oligonucleotide immobilizzato. Un anticorpo secondario coniugato ad una perossidasi di rafano (HRP) provoca una reazione colorimetrica facilmente quantificabile allo spettrofotometro.

Più in particolare: vengono aggiunti 20 µl degli estratti nucleari precedentemente diluiti in buffer B in ogni pozzetto in presenza di 30 µl di Binding Buffer completo (DTT 0.1%, Herring sperm DNA 1% + Binding Buffer); come controllo vengono caricati pozzetti positivi (20 µl di estratto cellulare WI-38 precedentemente diluito in buffer B) e bianchi; la piastra viene coperta con l'apposita pellicola adesiva e posta in agitazione a 100 rpm per 3 ore a temperatura ambiente. Ciascun pozzetto viene poi lavato per tre volte con 200 µl di Washing Buffer 1x (Washing Buffer 10%, acqua distillata 90%) ed in seguito vengono aggiunti 100 µl per pozzetto di anticorpo primario verso pCREB (diluizione 1:500 in Antibody Binding Buffer 1x, 10% Antibody Binding Buffer, 90% acqua distillata). Si copre la piastra e si mette ad incubare per un'ora a temperatura ambiente senza agitazione. Si ripetono i tre lavaggi con Washing Buffer e si aggiungono 100 µl per pozzetto di anticorpo secondario coniugato ad una perossidasi di rafano (diluizione 1:1000 in Antibody Binding Buffer 1x), lasciando in incubazione per un'ora a temperatura ambiente senza agitazione. Si aggiungono 100 µl per pozzetto di soluzione di sviluppo e si incuba la piastra protetta dalla luce per 5-15 minuti a temperatura ambiente. Appena il colore dei pozzetti positivi diventa blu scuro si aggiungono 100 µl di soluzione di stop: in presenza di acido il colore blu diventa giallo; entro 5 minuti si legge l'assorbanza allo spettrofotometro a 450 nm e si elaborano i dati con il programma Graph Pad Prism 4.0.

Livelli di Dinorfina: dosaggio radioimmunologico

L'estrazione dei tessuti per la determinazione dei livelli del peptide dinorfina è stata effettuata mediante sonicazione in 10 volumi (1g = 10 ml; 1 ml per i campioni di peso inferiore a 100 mg) di acido acetico 0.1 N e mantenuti alla temperatura di 95 °C per 10 minuti. Gli omogenati sono stati quindi centrifugati (12.000 giri per 15 minuti) e il sovrantante è stato posto a -24 °C fino al momento del dosaggio. I livelli di dinorfina sono stati determinati impiegando il metodo radioimmunologico. Esso si basa

sull'impiego di un peptide marcato, nel nostro caso dinorfina, di un peptide freddo e di un anticorpo specifico per la dinorfina col quale il peptide forma un complesso antigene-anticorpo. La tecnica si basa sulla competizione tra il peptide freddo e una quantità fissa del peptide marcato per il legame con un numero limitato di siti anticorpali presenti in una quantità costante di antisiero. In condizioni standard, la quantità di antigene marcato legata all'anticorpo diminuirà man mano che l'antigene freddo aumenta nel campione. I principi possono essere schematizzati dalle seguenti equazioni:



dove Ac, Ag, Ag* e AgAc rappresentano rispettivamente un equivalente di anticorpo, di antigene freddo, di antigene marcato e di complesso antigene anticorpo. La concentrazione di un campione sconosciuto viene determinata paragonando l'inibizione osservata con quella prodotta da una o più soluzioni standard che contengono quantità note del peptide di cui si deve determinare la quantità. All'equilibrio della reazione [1] è possibile misurare separatamente la radioattività del peptide marcato non legato (Ag*) e quella del peptide marcato legato all'anticorpo (Ag*Ac). Il sistema viene tarato in modo che all'equilibrio della reazione [1] corrisponda un determinato valore del rapporto $\text{Ag}^* \text{Ac} / \text{Ag}^*$, ad esempio 1. In questo caso le concentrazioni relative di antigene marcato e di anticorpo vengono scelte in modo tale che all'equilibrio il 50% del peptide sia in forma libera e il 50% sia in forma combinata. Se la reazione è fatta avvenire mantenendo costante la concentrazione dell'anticorpo e quella dell'antigene marcato, in presenza di concentrazioni crescenti di antigene nativo Ag₁, Ag₂, Ag₃ ... Ag_n, si verificherà una progressiva riduzione del rapporto $\text{Ag}^* \text{Ac} / \text{Ag}^*$, cioè una progressiva inibizione della reazione fra l'antigene marcato e l'anticorpo come risultato di una reazione competitiva parallela:



La quantità di antigene marcato è quindi la radioattività legata all'anticorpo, all'equilibrio [4], andrà progressivamente decrescendo al crescere della concentrazione di Ag; parallelamente andrà aumentando la quantità di antigene marcato libero Ag*. In dettaglio, il dosaggio dei nostri campioni si svolgeva preparando in duplicato due diluizioni (1:5 - 1:10) di ogni campione in tampone C (CH₃COOH 0,1 M; NaCl 0,15 M;

Triton X-100 0,1 %), come standard si utilizzava la dinorfina A (1-13) sempre diluita in tampone C a diverse concentrazioni. In ogni provetta di propilene venivano aggiunti e messi a incubare (a 4°C per 18-24 ore) 100 ml di dinorfina A (1-13) marcata, analogamente diluita in tampone B (395 ml Na₂HPO₄ 118 mM; 105 ml Na₂HPO₄ 31 mM; 500 ml H₂O; 1 g albumina bovina; 1 g triton X-100) (5.000 cpm). L'antisiero utilizzato (denominato "Lucia"), originariamente sviluppato per immunizzazione verso la dinorfina A (1-13), si lega al 30% del peptide marcato ad una diluizione di 1:30.000, riconosce la dinorfina A (1-17) e le sue estensioni COOH-terminali, mentre non riconosce la Leu- e la Met-enkefalina e tutti gli altri oppioidi noti. Al termine del periodo di incubazione si addizionavano 1 ml di una miscela di destrano e carbone attivo (300 mg di destrano, 15 g di carbone attivo, 12 ml di siero di cavallo e 85 ml di tampone A così composto: 395 ml Na₂HPO₄ 118 mM; 105 ml Na₂HPO₄ 31 mM; 500 ml H₂O) allo scopo di separare l'antigene marcato libero. Le provette venivano infine centrifugate (3.800 rpm, 4 °C, per 20 minuti) e su 1 ml di surnatante si contava la radioattività presente mediante un contatore di emissioni gamma (Gamma Counter 5500, Beckman). La riproducibilità dei risultati era valutata calcolando la IC₅₀ (la concentrazione di peptide che riduce il legame con la dinorfina del 50%) nei dosaggi eseguiti. La IC₅₀ media era di 4 fmoli/100 ml con un errore standard inferiore o uguale al 5%. Le diluizioni dei tessuti presentavano un parallelismo con la dinorfina standard, nelle condizioni di dosaggio da noi utilizzate. Le concentrazioni di materiale immunoreattivo dinorfinosimile (ir-dinorfina) sono state espresse come pmoli per grammo di tessuto, equivalenti alla dinorfina A.

Livelli di BDNF

I livelli del fattore neurotrofico BDNF sono stati valutati negli estratti citoplasmatici utilizzando un kit commerciale (Chemicon International-ChemiKineTM Brain Derived Neurotrophic Factor Sandwich ELISA Kit) basato su un saggio ELISA.

Anticorpi policlonali di coniglio generati contro il BDNF sono immobilizzati su una piastra a 96 pozzetti e sono utilizzati per catturare il BDNF contenuto nei tessuti omogenati. Anticorpi monoclonali di topo coniugati alla biotina specifici per il BDNF rilevano se il BDNF si è legato. In seguito all'aggiunta dell'enzima streptavidina, del campione (substrato) e della soluzione per fermare la reazione (stop solution) viene quantificato il BDNF. Dalla curva standard si osserva una correlazione diretta tra gli O.D. (densità ottica)

e la concentrazione del BDNF.

Il BDNF standard è stato preparato utilizzando il volume di Sample Diluent indicato sulla boccetta in modo da ottenere una concentrazione di 10000 pg/ml. Il BDNF standard è stato utilizzato per generare la curva standard. Sono state preparate 7 eppendorf numerate da 1 a 7 ed una "dose 0" ed aggiunti 950 µl di Sample Diluent alla eppendorf 1 e 500 µl nelle eppendorf da 2 a 7 e nella "dose 0". In seguito sono stati aggiunti 50 µl della soluzione standard di BDNF alla eppendorf 1 ottenendo una concentrazione di 500 pg/ml; gli standard 2-7 sono stati preparati mediante diluizione 1:2 dello standard precedente. Alla "dose 0" non è stato aggiunto il BDNF.

Ogni standard ed ogni campione sono stati testati in doppio. Sono stati aggiunti 100 µl degli standard 0-7 ai pozzetti ottenendo la curva standard.

I campioni diluiti 1:2 con il Sample Diluent sono stati aggiunti (100 µl) ad ogni pozzetto della piastra coperta con l'apposita pellicola ed è stata incubata a 4°C overnight in agitazione.

Sono stati effettuati 4 lavaggi con l'apposito wash buffer ed aggiunti 100 µl di anticorpo anti BDNF biotinilato 1:1000 (diluito in Sample Diluent), ed incubato per 2-3 ore in agitazione a temperatura ambiente. In seguito, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl della soluzione HRP-Streptavidina 1:1000 (diluito in Sample Diluent), ed è stata incubata la piastra per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente. Infine è stato aggiunto il TMB/E Substrate (100 µl) ad ogni pozzetto ed incubato per 15 minuti a RT, finchè lo standard 500 pg/µl non ha raggiunto un colore blu scuro. La reazione è stata bloccata con 100 µl di stop solution e la piastra letta a 450 nm. I dati sono stati elaborati al computer con il programma Graph Pad Prism 4.0.

Tecniche immunoistochimiche

Preparazione di sezioni cerebrali

I ratti sono stati anestetizzati con cloralio idrato alla dose di 400 mg/kg e sottoposti a perfusione transcardiaca con tampone fosfato (PBS) contenente eparina 25000 U.I./5 ml (Sigma Aldrich) e successivamente fissati con paraformaldeide al 4% in tampone fosfato. Dopo la decapitazione, i cervelli sono stati rimossi e conservati in PFA 4% per 24 ore, passati successivamente in saccarosio 15% e 30% per 24 ore ognuno ed infine inclusi in resina OTC.

Ciascun cervello è stato poi affettato in un criostato refrigerato in sezioni coronali di 50µm corrispondenti alle regione cerebrali di interesse. Le sezioni “free floating” sono state immerse e conservate ad una temperatura di -20°C in una soluzione crioprotettiva (30% glicerolo, 30% etilen glicol, 0.02% sodio azide e PBS).

Rilevazione cellule BrdU positive tramite immunoistochimica

Le sezioni così ottenute, corrispondenti alla regione ippocampale, sono state utilizzate per effettuare un saggio di immunoistochimica atto a rilevare le cellule BrdU positive e quindi le cellule in attiva proliferazione. Il saggio è stato svolto in due giorni consecutivi. Durante la prima giornata si effettua una incubazione in HCl 2N a 37°C per 30 minuti. Tale passaggio è essenziale affinché il DNA venga denaturato e la bromodeossiridina incorporata resa disponibile al legame con l'anticorpo primario. A questo seguono lavaggi in Borate Buffer a pH 8,6 per neutralizzare i residui di HCl ed una incubazione per 15 minuti in H₂O₂ per eliminare le perossidasi endogene che andrebbero ad interferire con il segnale dato dalla BrdU. In seguito, per eliminare i residui di H₂O₂ alle fettine sono stati effettuati tre lavaggi con TBS-Tween20 0,1% e poi incubati per un'ora in Blocking Solution (5% Horse Serum, 0,3% TrytonX100, TBS 1X) al fine di bloccare i siti di legame aspecifici dell'anticorpo primario. Infine al termine della prima giornata le sezioni sono state incubate overnight a 4°C con l'anticorpo monoclonale anti-BrdU (Millipore) (1:250).

Il secondo giorno, le sezioni coronali dopo essere state lavate ripetutamente in TBS-Tween20 0,1%, sono state incubate per un ora e mezza a 4°C in anticorpo secondario anti-mouse biotinitato 1:200 (Abcam). Terminata l'incubazione sono stati effettuati due lavaggi da 5 minuti in Blocking Solution (2% Horse Serum, 0,1% TrytonX100, TBS 1X) ed un lavaggio in TBS-Tween20 0,1%. Eliminati così i residui di anticorpo secondario il tessuto è stato incubato con Avidina-Biotina 1:100 (Vector Laboratories, Burlingame CA) in 2% Horse Serum, 0,1% TrytonX100 e TBS1X. Quest'ultima va a riconoscere la biotina dell'anticorpo secondario amplificandone il segnale e allo stesso tempo avendo legata una perossidasi (HRP) permette la visualizzazione delle cellule in seguito a reazione di un substrato cromogeno quale la 3,3-diamminobenzidina (DAB).

Le sezioni quindi sono state processate per 5/10 minuti con diamminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich). Il DAB dopo l'ossidazione prodotta dalla perossidasi, forma un precipitato colorato (marrone), che permette di individuare le cellule in attiva proliferazione. Prima

della visualizzazione al microscopio ottico le fettine sono state disidratate con soluzioni a percentuale crescente di etanolo (70%, 80%, 95% e 100%) e montate su vetrino con DPX.

Quantificazione delle cellule BrdU positive

Per la quantificazione delle cellule BrdU positive sono state utilizzate 6 sezioni per animale (1 ogni 12) prese ad una distanza di circa 600µm una dall'altra. Tutte le cellule BrdU positive appaiono di un intenso colore marrone e sono state cercate nel giro dentato (**Fig. B**). Le cellule sono state contate con un microscopio ottico ad un ingrandimento 60X.

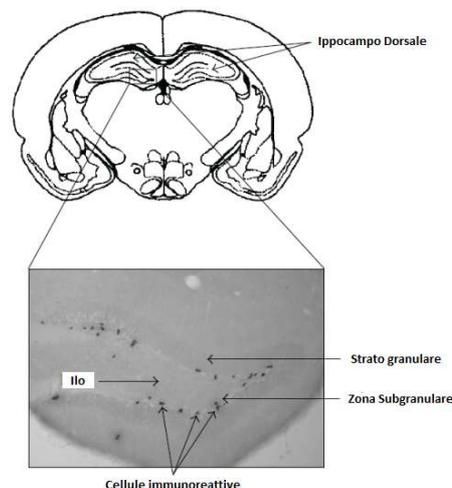


Fig. B: Sezione di ippocampo dorsale di ratto con particolare del giro dentato, dell'ilo e dello strato granulare.

Calcolo dei volumi ippocampali

Per poter calcolare il volume dell'ippocampo dei diversi animali sono state acquisite e salvate le immagini ottenute mediante l'utilizzo di una videocamera digitale annessa ad un microscopio ottico e ad un pc. A tal proposito è stato utilizzato il software Viewfinderlite 1.0.1.135 (Pixera Corporation, CA, USA). Sono state selezionate 4 sezioni per animale, comprendenti la regione dell'ippocampo dorsale, e ne è stata misurata l'area dell'ippocampo in entrambi gli emisferi ad un ingrandimento 2X, con l'ausilio del software Image Pro-Plus 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Le aree dell'ippocampo dorsale sono state tracciate seguendo la struttura anatomica riportata nell'atlante "The Rat Brain" di Paxinos e Watson. Infine è stata calcolata l'area media per ogni sezione ed utilizzato il Metodo Cavalieri per calcolarne il volume totale (Manaye et al., 2007):

$$V_{ref} = \Sigma Area_{slices} \cdot Mean t$$

- V_{ref} : volume ippocampale in mm^3 ;

- $Area_{slices}$: area della fettina in mm^2 ;
- $Mean t$: spessore delle fettine in mm (0,05 mm).

Rilevazione cellule pCREB immunoreattive tramite saggio immunoistochimico

In questo esperimento sono state utilizzate sezioni cerebrali di 50 μm al bregma +2.20 e -2.30 ovvero le sezioni cerebrali corrispondenti rispettivamente alla corteccia prefrontale e al nucleus accumbens e all'ippocampo e all'amigdala.

Le sezioni sono state lavate in PBS-triton 0.1% tre volte per 10 minuti inizialmente e prima di ogni step successivo al fine di eliminare i residui di soluzione in eccesso. Le sezioni cerebrali sono state inizialmente incubate con H_2O_2 allo 0.5% per 15 minuti per bloccare l'attività delle perossidasi ed in seguito è stato eseguito lo smascheramento antigenico ponendo le fettine in un buffer di sodio citrato (10mM) per 30 minuti a 96°C. Le fettine sono poi state trasferite in una blocking solution (1% BSA, 5% siero di capra, PBS-tritonX-100 0.5%) per saturare i siti aspecifici per 1 ora ed in seguito incubate per due notti con l'anticorpo primario Ser-133 pCREB (Cell Signaling) diluito 1:250. Il secondo giorno dell'esperimento le sezioni cerebrali sono state poste per due ore in una soluzione di PBS contenente un anticorpo secondario biotinilato (goat anti-rabbit, Abcam) e successivamente il tessuto è stato incubato con Avidina-Biotina 1:100 (Vector Laboratories, Burlingame CA) in 2% Horse Serum, 0,1% TritonX100 e PBS 1X. Quest'ultima va a riconoscere la biotina dell'anticorpo secondario amplificandone il segnale e allo stesso tempo avendo legata una perossidasi (HRP) permette la visualizzazione delle cellule in seguito a reazione di un substrato cromogeno quale la 3,3-diamminobenzidina (DAB). La rivelazione dell'anticorpo legato tramite il DAB, così come la fase di disidratazione e montaggio su vetrino è avvenuta come indicato nella sezione precedente.

Acquisizione delle immagini e analisi delle cellule pCREB immunoreattive

L'immagine delle sezioni sono state registrate utilizzando il microscopio Nikon Upright Microscope (Eclipse Ni-U) e la videocamera Nikon video camera (Digital sight DS-U1), interfacciata con un computer. Questo sistema è stato utilizzato in associazione con NIS-Elements F 4.00.00 per l'acquisizione delle immagini. Per quantificare il numero di cellule

pCREB immunoreattive è stato utilizzato Image Pro Plus 7.0 (2011 Media Cybernetics) grazie al quale l'operatore ha potuto contare le cellule manualmente.

Studi elettrofisiologici

Registrazioni elettrofisiologiche in vivo dei neuroni serotonergici e noradrenergici

Gli animali sono stati assegnati casualmente ad uno dei due gruppi, uno esclusivamente per le registrazioni serotoninergiche e l'altro esclusivamente per le registrazioni noradrenergiche alternativamente condotte per 15 giorni. I ratti sono stati anestetizzati con cloralio idrato (400 mg/kg, i.p.) e posizionati sullo stereotassico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) con il cranio posto orizzontalmente (barra di incisione a -3.3 mm). L'anestesia è stata confermata dall'assenza della reazione di riflesso nocicettivo al pizzico della coda o della zampa e alla risposta del battito dell'occhio alla pressione. Durante il corso degli esperimenti l'anestesia è stata mantenuta da una periodica iniezione i.p. di una dose supplementare di cloralio idrato (100 mg/kg), solitamente ogni 45 minuti e a seguito del recupero dei riflessi nocicettivi della coda e zampa e della risposta dello sbattere le palpebre. La temperatura corporea è stata mantenuta a $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ per tutta la durata dell'esperimento grazie all'utilizzo di una piastra elettrica a temperatura controllata (Seabrook Medical Instrument, Inc.).

Le registrazioni sono state condotte utilizzando micropipette di vetro a singola canna collegate ad un capillare di vetro di 2 mm (R&D Scientific Glass, Spencerville, MD) su una pipetta estrattrice PE-2 Narashige (Tokyo, Giappone). Le micropipette sono state pre-caricate per promuoverne la capillarità con il 2% di soluzione Pontamine Sky Blue in NaCl 2 M, e le loro punte sono state suddivise per diametri da 1 a 3 μm . L'impedenza delle micropipette variava da 4 a 7 M Ω . Utilizzando un microposizionatore idraulico (modello 650; David Kopf Instruments, Tujunga, CA), l'elettrodo è stato avanzato lentamente nel DR o nel LC a circa 0.15 mm/min per minimizzare la probabilità di mancare i neuroni low-spiking. Le coordinate sono state identificate utilizzando l'atlante del cervello di ratto di Paxinos e Watson (1986). L'attività a singola unità è stata registrata come potenziali d'azione discriminati amplificati da un amplificatore Tennelec TB3 MDA 3 (Oakridge, TN, USA), post-amplificato e filtrato da un equalizzatore Realistic a 10 bee di frequenza, digitalizzato da un sistema di interfaccia CED1401 (Cambridge Electronic Design,

Cambridge, UK) con una elaborazione on-line ed analizzati off-line da Spike2 versione software 5.20 per Windows PC (Microsoft, Seattle, WA) . L'attività spontanea del singolo picco di neuroni è stata registrata per almeno 3 minuti, i primi 60 secondi subito dopo il rilevamento del neurone non sono stati considerati per eliminare gli artefatti meccanici dovuti allo spostamento dell'elettrodo. La regolarità delle attività di scarica neuronale è stata rappresentata utilizzando gli istogrammi di intervallo interstimolo (ISI). L'attività del firing di burst è stata analizzata in linea utilizzando uno script progettato per Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) e diversi parametri sono stati generati ed analizzati: la percentuale di neuroni bursting, la percentuale di spikes in un burst, il numero dei singoli spikes all'interno di un burst, il burst interspike , la lunghezza del burst ed il tempo tra burst. Al termine di ogni sessione di registrazione, il sito di registrazione è stato marcato mediante l'espulsione iontoforetica (1-10 mA, corrente negativa per 10 min) di Blue Sky Pontamine per la verifica istologica dei siti di registrazione.

Attività spontanea a single-spike e burst firing dei neuroni serotoninergici

Il nucleo dorsale del rafe è la principale fonte delle innervazioni dei neuroni serotoninergici nel cervello. Per registrare i neuroni serotoninergici a singola unità nel nucleo dorsale del rafe, è stato perforato un foro sulla linea mediana craniale che sottende dalle regioni 0.5 a 1.5 mm anteriormente alla linea intraneurale, corrispondenti all'intera estensione mediale rostro caudale del nucleo dorsale del rafe che si presume essere ricca in neuroni serotoninergici (Paxinos e Watson, 1986). I primi presunti neuroni serotoninergici sono stati identificati immediatamente sotto al bordo ventrale dell'acquedotto di Silvio, e contenuti nel tratto di coordinate che va da 5.5 a 6.5 mm nella zona ventrale alla dura madre. In condizioni fisiologiche, i neuroni serotoninergici spontaneamente attivi, presentano caratteristiche proprietà elettrofisiologiche distinguibili dai neuroni non-serotoninergici. Questi neuroni serotoninergici mostrano un firing visibile regolare, un ampio bifasico (positivo-negativo) o lunghezza d'onda trifasica (0,8-3,5 ms, 1,4 ms prime deviazioni positive e negative) (Baraban e Aghajanian, 1980; Bambico et al., 2009). Sebbene questi criteri possono variare in funzione delle condizioni farmacologiche o ambientali, alcune caratteristiche, vale a dire, la forma d'onda e la durata del picco, hanno dimostrato di essere stabili nelle varie patologie e sono quindi indicatori affidabili per i neuroni serotoninergici. I parametri utilizzati per l'analisi del firing dei neuroni serotoninergici sono basati sui criteri di Gobbi et al. (2005), tali che un

susseguirsi di almeno due picchi con un inizio definito da un intervallo interspike iniziale di massimo 20 ms all'interno di un pattern regolare di burst a bassa frequenza è stato classificato come un burst. Il più lungo intervallo interspike consentito entro un burst è di 40 ms .

Attività spontanea ed evocata a single-spike e burst firing dei neuroni noradrenergici

Il locus coeruleus è la maggior fonte di innervazione dei neuroni noradrenergici nel cervello. Per registrare i neuroni noradrenergici a singola unità nel locus coeruleus è stato praticato un foro sottostante le regioni 0.7 mm posteriormente alla linea interneurale e da 1.1 a 1.4 mm lateralmente alla mediale, corrispondente alla estensione bilaterale del locus coeruleus. Il locus coeruleus è situato in posizione mediale al nucleo trigeminale mesencefalico, i neuroni possono essere stimolati spostando la mandibola. I neuroni noradrenergici spontaneamente attivi sono stati identificati utilizzando i seguenti criteri: tasso normale di burst (1-5 Hz) e bifasica (positivo-negativo) o lunghezza d'onda trifasica (0,8-1,2 ms) che presentano una caratteristica di scarica a raffica in risposta ad uno stimolo nocicettivo dato dal pizzico della zampa posteriore controlaterale. L'attività di burst è stata analizzata in modo tale che l'esordio è stato definito come il verificarsi di due punte, con un intervallo interstimolo ≤ 80 ms e la sua risoluzione da parte dell'intervallo successivo ≥ 160 ms . La risposta sensoriale evocata dei neuroni noradrenergici ad uno stimolo tattile è stata ulteriormente valutata da una breve (circa 1s) compressione con una pinza chirurgica . La compressione è stata immediatamente ritirata una volta che le gambe opposte alle pinze facevano contatto tra di loro.

Binding in autoradiografia

Prelievo del tessuto e raccolta delle sezioni cerebrali

I ratti sono stati decapitati e i cervelli sono stati rapidamente rimossi e congelati in azoto liquido. Mediante l'uso di un criostato refrigerato mantenuto a -20°C vengono raccolte sezioni coronali dello spessore di 20 μm seguendo le coordinate dell'atlante di Paxinos e Watson (1986). Le fettine ottenute vengono poste su vetrini, preventivamente gelatinati, asciugate sotto un getto di aria fredda e conservate a -80°C fino al momento di eseguire il saggio autoradiografico.

Binding del recettore cannabico CB1 in autoradiografia

I vetrini sono portati a temperatura ambiente e poi incubati a 37°C per 2.5 ore, per consentire il raggiungimento dell'equilibrio di reazione con i recettori cannabici, con [³H]CP-55,940 10 nM (Perkim Elmer Life Sciences, Milan, Italy) nel buffer di reazione (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, 5% BSA fatty acid free) per la determinazione del binding totale. Sezioni adiacenti sono incubate in parallelo con [³H]CP-55,940 10 nM e un eccesso di CP-55,940 10 μM non marcato per quantificare il binding aspecifico. La reazione di incubazione è interrotta mediante due successivi lavaggi della durata rispettivamente di una e tre ore a 4°C nel buffer di lavaggio (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 1% BSA). In seguito le sezioni sono state immerse per 5 minuti a temperatura ambiente in Tris-HCl 50 mM pH 7.4 per rimuovere l'eccesso di BSA, quindi sono state sciacquate velocemente in acqua distillata ed asciugate mediante un flusso di aria fredda per circa 20 minuti. Dopo aver lasciato asciugare i vetrini, le sezioni sono state esposte ad una lastra autoradiografica sensibile al trizio (³H Hyperfilm, Amersham) sviluppata dopo 7 giorni.

Binding del [³⁵S]GTPγS stimolato dall'agonista CP 55,940 in autoradiografia

Il saggio del legame del [³⁵S] GTPγS è stato eseguito secondo la metodica di Sim e collaboratori (1996) con qualche modifica.

I vetrini prelevati dal congelatore a -80°C vengono portati a temperatura ambiente e poi preincubati in un assay buffer contenente 50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 10 mU adenosina deaminasi e 0.5% BSA pH 7.4, a 25°C per 10 minuti. Si esegue poi una seconda incubazione sempre in assay buffer, ma contenente anche GDP 3 mM, a 25°C per 15 minuti. I vetrini vengono successivamente incubati per 2 ore a 25°C in assay buffer contenente 3 mM GDP e 0.04 nM [³⁵S]GTPγS (Amersham, Milan, Italy) in presenza (stimolato) o in assenza (attività basale) dell'agonista CP-55,940 (5 μM). Il legame aspecifico è valutato in presenza di GTPγS 10 μM non marcato, in assenza di GDP. Infine i vetrini vengono lavati due volte per 2 minuti in Tris-HCl 50 mM pH 7.4 a 4°C, una volta in acqua distillata, poi asciugati sotto un getto di aria fredda e quindi esposti ad una lastra autoradiografica BioMax MR film (Amersham) per 48 ore.

Analisi densitometrica delle lastre autoradiografiche

L'intensità delle lastre autoradiografiche è stata misurata valutando i livelli di grigio con un sistema di analisi d'immagini composto da uno scanner collegato ad un personal

computer dotato di software Image-Pro Plus versione 7.0 (MediaCybernetics Inc., Silver Spring MD, USA). Le principali regioni anatomiche delle sezioni visualizzate sullo schermo sono contornate utilizzando un mouse ed il livello di trasmittanza luminosa è determinata come livello di grigio. Tali valori sono risultati essere all'interno di un range lineare di misura densitometrica determinato utilizzando una scala comparativa di livelli di grigio (standard per trizio, Autoradiographic [³H]Microscales, Amersham per il binding recettoriale e standard per lo ³⁵S prodotti in laboratorio). I livelli di grigio ottenuti dal binding del recettore, presenti nelle diverse aree cerebrali, sono stati trasformati in fmol/mg di tessuto grazie ad opportuni standard di trizio. Le percentuali di stimolazione netta del legame del [³⁵S] GTPγS sono state determinate sottraendo il legame basale del [³⁵S] GTPγS da quello stimolato con lo specifico agonista.

Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata condotta utilizzando Graph Pad Prism 4.0. I risultati sono espressi come medie \pm SEM. I test statistici utilizzati sono stati lo *Student's t-test* per il confronto di due gruppi e l'ANOVA a due vie seguita dal Bonferroni post hoc test nell'analisi dei quattro gruppi.

RISULTATI

1. L'esposizione al nandrolone decanoato in adolescenza induce lo sviluppo di un fenotipo simil-depressivo

1.1 Analisi comportamentale

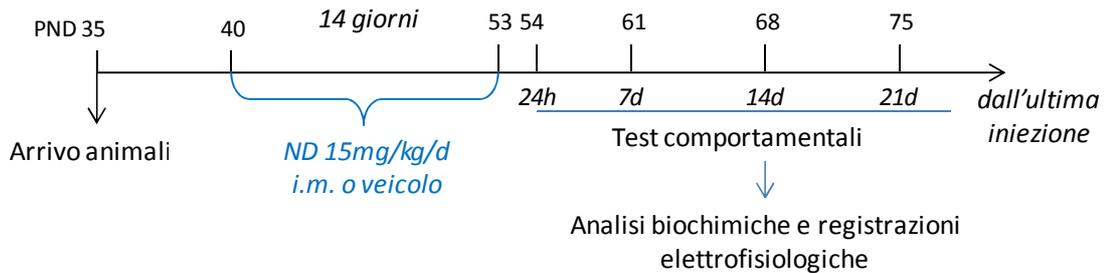


Fig C: Trattamento cronico con nandrolone decanoato in ratti maschi adolescenti alla dose di 15 mg/kg una volta al giorno per 14 giorni consecutivi a partire dal quarantesimo giorno post natale. A 24 ore dall'ultima iniezione sono stati effettuati i test comportamentali, che sono stati ripetuti a 7, 14 e 21 giorni dall'ultima iniezione. Le analisi biochimiche e le registrazioni elettrofisiologiche sono state condotte a partire da 14 giorni dalla fine del trattamento.

Per valutare la presenza e la durata di alterazioni nella sfera emotiva e cognitiva indotte dal trattamento con nandrolone decanoato in adolescenza sono stati eseguiti una batteria di test comportamentali 24 ore, 7 giorni, 14 giorni e 21 giorni dalla fine del trattamento.

1.1a Quadro comportamentale presente 24 ore dopo la fine del trattamento con nandrolone

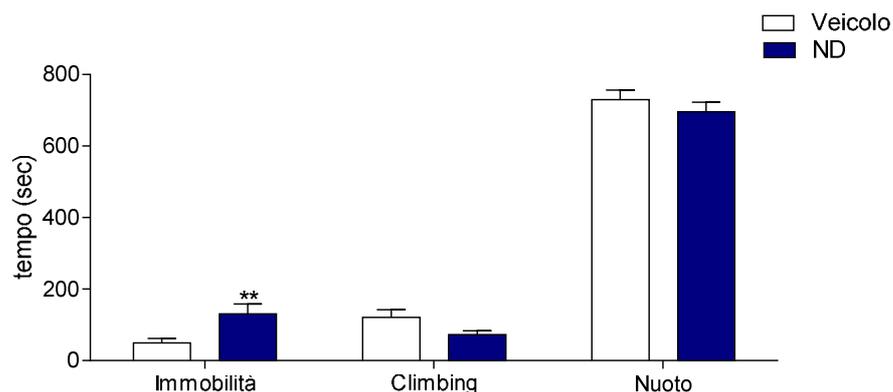


Fig. 1: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in ratti maschi adolescenti sul comportamento nella versione modificata del test del nuoto forzato a 24 ore dalla sospensione del trattamento. I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. ** $p < 0.01$ vs veicolo (Student's t test).

A 24 ore dalla fine del trattamento gli animali sono stati sottoposti ad una versione modificata del test del nuoto forzato che consiste in una unica sessione di nuoto della durata di 15 minuti. In **Fig. 1** è possibile osservare come negli animali trattati con

nandrolone decanoato si abbia un aumento significativo nel tempo speso in immobilità ($p=0.017$) suggerendo la presenza di disperazione comportamentale. I parametri di climbing e di nuoto invece, non risultano alterati dal trattamento con lo steroide.

1.1b Quadro comportamentale presente 7 giorni dopo la fine del trattamento con nandrolone

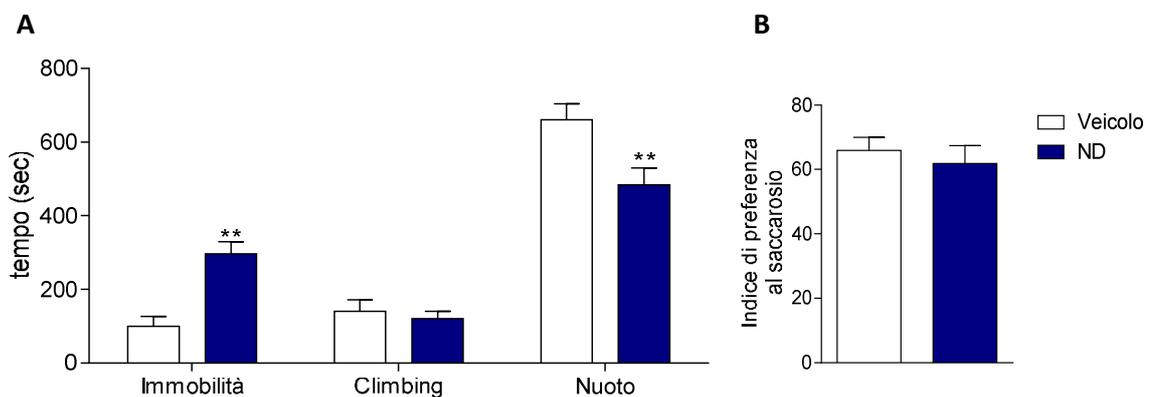


Fig. 2: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in ratti maschi adolescenti nella versione modificata del test del nuoto forzato (A) e nel test di preferenza al saccarosio (B) dove è riportato l'indice di preferenza al saccarosio calcolato come indicato nella sezione di "materiali e metodi" a 7 giorni dalla sospensione del trattamento. I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. ** $p<0.01$ vs veicolo (Student's t test).

Sette giorni dopo la fine del trattamento, nei ratti esposti al nandrolone decanoato si riscontra un significativo incremento dell'immobilità ($p=0.040$) accanto ad una significativa riduzione del tempo di nuoto ($p=0.002$) (Fig. 2A). Anche in questo esperimento il climbing non risulta alterato dal trattamento. Nel test di preferenza al saccarosio utilizzato per valutare la presenza di anedonia, i due gruppi di animali non presentano differenze significative nel consumo di saccarosio e di conseguenza nell'indice di preferenza (Fig. 2B).

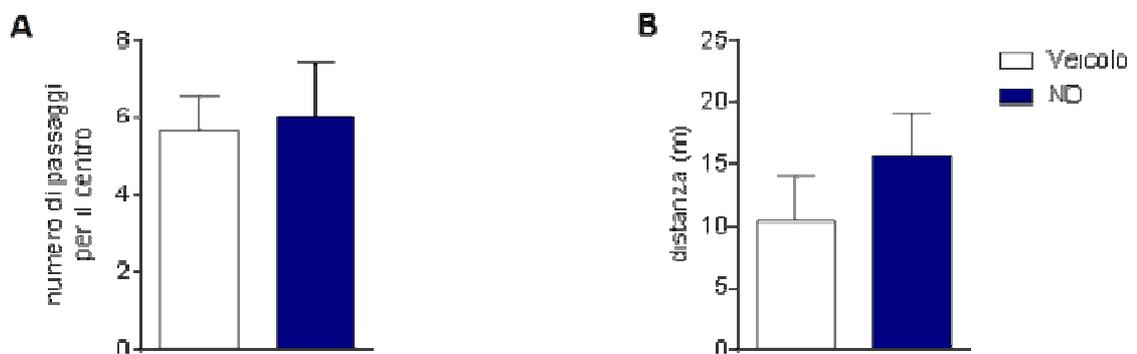


Fig. 3: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in ratti maschi adolescenti sul comportamento nel test dell'open field a 7 giorni dalla conclusione del trattamento. In figura vengono riportati il numero di passaggi per il centro dell'arena (A) e la distanza totale percorsa (B). I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo.

Il test dell'open field è stato effettuato per valutare la presenza di comportamenti ansiosi e di alterazioni nell'attività locomotoria. Il trattamento con nandrolone decanoato non induce alterazioni né nel numero di passaggi per il centro dell'arena, normalmente ridotti in animali che presentano comportamenti ansiosi (**Fig. 3A**), né nell'attività locomotoria (**Fig. 3B**), valutata come distanza totale percorsa.

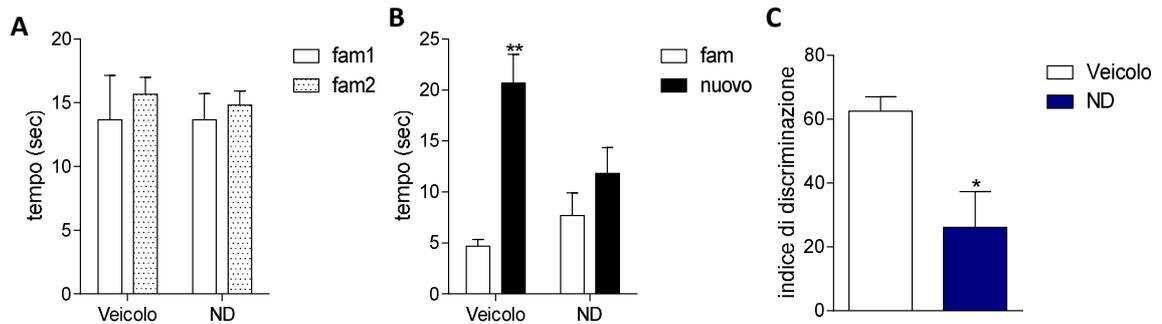


Fig. 4: Effetto del trattamento con nandrolone decanoato (ND) in adolescenza sulla memoria di riconoscimento a 7 giorni dall'ultima iniezione dello steroide. Le figure riportano il tempo, espresso in secondi, speso dagli animali ad esplorare i due oggetti identici (oggetto familiare, fam1 e fam2) durante la fase di familiarizzazione (**A**), il tempo speso ad esplorare l'oggetto familiare (fam) e quello nuovo durante la fase del test (**B**) e l'indice di discriminazione, calcolato come riportato nella sessione "materiali e metodi" (**C**). I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. * $p < 0.05$ vs veicolo; ** $p < 0.01$ vs oggetto familiare (Student's t test).

Nella fase di familiarizzazione del test di riconoscimento dell'oggetto nuovo (**Fig. 4A**), gli animali trattati con nandrolone decanoato o veicolo esplorano i due oggetti identici in egual misura. Nella fase di test (**Fig. 4B**), come atteso, gli animali veicolo spendono un tempo maggiore nell'esplorazione dell'oggetto nuovo mentre gli animali trattati con nandrolone decanoato non presentano differenze di esplorazione dei due oggetti. Ciò indica chiaramente la presenza di un deficit cognitivo a carico della memoria di riconoscimento. Conseguentemente l'indice di discriminazione degli animali trattati con lo steroide è significativamente ridotto rispetto a quello del gruppo di controllo (**Fig. 4C**, $p = 0.048$).

1.1c Quadro comportamentale presente 14 giorni dopo la fine del trattamento con nandrolone

Nel test del nuoto forzato (**Fig. 5A**) si osserva ancora una volta l'incremento del tempo speso in immobilità ($p = 0.0306$) ed il conseguente decremento del tempo di nuoto ($p = 0.0288$) negli animali trattati con nandrolone, suggerendo che la disperazione comportamentale già osservabile a 24 ore dalla fine del trattamento persiste per un lungo periodo di tempo. Il test di preferenza al saccarosio (**Fig. 5B**), indica che gli animali trattati

con lo steroide presentano una significativa riduzione nel consumo di saccarosio ($p=0.0064$), suggerendo quindi la comparsa di anedonia a questo specifico intervallo di tempo.

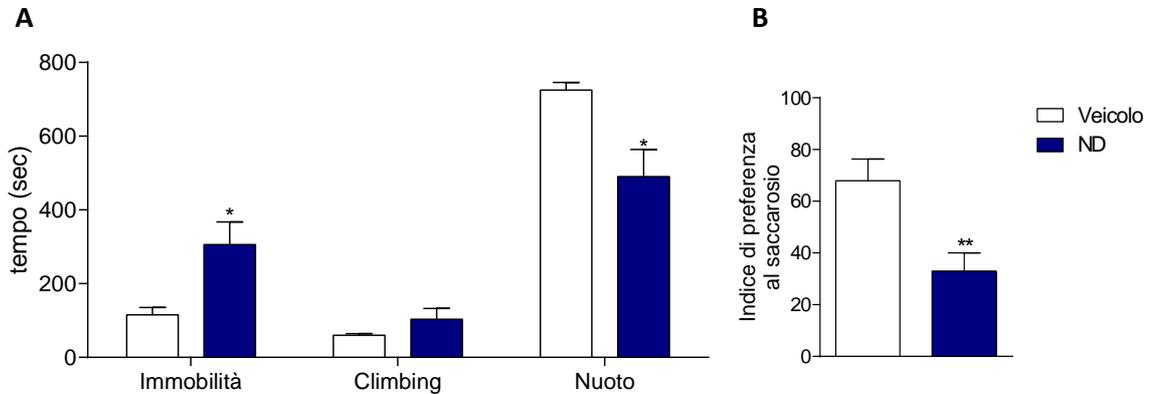


Fig. 5: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in ratti maschi adolescenti nella versione modificata del test del nuoto forzato (A) e nel test di preferenza al saccarosio (B) a 14 giorni dalla sospensione del trattamento. I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 8 animali per gruppo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs veicolo (Student's t test).

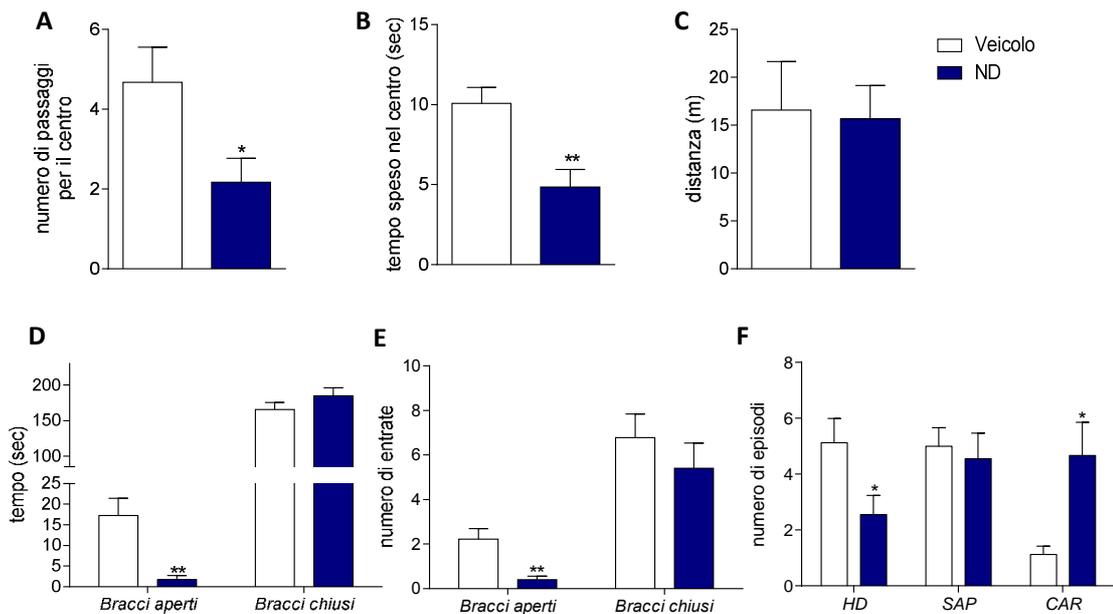


Fig. 6: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in ratti maschi adolescenti sul comportamento ansioso a 14 giorni dalla fine del trattamento. In figura vengono riportati il numero di passaggi per il centro dell'arena (A), il tempo speso nel centro (B) e la distanza totale percorsa (C). I parametri registrati nell'elevated plus maze sono: il tempo speso (D) ed il numero di ingressi (E) rispettivamente nei bracci aperti e nei bracci chiusi ed i parametri etologici quali head dips (HD), stretched attent posture (SAP) e closed arms return (CAR) (F). I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 6 animali per gruppo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs veicolo (Student's t test).

Nel test dell'open field (Fig. 6) i ratti trattati con nandrolone decanoato mostrano comportamenti ansiosi: sia il numero di passaggi per il centro (Fig. 6A, $p=0.0324$), sia il tempo speso nel centro dell'arena (Fig. 6B, $p=0.0025$) risultano infatti significativamente

ridotti rispetto ai controlli. Questo effetto non è dovuto ad alterazioni nell'attività locomotoria, infatti la distanza totale percorsa durante il test dai due gruppi di animali risulta paragonabile (**Fig. 6C**). Per meglio caratterizzare la presenza dello stato simil-ansioso osservato a questo intervallo di tempo, gli animali sono stati sottoposti ad un ulteriore test d'ansia ovvero l'elevated plus maze. Anche nel test dell'elevated plus maze gli animali trattati con nandrolone mostrano un comportamento ansioso riducendo significativamente il tempo speso (**Fig. 6D** $p=0.0015$) e il numero di entrate (**Fig. 6E** $p=0.0013$) nei bracci aperti. Nessuna alterazione significativa si riscontra invece nel tempo speso e nel numero di ingressi nei bracci chiusi, dimostrando che l'attività locomotoria non è alterata dal trattamento. Durante questo test sono stati inoltre registrati i parametri etologici: come si può osservare in **Fig. 6F** gli head dips (HD) risultano ridotti in modo significativo ($p=0.034$) mentre i closed arms return (CAR) aumentano nei ratti trattati con nandrolone decanoato ($p=0.0155$), diversamente gli stretched attended postures (SAP) non risultano alterati. Variazioni di tali parametri sono indice della presenza di ansia e rafforzano i risultati precedenti ottenuti.

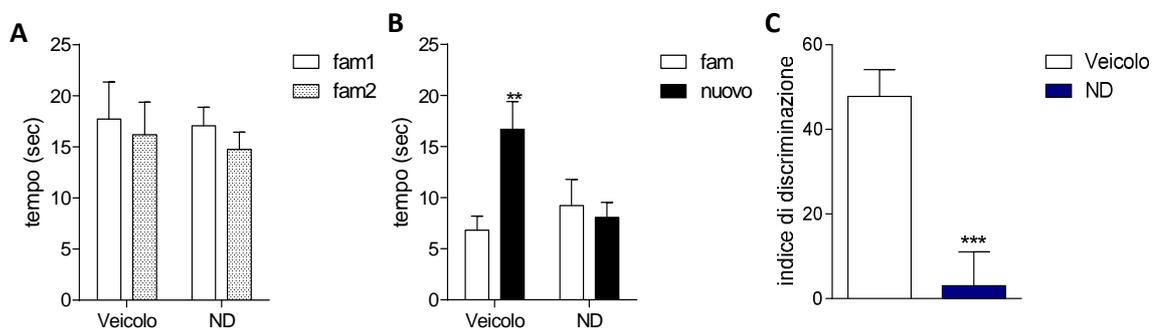


Fig. 7: Effetto del trattamento con nandrolone decanoato (ND) in adolescenza sulla memoria di riconoscimento a 14 giorni dall'ultima iniezione dello steroide. Le figure riportano il tempo, espresso in secondi, speso dagli animali ad esplorare i due oggetti identici (oggetto familiare, fam1 e fam2) durante la fase di familiarizzazione (**A**), il tempo speso ad esplorare l'oggetto familiare (fam) e quello nuovo durante la fase del test (**B**) e l'indice di discriminazione, calcolato come riportato nella sessione "materiali e metodi" (**C**). I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. ** $p<0.01$ vs oggetto familiare ; *** $p<0.001$ vs veicolo(Student's t test).

Quattordici giorni dopo la fine del trattamento con lo steroide, gli animali presentano ancora il deficit cognitivo a carico della memoria di riconoscimento. Nella **Fig. 7B** viene mostrata la fase di test nella quale si nota chiaramente che gli animali veicolo discriminano l'oggetto nuovo dall'oggetto familiare, mentre gli animali trattati con nandrolone decanoato non ne sono capaci. Ne consegue che anche a questo intervallo di tempo, i ratti esposti al nandrolone decanoato in adolescenza presentano un indice di

discriminazione ridotto e specificatamente la riduzione è pari a circa il 96% rispetto a quello dei veicoli (**Fig. 7C**, $p=0.0003$).

1.1d Quadro comportamentale presente 21 giorni dopo la fine del trattamento con nandrolone

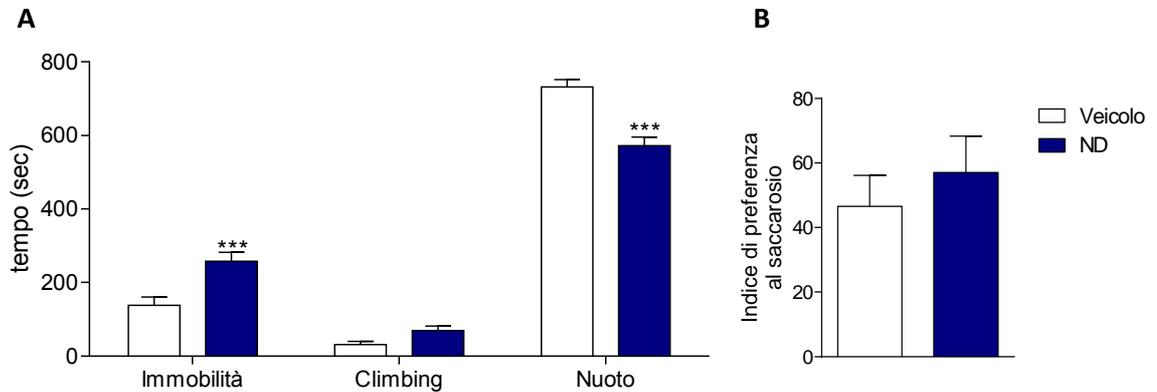


Fig. 8: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in ratti maschi adolescenti sui comportamenti simil-depressivi: comportamento nella versione modificata del test del nuoto forzato (**A**) e nel test di preferenza al saccarosio (**B**) a 21 giorni dalla sospensione del trattamento. I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 8 animali per gruppo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs veicolo (Student's t test).

Nel test del nuoto forzato si assiste ancora ad un significativo aumento dei comportamenti passivi (immobilità: $p=0.0040$) e riduzione dei comportamenti attivi (nuoto: $p=0.0002$) (**Fig. 8A**) negli animali trattati con il nandrolone. Al contrario, l'anedonia osservata a 21 giorni dall'interruzione del trattamento non è più presente a questo intervallo di tempo. Infatti l'indice di preferenza al saccarosio non presenta alterazioni significative tra i due gruppi in esame (**Fig. 8B**).

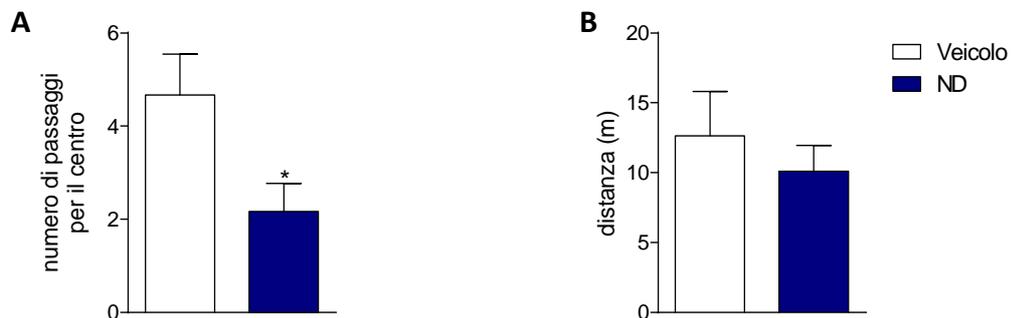


Fig. 9: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in ratti maschi adolescenti sul comportamento nel test dell'open field a 21 giorni dalla conclusione del trattamento. In figura vengono riportati il numero di passaggi per il centro dell'arena (**A**) e la distanza totale percorsa (**B**). I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. * $p<0.05$ vs veicolo (Students' t test)

Anche a questa tempistica, nel test dell'open field (**Fig. 9A**) gli animali trattati con nandrolone decanoato presentano un numero ridotto di passaggi per il centro dell'arena ($p=0.0492$) senza alterazioni nell'attività locomotoria (**Fig. 9B**). Infine, a 21 giorni dalla sospensione del trattamento, gli animali esposti a nandrolone decanoato in adolescenza recuperano spontaneamente il deficit nella memoria di riconoscimento (**Fig. 10**). Infatti a questo intervallo di tempo, nella fase di test entrambi i gruppi discriminano tra oggetto nuovo ed oggetto familiare (**Fig. 10B**), presentando così un indice di discriminazione molto simile (**Fig. 10C**).

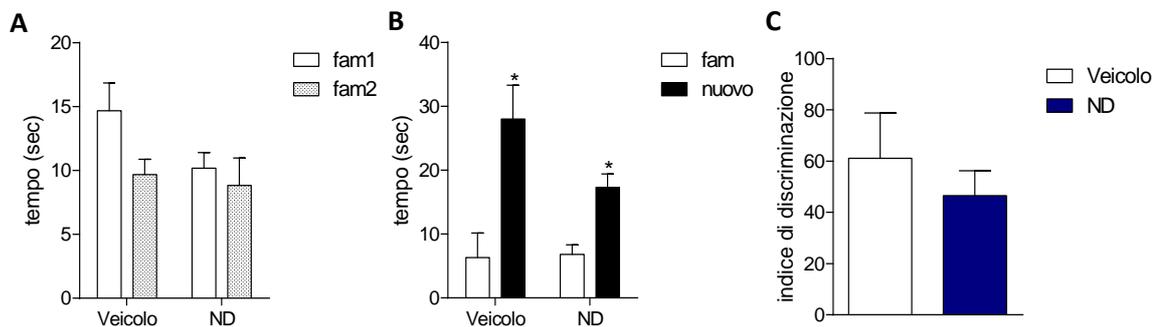


Fig. 10: Effetto del trattamento con nandrolone decanoato (ND) in adolescenza sulla memoria di riconoscimento a 21 giorni dall'ultima iniezione dello steroide. Le figure riportano il tempo, espresso in secondi, speso dagli animali ad esplorare i due oggetti identici (oggetto familiare, fam1 e fam2) durante la fase di familiarizzazione (**A**), il tempo speso ad esplorare l'oggetto familiare (fam) e quello nuovo durante la fase del test (**B**) e l'indice di discriminazione, calcolato come riportato nella sessione "materiali e metodi" (**C**). I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. * $p<0.05$ vs oggetto familiare (Student's t test).

1.1e Riassunto analisi comportamentale

	24h	7giorni	14giorni	21giorni
Test del nuoto forzato	↑ immobilità ↓ nuoto	↑ immobilità ↓ nuoto	↑ immobilità ↓ nuoto	↑ immobilità ↓ nuoto
Test di preferenza al saccarosio	-	= consumo saccarosio/acqua	↓ preferenza saccarosio	= consumo saccarosio/acqua
Open Field	-	= numero di passaggi per il centro	↓ numero di passaggi per il centro ↓ tempo speso nel centro	↓ numero di passaggi per il centro
Elevated Plus Maze	-	-	↓ tempo speso nei bracci aperti ↓ numero di entrate nei bracci aperti ↓ HD, ↑ CAR	-
Test del riconoscimento del nuovo oggetto	-	↓ indice di discriminazione	↓ indice di discriminazione	= indice di discriminazione

Tab. 1 Riassunto dei dati relativi all'effetto del trattamento con nandrolone decanoato (ND) in ratti maschi adolescenti sul comportamento emotivo e cognitivo a 24 ore, 7 giorni, 14 giorni e 21 giorni dalla fine del trattamento.

La **Tab. 1** riassume brevemente i dati fin qui presentati. Si può osservare che alterazioni nei parametri comportamentali esaminati si sviluppano lentamente, raggiungono un

picco a 14 giorni e poi tendono a ridursi a 21 giorni dalla fine del trattamento, ma non scompaiono totalmente. Poiché il quadro più severo è evidenziabile 14 giorni dopo la fine del trattamento con nandrolone, questa tempistica verrà utilizzata per l'analisi biochimica ed elettrofisiologica.

1.2 Analisi biochimiche

Poiché il fenotipo comportamentale indotto dal trattamento cronico con nandrolone presenta endofenotipi simil-depressivi, in questa analisi è stato preso in esame il fattore di trascrizione CREB, la cui attivazione (espressa come livelli di CREB fosforilato, pCREB) è alterata negli animali in cui sono stati osservati comportamenti simil-depressivi o simil-ansiosi, e due proteine comunemente regolate da questo fattore di trascrizione, ovvero BDNF e dinorfina A. L'analisi ha interessato quattro diverse aree cerebrali particolarmente coinvolte nella modulazione del comportamento emotivo e cognitivo. Inoltre, poiché alterazioni nella proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo e del volume dell'ippocampo dorsale sono state riscontrate sia in pazienti depressi che in modelli animali di depressione, la nostra analisi ha valutato anche questi parametri dopo trattamento cronico con nandrolone decanoato.

1.2a CREB e proteine correlate in corteccia prefrontale

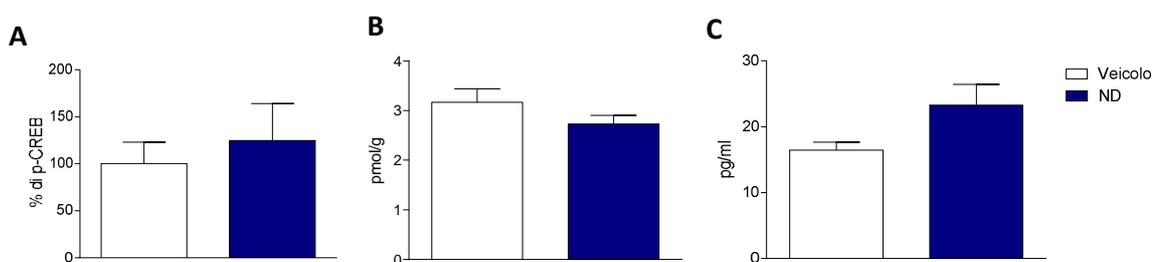


Fig. 11: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in adolescenza sui livelli di pCREB (A), dinorfina A (B) e BDNF (C) in corteccia prefrontale, 14 giorni dalla fine del trattamento. I livelli di pCREB e BDNF sono stati calcolati tramite saggio ELISA e sono espressi rispettivamente come % verso il veicolo e pg/ml, mentre i livelli di dinorfina A sono stati ottenuti tramite dosaggio radioimmunologico e sono espressi in pmol/g. I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo (Student's t test).

La **Fig. 11** mostra i livelli delle proteine prese in esame in corteccia prefrontale. E' possibile osservare che il trattamento cronico con nandrolone non ha indotto alterazioni significative nei livelli di pCREB (**Fig. 11A**), di dinorfina A (**Fig. 11B**), o di BDNF (**Fig. 11C**) in questa area cerebrale.

1.2b CREB e proteine correlate nel nucleus accumbens

Come è possibile osservare in **Fig. 12A**, il trattamento cronico con nandrolone decanoato induce un significativo incremento dei livelli di pCREB ($p=0.028$) nel nucleus accumbens. Inoltre si osserva una riduzione significativa dei livelli di dinorfina A ($p<0.001$, **Fig.12B**) e nessuna alterazione nei livelli di BDNF (**Fig. 12C**).

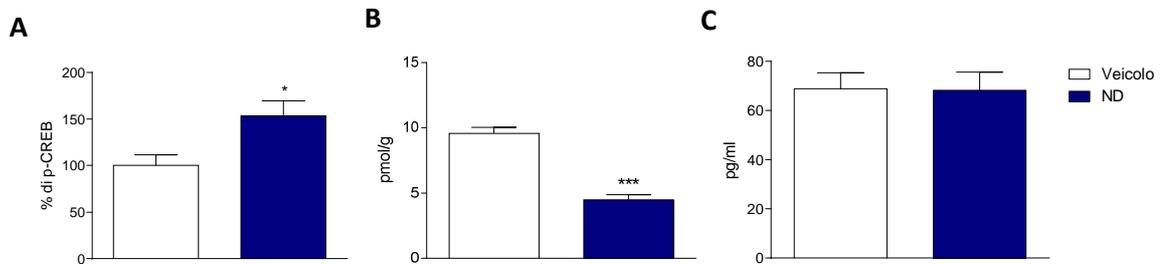


Fig. 12: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in adolescenza sui livelli di pCREB (A), dinorfina A (B) e BDNF (C) nel nucleus accumbens, 14 giorni dalla fine del trattamento. I livelli di pCREB e BDNF sono stati calcolati tramite saggio ELISA e sono espressi rispettivamente come % verso il veicolo e pg/ml, mentre i livelli di dinorfina A sono stati ottenuti tramite dosaggio radioimmunologico e sono espressi in pmol/g. I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. * $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs veicolo (Student's t test).

1.2c CREB e proteine correlate in amigdala

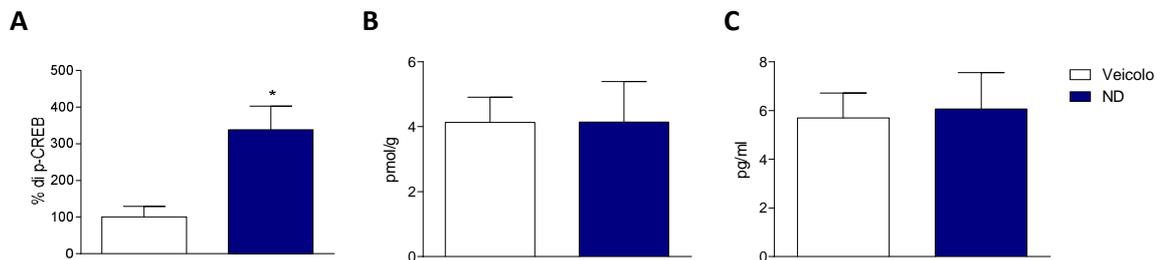


Fig. 13 Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in adolescenza sui livelli di pCREB (A), dinorfina A (B) e BDNF (C) in amigdala, 14 giorni dalla fine del trattamento. I livelli di pCREB e BDNF sono stati calcolati tramite saggio ELISA e sono espressi rispettivamente come % verso il veicolo e pg/ml, mentre i livelli di dinorfina A sono stati ottenuti tramite dosaggio radioimmunologico e sono espressi in pmol/g. I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo * $p<0.05$ vs veicolo (Student's t test).

Il trattamento cronico con nandrolone decanoato in ratti maschi adolescenti porta in amigdala ad un incremento significativo dei livelli di p-CREB ($p=0.0185$) come si osserva in **Fig. 13A**, mentre non si osservano variazioni significative nei livelli proteici della dinorfina A e di BDNF (**Fig. 13B e 13C**).

1.2d Analisi biochimica in ippocampo

Anche in ippocampo si assiste ad un incremento significativo dei livelli di pCREB ($p=0.028$, **Fig. 14A**) negli animali esposti a nandrolone decanoato, ma non si riscontrano alterazioni significative nei livelli di dinorfina A (**Fig. 14B**) e di BDNF (**Fig. 14C**).

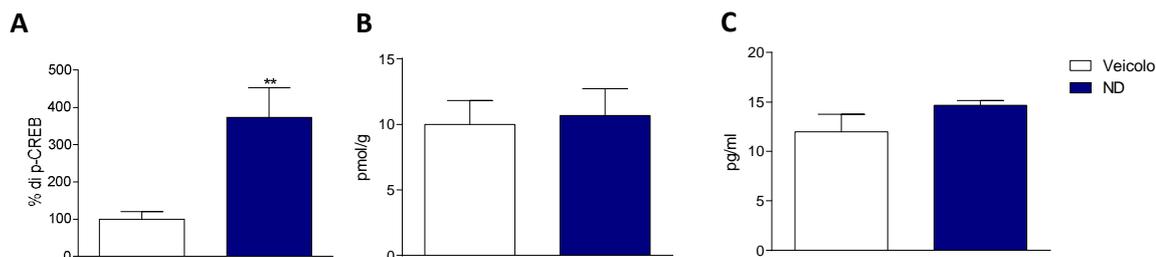


Fig. 14 Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in adolescenza sui livelli di pCREB (A), dinorfina A (B) e BDNF (C) in ippocampo, 14 giorni dalla fine del trattamento. I livelli di pCREB e BDNF sono stati calcolati tramite saggio ELISA e sono espressi rispettivamente come % verso il veicolo e pg/ml, mentre i livelli di dinorfina A sono stati ottenuti tramite dosaggio radioattivo e sono espressi in pmol/g. I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. *** $p < 0.001$ vs veicolo (Student's t test).

In ippocampo è stata anche analizzata la proliferazione cellulare nel giro dentato.

L'esposizione cronica al nandrolone decanoato durante l'adolescenza porta ad una riduzione significativa del numero di cellule BrdU-positive, cioè in attiva proliferazione (**Fig. 15A** $p = 0.007$). La **Fig. 15B** mostra degli esempi di cellule BrdU-positive a differenti ingrandimenti. Inoltre, il volume dell'ippocampo dorsale dei ratti ai quali è stato somministrato nandrolone decanoato in adolescenza è significativamente ridotto rispetto agli animali ai quali è stato somministrato il solo veicolo (**Fig. 15C** $p = 0.0023$). In **Fig. 15D** vengono riportate sezioni cerebrali rappresentative utilizzate per la determinazione del volume ippocampale.

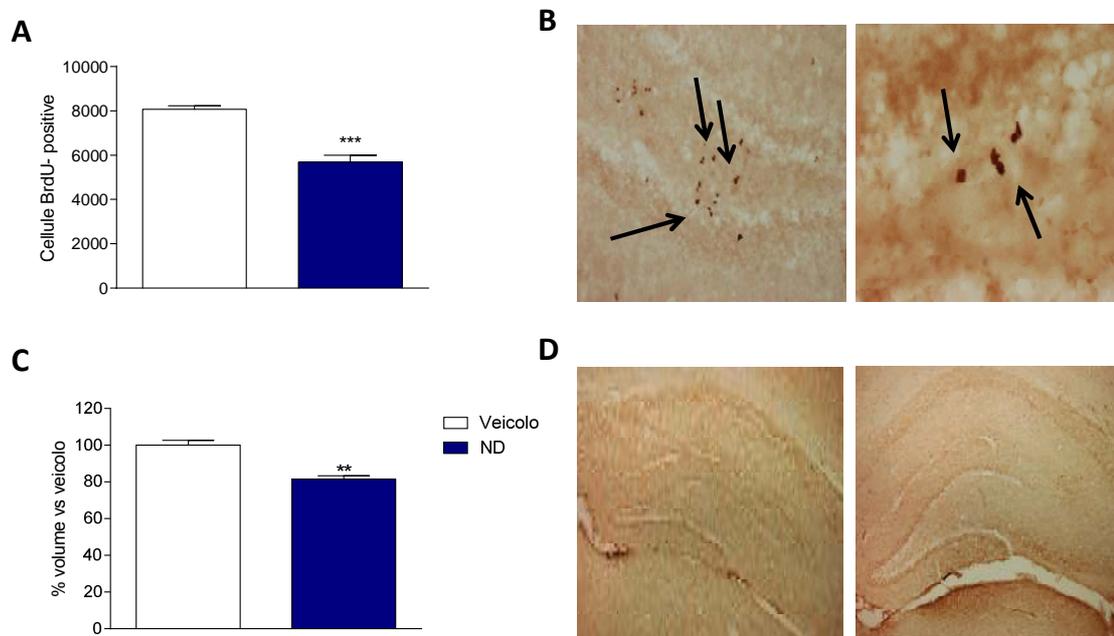


Fig. 15 Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in adolescenza sulla proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo e sul volume dell'ippocampo dorsale. La proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo è espressa come cellule BrdU-positive (A); esempi di cellule BrdU positive sono indicati dalle frecce nelle foto acquisite ad ingrandimenti rispettivamente di 20x e di 60x (B). Il volume dell'ippocampo dorsale è espresso come % rispetto al veicolo (C), le foto ad un ingrandimento di 4x indicano sono sezioni di esempio per calcolare il volume dell'ippocampo dorsale (D). I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs veicolo (Student's t test).

1.3 Analisi elettrofisiologica

Esperimenti di elettrofisiologia hanno permesso di valutare l'effetto del trattamento con nandrolone decanoato sulla funzionalità della neurotrasmissione monoaminergica. In particolare sono stati considerati due sistemi neurotrasmettitoriali implicati nelle alterazioni emotive, ovvero il sistema serotoninergico e quello noradrenergico. La registrazione dell'attività neuronale è stata effettuata in vivo, in animali anestetizzati, rispettivamente nel nucleo dorsale del rafe e nel locus coeruleus.

1.3a Analisi della funzionalità della neurotrasmissione serotoninergica

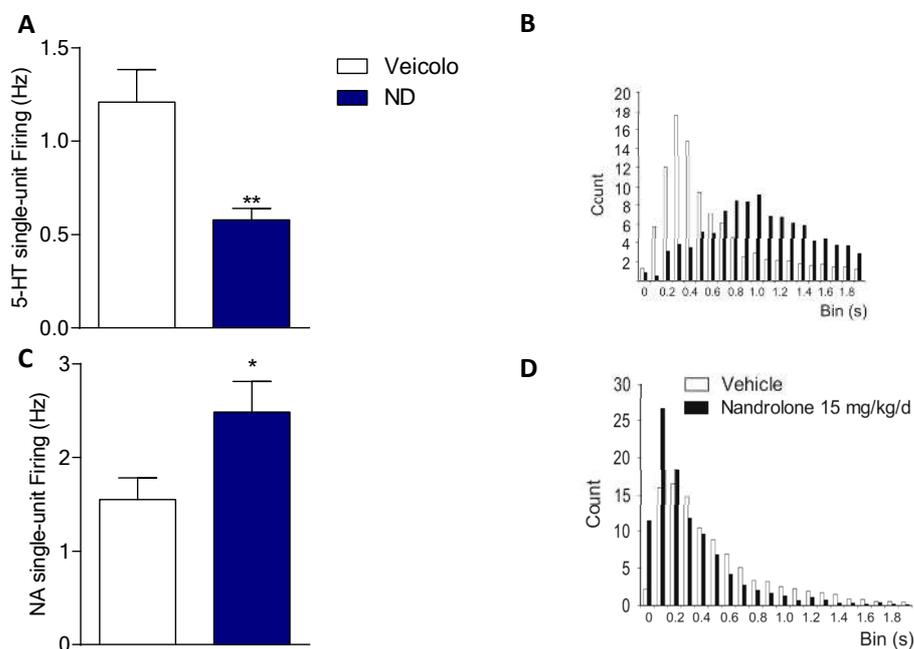


Fig. 16 Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato durante l'adolescenza sull'attività dei neuroni serotoninergici e noradrenergici in ratti adulti. La neurotrasmissione serotoninergica nel nucleo dorsale del rafe è espressa come media del firing rate dei neuroni serotoninergici (5-HT) (A) e gli istogrammi degli intervalli di interspike (ISI) mostrano differenze nella regolarità del pattern di firing dei neuroni serotoninergici (B). La neurotrasmissione noradrenergica nel locus coeruleus è espressa come media del firing rate dei neuroni noradrenergici (NA) (C) e gli istogrammi degli intervalli di interspike (ISI) mostrano differenze nella regolarità del pattern di firing dei neuroni noradrenergici (D). I valori riportati sono medie \pm SEM (n=19–29 per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs gruppo controllo (Student's t test).

Il trattamento cronico con nandrolone decanoato riduce significativamente il firing medio (Fig. 16A $p=0.004$) dei neuroni serotoninergici e distrugge la regolarità del firing di tali neuroni, come rivelato dall'analisi degli istogrammi degli intervalli di interspike (ISI Fig. 16B). L'ANOVA a due vie rivela infatti un effetto significativo del fattore trattamento ($F_{1,1007}=10.40$, $p=0.002$), del fattore tempo ($F_{19,1007}=4.21$, $p < 0.001$) e dell'interazione tempo e trattamento ($F_{19,1007}=4.84$, $p < 0.001$).

1.3b Analisi della funzionalità della neurotrasmissione noradrenergica

Al contrario di quanto osservato per la trasmissione serotonergica, l'esposizione a nandrolone decanoato comporta un significativo incremento del firing rate medio (**Fig. 16C**, $p < 0.05$) dei neuroni noradrenergici accompagnato da un generale incremento del pattern di firing (**Fig. 16D**). L'ANOVA a due vie per misure ripetute rivela infatti un effetto significativo del fattore trattamento ($F_{1,703}=6.06$, $p=0.019$), del fattore tempo ($F_{19,703}=14.42$, $p < 0.001$) e dell'interazione dei due fattori ($F_{19,703}=3.10$, $p < 0.001$).

2. Coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel fenotipo simil-depressivo indotto dall'esposizione adolescenziale a nandrolone decanoato

2.1 Analisi del recettore CB1 e della sua funzionalità

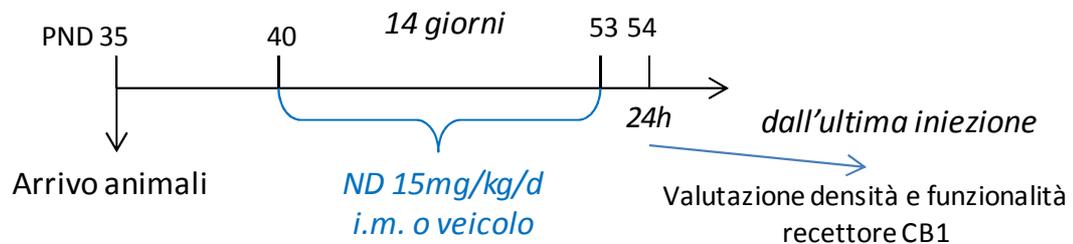


Fig. D: Trattamento cronico con nandrolone decanoato in ratti maschi adolescenti alla dose di 15 mg/kg una volta al giorno per 14 giorni consecutivi a partire dal quarantesimo giorno post natale. A 24 ore dall'ultima iniezione sono stati condotti i binding in autoradiografia per valutare la densità e la funzionalità del recettore CB1.

Al fine di valutare il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel fenotipo simil-depressivo indotto dal trattamento cronico con nandrolone in adolescenza, sono stati effettuati saggi di binding in autoradiografia che hanno permesso di valutare possibili alterazioni nella densità e funzionalità del recettore CB1.

La **Fig. 17A** mostra l'effetto del trattamento con nandrolone decanoato sulla densità del recettore CB1 in diverse aree cerebrali correlate al comportamento emotivo e cognitivo. È possibile osservare che il trattamento condotto in età adolescenziale induce una significativa riduzione della densità recettoriale limitatamente all'area tegmentale ventrale ($p=0.0216$) e al cervelletto ($p=0.0091$).

Inoltre, quando si valuta l'accoppiamento tra il recettore CB1 e le G proteine tramite il saggio del legame del GTP γ S, si osserva che il trattamento con nandrolone decanoato induce una significativa riduzione di tale parametro nel nucleus accumbens ($p=0.0361$) e nel cervelletto ($p=0.0420$) ed un significativo aumento nell'ipotalamo ($p=0.0345$) (**Fig. 17B**).

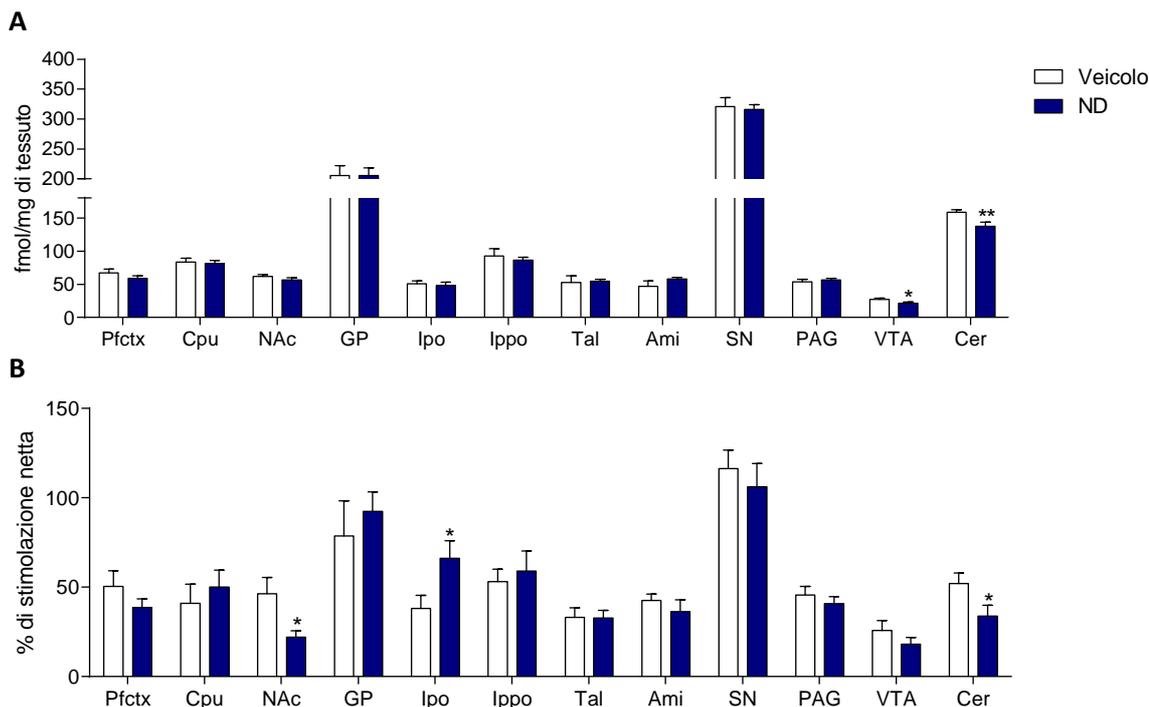


Fig. 17 Effetto del trattamento cronico adolescenziale con nandrolone decanoato sulla densità (A) e funzionalità del recettore CB1 (B). I dati sono espressi come medie \pm SEM di 9-12 fettine per un totale di almeno 3 animali per gruppo. Pfctx= corteccia prefrontale, Cpu= caudato e putamen, NAc= nucleus accumbens, GP= globo pallido, Ipo=ipotalamo, Ippo= ippocampo, Tal= talamo, Ami= amigdala, PAG= sostanza grigia peracqueductale, VTA= area tegmentale ventrale, Cer= cervelletto. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs veicolo (Student's t test).

3. L'esposizione al nandrolone decanoato in età adulta non altera il comportamento emotivo degli animali

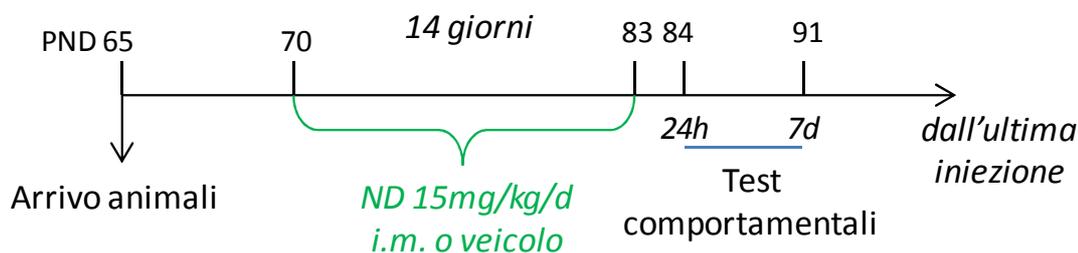


Fig E: I ratti maschi adulti sono stati trattati con nandrolone decanoato (ND) alla dose di 15 mg/kg una volta al giorno per 14 giorni consecutivi a partire dal settantesimo giorno post natale. A 24 ore dall'ultima iniezione sono stati effettuati i test comportamentali, che sono stati ripetuti a 7 giorni dall'ultima iniezione.

3.1 Analisi comportamentale

Per valutare la presenza di una eventuale specifica vulnerabilità del cervello adolescente agli effetti avversi del nandrolone sul comportamento emotivo, lo stesso schema di trattamento con lo steroide è stato eseguito anche in animali adulti. Ventiquattro ore

dopo l'ultima somministrazione di nandrolone gli animali sono stati sottoposti alla versione modificata del test del nuoto forzato e, come è possibile osservare in **Fig. 18A**, il nandrolone decanoato non induce alcuna alterazione del comportamento dei ratti maschi adulti in questo test. Lo stesso risultato è presente anche quando il test del nuoto forzato viene ripetuto 7 giorni dopo l'ultima somministrazione di nandrolone decanoato (**Fig. 18B**).

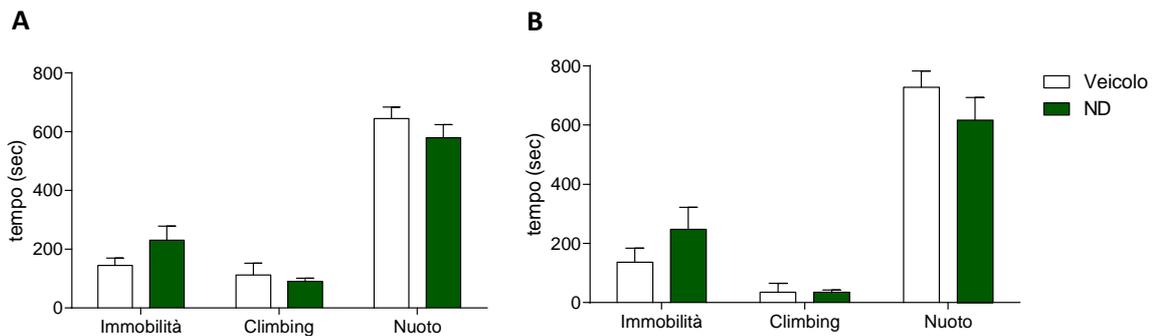


Fig. 18: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND) in ratti maschi adulti sul comportamento nella versione modificata del test del nuoto forzato a 24 ore (A) e 7 giorni (B) dalla sospensione del trattamento. I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 8 animali per gruppo. ** $p < 0.01$ vs veicolo (Student's t test).

L'assenza di alterazioni nel test del nuoto forzato alle due tempistiche considerate suggerisce quindi che il trattamento con nandrolone decanoato in età adulta non induce alterazioni nel comportamento emotivo degli animali, come invece rilevato dopo trattamento in adolescenza.

4. Coinvolgimento del sistema endocannabinoide nell'esposizione a nandrolone decanoato durante l'età adulta

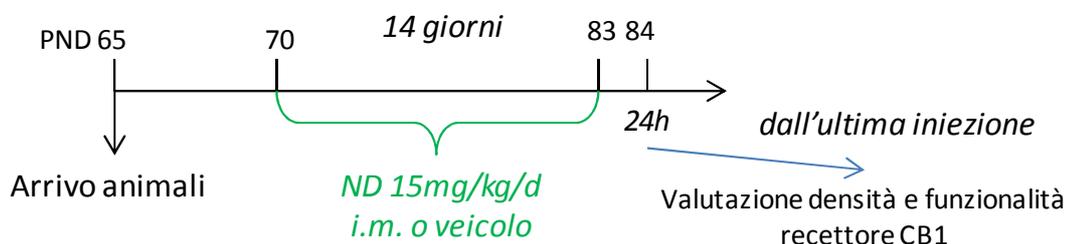


Fig. F: I ratti maschi adulti sono stati trattati con nandrolone decanoato (ND) alla dose di 15 mg/kg una volta al giorno per 14 giorni consecutivi a partire dal settantesimo giorno post natale. A 24 ore dall'ultima iniezione sono stati effettuati i test comportamentali, che sono stati ripetuti a 7 giorni dall'ultima iniezione.

4.1 Analisi del recettore CB1 e della sua funzionalità

Il trattamento con nandrolone decanoato in età adulta induce solo lievi ma significative down-regolazioni della densità del recettore CB1 limitatamente all'amigdala ($p=0.017$) ed alla VTA ($p=0.039$) (Fig. 19A), senza alterare la funzionalità recettoriale in nessuna delle 12 aree considerate (Fig. 19B).

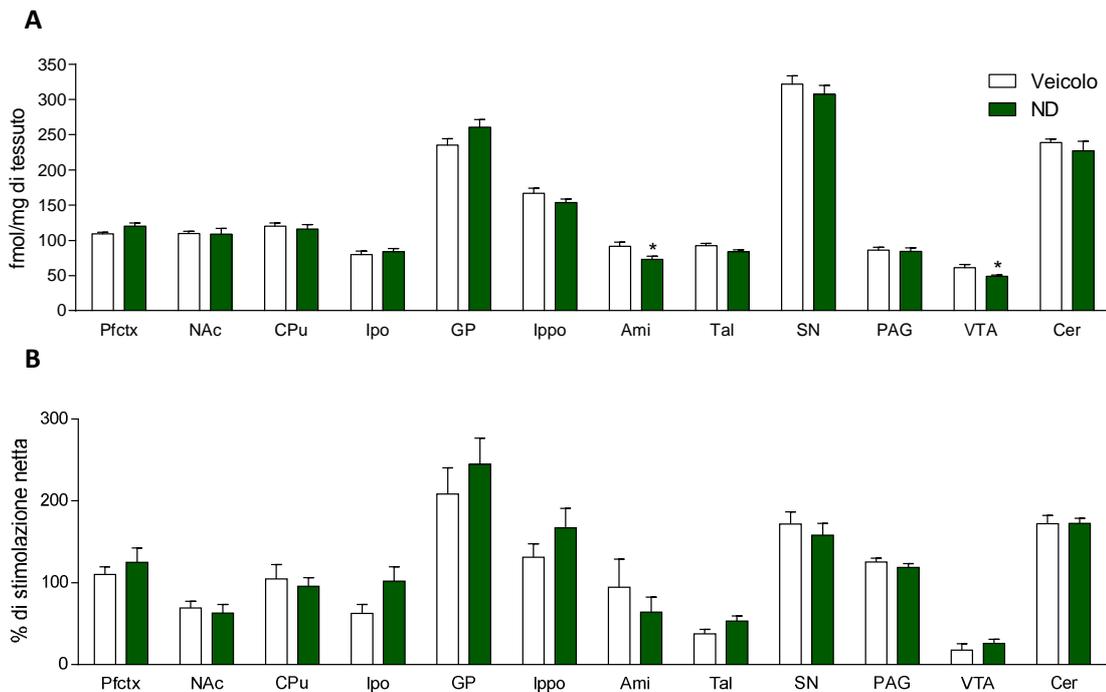


Fig. 19: Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato in ratti maschi adulti sulla densità (A) e funzionalità del recettore CB1 (B). I dati sono espressi come medie \pm SEM di 9-12 fettine per un totale di almeno 3 animali per gruppo. Pfctx= corteccia prefrontale, Cpu= caudato e putamen, NAc= nucleus accumbens, GP= globo pallido, Ipo=ipotalamo, Ippo= ippocampo, Tal= talamo, Ami= amigdala, PAG= sostanza grigia peracqueduttale, VTA= area tegmentale ventrale, Cer= cervelletto. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs veicolo (Student's t test).

5. Effetto della manipolazione del sistema endocannabinoide sul fenotipo simil-depressivo indotto dall'esposizione adolescenziale al nandrolone decanoato

I risultati riportati finora indicano chiaramente che l'esposizione al nandrolone decanoato durante l'adolescenza è in grado di indurre un complesso fenotipo simil-depressivo che non è invece presente quando il trattamento viene effettuato in età adulta. Tale quadro si accompagna con una significativa riduzione della densità e/o funzionalità del recettore CB1 nel nucleus accumbens, VTA e cervelletto. Poiché ipotizziamo che tali eventi possano giocare un ruolo nell'induzione del fenotipo simil-depressivo, il passo successivo è stato

quello di trattare gli animali adolescenti esposti al nandrolone con il composto URB597, un inibitore selettivo dell'enzima degradativo dell'anandamide, uno dei principali ligandi cannabinoidi endogeni che aveva già dimostrato proprietà antidepressive in altri modelli animali (Gobbi et al., 2005; Realini et al., 2011).

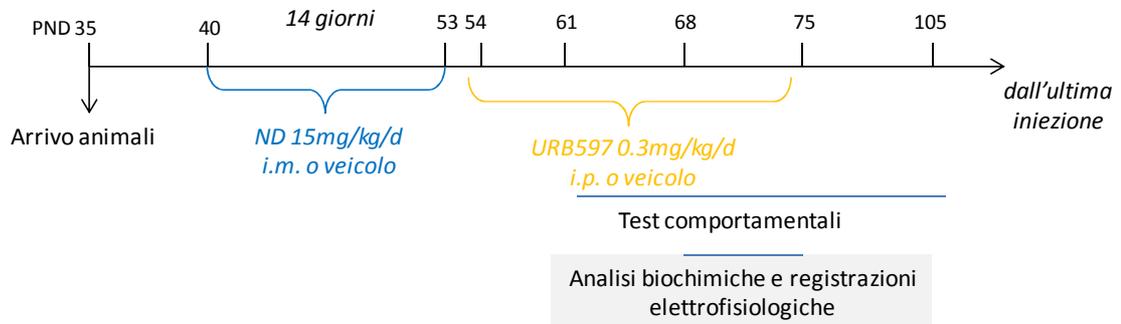


Fig. G: Trattamento con URB597 in ratti maschi pre-esposti a nandrolone decanoato in adolescenza: a seguito del trattamento cronico con nandrolone decanoato i ratti maschi adolescenti sono stati trattati, a partire dal giorno successivo, con URB597 alla dose di 0.3 mg/kg una volta al giorno per tre settimane. Dopo una settimana dall'inizio del trattamento con URB597, gli animali sono stati sottoposti ai test comportamentali, ripetuti anche a time-points successivi (dopo 2 e dopo 3 settimane di trattamento con URB597 e dopo 4 settimane dalla sospensione del trattamento con URB597).

5.1 Analisi comportamentale

A partire dalle 24 ore dopo l'ultima somministrazione di nandrolone, gli animali sono stati trattati con URB597 alla dose di 0.3 mg/kg per tre settimane. L'analisi comportamentale per valutare l'effetto dell'URB597 sul fenotipo simil-depressivo indotto dal nandrolone è stata effettuata dopo 1, 2 e 3 settimane di trattamento. Infine, per valutare se gli effetti dell'URB597 fossero duraturi, la stessa analisi comportamentale è stata ripetuta 4 settimane dopo la sospensione del trattamento con URB597.

5.1a Analisi comportamentale una settimana dopo trattamento con URB597

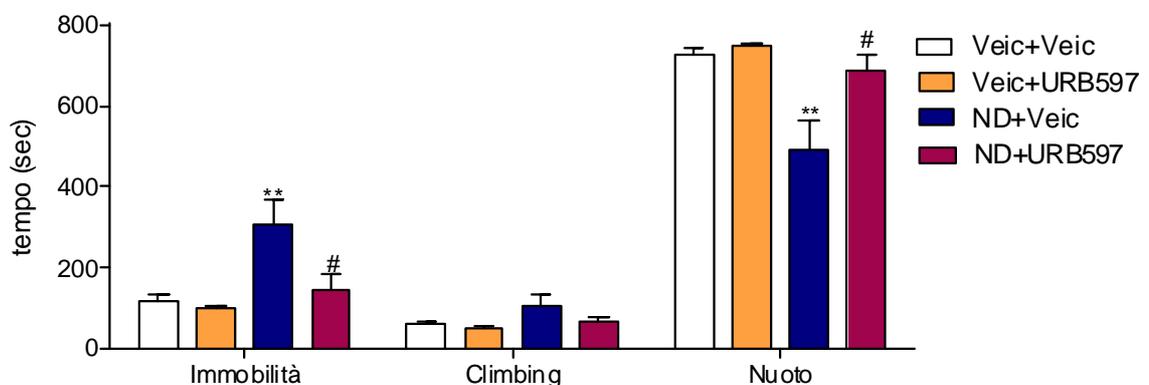


Fig. 20: Effetto di una settimana di trattamento con URB597 in ratti pre-esposti a nandrolone decanoato (ND) durante l'adolescenza in una versione modificata del test del nuoto forzato. I dati sono espressi come medie \pm SEM di almeno 6 animali per gruppo. ** $p < 0.01$ vs veicolo/veicolo, # $p < 0.05$ vs ND/veicolo. (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

L'ANOVA a due vie rivela un significativo effetto del nandrolone decanoato e dell'URB597 nel test del nuoto forzato sia per il tempo speso in immobilità (ND: $F_{1,14}=8.568$, $p=0.0110$; URB: $F_{1,14}=4.592$, $p=0.0502$) che per il tempo di nuoto (ND: $F_{1,14}=9.574$, $p=0.0079$; URB: $F_{1,14}=5.511$, $p=0.0341$). Nel test del nuoto forzato (**Fig. 20**), come atteso, il trattamento cronico con nandrolone incrementa l'immobilità ($p<0.01$) e riduce il tempo di nuoto ($p<0.01$). Il trattamento con URB597 recupera l'alterazione indotta dallo steroide, riportando ai valori controllo sia il tempo di immobilità ($p<0.05$), sia il tempo di nuoto ($p<0.05$).

Nel test di riconoscimento del nuovo oggetto (**Fig. 21**) solo gli animali veicolo sono in grado di discriminare tra oggetto nuovo e familiare. L'analisi statistica ANOVA a due vie mostra, anche in questo caso, un effetto significativo dello steroide ($F_{1,15}=3.856$, $p=0.0684$) e dell'URB597 ($F_{1,15}=8.277$, $p=0.0115$), sull'indice di discriminazione nel test di riconoscimento del nuovo oggetto. L'indice di discriminazione (**Fig. 21C**) risulta infatti ridotto negli animali pre-esposti al nandrolone ($p<0.05$), ma anche in quelli esposti al composto URB597 ($p<0.05$), suggerendo che non solo tale composto non recupera il deficit cognitivo indotto dallo steroide ma, addirittura, lo induce di per sé.

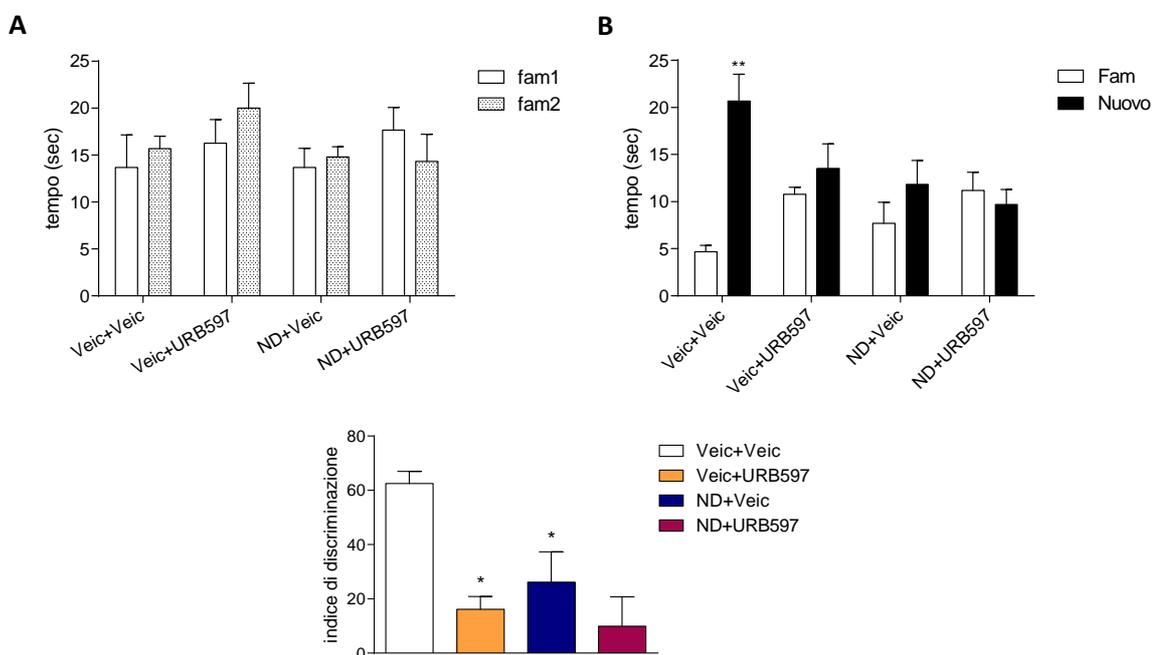


Fig. 21 Effetto di una settimana di trattamento con URB597 in ratti pre-esposti a nandrolone decanoato (ND) durante l'adolescenza nel test di riconoscimento del nuovo oggetto: fase di familiarizzazione (**A**), fase di test (**B**) e indice di discriminazione (**C**). I dati sono espressi come medie \pm SEM di almeno 6 animali per gruppo. ** $p<0.01$ vs oggetto familiare (fam), * $p<0.05$ vs veicolo/veicolo, # $p<0.05$ vs ND/veicolo. (student's t test, ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

5.1b Analisi comportamentale due settimane dopo trattamento con URB597

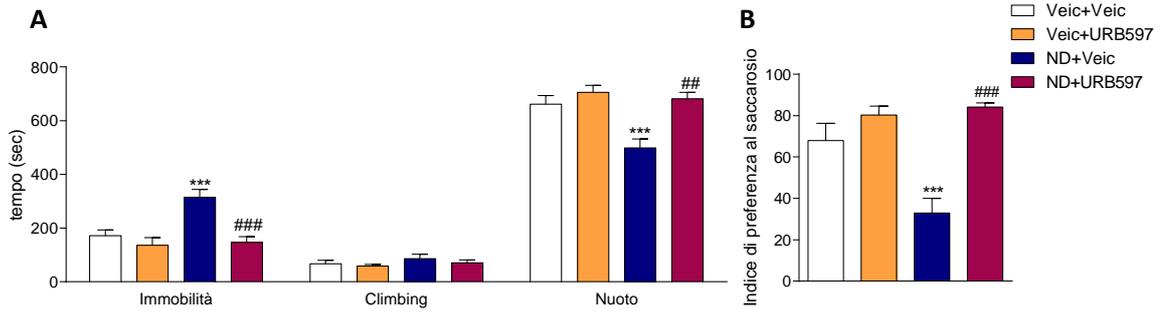


Fig. 22: Effetto del trattamento di 2 settimane con URB597 in animali esposti in adolescenza a nandrolone (ND) in ratti maschi adulti sui comportamenti simil-depressivi: comportamento nella versione modificata del test del nuoto forzato (A) e nel test di preferenza al saccarosio (B) dove è riportato l'indice di preferenza al saccarosio calcolato come indicato nella sezione di "materiali e metodi". I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 8 animali per gruppo. *** $p < 0.001$ vs veicolo/veicolo, ### $p < 0.001$ vs ND/veicolo (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

La **Fig 22A** mostra l'effetto del trattamento con URB597 sul comportamento di animali esposti a nandrolone decanoato in adolescenza nel test del nuoto forzato. È possibile osservare un significativo effetto del nandrolone decanoato, dell'URB597 e dell'interazione tra le due variabili sull'immobilità (ND: $F_{1,37} = 8.690$, $p = 0.0055$; URB: $F_{1,37} = 15.12$, $p = 0.0004$; NDxURB: $F_{1,37} = 6.392$, $p = 0.0159$) e sul tempo di nuoto (ND: $F_{1,37} = 9.031$, $p = 0.0047$; URB: $F_{1,37} = 13.32$, $p = 0.0008$; NDxURB: $F_{1,37} = 4.970$, $p = 0.019$) come rivelato dall'ANOVA a due vie. Come atteso, il trattamento cronico con nandrolone decanoato in età adolescenziale incrementa il tempo di immobilità ($p < 0.001$) e decrementa il tempo di nuoto ($p < 0.001$). Il trattamento cronico con URB597 è in grado di recuperare queste alterazioni, riportando ai valori di controllo sia il tempo di immobilità ($p < 0.001$) che quello speso in nuoto ($p < 0.01$). Anche nel test di preferenza al saccarosio (**Fig. 22B**) l'ANOVA a due vie mostra un principale effetto dei due trattamenti farmacologici (ND: $F_{1,30} = 7.526$, $p = 0.0102$; URB: $F_{1,30} = 31.21$, $p < 0.0001$) e dell'interazione tra essi (NDxURB: $F_{1,30} = 7.526$, $p = 0.0102$). Due settimane di trattamento con URB597 ($p < 0.001$) sono anche in grado di recuperare la riduzione di preferenza di saccarosio indotta dal nandrolone ($p < 0.001$) a questo specifico intervallo di tempo.

Analogamente, nel test dell'open field, mostrato in **Fig. 23A** e **23B**, l'ANOVA a due vie rivela un principale significativo effetto del nandrolone decanoato e dell'URB597 sul tempo speso nel centro dell'Open Field (ND: $F_{1,31} = 4.936$, $p = 0.0337$; URB: $F_{1,31} = 4.751$, $p = 0.0370$). Inoltre, non si rileva un effetto significativo del nandrolone e dell'URB597 nel numero di passaggi per il centro dell'arena ma un principale significativo effetto dell'interazione ND e URB597 (NDxURB: $F_{1,28} = 5.465$, $p = 0.0268$). Nello specifico il

trattamento con URB597 induce un significativo incremento sia nel numero di passaggi nel centro dell'arena ($p < 0.05$) sia nel tempo speso nel centro ($p < 0.05$) negli animali pre-esposti al nandrolone decanoato ($p < 0.05$). Infine non si riscontrano alterazioni significative nell'attività locomotoria spontanea in nessuno dei gruppi considerati (**Fig. 23C**). In **Fig. 23D** e **23E** viene mostrato l'effetto del trattamento cronico con URB597 in ratti pre-esposti al nandrolone decanoato nel test dell'elevated plus maze. L'ANOVA a due vie mostra un principale significativo effetto del nandrolone, dell'URB597 e dell'interazione di questi due trattamenti farmacologici sul tempo speso (ND: $F_{1,30}=9.658$, $p=0.0041$ URB: $F_{1,30}=6.474$, $p=0.0163$; NDxURB: $F_{1,30}=4.876$, $p=0.0350$;) e sul numero di ingressi (ND: $F_{1,30}=7.624$, $p=0.0097$; URB: $F_{1,30}=7.394$, $p=0.0108$; NDxURB597: $F_{1,30}=4.341$, $p=0.0458$) nei bracci aperti dell'apparato. L'esposizione adolescenziale al nandrolone induce una riduzione significativa del tempo speso nei bracci aperti ($p < 0.01$) ed una riduzione del numero di entrate nei bracci aperti ($p < 0.01$).

Al contrario non si osservano differenze significative né nelle entrate né nel tempo speso nei bracci chiusi. Il trattamento con URB597 nei ratti trattati con nandrolone decanoato è in grado di riportare ai valori controllo il tempo speso ($p < 0.01$) ed il numero di entrate nei bracci aperti ($p < 0.01$).

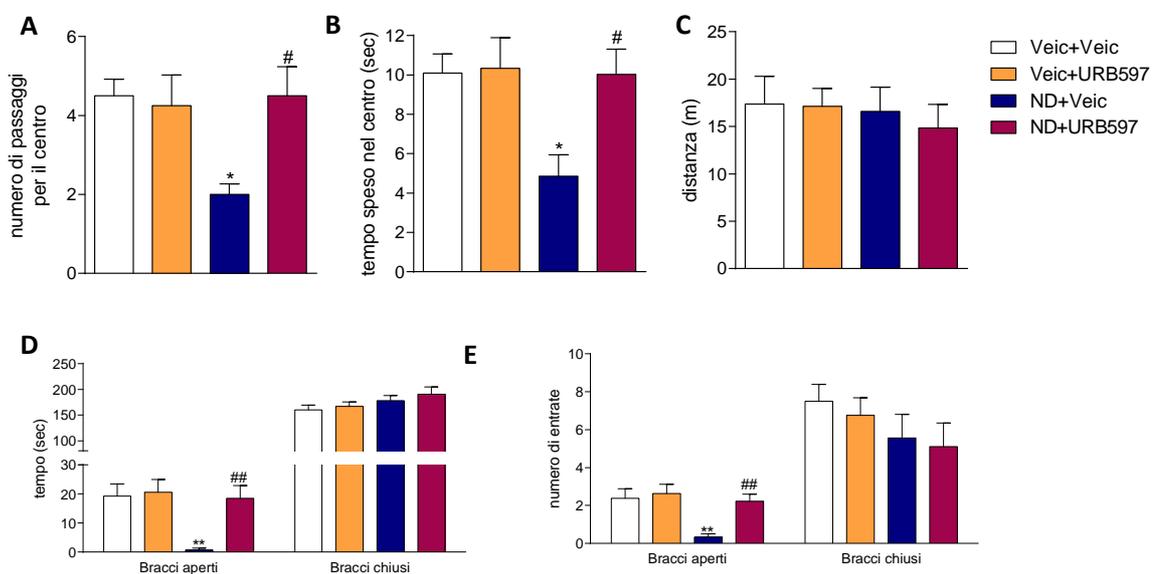


Fig. 23: Effetto di due settimane di trattamento con URB597 in animali pre-esposti a nandrolone decanoato (ND) in adolescenza sul comportamento ansioso. In figura vengono riportati i parametri registrati nell'open field ovvero il numero di passaggi per il centro dell'arena (**A**), il tempo speso nel centro (**B**) e la distanza totale percorsa (**C**). I parametri registrati nell'elevated plus maze sono: il tempo speso (**D**) ed il numero di ingressi (**E**) rispettivamente nei bracci aperti e nei bracci chiusi. I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 8 animali per gruppo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs veicolo/veicolo, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs ND/veicolo (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

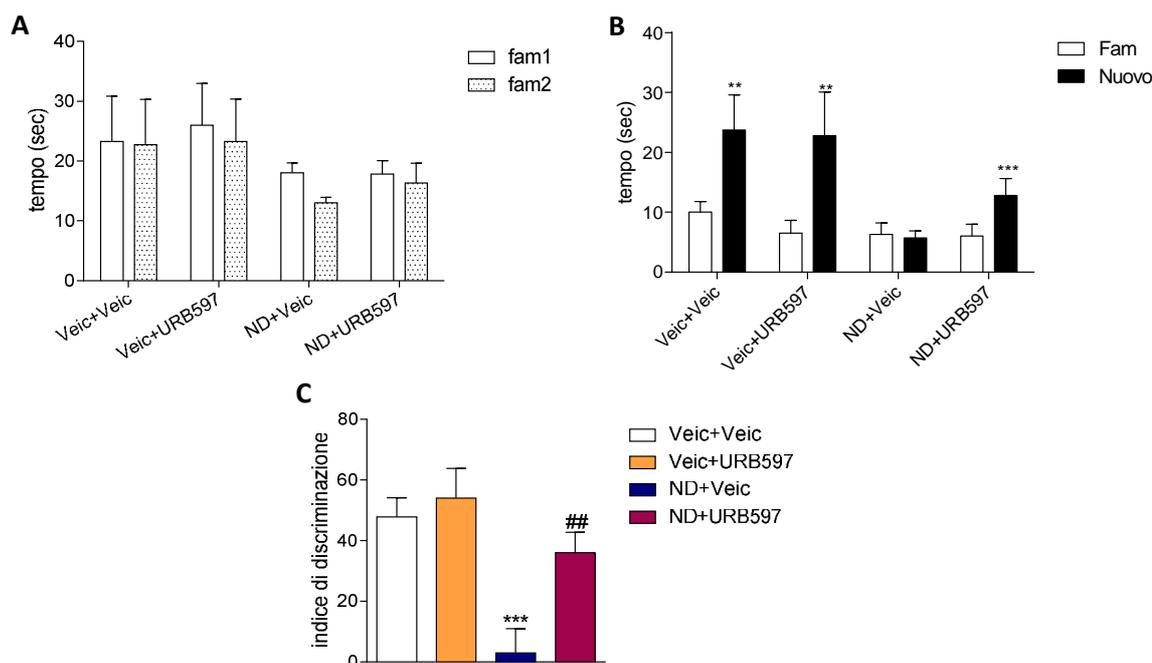


Fig. 24 Effetto di 2 settimane di trattamento con URB597 in ratti maschi adulti esposti in adolescenza a nandrolone decanoato (ND) sulla memoria di riconoscimento nel test di riconoscimento del nuovo oggetto. Le figure riportano il tempo, espresso in secondi, speso dagli animali ad esplorare i due oggetti identici (oggetto familiare, fam1 e fam2) durante la fase di familiarizzazione (A), il tempo speso ad esplorare l'oggetto familiare (fam) e quello nuovo durante la fase del test (B) e l'indice di discriminazione, calcolato come riportato nella sessione "materiali e metodi" (C). I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 9 animali per gruppo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs oggetto familiare; *** $p < 0.001$ vs veicolo/veicolo, ## $p < 0.01$ vs ND/veicolo (Student's t test, ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

Infine, la **Fig. 24** mostra gli effetti del trattamento con URB597 sul deficit nella memoria di riconoscimento indotto dall'esposizione adolescenziale con nandrolone decanoato. Nella fase di test tutti i gruppi di animali, ad eccezione di quelli pre-esposti allo steroide in adolescenza, sono in grado di discernere tra i due oggetti, spendendo un tempo maggiore nell'esplorazione del nuovo oggetto. Infatti l'analisi della varianza rivela un principale effetto del nandrolone decanoato e dell'URB597 (ND: $F_{1,36} = 13.93$, $p = 0.007$; URB: $F_{1,36} = 7.062$, $p = 0.0117$). Il trattamento cronico con URB597 riporta l'indice di discriminazione degli animali trattati con nandrolone decanoato ($p < 0.001$) ad un valore paragonabile a quello dei veicoli ($p < 0.01$). E' importante notare che a questa specifica tempistica l'URB597 di per sé non altera la memoria di riconoscimento degli animali.

5.1c Analisi comportamentale tre settimane dopo trattamento con URB597

La Fig. 25 mostra che, anche dopo tre settimane di trattamento, l'URB597 recupera completamente i comportamenti alterati dalla pre-esposizione a nandrolone decanoato in adolescenza nel test del nuoto forzato.

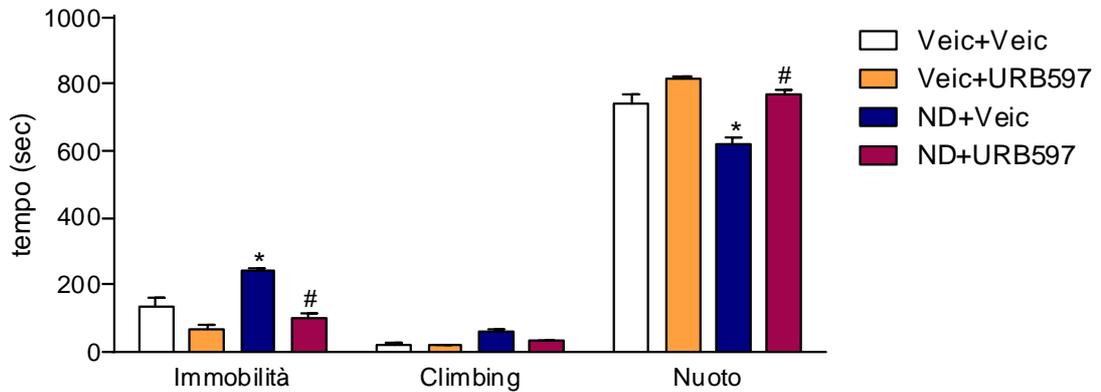


Fig. 25: Comportamento dei ratti pre-esposti o meno al nandrolone decanoato in adolescenza nel test del nuoto forzato dopo tre settimane di trattamento con URB597. I dati sono espressi come medie \pm SEM di almeno 6 animali per gruppo. * $p < 0.05$ vs veicolo/veicolo, # $p < 0.05$ vs ND/veicolo. (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

L'ANOVA a due vie mostra un principale effetto del nandrolone e dell'URB597, sui parametri di immobilità (ND: $F_{1,14}=4.468$, $p=0.05$; $F_{1,14}=9.763$, $p=0.0075$) e nuoto (ND: $F_{1,14}=4.671$, $p=0.0485$; $F_{1,14}=7.681$, $p=0.0015$) nel test del nuoto forzato. Si osserva infatti che, sia l'incremento del tempo di immobilità ($p < 0.05$) che il decremento del nuoto ($p < 0.05$) indotti vengono riportati a valori controllo dopo tre settimane di trattamento con URB597 (immobilità: $p < 0.05$, nuoto: $p < 0.05$).

5.1d Effetto anti-depressivo dell'URB597 dopo quattro settimane dalla sospensione del trattamento

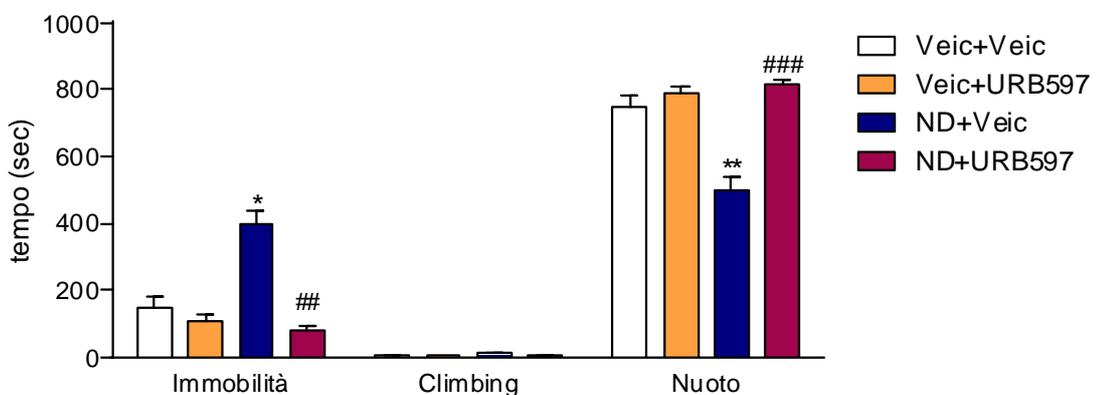


Fig. 26: Comportamento dei ratti pre-esposti o meno al nandrolone decanoato in adolescenza nel test del nuoto forzato dopo quattro settimane dalla sospensione del trattamento con URB597. I dati sono espressi come medie \pm SEM di almeno 6 animali per gruppo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs veicolo/veicolo, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs ND/veicolo. (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

In **Fig. 26** si osserva che sette settimane dopo la fine del trattamento con nandrolone decanoato, le alterazioni comportamentali nel test del nuoto forzato sono ancora presenti. È presente un principale effetto dei due trattamenti farmacologici e dell'interazione di essi come rivelato dall'ANOVA a due vie sui parametri di immobilità (ND: $F_{1,14}=7.152$, $p=0.0181$; URB: $F_{1,14}=12.41$, $p=0.0034$; NDxURB: $F_{1,14}=9.4$, $p=0.0084$) e nuoto (ND: $F_{1,14}=10.81$, $p=0.0054$; URB: $F_{1,14}=18.52$, $p=0.0007$; NDxURB: $F_{1,14}=13.94$, $p=0.0022$).

Infatti gli animali trattati con nandrolone decanoato mostrano un significativo incremento dell'immobilità ($p<0.05$) e un significativo decremento del nuoto ($p<0.01$). Inoltre, nonostante il trattamento con URB597 sia terminato da 4 settimane, è ancora presente il recupero sia del tempo di immobilità ($p<0.01$), che di nuoto ($p<0.001$) negli animali pre-esposti a nandrolone e poi trattati con il composto cannabinoide.

5.1e Riassunto analisi comportamentale

La **Tab. 2** riassume brevemente gli effetti del trattamento con URB597 sui comportamenti alterati dal trattamento con nandrolone in adolescenza. E' possibile osservare che già dopo una sola settimana di trattamento, l'URB597 recupera le alterazioni nella sfera emotiva, ma non il deficit cognitivo. A partire dalle due settimane di trattamento con URB597, tutti i comportamenti alterati dal nandrolone decanoato risultano essere recuperati.

	Dopo 1 settimana	Dopo 2 settimane	Dopo 3 settimane	A 4 settimane dalla sospensione
Test del nuoto forzato	↑ immobilità ↓ nuoto	↑ immobilità ↓ nuoto	↑ immobilità ↓ nuoto	↑ immobilità ↓ nuoto
Test di preferenza al saccarosio	-	↓ preferenza al saccarosio	-	-
Open Field	-	↓ numero di passaggi per il centro ↓ tempo speso nel centro	-	-
Elevated Plus Maze	-	↓ tempo speso nelle braccia aperte ↓ numero di entrate nelle braccia aperte	-	-
Test del riconoscimento del nuovo oggetto	↓ indice di discriminazione	↓ indice di discriminazione	-	-

Tab. 2 Riassunto dei dati relativi all'effetto del trattamento con URB597 sui comportamenti alterati dall'esposizione adolescenziale al nandrolone decanoato (ND) dopo 1, 2, 3 settimane di trattamento con URB597 o a 4 settimane dalla sua sospensione.

5.2 Analisi biochimica

Le analisi biochimiche sono state effettuate dopo due settimane di trattamento con URB597 e sono state mirate a valutare se questo trattamento fosse in grado di recuperare le alterazioni cellulari/molecolari indotte dall'esposizione adolescenziale al nandrolone precedentemente osservate.

5.2a Analisi dei livelli del fattore di trascrizione p-CREB e delle proteine ad esso correlate

La **Fig. 27A** mostra i livelli di CREB fosforilato nelle diverse aree cerebrali di ratti pre-esposti al nandrolone decanoato in adolescenza e poi trattati con URB597. L'ANOVA a due vie mostra un significativo effetto del nandrolone e dell'URB597 sui livelli di pCREB in diverse aree cerebrali. Nello specifico il nandrolone incrementa i livelli di pCREB nel nucleus accumbens (ND: $F_{1,15}=1,626$; $p=0,0230$), nell'amigdala (ND: $F_{1,15}=14,04$; $p=0,0026$) e nell'ippocampo dorsale (ND: $F_{1,15}=12,52$; $p=0,0036$), mentre il trattamento con URB597 recupera significativamente le alterazioni indotte dal nandrolone decanoato nel nucleus accumbens (URB: $F_{1,14}=13,36$; $p=0,0026$) e nell'ippocampo dorsale (URB: $F_{1,14}=12,86$; $p=0,0030$) ma non nell'amigdala (URB: $F_{1,13}=1,1771$ $p=0,6808$).

In **Fig. 27B**, si osservano i livelli di dinorfina A nel nucleus accumbens. L'analisi statistica rivela un effetto del solo nandrolone decanoato (ND: $F_{1,14}=8,764$, $p=0,0103$), infatti i livelli della proteina risultano drasticamente ridotti negli animali esposti allo steroide ($p<0,05$). Il trattamento con URB597 non è in grado di recuperare tale riduzione.

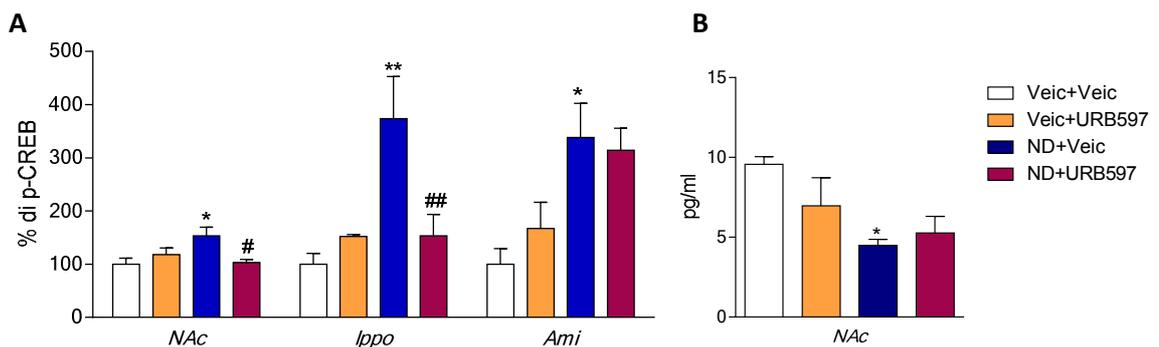


Fig. 27: Effetto di due settimane di trattamento con URB597 sulle alterazioni biochimiche indotte dall'esposizione adolescenziale al nandrolone decanoato (ND). Livelli di pCREB (A) nel Nucleus Accumbens (NAc) in Ippocampo (Ippo) e in Amigdala (Ami) e livelli di dinorfina A (B) nel Nucleus Accumbens (NAc). I livelli di pCREB sono stati calcolati tramite saggio ELISA e sono espressi come % verso il veicolo, mentre i livelli di dinorfina A sono stati ottenuti tramite dosaggio radioimmunologico e sono espressi in pmol/g. I dati sono riportati come media \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ vs veicolo/veicolo; # $p<0,05$, ### $p<0,01$ vs ND/veicolo (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

5.2b Analisi della proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo e del suo volume

Nella proliferazione cellulare del giro dentato, l'ANOVA a due vie evidenzia un effetto principale del nandrolone (ND: $F_{1,11}=25.10$, $p=0.0004$), dell'URB597 (URB597: $F_{1,11}=17.44$, $p=0.0015$). L'esposizione adolescenziale al nandrolone decanoato riduce la proliferazione cellulare nel giro dentato ($p<0.001$), effetto che non viene recuperato dal trattamento con URB597 (Fig. 28A). Inoltre, il trattamento con URB597 è in grado di ridurre di per sé la proliferazione cellulare ($p<0.001$).

Analogamente l'analisi della varianza applicata al volume ippocampale mostra un significativo effetto dei due trattamenti cronici (ND: $F_{1,10}=15.71$, $p=0.0027$; URB: $F_{1,10}=9.555$, $p=0.0114$). Gli animali trattati in adolescenza con nandrolone decanoato presentano un ridotto volume ippocampale ($p<0.05$) che non viene recuperato dal trattamento con URB597 che anzi induce di per sé una riduzione del volume ippocampale ($p<0.05$) (Fig. 28B).

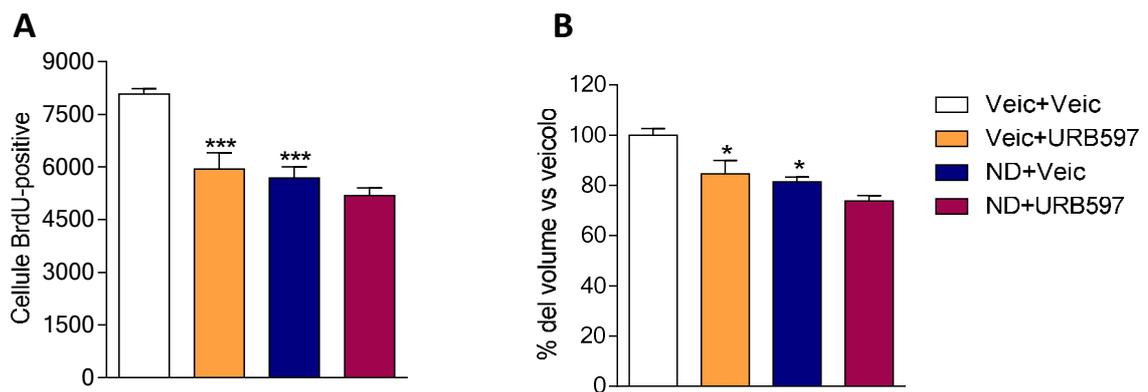


Fig. 28: Effetto di due settimane di trattamento con URB597 sulla proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo (A) e sul volume dell'ippocampo dorsale (B) in ratti pre-esposti a nandrolone decanoato in adolescenza. La proliferazione cellulare è espressa come numero di cellule BrdU-positive mentre il volume ippocampale come % rispetto al veicolo. I dati sono espressi come media di \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo. * $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs veicolo/veicolo (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

5.3 Analisi elettrofisiologica

L'ANOVA a due vie svela un principale effetto del nandrolone e dell'interazione NDxURB sull'attività dei neuroni serotonergici (ND: $F_{1,86}=6.937$, $p=0.01$; NDxURB: $F_{1,86}=4.86$, $p=0.0302$). Nello specifico, due settimane di trattamento con URB597 non solo non recuperano le alterazioni indotte dal nandrolone decanoato ($p<0.05$) in adolescenza, bensì riducono di per sé l'attività serotonergica ($p<0.05$). Al contrario, l'analisi della varianza dell'attività dei neuroni noradrenergici rivela un principale effetto del trattamento con URB597 e della sua interazione con lo steroide (URB: $F_{1,78}=7.232$,

$p=0.0427$; NDxURB: $F_{1,78}=4.174$, $p=0.0444$). il trattamento con URB597 ($p<0.05$) è in grado di riportare ai livelli basali l'aumento di attività dei neuroni noradrenergici registrata nel locus coeruleus dopo nandrolone ($p<0.05$) (Fig. 29B).

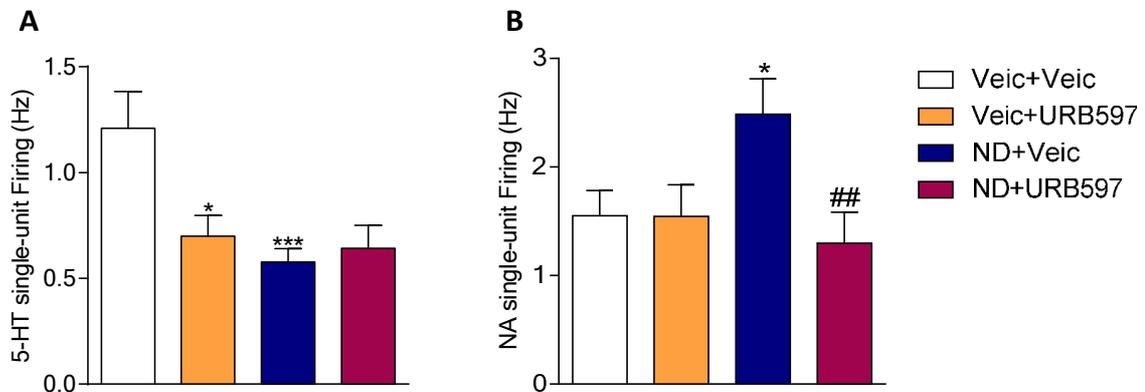


Fig. 29: Effetto di due settimane di trattamento con URB597 sull'attività dei neuroni serotonergici e noradrenergici in ratti adulti. La neurotrasmissione serotonergica nel nucleo dorsale del rafe è espressa come media del firing rate dei neuroni serotonergici (5-HT) (A) mentre la neurotrasmissione noradrenergica nel locus coeruleus è espressa come media del firing rate dei neuroni noradrenergici (NA) (B). I valori riportati sono medie \pm SEM ($n=19-29$ per group). * $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs veicolo/veicolo; ## $p<0.01$ vs ND/veicolo (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

6. Effetti del co-abuso nandrolone decanoato/THC in ratti maschi adolescenti

Poiché la *cannabis sativa* rappresenta la sostanza illecita più usata tra gli adolescenti, ultimo scopo della presente tesi è quello di valutare l'effetto di un co-abuso tra nandrolone e *cannabis*. I ratti maschi adolescenti sono stati co-trattati per 14 giorni con nandrolone decanoato e THC, il principale ingrediente psicoattivo presente nella *cannabis sativa*, e 24 ore dopo l'ultima somministrazione sono stati eseguiti gli screening comportamentali.

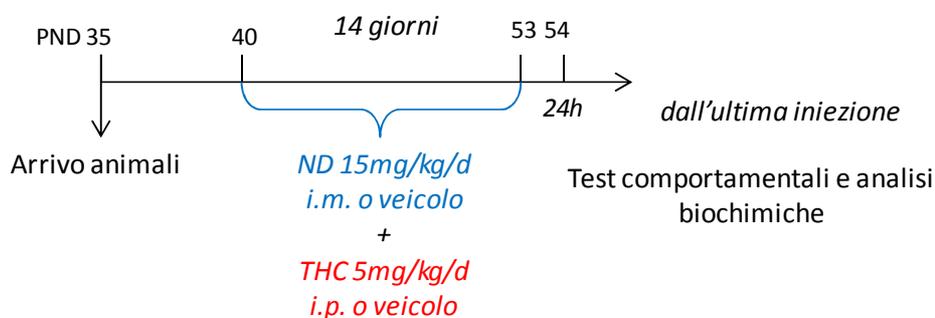


Fig H: Co-trattamento cronico nandrolone decanoato/THC in ratti maschi adolescenti: i ratti maschi adolescenti sono stati co-trattati con nandrolone decanoato alla dose di 15 mg/kg e THC alla dose di 5 mg/kg per 14 giorni consecutivi a partire dal quarantesimo giorno post natale. A 24 ore dalla sospensione del trattamento alcuni animali sono stati sottoposti a test comportamentali, altri destinati agli studi biochimici.

6.1 Analisi comportamentale

6.1a Effetti del co-trattamento ND/THC sul comportamento emotivo

La **Fig. 30** riporta il comportamento degli animali trattati con nandrolone decanoato, THC o entrambe le sostanze nella versione modificata del nuoto forzato. L'analisi delle varianze svela un effetto principale del nandrolone e del THC sul tempo di immobilità (ND: $F_{1,37}=14.09$, $p=0.0233$; THC: $F_{1,27}=11.11$, $p=0.0419$) un effetto principale del THC sul tempo di climbing (THC: $F_{1,27}=8.976$, $p=0.0058$) e un effetto dell'interazione ND/THC sul nuoto (NDxTHC: $F_{1,27}=13.29$, $p=0.0412$).

Nello specifico come già osservato, il trattamento con il solo nandrolone decanoato incrementa significativamente il tempo di immobilità ($p<0.05$) e decrementa significativamente il tempo di nuoto ($p<0.05$), inoltre, il trattamento con THC incrementa significativamente il climbing ($p<0.05$), mentre la co-esposizione a nandrolone decanoato e THC riporta i parametri di immobilità ($p<0.05$), climbing e nuoto ai valori controllo.

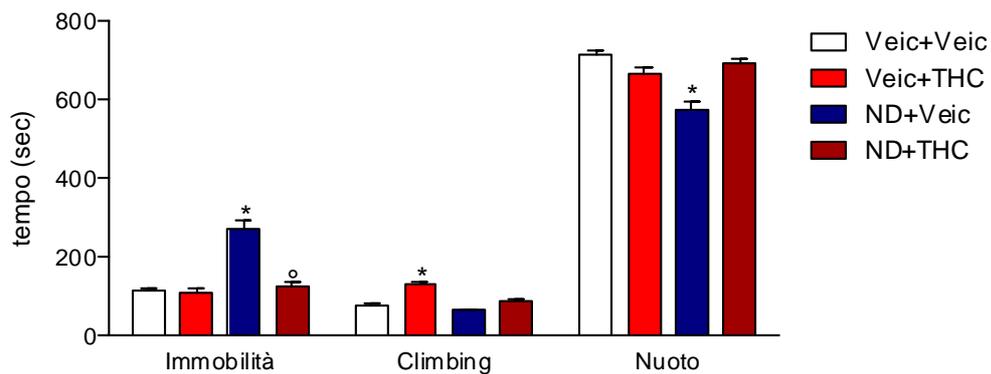


Fig. 30: Effetto del co-trattamento con nandrolone decanoato (ND) e THC sui parametri di immobilità, climbing e nuoto nella versione modificata del test del nuoto forzato, in ratti maschi adolescenti a 24 ore dalla fine del trattamento. I dati sono espressi come media di \pm SEM di almeno 7 animali per gruppo. * $p<0.05$ vs veicolo/veicolo; * $p<0.05$ vs ND/veicolo (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

Nel test dell'elevated plus maze (**Fig. 31**), l'ANOVA a due vie rivela solo un effetto principale dell'interazione tra le due sostanze nel numero di entrate nei bracci aperti (NDxTHC: $F_{1,27}=16.17$, $p=0.0248$). In particolare negli animali trattati con il solo nandrolone decanoato si osserva una riduzione statisticamente significativa nel numero di entrate nei bracci aperti ($p<0.05$; **Fig. 31B**), e solo una tendenza alla riduzione del tempo speso negli stessi bracci (**Fig. 31A**) mentre il co-trattamento con THC recupera questi parametri. La valutazione dei parametri etologici come head dips (HD), closed arms return (CAR) e stretched attend postures (SAP), non ha evidenziato alcuna alterazione nei quattro gruppi presi in esame (**Fig. 31C**). Inoltre come atteso, non sono state riscontrate alterazioni nel

tempo speso nei bracci chiusi e nel numero delle entrate in essi (**Fig. 31 A-B**), ad indicare chiaramente che non ci sono alterazioni nell'attività locomotoria degli animali.

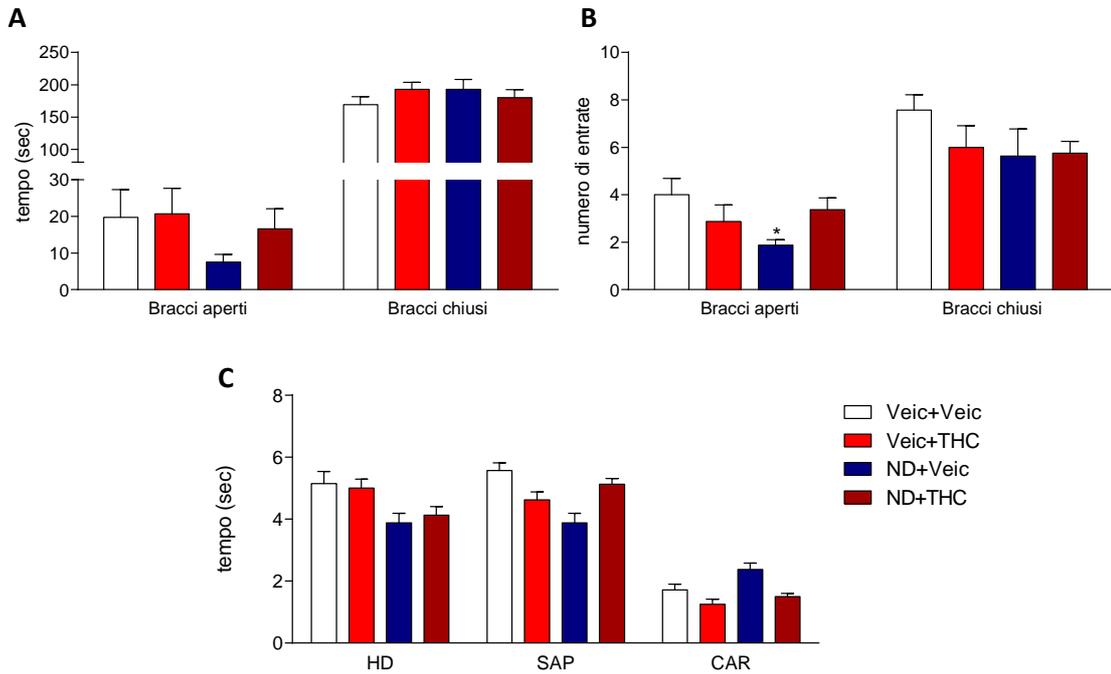


Fig. 31: Effetto del co-trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND)/THC in ratti maschi adolescenti sul comportamento ansioso a 24 ore dalla fine del trattamento con nandrolone. In figura vengono riportati i parametri registrati nell'elevated plus maze: il tempo speso (**A**) ed il numero di ingressi (**B**) rispettivamente nei bracci aperti e nei bracci chiusi ed i parametri etologici quali head dips (HD), stretched attent posture (SAP) e closed arms return (CAR) (**C**). I dati sono riportati come media di \pm SEM di almeno 7 animali per gruppo. * $p < 0.05$ vs veicolo+veicolo (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni).

6.2 Analisi biochimica

6.2a Effetti del co-trattamento ND/THC sulla proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo

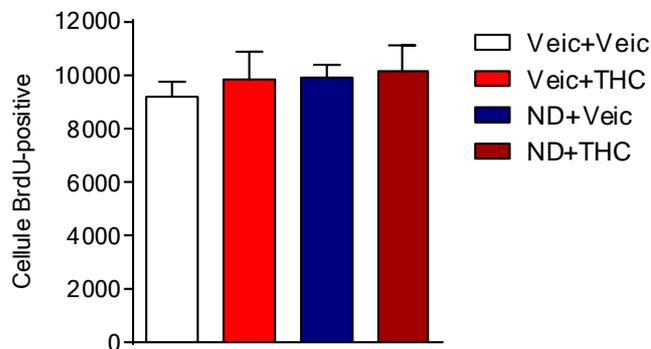


Fig. 32: Effetto del co-trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND)/THC in ratti maschi adolescenti sulla proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo. La proliferazione cellulare è espressa come numero di cellule BrdU-positive. I dati sono espressi come media di \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo.

Come è possibile osservare dalla **Fig. 32** non si evidenziano alterazioni significative della proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo a 24 ore dalla sospensione del trattamento con nandrolone decanoato e THC.

6.2b Effetti del co-trattamento ND/THC sull'espressione di pCREB

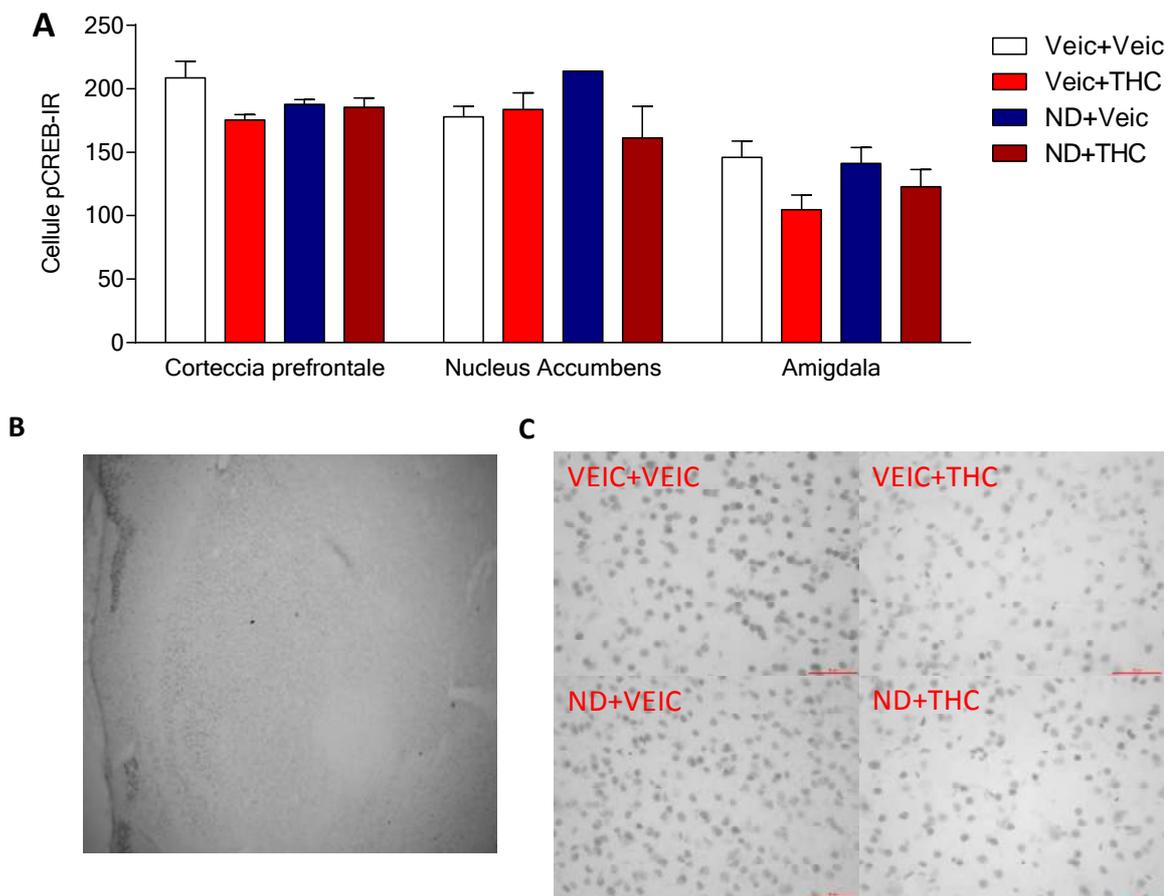


Fig. 33 Effetto del co-trattamento cronico con nandrolone decanoato (ND)/THC in ratti maschi adolescenti sulla espressione di pCREB. Il grafico riporta la conta delle cellule pCREM-immunoreattive nella corteccia prefrontale, nel nucleus accumbens nell'amigdala (**A**), esempi di cellule pCREB-IR nelle foto acquisite ad ingrandimenti rispettivamente di 4x (**B**) e di 20x (**C**) nel nucleus accumbens. I dati sono espressi come media di \pm SEM di almeno 4 animali per gruppo.

La **Fig. 33A** riporta la conta delle cellule pCREB immunoreattive in diverse aree cerebrali implicate nel comportamento emotivo. E' possibile osservare che non ci sono alterazioni significative nel numero di cellule pCREB-positive tra i vari gruppi considerati né in corteccia prefrontale, né nel nucleus accumbens, né in amigdala.

Immagine esemplificative dell'area del nucleus accumbens sono riportate in **Fig. 33B-C**.

DISCUSSIONE

Il trattamento cronico con nandrolone decanoato in adolescenza induce un complesso fenotipo simil-depressivo

I nostri risultati indicano chiaramente che l'esposizione adolescenziale al nandrolone decanoato induce un complesso fenotipo simil-depressivo nel periodo successivo alla sospensione del trattamento, che raggiunge la maggiore intensità 2 settimane dopo l'ultima somministrazione dello steroide ma perdura, seppur in forma più lieve per almeno 7 settimane. Questo fenotipo è caratterizzato a livello comportamentale, nel punto di maggiore intensità, da disperazione comportamentale, anedonia, ansia e deficit nella memoria di riconoscimento. Allo stesso intervallo di tempo, il quadro biochimico comprende alterazioni in specifici markers cellulari/molecolari dello stato simil-depressivo, quali alterazioni nei livelli di attivazione di CREB in ippocampo, nucleus accumbens ed amigdala, riduzione della proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo e riduzione del volume dell'ippocampo dorsale, nonché alterazioni nella neurotrasmissione serotoninergica e noradrenergica.

Il protocollo scelto per il trattamento dei ratti maschi Sprague-Dawley adolescenti (40 PND; nandrolone decanoato alla dose di 15 mg/kg per 14 giorni consecutivi) è ampiamente utilizzato in letteratura (Roszbach et al., 2007; Clark e Harrold, 1997; Harrison et al., 2000; McGinnis et al., 2002a,b; Melloni et al., 1997) in quanto mima le dosi abusate nell'uomo, che superano di 10-100 volte la dose terapeutica (Lindblom et al., 2003; Pope e Katz, 1994; Clark e Fast, 1996; Breuer et al., 2001). Per valutare l'insorgenza e la durata del fenotipo simil-depressivo dopo somministrazione cronica di nandrolone decanoato sono stati monitorati differenti parametri comportamentali correlabili a questo fenotipo a diverse tempi dalla sospensione del trattamento, quali 24 ore, 7, 14 e 21 giorni. I risultati ottenuti suggeriscono che i diversi segni comportamentali sono caratterizzati da una differente cinetica di comparsa. In particolare, l'assunzione di comportamenti passivi (immobilità) quando sottoposti ad una situazione di stress (il nuoto forzato), indice di disperazione comportamentale, è presente a tutti gli intervalli di tempo considerati, addirittura anche dopo 7 settimane dalla sospensione del trattamento, come indicato negli esperimenti di associazione con il composto URB597. Ad

oggi non si ritrovano riscontri in letteratura sulla presenza di comportamenti simil-depressivi in animali adolescenti trattati cronicamente con nandrolone. Solo due studi, condotti però in animali adulti, hanno analizzato gli effetti del nandrolone decanoato nel test del nuoto forzato e riportano risultati opposti. Nello studio di Ambar e Chiavegatto (2009) lo steroide mostra un effetto anti-depressivo in topi adulti, mentre nel lavoro di Matrisciano e colleghi (2010), il trattamento di 28 giorni consecutivi con 5 mg/kg di nandrolone decanoato determina la presenza di disperazione comportamentale. La notevole discrepanza tra i risultati potrebbe essere spiegata dal fatto che negli studi di Ambar e Chiavegatto gli animali esposti allo steroide mostrano un'attività locomotoria significativamente aumentata e ciò potrebbe aver influenzato il loro comportamento nel test del nuoto forzato. L'effetto pro-depressivo del trattamento cronico con nandrolone decanoato in ratti maschi adolescenti, sembra essere più intenso a 14 giorni dalla sospensione del trattamento. A questa tempistica compare anche l'anedonia, infatti gli animali trattati con nandrolone decanoato mostrano un ridotto intake di saccarosio rispetto agli animali veicolo. L'incapacità di essere gratificati o provare piacere da stimoli positivi viene considerato un tratto distintivo nonché un sintomo cardine della patologia depressiva (Anisman e Matheson, 2005), che riflette i cambiamenti nella motivazione e perciò anche i cambiamenti nella sensibilità del sistema dopaminergico implicato nella gratificazione (Nestler e Carlezon, 2006). Nonostante l'importanza di questo sintomo, nessuno studio presente in letteratura valuta l'anedonia indotta da SAA.

Poiché spesso l'ansia accompagna uno stato depressivo e depressione ed ansia non solo condividono molti aspetti ma hanno in comune anche numerosi fattori di rischio (Mineka et al., 1998), abbiamo monitorato anche il comportamento ansioso degli animali sottoposti al trattamento con nandrolone. I nostri dati dimostrano che l'esposizione adolescenziale allo steroide induce comportamenti ansiosi osservabili sia nel test dell'Open Field che nel test dell'Elevated Plus Maze. L'ansia compare a partire da 2 settimane dall'ultima somministrazione dello steroide ed è ancora presente a 3 settimane. La letteratura sull'ansia indotta dall'abuso di SAA è abbastanza contraddittoria. Studi condotti su animali adulti riportano sia la presenza di uno stato ansioso in animali trattati cronicamente con SAA (Minkin et al., 1993; Rocha et al., 2007; Ambar e Chiavegatto, 2009) che di una disinibizione comportamentale e quindi ansiolisi (Kouvelas et al., 2008). Quando invece gli studi vengono condotti su animali adolescenti,

sia di sesso femminile che maschile, tutti osservano la comparsa di comportamenti simil-ansiosi (Costine et al., 2010; Oberlander et al., 2012; Ricci et al., 2012). I nostri dati confermano ed espandono queste osservazioni, in quanto descrivono anche la durata dell'effetto ansiogeno indotto dal nandrolone.

Diversi lavori presenti in letteratura suggeriscono che il deficit cognitivo è parte integrante del fenotipo simil-depressivo ed anzi rappresenta uno dei sintomi caratterizzanti la depressione (Lapiz-Bluhm et al., 2008). Su questa base abbiamo monitorato la memoria di riconoscimento dopo trattamento cronico con nandrolone. L'esposizione allo steroide induce un deficit nella memoria di riconoscimento 7 e 14 giorni dopo la fine del trattamento, mentre non è più presente alla tempistica successiva (21 giorni). La presenza di deficit cognitivi in animali adulti esposti a SAA è riportata da tutti gli studi che hanno monitorato apprendimento e memoria. Ampiamente dimostrata è la presenza di un deficit nella memoria spaziale valutata attraverso il test del Morris Water Maze e nella memoria sociale (Magnusson et al., 2009; Kouvelas et al., 2008). Un recente lavoro mostra inoltre che infusioni bilaterali di testosterone direttamente nell'ippocampo di ratti maschi inducono danni nell'apprendimento spaziale durante la fase di acquisizione del test del Morris Water Maze (Khorshidahmad et al., 2012). Nel nostro studio abbiamo esteso queste osservazioni anche ad un altro tipo di memoria, la memoria di riconoscimento, suggerendo così la presenza di un più ampio spettro di deficit cognitivi dopo abuso di SAA e nandrolone decanoato in particolare.

L'insieme di questi dati suggerisce quindi la presenza di un complesso quadro simildepressivo in animali adolescenti esposti a nandrolone decanoato. Questo quadro compare immediatamente dopo la sospensione del trattamento, si intensifica a due settimane per poi ridursi di intensità alle tempistiche successive, senza mai scomparire del tutto. È interessante notare che quando lo stesso schema di trattamento è stato eseguito negli animali adulti, non siamo riusciti ad evidenziare alcuna interferenza con il comportamento emozionale. Questo suggerisce la specifica vulnerabilità del cervello adolescente agli effetti del nandrolone decanoato, confermando l'evidenza che l'adolescenza rappresenta un periodo critico per l'abuso di sostanze illecite e l'emergenza di disordini psichiatrici (Paus et al., 2008).

Per comprendere le possibili basi cellulari/molecolari che sottendono al fenotipo simildepressivo osservato negli animali adolescenti dopo trattamento cronico con

nandrolone decanoato, abbiamo condotti saggi biochimici volti a valutare la presenza di alcuni eventi marker dello stato simildepressivo. In particolare ci siamo focalizzati sui livelli di CREB attivato e di due proteine da esso regolate (il peptide oppioide dinorfina A ed il fattore neurotrofico cerebrale BDNF) in specifiche aree cerebrali notoriamente coinvolte nella modulazione degli stati emozionali, quali la corteccia prefrontale, il nucleus accumbens, l'amigdala e l'ippocampo. Abbiamo poi monitorato la proliferazione cellulare nel giro dentato dell'ippocampo ed il volume ippocampale, nonché la trasmissione serotoninergica e noradrenergica.

CREB è un fattore trascrizionale la cui attivazione tramite fosforilazione stimola la trascrizione di geni bersaglio, essenziali per l'espletamento dei più sofisticati processi biologici (Mayr et al., 2001). Numerosi studi dimostrano che gli stati depressivi sono caratterizzati da significative alterazioni di CREB in specifiche aree cerebrali e che queste alterazioni sono associate ad alterata espressione di proteine la cui sintesi è regolata da questo fattore di trascrizione (McClung et al., 2003). Diverse evidenze suggeriscono che un incremento nei livelli di CREB fosforilato (pCREB) possa portare a sintomi simil-depressivi o ad effetti antidepressivi a seconda della regione cerebrale considerata. I geni trascritti da questo fattore di trascrizione possono infatti differire da area ad area e portare ad effetti diversi (Cha-Molstad et al., 2004). Nel nostro modello abbiamo riscontrato un aumento significativo della frazione attiva di CREB a seguito dell'esposizione al nandrolone decanoato nel nucleus accumbens, nell'amigdala e nell'ippocampo ma non in corteccia prefrontale.

Numerosi studi supportano l'ipotesi che un'elevata attivazione di CREB nel nucleus accumbens possa essere responsabile della comparsa di effetti simildepressivi negli animali. E' stato dimostrato infatti come nei ratti l'overespressione e l'incrementata attivazione del fattore di trascrizione in quest'area siano correlate ad effetti anedonici e a disperazione comportamentale (Chartoff et al., 2009; Pliakas et al., 2001; Barrot et al. 2002; McClung et al., 2003; Newton et al., 2002). In particolare, gli studi pionieristici di Pliakas e collaboratori nel 2001 basati sull'overespressione di CREB nel nucleus accumbens di ratti adulti ottenuta mediante l'iniezione di vettori virali, evidenziano un forte incremento del tempo speso in immobilità nel test del nuoto forzato (Pliakas et al., 2001). In linea con questi risultati, linee di topi transgenici che overesprimono CREB nel nucleus accumbens mostrano effetti simil-depressivi, mentre l'espressione di una forma

di CREB mutato nella stessa area cerebrale porta invece ad evidenti effetti antidepressivi (Newton et al., 2002). La presenza quindi nel nostro studio di incrementi di CREB attivato nel nucleus accumbens dei ratti esposti cronicamente al nandrolone decanoato sembra accordarsi perfettamente con la presenza del fenotipo simil-depressivo da noi evidenziata. Sorprendentemente, però, tali incrementi non si associano con una incrementata produzione di dinorfina A, come invece ritrovato nei lavori precedentemente citati (Pliakas et al., 2001; Newton et al., 2002), ma ad una sua significativa riduzione. Ulteriori studi saranno quindi necessari per chiarire quali siano i geni bersaglio dell'incrementata attivazione di CREB a livello del nucleus accumbens. In linea con quanto da noi osservato, la somministrazione cronica di nandrolone decanoato riduce la densità del recettore k degli oppioidi, target della dinorfina (Magnusson et al. 2009), e induce un incremento nell'attività dell'enzima degradativo della dinorfina (Magnusson et al. 2006). In generale, i nostri dati e quelli presenti in letteratura sembrano indicare la presenza di un ipotono dinorfinergico nel nucleus accumbens dopo trattamento cronico con nandrolone.

I nostri risultati mostrano inoltre un significativo incremento di pCREB nell'amigdala, un'area cerebrale molto importante per il controllo delle emozioni e sembrano essere in accordo con la letteratura. Infatti diversi studi condotti in modelli animali supportano un'associazione tra una maggiore attività di CREB in quest'area ed effetti simil-depressivi (Pliakas et al., 2001; Wallace et al., 2004). Inoltre la sovraespressione di CREB nell'amigdala basolaterale induce un significativo effetto ansiogenico osservato sia nel test dell'open field che nell'elevated plus maze (Wallace et al., 2004), effetto presente anche nei nostri animali.

Il trattamento cronico con nandrolone decanoato in adolescenza induce, infine, un significativo incremento di CREB attivato nell'ippocampo, un'area del cervello coinvolta nel controllo delle emozioni ed implicata nei processi di memoria ed apprendimento (Nibuya et al., 1996; Thome et al., 2000). Questo risultato sembra in contrasto con la letteratura, che riporta invece incrementi dei livelli di pCREB dopo trattamento con farmaci antidepressivi. Recentemente, però, il gruppo di lavoro di Julie Blendy ha dimostrato che la selettiva delezione di CREB nell'ippocampo risultava in una accelerata risposta agli antidepressivi ed incrementava la neurogenesi (Gundersen et al., 2013). Questo ci potrebbe far ipotizzare che, almeno in alcune condizioni, l'attivazione di CREB

nell'ippocampo possa non essere coinvolta nel determinare o meno un comportamento simil-depressivo. In accordo con questa ipotesi, potremmo associare l'incrementata attività di CREB con il deficit cognitivo osservato dopo nandrolone cronico. Infatti recentemente Gruart e colleghi (Gruart et al., 2012) hanno dimostrato che la persistente attivazione di CREB nell'ippocampo porta a deficit di memoria nel test di condizionamento del "battito dell'occhio" (eyeblink). Analogamente Viosca e colleghi (2009) hanno riportato che l'incremento cronico di CREB attivato nell'ippocampo porta a dei deficit nella memoria spaziale, suggerendo quindi una relazione a U invertita tra questo tipo di memoria e la plasticità mediata da CREB.

Nelle nostre condizioni sperimentali non abbiamo osservato alcuna alterazione nei livelli di BDNF nelle aree cerebrali esaminate. BDNF fa parte della famiglia delle neurotrofine, proteine che promuovono la sopravvivenza, lo sviluppo e la funzionalità dei neuroni (Hyman et al., 1991). Diverse evidenze mostrano che la depressione negli uomini, così come lo stress cronico nei roditori, sono associati ad una riduzione dei livelli di BDNF a livello dell'ippocampo e della corteccia prefrontale, e che questi sono recuperati da un trattamento con antidepressivi (Duman et al., 1997; Krishnan et al., 2008). Inoltre, incrementi nei livelli di BDNF nell'ippocampo di roditori producono effetti antidepressivi (Shirayama et al., 2002). I nostri risultati sembrano in contrasto con la letteratura, va però sottolineato che in alcuni studi non sembra esistere un'associazione tra alterazioni nei livelli della neurotrofina e depressione. Ad esempio, difetti genetici nella secrezione di BDNF non sembrano incrementare la vulnerabilità alla depressione (Lopez-Leon et al., 2008; Gratacos et al., 2008). Possiamo quindi supporre che nel fenotipo simil-depressivo indotto dal nandrolone decanoato il BDNF non giochi un ruolo importante, almeno nell'intervallo di tempo da noi utilizzato per gli studi biochimici (14 giorni dopo la fine del trattamento). Matrisciano e collaboratori (2010) riportano invece un'associazione tra sintomi simil-depressivi e decremento nei livelli di BDNF nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale di ratti maschi trattati con nandrolone (5 mg/kg). In questo caso, però, gli studi sono stati condotti in ratti adulti e immediatamente dopo la sospensione del trattamento con lo steroide.

Poiché la diminuzione della proliferazione cellulare a livello del giro dentato dell'ippocampo è una importante caratteristica biochimica che si accompagna ai modelli sperimentali di depressione, siamo andati a studiare tale evento dopo trattamento

cronico con nandrolone. I nostri dati indicano la presenza di una riduzione della proliferazione cellulare a seguito del trattamento con lo steroide e ben si accordano quindi con quanto riportato in letteratura. Numerosi sono infatti i lavori che dimostrano una correlazione tra comportamenti simil-depressivi e riduzione del numero di cellule proliferanti nel giro dentato (DG) dell'ippocampo (Lau et al., 2011; Baek et al., 2011; Lagunas et al., 2010). Così come la proliferazione cellulare nel DG dell'ippocampo, il volume dell'ippocampo dorsale risulta ridotto negli animali trattati con nandrolone. Questo decremento potrebbe dipendere dalla significativa diminuzione delle cellule proliferanti nell'ippocampo. È ormai ben nota la presenza di una riduzione del volume dell'ippocampo sia nei pazienti depressi, come evidenziato dagli studi di risonanza magnetica (Frodl et al., 2008; Campbell et al., 2004) che nei modelli animali di depressione (Realini et al., 2011; Blugeot et al., 2011).

Infine poiché i sistemi serotonergico e noradrenergico sono coinvolti nella patofisiologia degli stati simil-depressivi (Belmaker e Agam, 2008) abbiamo condotto studi di elettrofisiologia per evidenziare la presenza di alterazioni nella loro attività dopo trattamento cronico con nandrolone. Il nandrolone riduce significativamente il firing rate dei neuroni serotonergici nel nucleo dorsale del rafe. Questo evento è stato osservato in animali sottoposti a CUS (chronic unpredictable stress), un paradigma che induce uno stato simil-depressivo negli animali (Bambico et al., 2009), così come in diversi modelli knockout che mostrano comportamenti simil-depressivi (Dominguez-Lopez et al., 2012). La riduzione della neurotrasmissione serotonergica potrebbe essere in relazione con la riduzione del tempo di nuoto osservato nel test del nuoto forzato, così come suggerito da Detke e collaboratori (1995). In accordo con i nostri risultati, studi condotti in criceti maschi adolescenti esposti al nandrolone hanno mostrato una significativa riduzione delle innervazioni serotonergiche afferenti (Grimes e Melloni, 2002) ed alterazioni nei livelli dell'mRNA del recettore 5HT1B nel sistema nervoso centrale (Grimes e Melloni, 2005). Inoltre nelle proiezioni del nucleo dorsale del rafe, l'espressione dell'mRNA del recettore 5-HT1A è down regolata (Ambar e Chiavegatto, 2009; Ricci et al., 2006), ed è stata implicata direttamente nella patofisiologia della depressione e dell'ansia (Savitz et al., 2009).

Infine, il trattamento cronico con nandrolone decanoato in adolescenza incrementa significativamente l'attività del sistema noradrenergico. Pochi sono i lavori presenti in

letteratura che si sono interessati di esplorare il legame presente tra funzionalità della trasmissione noradrenergica e somministrazione di nandrolone. Lindqvist e collaboratori (2002) non evidenziano alterazioni nei livelli extracellulari di noradrenalina in diverse aree cerebrali a seguito di un trattamento cronico con nandrolone decanoato in ratti maschi adulti. Probabilmente questa discrepanza con il nostro studio è ascrivibile alla diversa età degli animali utilizzati. E' noto che in condizioni di stress ed ansia viene stimolata la produzione di corticosteroidi che possono incrementare l'attività noradrenergica nel locus coeruleus (Chen e Herbert, 1995) ed il rilascio di noradrenalina (Finlay et al., 1997). Nelle nostre condizioni sperimentali, quindi, la presenza di ansia negli animali potrebbe aver determinato l'incremento del firing noradrenergico.

E' interessante sottolineare che il nandrolone decanoato produce alterazioni comportamentali e cambiamenti nel firing delle monoamine simili a quelle osservate a seguito dell'esposizione adolescenziale ad altre sostanze d'abuso quali i cannabinoidi (Rubino et al., 2008, Bambico et al. 2010). Questa osservazione potrebbe quindi suggerire che l'utilizzo di alcune sostanze d'abuso in adolescenza possa portare ad effetti comuni sul comportamento e sulla neurotrasmissione monoaminergica.

Nel loro insieme questi risultati suggeriscono che solo il trattamento cronico con nandrolone in adolescenza induce un complesso fenotipo simil-depressivo caratterizzato a livello biochimico dalla presenza di alcuni eventi notoriamente coinvolti nella eziopatogenesi della depressione, come alterazioni di volume e proliferazione cellulare a livello ippocampale, ridotta trasmissione serotoninergica ed incrementati livelli di CREB attivato nel nucleus accumbens. Non sono però presenti in questo fenotipo altri eventi cellulari/molecolari associati alla depressione, come ad esempio riduzione nei livelli di BDNF in specifiche aree cerebrali ed incrementi di dinorfina A nel nucleus accumbens. Questo quadro risulta quindi specifico per il nandrolone.

Effetto del trattamento cronico con nandrolone decanoato sul sistema degli endocannabinoidi

Il secondo scopo della presente tesi è stato quello di valutare la presenza di un coinvolgimento del sistema degli endocannabinoidi nel fenotipo simil-depressivo indotto dal trattamento adolescenziale con nandrolone decanoato. Specificatamente abbiamo valutato possibili alterazioni nella densità e funzionalità del recettore CB1. A 24 ore dalla

fine del trattamento è stata riscontrata una riduzione dei siti di binding per il recettore CB1 nell'area tegmentale ventrale (VTA) e nel cervelletto, ed una riduzione della sua funzionalità nel nucleus accumbens (NAc) e nel cervelletto. Aree quali VTA e NAc appartengono al circuito coinvolto nei processi emozionali e di ricompensa, e sono inoltre regioni cerebrali strettamente legate alla depressione (Nestler e Carlezon, 2006). Il cervelletto, comunemente associato all'apprendimento ed al controllo motorio, sembra avere un ruolo anche nei processi cognitivi e nel controllo emozionale (Schmahmann e Caplan, 2006). Ad oggi in letteratura non sono presenti studi che valutano una relazione tra il sistema endocannabinoide e l'abuso di SAA ad eccezione del lavoro di Celerier e collaboratori (2006). In questo lavoro gli autori hanno investigato la densità e la funzionalità del recettore CB1 limitatamente al cervelletto e al caudato e putamen. I dati riportati non mostrano alcuna alterazione nei due parametri dopo trattamento cronico con nandrolone. Questa discrepanza potrebbe risiedere nel fatto che, seppur utilizzando lo stesso paradigma sperimentale, sono stati utilizzati topi e non ratti.

Inoltre, quando il trattamento viene eseguito in età adulta, non si riscontrano alterazioni nella funzionalità del recettore CB1 in nessuna delle aree analizzate, mentre è presente una lieve, seppur significativa riduzione della densità nella VTA e nell'amigdala.

Ancora una volta, quindi, è presente un quadro differente dopo trattamento in adolescenza o età adulta, con un effetto più intenso in adolescenza, a suggerire quindi una maggiore vulnerabilità del cervello più giovane.

Il trattamento con URB597 recupera il fenotipo simil-depressivo indotto dall'esposizione cronica a nandrolone decanoato in adolescenza

Poiché il fenotipo simil-depressivo indotto dal trattamento cronico con nandrolone in adolescenza era caratterizzato da un ipotono del sistema endocannabinoide, abbiamo voluto valutare se correggendo questa alterazione fosse possibile recuperare il fenotipo stesso. A tale scopo, alla fine del trattamento con lo steroide, abbiamo trattati gli animali con URB597, un inibitore selettivo dell'enzima degradativo dell'anandamide, alla dose di 0.3 mg/kg, per tre settimane. La dose è stata scelta in base a studi presenti in letteratura che dimostravano proprietà antidepressive dell'URB597 (Gobbi et al., 2005; Bortolato et al., 2007; Realini et al., 2011). Dopo una settimana di trattamento con il composto cannabinoide siamo andati a valutare i parametri comportamentali, gli aspetti biochimici

ed elettrofisiologici precedentemente alterati dal trattamento con nandrolone decanoato.

In generale, il trattamento cronico con URB597 è stato in grado di recuperare quasi totalmente le alterazioni comportamentali indotte dall'esposizione a nandrolone decanoato ma solo parzialmente i cambiamenti biochimici e le alterazioni elettrofisiologiche.

In particolare, già dopo una sola settimana di trattamento con URB597 si ha il recupero dell'immobilità nel test del nuoto forzato. Questo effetto è osservabile anche dopo due e tre settimane di trattamento con URB597. Inoltre, è molto interessante notare che tale recupero è ancora presente anche dopo 4 settimane dalla sospensione del trattamento con l'inibitore selettivo. Inoltre dopo due settimane di trattamento con URB597, l'indice di preferenza al saccarosio, ridotto negli animali pre-esposti a nandrolone decanoato in adolescenza, risulta paragonabile a quello degli animali controllo. Ciò dimostra che la modulazione del sistema endocannabinoide attraverso l'URB597 recupera anche l'anedonia, un altro evento fondamentale presente nel fenotipo simil-depressivo indotto dal nandrolone. Il trattamento con URB597 è anche in grado di recuperare tutti i comportamenti simil-ansiosi indotti dall'esposizione al nandrolone decanoato in adolescenza. Nello specifico, l'URB597 riporta ai valori di controllo sia il tempo trascorso ed il numero dei passaggi nel centro dell'arena dell'open field, che il tempo speso ed il numero di entrate nei bracci aperti nell'elevated plus maze. In entrambi i test gli animali trattati con URB597 non hanno mostrato alterazioni dell'attività locomotoria, a conferma che l'effetto osservato è ascrivibile ad un cambio nella risposta emozionale. Infine, il deficit cognitivo indotto dal nandrolone decanoato non viene recuperato dopo solo una settimana di trattamento con URB597, bensì dopo due settimane. Inoltre, dopo una settimana, non solo non si assiste al recupero del deficit nella memoria di riconoscimento indotto dall'esposizione al nandrolone decanoato in adolescenza, ma si osserva che l'URB597 di per sé induce un deficit cognitivo. In letteratura i dati relativi ad un incremento del tono degli endocannabinoidi ed apprendimento/memoria sono contrastanti. La somministrazione di anandamide sembra indurre un deficit della memoria di lavoro (Mallet e Beninger, 1998) e nella fase di consolidamento nel test della passive avoidance (Costanzi et al., 2004). Al contrario, topi knock-out per la FAAH mostrano performance migliori in una versione modificata del Morris Water Maze (Varvel

et al., 2006, 2007), e l'utilizzo di URB597 migliora la fase di acquisizione nella passive avoidance (Mazzola et al., 2009). Nelle nostre condizioni sperimentali è possibile ipotizzare che un trattamento breve con URB597 induce uno sbilanciamento del sistema endocannabinoide che induce un deficit cognitivo, sbilanciamento che però si riequilibra dopo due settimane di trattamento, almeno per ciò che concerne la memoria di riconoscimento.

Nel complesso il blocco dell'inibizione della degradazione dell'anandamide tramite somministrazione di URB597 determina il recupero del fenotipo simil-depressivo indotto dal nandrolone. L'URB597 sembra quindi essere un composto particolarmente interessante dal punto di vista delle possibili applicazioni terapeutiche perché pur agendo come un agonista indiretto del recettore CB1 non evoca i classici effetti psicotropi dei cannabinoidi come catalessia, ipotermia e iperfagia, anche se iniettato a dosi che inibiscono completamente l'attività della FAAH (Kathuria et al., 2003). Inoltre l'URB597 non sembra indurre dipendenza, infatti non provoca "place preference" nel conditioned place preference test (Scherma et al., 2008; Gobbi et al., 2005; Piomelli et al., 2006). Diversi lavori presenti in letteratura depongono a favore dell'effetto antidepressivo dell'URB597 sia dopo trattamento acuto che cronico (Gobbi et al., 2005; Hill et al., 2007; McLaughlin et al., 2007; Bortolato et al., 2007; Realini et al., 2011). I nostri risultati confermano queste osservazioni ottenute in classici modelli di depressione, e le estendono anche alla depressione indotta da abuso di SAA in adolescenza. Per la prima volta, inoltre, si evidenzia che l'effetto di recupero dell'URB597 è duraturo, mantenendosi ben oltre la sospensione del trattamento.

L'analisi biochimica effettuata dopo due settimane di trattamento con URB597 rivela che l'inibitore selettivo della FAAH riporta ai valori controllo l'incremento della frazione attivata di CREB nel nucleus accumbens e nell'ippocampo, ma non nell'amigdala, e non recupera la riduzione nei livelli di dinorfina A osservata nel nucleus accumbens. Il trattamento con URB597 non è neanche in grado di recuperare la ridotta proliferazione cellulare indotta dal nandrolone nel giro dentato dell'ippocampo così come il ridotto volume ippocampale. È interessante notare che l'URB597 di per sé ha un effetto su questi ultimi due parametri molto simile a quello indotto dal nandrolone. Allo stesso modo, il composto URB597 non recupera il decremento dell'attività dei neuroni serotoninergici indotto dal nandrolone, ma anzi la riduce di per sé. Al contrario, è in grado

di riportare ai livelli controllo l'incremento dell'attività dei neuroni noradrenergici indotto dallo steroide. Il quadro cellulare/molecolare indotto dal trattamento cronico con URB597 è abbastanza peculiare. Nonostante il totale recupero del quadro comportamentale assimilabile ad un fenotipo simil-depressivo, il quadro delle alterazioni biochimiche è solo parzialmente recuperato. Questo può far supporre che alcuni eventi giochino un ruolo più importante di altri nello sviluppo di tale fenotipo. In particolare il recupero dell'incrementata attività di CREB nell'ippocampo e nel nucleus accumbens, così come dell'aumentata attività noradrenergica sembrano essere stati determinanti nel riportare a controllo i comportamenti simil-depressivi indotti dal nandrolone.

In generale, la manipolazione del sistema endocannabinoide rappresenterebbe un utile target terapeutico per il recupero della sindrome pro-depressiva che si sviluppa durante il periodo di withdrawal del trattamento con steroidi androgeni anabolizzanti in adolescenza.

Il co-trattamento con nandrolone decanoato e THC previene la comparsa del fenotipo simil-depressivo indotto dal nandrolone decanoato.

Poiché la *Cannabis* è la sostanza illegale più abusata dagli adolescenti, è possibile che ci sia un concomitante uso di steroidi androgeni anabolizzanti e *Cannabis*. Per indagare questa relazione, abbiamo eseguito un co-trattamento con nandrolone e THC per 14 giorni negli animali adolescenti e 24 ore dopo l'ultima somministrazione abbiamo condotto i test comportamentali.

Nel test del nuoto forzato, la co-somministrazione nandrolone-THC previene la comparsa di disperazione comportamentale osservata con il solo nandrolone. Lo stesso quadro si ripresenta nel test dell'elevated plus maze. Gli animali trattati con nandrolone decanoato presentano un ridotto tempo e numero di ingressi nei bracci aperti, mentre la co-assunzione delle due sostanze previene la comparsa degli effetti deleteri del nandrolone sul comportamento ansioso.

Questo quadro sembra rafforzare l'ipotesi che la stimolazione del sistema endocannabinoide possa in qualche modo contrastare la comparsa di effetti avversi del nandrolone sul comportamento emotivo degli animali. Non esistono ad oggi in letteratura lavori in cui viene valutato l'effetto di una co-somministrazione tra steroidi e cannabinoidi sul comportamento emotivo.

Diversamente da quanto atteso, le analisi biochimiche non registrano alterazioni significative né nella proliferazione cellulare del giro dentato, né nell'analisi delle cellule pCREB immunoreattive in diverse aree cerebrali. Si osserva però la presenza di una tendenza di incremento nel numero delle cellule pCREB immunoreattive nel nucleus accumbens negli animali trattati cronicamente con nandrolone decanoato, ma non in quelli co-somministrati. Questo risultato sembrerebbe confermare ulteriormente l'importanza delle alterazioni nei livelli di CREB attivato presenti nel nucleus accumbens nell'insorgenza del fenotipo simil-depressivo indotto dal nandrolone.

CONCLUSIONI

Le conclusioni che possiamo trarre dal presente lavoro di tesi sono le seguenti:

- 1. Il trattamento cronico con nandrolone decanoato induce un complesso fenotipo simil-depressivo in ratti maschi adolescenti caratterizzato da alterazioni comportamentali, biochimiche ed elettrofisiologiche.*
- 2. Il sistema endocannabinoide è coinvolto in questo fenotipo simil-depressivo indotto dal nandrolone decanoato.*
- 3. Lo stesso schema sperimentale proposto in ratti maschi adulti non porta ad alterazioni comportamentali sottolineando che gli animali adolescenti sono più sensibili agli effetti negativi dello steroide.*
- 4. Il fenotipo simil-depressivo indotto dall'esposizione a nandrolone decanoato in adolescenza viene recuperato totalmente da un punto di vista comportamentale dal trattamento cronico con URB597, ma solo parzialmente per quanto riguarda il profilo biochimico ed elettrofisiologico.*
- 5. La somministrazione di THC in concomitanza con nandrolone decanoato previene le alterazioni nel comportamento emotivo nei ratti maschi adolescenti.*
- 6. L'insieme dei dati suggerisce quindi che la manipolazione del sistema endocannabinoide potrebbe modulare gli effetti avversi indotti dagli steroidi sul comportamento emotivo.*

BIBLIOGRAFIA

- Achar S, Rostamian A, Narayan SM. Cardiac and metabolic effects of anabolic-androgenic steroid abuse on lipids, blood pressure, left ventricular dimensions, and rhythm. *Am J Cardiol.* 2010; 106: 893-901.
- Ambar G, Chiavegatto S. Anabolic-androgenic steroid treatment induces behavioral disinhibition and downregulation of serotonin receptor messenger RNA in the prefrontal cortex and amygdala of male mice. *Genes Brain Behav.* 2008; 8: 161-173.
- Amery A. The effect of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* 1998; 58: 315-348.
- Anisman H and Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005; 29: 525-546.
- Aso E, Ozaita A, Valdizán EM, Ledent C, Pazos A, Maldonado R, Valverde O. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J Neurochem.* 2008; 105: 565-572.
- Azen EA, Shahidi NT. Androgen dependency in acquired aplastic anemia. *Am J Med.* 1977; 63: 320-324.
- Baek SB, Bahn G, Moon SJ, Lee J, Kim KH, Ko IG, Kim SE, Sung YH, Kim BK, Kim TS, Kim CJ, Shin MS. The phosphodiesterase type-5 inhibitor, tadalafil, improves depressive symptoms, ameliorates memory impairment, as well as suppresses apoptosis and enhances cell proliferation in the hippocampus of maternal-separated rat pups. *Neurosci Lett.* 2011; 488:26-30.
- Bambico FR, Nguyen NT, Gobbi G. Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors after chronic unpredictable stress. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2009; 19:215-228.
- Bambico FR, Nguyen NT, Katz N, Gobbi G. Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission. *Neurobiol Dis.* 2010; 37:641-655.
- Bambico FR, Katz N, Debonnel G, Gobbi G. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2007; 27: 11700-11711.
- Baraban JM, Aghajanian GK. Suppression of serotonergic neuronal firing by alpha-adrenoceptor antagonists: Evidence against GABA mediation. *Eur J Pharmacol.* 1980; 66:287-294.
- Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, Storm DR, Neve RL, Yin JC, Zachariou V, Nestler EJ. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:11435-11440.

- Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 5108-5117.
- Beaver KM. Nonshared environmental influences on adolescent delinquent involvement and adult criminal behavior. *Criminology.* 2008. 46: 341-370.
- Belmaker RH, Agam G, Bersudsky Y. Role of GSK3beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105.
- Beyer CE, Dwyer JM, Piesla MJ, Platt BJ, Shen R, Rahman Z, Chan K, Manners MT, Samad TA, Kennedy JD, Bingham B, Whiteside GT. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiol Dis.* 2010; 39: 148-155.
- Bhasin S, Storer TW, Javanbakht M, Berman N, Yarasheski KE, Phillips J, Dike M, Sinha-Hikim I, Shen R, Hays RD, Beall G. Testosterone replacement and resistance exercise in HIV-infected men with weight loss and low testosterone levels. *JAMA.* 2000; 283: 763-70.
- Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B, Bernard C, Benoliel JJ, Becker C. Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *J Neurosci.* 2011; 31: 12889-12899.
- Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry.* 2007; 62: 1103-1110.
- Bracey MH, Hauson MA, Masuda KR, Stevens RC, Benjamin F, Cravatt. Structure Adaptations in a Membrane Enzyme that Terminates Endocannabinoid Signaling. *Science* 2002; 298: 1793-1796.
- Breuer ME, McGinnis MY, Lumia AR, Possidente BP. Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental provocation. *Horm. Behav.* 2001; 40, 409-418.
- Brower KJ, Blow FC, Beresford TP, Fuelling C. Anabolic-androgenic steroid dependence. *J Clin Psychiatry.* 1989; 50: 31-33.
- Brower KJ, Blow FC, Young JP, Hill EM. Symptoms and correlates of anabolic-androgenic steroid Dependence. *Brit. J. Addiction.* 1991; 86: 759-768.
- Brower KJ, Eliopoulos GA, Blow FC, Catlin DH, Beresford TP. Evidence for physical and psychological dependence on anabolic androgenic steroids in eight weight lifters. *Am. J. Psychiatry.* 1990; 147: 510-512.
- Brower KJ. Anabolic steroids: addictive, psychiatric, and medical consequences. *Am J Addict.* 1992; 1: 100-114.
- Brown-Séquard CE. The effects produced on man by subcutaneous injection of a liquid obtained from the testicles of animals. *Lancet.* 1889. 137: 105-107.
- Burnett KF, Kleiman ME. Psychological characteristics of adolescent steroid users. *Adolescence.* 1994; 29: 81-90.

- Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 2004; 161: 598-607.
- Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*. 2004; 65: 999–1007.
- Célérier E, Ahdepil T, Wikander H, Berrendero F, Nyberg F, Maldonado R. Influence of the anabolic-androgenic steroid nandrolone on cannabinoid dependence. *Neuropharmacology*. 2006; 50: 788-806.
- Cha-Molstad H, Keller DM, Yochum GS, Impey S, Goodman RH. Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 13572-13577.
- Chartoff EH, Papadopoulou M, MacDonald ML, Parsegian A, Potter D, Konradi C, Carlezon WA Jr. Desipramine reduces stress-activated dynorphin expression and CREB phosphorylation in NAc tissue. *Mol Pharmacol*. 2009; 75:704-712.
- Chen X, Herbert J. The effect of long-term castration on the neuronal and physiological responses to acute or repeated restraint stress: interactions with opioids and prostaglandins. *J Neuroendocrinol*. 1995; 7:137-144.
- Choi PY, Pope HG Jr. Violence toward women and illicit androgenic-anabolic steroid use. *Ann Clin Psychiatry*. 1994; 6: 21-25.
- Chung WC, De Vries GJ, Swaab DF. Sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis in humans may extend into adulthood. *J Neurosci*. 2002; 22: 1027-1033.
- Cicero TJ, O'Connor LH. Abuse liability of anabolic steroids and their possible role in the abuse of alcohol, morphine, and other substances. *Anabolic Steroid Abuse*. 102. NIDA Research Monograph. 1990; 1-28.
- Clark AS, Fast AS. Comparison of the effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the sexual behavior of castrated male rats. *Behav Neurosci*. 1996; 110:1478-1486.
- Clark AS, Harrold EV. Comparison of the effects of stanozolol, oxymetholone, and testosterone cypionate on the sexual behavior of castrated male rats. *Behav Neurosci*. 1997; 111: 1368-1374.
- Cohen JC, Hickman R. Insulin resistance and diminished glucose tolerance in powerlifters ingesting anabolic steroids. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 64: 960-963.
- Cooper CJ, Noakes TD, Dunne T, Lambert MI, Rochford KA. High prevalence of abnormal personality traits in chronic users of anabolic androgenic steroids. *Br J Sports Med*. 1996; 30:246–250.
- Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA. Role of gonadal steroids in the corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin gene expression

response to Delta(9)-tetrahydrocannabinol in the hypothalamus of the rat. *Neuroendocrinol.* 2001; 74: 185-192.

- Costanzi M, Battaglia M, Rossi-Arnaud C, Cestari V, Castellano C. Effects of anandamide and morphine combinations on memory consolidation in cd1 mice: involvement of dopaminergic mechanisms. *Neurobiol Learn Mem.* 2004; 81: 144-149.
- Costine BA, Oberlander JG, Davis MC, Penatti CA, Porter DM, Leaton RN, Henderson LP. Chronic anabolic androgenic steroid exposure alters corticotropin releasing factor expression and anxiety-like behaviors in the female mouse. *Psychoneuroendocrinology.* 2010; 35: 1473-1485.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996; 384: 83-87.
- Cunningham ER, Sabback MS, Smith RM, Fitts CT. Snakebite: role of corticosteroids as immediate therapy in an animal model. *Am Surg.* 1979; 45: 757-759.
- David K, Dingemans E, Freud J, Laqueur E. On crystalline male hormone from testicles (testosterone) effective as from urine or from cholesterol. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem,* 1935; 233: 281.
- Davis EC, Shryne JE, Gorski RA. Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology.* 1996; 63: 142-148.
- Dekaban AS. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann Neurol.* 1978; 4: 345-356.
- Demling RH, DeSanti L. Effect of a hypocaloric diet, increased protein intake and resistance training on lean mass gains and fat mass loss in overweight police officers. *Ann Nutr Metab.* 2000; 44: 21-29.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl).* 1995; 121: 66-72.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 1992; 258: 1946-1949.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 2002; 372: 686-691.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 1998; 21: 521-528.
- Dolecek R, Jezek M, Adámková M, Polivka P, Kubis M, Sajnar J, Dolecková D, Kurková J, Závada M. Endorphin releasers: a new possible approach to the

treatment of pain after burns--a preliminary report. *Burns Incl Therm Inj.* 1983; 10: 41-44.

- Domínguez-López S, Howell R, Gobbi G. Characterization of serotonin neurotransmission in knockout mice: implications for major depression. *Rev Neurosci.* 2012;23: 429-443.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of Depression. *Archives of General Psychiatry;* 1997; 54: 607-608.
- Durant RH, Rickert VI, Ashworth CS, Newman C, Slavens G. Use of multiple drugs among adolescents who use anabolic steroids. *N Engl J Med.* 1993; 32: 922-926.
- Eaton DK, Kann L, Kinchen S, Ross J, Hawkins J, Harris WA, Lowry R, McManus T, Chyen D, Shanklin S, Lim C, Grunbaum JA, Wechsler H. Youth risk behavior surveillance--United States, 2005. *MMWR Surveill Summ.* 2005; 55: 1-108.
- Eckenhoff ME and Rakic P. Nature of the proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkeys. *J. Neurosci.* 1988; 8: 2729-2747.
- Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle RD. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation.* 2005; 2:29.
- Evans NA. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sports Med.* 2004; 32: 534-542.
- Finlay JM, Jedema HP, Rabinovic AD, Mana MJ, Zigmond MJ, Sved AF. Impact of corticotropin-releasing hormone on extracellular norepinephrine in prefrontal cortex after chronic cold stress. *J Neurochem.* 1997; 69:144-150.
- Frodl T, Koutsouleris N, Bottlender R, Born C, Jäger M, Mörgenthaler M, Scheuerecker J, Zill P, Baghai T, Schüle C, Rupprecht R, Bondy B, Reiser M, Möller HJ, Meisenzahl EM. Reduced gray matter brain volumes are associated with variants of the serotonin transporter gene in major depression. *Mol Psychiatry.* 2008; 13: 1093-1101.
- Galligani N, Renck A, Hansen S. Personality profile of men using anabolic androgenic steroids. *Horm Behav.* 1996; 30:170-175.
- Giuffrida A, Beltramo M, Piomelli D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: Biochemistry and pharmacology. *Pharmacology.* 2001; 298: 7-14.
- Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Mor M, Trezza V, Goldberg SR, Cuomo V, Piomelli D. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 18620-18625.
- Gonzalez S, Bisogno T, Wenger T, Manzanares J, Milone A, Berrendero F, Di Marzo V, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. Sex steroid influence on cannabinoid CB(1) receptor mRNA and endocannabinoid levels in the anterior pituitary gland. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 270: 260-266.

- Gooren LJG, Bunck MGM. Androgen replacement therapy. Present and future. *Drugs*. 2004; 64: 1861-1891.
- Gorzalka, B.B., Hill, M.N. Putative role of endocannabinoid signaling in the etiology of depression and actions of antidepressants. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2011; 35, 1575-1585.
- Graham S, Kennedy M. Recent developments in the toxicology of anabolic steroids. *Drug Saf*. 1990; 5: 458-476.
- Gratacòs M, Soria V, Urretavizcaya M, González JR, Crespo JM, Bayés M, de Cid R, Menchón JM, Vallejo J, Estivill X. A brain-derived neurotrophic factor (BDNF) haplotype is associated with antidepressant treatment outcome in mood disorders. *Pharmacogenomics J*. 2008; 8: 101-112.
- Grimes JM, Melloni RH Jr. Serotonin modulates offensive attack in adolescent anabolic steroid-treated hamsters. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 73: 713-721.
- Grimes JM, Melloni RH Jr. Serotonin-1B receptor activity and expression modulate the aggression-stimulating effects of adolescent anabolic steroid exposure in hamsters. *Behav Neurosci*. 2005; 119:1184-1194.
- Grinspoon S, Mulligan K. Weight loss and wasting in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2003;36:S69-78.
- Gruart A, Benito E, Delgado-García JM, Barco A. Enhanced cAMP response element-binding protein activity increases neuronal excitability, hippocampal long-term potentiation, and classical eyeblink conditioning in alert behaving mice. *J Neurosci*. 2012; 32:17431-17441.
- Gruber AJ, Pope HG Jr. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in women. *Psychother. Psychosom*. 2000; 69: 19–26.
- Gundersen BB, Briand LA, Onksen JL, Lelay J, Kaestner KH, Blendy JA. Increased hippocampal neurogenesis and accelerated response to antidepressants in mice with specific deletion of CREB in the hippocampus: role of cAMP response-element modulator τ . *J Neurosci*. 2013; 33: 13673-13685.
- Hall RC, Hall RC. Abuse of supraphysiologic doses of anabolic steroids. *South Med J*. 2005; 98: 550-555.
- Harrison RJ, Connor DF, Nowak C, Nash K, Melloni RH Jr. Chronic anabolic-androgenic steroid treatment during adolescence increases anterior hypothalamic vasopressin and aggression in intact hamsters. *Psychoneuroendocrinology*. 2000; 25: 317-338.
- Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med*. 2004; 34:513-554.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 1991; 11: 563-583.

- Hershberger LG, Shipley EG, Meyer RK. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator and muscle method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1953; 83: 175–180.
- Hill MN, Gorzalka BB. Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav. Pharmacol.* 2005; 16: 333-352.
- Hill MN, Miller GE, Carrier EJ, Gorzalka BB, Hillard CJ. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 34: 1257-1262.
- Hoberman JM, Yesalis EC. *The History of Synthetic Testosterone.* Munn & Company, 1995. p6.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse. *Brain. EMBO J.* 1990; 9:2459–2464.
- Howlett AC, Champion-Dorow TM, McMahon LL, Westlake TM. The cannabinoid receptor: biochemical and cellular properties in neuroblastoma cells. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991; 40: 565-569.
- Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 1997; 387: 167-178.
- Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 1991; 50: 230–232.
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 2005; 115: 3104-3116.
- Johnston LD, O'Malley PM, & Bachman JG. Monitoring the Future national survey results on adolescent drug use: Overview of key findings. 2002; (NIH Publication No. 02-5105). Bethesda, MD: National Institute on Drug Abuse, 56 pp.
- Juhasz G, Chase D, Pegg E, Downey D, Toth ZG, Stones K, Platt H, Mekli K, Payton A, Elliott R, Anderson IM, Deakin JF. CNR1 gene is associated with high neuroticism and low agreeableness and interacts with recent negative life events to predict current depressive symptoms. *Neuropsychopharmacology.* 2009; 34: 2019-2027.
- Kaliris Y, Salas-Ramirez, Pamela R. Montalto, Cheryl L. Sisk. Anabolic androgenic steroids differentially affect social behaviors in adolescent and adult male Syrian hamsters. *Horm Behav.* 2010. 53: 376-385
- Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry.* 2005; 162: 1403-1413.
- Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson JI, Pope HG Jr. Anabolic-androgenic steroid dependence: an emerging disorder. *Addiction.* 2009; 104:1966-1978.

- Kanayama G, Cohane GH, Weiss RD, Pope HG. Past anabolic-androgeic steroid use among men admitted for substance abuse treatment: an underrecognized problem? *J Clin Psychiatry*. 2003; 64: 156-160.
- Kanayama G, Hudson JI, Pope HG Jr. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: a looming public health concern?. *Drug Alcohol Depend*. 2008; 98: 1-12.
- Kanayama G, Hudson JI, Pope HG. Illicit anabolic steroid use. *Horm.Behav*. 2010; 58: 111-121.
- Kashkin KB, Kleber HD. Hooked on hormones? An anabolic steroid addiction hypothesis. *JAMA*. 1989 ;262(22):3166-3170.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, et al. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*. 2003; 9:76–81.
- Khorshidahmad T, Tabrizian K, Vakilzadeh G, Nikbin P, Moradi S, Hosseini-Sharifabad A, Roghani A, Naghdi N, Sharifzadeh M. Interactive effects of a protein kinase A inhibitor and testosterone on spatial learning in the Morris water maze. *Behav Brain Res*. 2012; 228: 432-439.
- Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 15: 502–521
- Kindlundh A, Isacson DG, Berglund L, Nyberg F. Factors associated with adolescent use of doping agents: anabolic-androgenic steroids. *Addiction*. 1999; 94: 543-553.
- Klein TW, Newton C, Zhu W, Daaka Y, Friedman H. Delta 9-Tetrahydrocannabinol, cytokines, and immunity to *Legionella pneumophila*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995; 209: 205-212.
- Kouvelas D, Pourzitaki C, Papazisis G, Dagklis T, Dimou K, Kraus MM. Nandrolone abuse decreases anxiety and impairs memory in rats via central androgenic receptors. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11:925-934.
- Krishnan V, Graham A, Mazei-Robison MS, Lagace DC, Kim KS, Birnbaum S, Eisch AJ, Han PL, Storm DR, Zachariou V, Nestler EJ. Calcium-sensitive adenylyl cyclases in depression and anxiety: behavioral and biochemical consequences of isoform targeting. *Biol Psychiatry*. 2008; 64: 336-343.
- Lagunas N, Calmarza-Font I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM. Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. *Horm Behav*. 2010; 58: 786-791.
- Lapiz-Bluhm MD, Bondi CO, Doyen J, Rodriguez GA, Bédard-Arana T, Morilak DA. Behavioural assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20: 1115-1137.
- Lau BW, Yau SY, Lee TM, Ching YP, Tang SW, So KF. Effect of corticosterone and paroxetine on masculine mating behavior: possible involvement of neurogenesis. *J Sex Med*. 2011; 8:1390-1403.

- Lenroot RK, Giedd JN. Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006; 30: 718-729.
- Lindqvist A, Dreja K, Swärd K, Hellstrand P. Effects of oxygen tension on energetics of cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H110-117.
- López-León S, Janssens AC, González-Zuloeta Ladd AM, Del-Favero J, Claes SJ, Oostra BA, van Duijn CM. Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder. *Mol Psychiatry.* 2008; 13: 772-785.
- Lumia AR, McGinnis MY. Impact of anabolic androgenic steroids on adolescent males. *Physiol Behav.* 2010; 100:199-204.
- Maccarrone M, De Felici M, Bari M, Klinger F, Siracusa G, Finazzi-Agrò A. Down-regulation of anandamidehydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 2991-2997.
- Magnusson K, Birgner C, Bergström L, Nyberg F, Hallberg M. Nandrolone decanoate administration dose-dependently affects the density of kappa opioid peptide receptors in the rat brain determined by autoradiography. *Neuropeptides.* 2009; 43: 105-111.
- Magnusson K, Hallberg M, Bergquist J, Nyberg F. Enzymatic conversion of dynorphin A in the rat brain is affected by administration of nandrolone decanoate. *Peptides.* 2007; 28: 851-858.
- Mallet PE, Beninger RJ. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by delta9-tetrahydrocannabinol or anandamide. *Psychopharmacology (Berl).* 1998; 140: 11-19.
- Malone DA Jr, Dimeff RJ, Lombardo JA, Sample RH. Psychiatric effects and psychoactive substance use in anabolic-androgenic steroid users. *Clin J Sport Med.* 1995; 5:25–31
- Malone DA Jr, Dimeff RJ. The use of fluoxetine in depression associated with anabolic steroid withdrawal: a case series. *J Clin Psychiatry.* 1992; 53(4):130-132.
- Malone DA, Sorboro JM. Anabolic-androgenic steroids. Section II, chapter 9. In: Miller, NS., editor. *Principles of Addiction Medicine.* American Society of Addiction Medicine. 1994
- Manaye KF, Wang PC, O'Neil JN, Huang SY, Xu T, Lei DL, Tizabi Y, Ottinger MA, Ingram DK, Mouton PR. Neuropathological quantification of dtg APP/PS1: neuroimaging, stereology, and biochemistry. *Age (Dordr).* 2007;29:87-96.
- Martin CA, Kelly TH, Rayens MK, Brogli BR, Brenzel A, Smith WJ, Omar HA. Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatr.* 2002; 41, 1495-1502.
- Matriciano F, Modafferi AM, Togna GI, Barone Y, Pinna G, Nicoletti F, Scaccianoce S. Repeated anabolic androgenic steroid treatment causes antidepressant-

reversible alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, BDNF levels and behavior. *Neuropharmacology*. 2010; 58: 1078-1084.

- Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 599–609.
- Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, Drago F, Cadet JL, Goldberg SR, Yasar S. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn Mem.* 2009;16:332-337.
- McClung CA, Nestler EJ. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci.* 2003; 6: 1208-1215.
- McGinnis MY, Lumia AR, Breuer ME, Possidente BP. Physical provocation potentiates aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids. *Horm. Behav.* 2000a; 41: 101–110.
- McGinnis MY, Lumia AR, Possidente BP. Effects of withdrawal from anabolic androgenic steroids on aggression in adult male rats. *Physiol. Behav.* 2000b; 75: 541–549.
- McGinnis MY. Anabolic androgenic steroids and aggression: Studies using animal models. *New York Academy of Sciences.* 2004; 39:399-415.
- McLaughlin RJ, Hill MN, Morrish AC, Gorzalka BB. Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect. *Behav Pharmacol.* 2007; 18: 431-438.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminsky NE, Schatz AR, Gopher A, Almog , Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50: 83-90.
- Melloni JrRH, Connor DF, Hang PT, Harrison RJ, Ferris CF. Anabolic–androgenic steroid exposure during adolescence and aggressive behavior in golden hamsters. *Physiol. Behav.* 1997; 61: 359– 364.
- Mendenhall CL, Anderson S, Weesner RE. Protein-calorie malnutrition associated with alcoholic hepatitis. *Veterans Administration Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis. American Journal of Medicine.* 1984; 76:211–222.
- Micale V, Di Marzo V, Sulcova A, Wotjak CT, Drago F. Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. *Pharmacol Ther.* 2013;138(1): 18-37.
- Midgley SJ, Heather N, Davies JB. Levels of aggression among a group of anabolic-androgenic steroid users. *Med Sci Law.* 2001; 41: 309-314.
- Mineka S, Watson D, Clark LA. Comorbidity of anxiety and unipolar mood disorders. *Annu Rev Psychol.* 1998; 49: 377-412.

- Minkin DM, Meyer ME, van Haaren F. Behavioral effects of long-term administration of an anabolic steroid in intact and castrated male Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 44: 959-963.
- Monshouwer K, Smit F, de Graaf R, van Os J, Vollebergh W. First cannabis use: does onset shift to younger ages? Findings from 1988 to 2003 from the Dutch National School Survey on Substance Use. *Addiction.* 2005; 100: 963-970.
- Monteggia LM, Luikart B, Barrot M, Theobald D, Malkovska I, Nef S, Parada LF, Nestler EJ. Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry.* 2007;61:187-197.
- Morrish AC, Hill MN, Riebe CJ, Gorzalka BB. Protracted cannabinoid administration elicits antidepressant behavioral responses in rats: role of gender and noradrenergic transmission. *Physiol Behav.* 2009; 98: 118-124.
- Moser PC. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology.* 1989; 99:48-53.
- Mottram DR, George AJ. Anabolic steroids. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000; 14:55–69.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; 365: 61-65.
- Naghdi N, Oryan S, Etemadi R. The study of spatial memory in adult male rats with injection of testosterone enanthate and flutamide into the basolateral nucleus of the amygdala in Morris water maze. *Brain Res.* 2003; 972:1-8.
- Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M, Schlicker E. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000; 361: 19-24.
- Nestler EJ, Carlezon WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry.* 2006; 59: 1151–1159.
- Newton SS, Thome J, Wallace TL, Shirayama Y, Schlesinger L, Sakai N, Chen J, Neve R, Nestler EJ, Duman RS. Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. *J Neurosci.* 2002; 22: 10883-10890.
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci.* 1996; 16: 2365-2372.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001; 81: 1535-1565.
- Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Rodés-Cabau J, Cannon CP, Deanfield JE, Després JP, Kastelein JJ, Steinhilber SR, Kapadia S, Yasin M, Ruzyllo W, Gaudin C, Job B, Hu B, Bhatt DL, Lincoff AM, Tuzcu EM. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *AMA.* 2008; 299:1547-1560.

- Nuñez JL, Sodhi J, Juraska JM. Ovarian hormones after postnatal day 20 reduce neuron number in the rat primary visual cortex. *J Neurobiol.* 2002; 52(4): 312-321.
- Nunez JL; Lauschke DM; Juraska JM. Cell death in the development of the posterior cortex in male and female rats. *J COMP NEUR*, 2001, 439: 32-41
- Oberlander JG, Porter DM, Onakomaiya MM, Penatti CA, Vithlani M, Moss SJ, Clark AS, Henderson LP. Estrous cycle variations in GABA(A) receptor phosphorylation enable rapid modulation by anabolic androgenic steroids in the medial preoptic area. *Neuroscience.* 2012; 13; 226: 397-410.
- Papazisis G, Kouvelas D, Mastrogianni A, Karastergiou A. Anabolic androgenic steroid abuse and mood disorder: a case report. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2007; 10: 291-293.
- Paus T, Keshavan M, Giedd JN. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat. Rev. Neurosci.* 2008; 9, 947–957.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition.* 1986.
- Perry PJ, Kutscher EC, Lund BC, Yates WR, Holman TL, Demers L. Measures of aggression and mood changes in male weightlifters with and without androgenic anabolic steroid use. *J Forensic Sci.* 2003; 48: 646-651.
- Pinna G, Agis-Balboa, Pibiri F, Nelson M, Guidotti A, Costa E. Neurosteroid biosynthesis regulates sexually dimorphic fear and aggressive behavior in mice. *Neurochem Res.* 2008; 33: 1990-2007.
- Pinos H, Collado P, Rodríguez-Zafra M, Rodríguez C, Segovia S, Guillamón A. The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat. *Brain Res Bull.* 2001; 56: 73-8.
- Piomelli D, Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Putman D. Pharmacological Profile of the Selective FAAH Inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Reviews.* 2006; 12: 21–38
- Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon WA Jr. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci.* 2001; 21: 7397–7403.
- Pope HG Jr, Kanayama G, Hudson JI. Risk factors for illicit anabolic-androgenic steroid use in male weightlifters: a cross-sectional cohort study. *Biol Psychiatry.* 2012; 71: 254-261.
- Pope HG Jr, Katz DL. Bodybuilder's psychosis. *Lancet.* 1988; 1: 863.
- Pope HG Jr, Katz DL. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. *Arch Gen Psychiatry.* 1994; 51: 375-382.
- Pope HG Jr, Kouri EM, Hudson JI. Effects of supraphysiologic doses of testosterone on mood and aggression in normal men: a randomized controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57:133–140.
- Pope HG Jr, Kouri EM, Powell KF, Campbell C, Katz DL. Anabolic androgenic steroid use among 133 prisoners. *Compr Psychiatry* 1996; 37:322–327.

- Pope HG, Brower KJ. Anabolic-Androgenic Steroid-Related Disorders. In: Sadock B, Sadock V, editors. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. Ninth Edition Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA: 2009. pp. 1419–1431.
- Rankin SL, Partlow GD, McCurdy RD, Giles ED, Fisher KR. Postnatal neurogenesis in the vasopressin and oxytocin-containing nucleus of the pig hypothalamus. *Brain Res*. 2003; 971: 189-196.
- Realini N, D. Viganò, C. Guidali, E. Zamberletti, T. Rubino, D. Parolaro. Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology*. 2011; 60: 235-243.
- Reyes-Fuentes A, Veldhuis JD. Neuroendocrine physiology of the normal male gonadal axis. *Endocrinol Metab. Clin North Am*. 1993; 22: 93-124.
- Ricci LA, Morrison TR, Melloni RH Jr. Serotonin modulates anxiety-like behaviors during withdrawal from adolescent anabolic-androgenic steroid exposure in Syrian hamsters. *Horm Behav*. 2012; 62: 569-578.
- Ricci LA, Rasakham K, Grimes JM, Melloni RH Jr. Serotonin-1A receptor activity and expression modulate adolescent anabolic/androgenic steroid-induced aggression in hamsters. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006; 85:1-11.
- Rocha VM, Calil CM, Ferreira R, Moura MJ, Marcondes FK. Influence of anabolic steroid on anxiety levels in sedentary male rats. *Stress*. 2007; 10: 326-331.
- Rommerts FFG. *Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and non genomic actions*. Cambridge University Press, Cambridge. 2004; 1–38.
- Rossbach UL, Steensland P, Nyberg F, Le Grevès P. Nandrolone-induced hippocampal phosphorylation of NMDA receptor subunits and ERKs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 357:1028-1033.
- Rubino T, Viganò D, Realini N, Guidali C, Braidà D, Capurro V, Castiglioni C, Cherubino F, Romualdi P, Candeletti S, Sala M, Parolaro D. Chronic Delta (9)-tetrahydrocannabinol during adolescence provoke sexdependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioural and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33 (11): 2760-2771.
- Rubino T, Realini N, Braidà D, Alberio T, Capurro V, Viganò D, Guidali C, Sala M, Fasano M, Parolaro D. 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*. 2009; 15: 291-302.
- Salas-Ramirez K, Frankfurt M, Luine V, Friedman E. Prenatal cocaine exposure increases anxiety, impairs cognitive function and increases dendritic spine density in adult rats: influence of sex. *Neuroscience*. 2010; 169: 1287–1295.
- Salas-Ramirez KY, Montalto PR, Sisk CL. Anabolic androgenic steroids differentially affect social behaviors in adolescent and adult male Syrian hamsters. *Horm Behav*. 2008; 53: 378-385.
- SAMHSA/OAS National Household Survey on Drug Abuse, Main Findings. 2004.

- Santos AM, da Rocha MS, da Silva MF. Illicit use and abuse of anabolic-androgenic steroids among Brazilian bodybuilders. *Subst Use Misuse*. 2011; 46:742-748.
- Savitz J, Lucki I, Drevets WC. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*. 2009; 88: 17-31.
- Schatz AR, Lee M, Die RB, Pulaski JT, Kaminski NE. Cannabinoid receptor CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997; 142: 278-287.
- Scherma M, Medalie J, Fratta W, Vadivel SK, Makriyannis A, Piomelli D, Mikics E, Haller J, Yasar S, Tanda G, Goldberg SR. The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology*. 2008; 54:129-140.
- Schmahmann JD, Caplan D. Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain*. 2006; 129: 290-292.
- Serra G, Fratta W. A possible role for the endocannabinoid system in the neurobiology of depression. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*. 2007; 19:3-25.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioural models of depression. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22: 3251-3261.
- Sim LJ, Hampson RE, Deadwyler SA, Childers SR. Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci*. 1996;16:8057-8066.
- Skårberg K, Nyberg F, Engström I. Is there an association between the use of anabolic-androgenic steroids and criminality. *Eur Addict Res*. 2010; 16: 213-219.
- Sowell ER, Thompson PM, Leonard CM, Welcome SE, Kan E, Toga AW. Longitudinal mapping of cortical thickness and brain growth in normal children. *J Neurosci*. 2004; 24: 8223-8231.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 1997; 388: 773-778.
- Stilger VG, Yesalis CE. Anabolic-androgenic steroid use among high school football players. *J Community Health*. 1999; 24:131-145.
- Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*. 1996; 17: 221-244.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Natane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 215: 89-97.
- Summers J. *Steroids* 101. 2003; Aurora, CO: Anabolics.com
- Swerdloff RS, Wang C, Hikim APS. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in men. *Hormones, Brain and Behavior*. 2002; 1-36.
- Talih F, Fattal O, Malone DJr. Anabolic steroid abuse: psychiatric and physical costs. *Cleve Clin J Med*. 2007; 74(5):341-344, 346, 349-352.
- Taylor WN. *Anabolic steroids and athlete*. Jefferson NC: McFarland & Co. 2002.

- the non-medical use of prescription drugs among U.S. college students from 1993 to 2001. *Addiction* 2007; 102:455-465.
- Thevis M, Schanzer W. Synthetic Anabolic Agents: Steroids and Nonsteroidal Selective Androgen Receptor Modulators. *Handb Exp Pharmacol*. 2010; 195: 99-126.
- Thiblin I, Runeson B, Rajs J. Anabolic androgenic steroids and suicide. *Ann Clin Psychiatry*. 1999; 11: 223-231.
- Thome J, Sakai N, Shin K, Steffen C, Zhang Yj, Impey S, Storm D, Duman RS. cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J Neurosci*. 2000; 20 :4030-4036.
- Trenton AJ, Currier GW. Behavioural manifestations of anabolic steroid use. *CNS Drugs*. 2005; 19:571-595.
- Tricker R, Casaburi R, Storer TW, Clevenger B, Berman N, Shirazi A, Bhasin S. The effects of supraphysiological doses of testosterone on angry behavior in healthy eugonadal men--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 3754-3758.
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci*. 1998; 83: 393-411.
- Urigüen L, Pérez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology*. 2004; 46: 966-973.
- Uzych L. Anabolic-androgenic steroids and psychiatric-related effects: a review. *Can J Psychiatry*. 1992; 37:23-28.
- Varvel SA, Cravatt BF, Engram AE, Lichtman AH. Fatty acid amide hydrolase (-/-) mice exhibit an increased sensitivity to the disruptive effects of anandamide or oleamide in a working memory water maze task. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 317: 251-257.
- Varvel SA, Wise LE, Niyuhire F, Cravatt BF, Lichtman AH. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32: 1032-1041.
- Viosca J, Malleret G, Bourtchouladze R, Benito E, Vronskava S, Kandel ER, Barco A. Chronic enhancement of CREB activity in the hippocampus interferes with the retrieval of spatial information. *Learn Mem*. 2009; 16: 198-209.
- Wallace TL, Stellitano KE, Neve RL, Duman RS. Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety. *Biol Psychiatry*. 2004; 56: 151-160.
- Wichstrøm and Pedersen. Use of anabolic-androgenic steroids in adolescence: winning, looking good or being bad. *J Stud Alcohol*. 2001; 62: 5-13.

- Wilson JD, George FW, Griffin JE. The hormonal control of sexual development. *Science*. 1981; 211:1278-1284.
- Wood RI, Johnson LR, Chu L, Schad C, Self DW. Testosterone reinforcement: intravenous and intracerebroventricular self-administration in male rats and hamsters. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004; 171: 298-305.
- Wood RI. Anabolic-androgenic steroid dependence? Insights From animals and humans. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29: 490–506
- Wu FC. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin Chem*. 1997; 43:1289-1292.
- Yesalis CE and Bahrke MS. Anabolic-androgenic steroids, current issue. *Sports Med* 1995; 19: 326-340.
- Yesalis CE. Anabolic steroids in sport and exercise. 2002 Champaign, IL: Human Kinetics.
- Zamberletti E, Prini P, Speziali S, Gabaglio M, Solinas M, Parolaro D, Rubino T. Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. *Neuroscience*. 2012; 204:245-257.