



Programa de Doctorado en Neurociencias

Potencialidad terapéutica del cannabidiol en el manejo de la conducta depresiva e identificación de marcadores cerebrales implicados



Tesis Doctoral presentada por

Amaya Montserrat Austrich Olivares

Director de Tesis: Dr. Jorge Manzanares Robles

Co-directora de Tesis: Dra. María Salud García Gutiérrez

Instituto de Neurociencias

Universidad Miguel Hernández de Elche

- 2024-



La presente Tesis Doctoral, titulada “Potencialidad terapéutica del cannabidiol en el manejo de la conducta depresiva e identificación de marcadores cerebrales implicados” se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

REFERENCIAS

- Austrich-Olivares A, García-Gutiérrez MS, Illescas L, Gasparyan A, Manzanares J. Cannabinoid CB1 Receptor Involvement in the Actions of CBD on Anxiety and Coping Behaviors in Mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Apr 13;15(4):473. doi:10.3390/ph15040473. PMID: 35455470; PMCID: PMC9027088.
- García-Gutiérrez MS, Navarro D, Austrich-Olivares A, Manzanares J. Unveiling behavioral and molecular neuroadaptations related to the antidepressant action of cannabidiol in the unpredictable chronic mild stress model. *Front Pharmacol*. 2023 Apr 18;14:1171646. doi: 10.3389/fphar.2023.1171646. PMID: 37144214; PMCID: PMC10151764.



El Dr. D. / La Dra. Dña. *“Jorge Manzanares Robles”*, director/a, y el Dr. D. / la Dra. Dña. *“María Salud García Gutiérrez”*, codirector/a de la tesis doctoral titulada *“Potencialidad terapéutica del cannabidiol en el manejo de la conducta depresiva e identificación de marcadores cerebrales implicados”*

INFORMA/N:

Que D./Dña. *“Amaya Montserrat Austrich Olivares”* ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado *“Potencialidad terapéutica del cannabidiol en el manejo de la conducta depresiva e identificación de marcadores cerebrales implicados”* conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo/firmamos para los efectos oportunos, en San Juan de Alicante a 11 de julio de 2024



El Dr. D. / La Dra. Dña. *“Cruz Morenilla Palao”*, Coordinador/a del Programa de Doctorado en Neurociencias

INFORMA:

Que D./Dña. *“Amaya Montserrat Austrich Olivares”* ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado *“Potencialidad terapéutica del cannabidiol en el manejo de la conducta depresiva e identificación de marcadores cerebrales implicados.”* conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en San Juan de Alicante a 12 de julio de 2024



La beca otorgada por el Instituto de Salud Carlos III bajo la solicitud del expediente FI19/00170 en Acción Estratégica de Salud – Ayudas y Subvenciones del Órgano SG de Evaluación y Fomento de la Investigación transmitido al Servicio Público de Empleo con fecha 4 de febrero de 2020 (E-03-2020-0050787) permitió el desarrollo de esta Tesis doctoral.

Número de expediente: ISCIH-AES-2019/002592

Número de asiento registral: 2019000E003703



I. Índice

I. Listado de abreviaturas.....	1
II. Resumen.....	5
III. Summary.....	7
1. Introducción.....	9
1.1. Trastornos depresivos.....	9
1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo.....	9
1.1.2. Definición, clasificación y diagnóstico	11
1.1.3. Abordaje farmacológico	13
1.2. Sistema cannabinoide endógeno.....	16
1.2.1. Papel fisiológico y terapéutico del rCB1 en ansiedad y depresión.....	18
1.2.2. Papel fisiológico y terapéutico del rCB2 en ansiedad y depresión	22
1.1.3. Papel fisiológico y terapéutico del GPR55 en ansiedad y depresión.....	25
1.2.4. Fitocannabinoides: cannabidiol.....	27
1.3. Modelos animales de ansiedad y depresión	31
1.3.1. Paradigmas empleados para evaluar la ansiedad.....	31
1.3.2. Paradigmas empleados para evaluar la depresión	33
2. Hipótesis.....	37
3. Objetivos	38
4. Resumen global de materiales y métodos.....	39
4.1. Animales	39
4.2. Fármacos.....	39
4.3. Modelo de estrés crónico leve (ECL)	39
4.4. Paradigmas comportamentales de ansiedad y depresión.....	40
4.4.1. Caja clara-oscura (LDB).....	40
4.4.2. Laberinto elevado en cruz (EPM):	40
4.4.3. Test de suspensión por la cola (TST):	40
4.4.4. Test de ingesta inhibida por la novedad (NSFT):	40
4.4.5. Reconocimiento de objetos.....	40
4.4.6. Consumo de una solución de sacarosa 1%.....	41
4.5. Identificación de los biomarcadores de respuesta al tratamiento que subyacen a la potencial eficacia ansiolítica y antidepresiva del CBD	41
4.5.1. Expresión génica mediante PCR a tiempo real	41
4.5.2. Inmunohistoquímica.....	41
4.6. Análisis estadístico	42
5. Resumen de los resultados	43

5.1. Artículo 1: Cannabinoid CB1 receptor involvement in the actions of CBD on anxiety and coping behaviors in mice (Anexo 1).....	43
5.2. Artículo 2: Unveiling behavioral and molecular neuroadaptations related to the antidepressant action of cannabidiol in the unpredictable chronic mild stress model (Anexo 1).....	46
6. <i>Discusión global</i>	50
7. <i>Futuras direcciones</i>	57
8. <i>Conclusiones finales</i>	58
9. <i>Referencias</i>	59
IV. ANEXO I.....	85
IV.I. ARTÍCULO 1.....	85
IV.II. ARTÍCULO 2.....	107



I. Listado de abreviaturas

2-AG: 2-araquidonilglicerol

5-HT: Serotonina

5-HT1A: Receptor serotoninérgico 1A

5-HT2A: Receptor serotoninérgico 2A

5HTT: Transportador de serotonina

ACTH: Hormona adrenocorticotropica

ADT: Antidepresivos tricíclicos

AEA: Anandamida

AMY: Amígdala

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

Ca⁺: Calcio

CA1: Región I del hipocampo

CA2: Región II del hipocampo

CA3: Región III del hipocampo

CB1KO: Ratón desprovisto del gen del receptor cannabinoide 1

CB2KO: Ratón desprovisto del gen del receptor cannabinoide 2

CB2xP: Ratón transgénico que sobreexpresa el receptor cannabinoide 2

CBD: Cannabidiol

CRF: Factor liberador de corticotropina

DAGL: Diacilglicerol lipasa

DLPFC: Corteza prefrontal dorolateral

ECBs: Endocannabinoides

ECL: Estrés crónico leve

ECT: Estimulación cerebral

EPM: Laberinto elevado en cruz

ESC: Escitalopram

FAAH: Amidohidrolasa de ácidos grasos

fMRI: Resonancia Magnética Nuclear funcional

FRL: Ratas Flinders Resistentes

FSL: Ratas Flinders Sensibles

FST: Natación forzada

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GABA(A): Receptor gabaérgico subunidad A

Glu: glutamato

GluA1: Receptor glutamatérgico A1

GluN2A: Receptor glutamatérgico N2A

GPR: Receptor acoplado a proteínas G

GPR55KO: ratón desprovisto del gen del receptor GPR55

HAMD: Escala de depresión de Hamilton

HIPP: Hipocampo

HPA: Eje hipotalámico-hipofisis-adrenal

IL: Interleucina

IMAO: Inhibidores selectivos de la monoaminoxidasa

iNOS: Óxido nítrico sintasa

IRN: Inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina

IRSN: Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina

ISRS: Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina

LDB: Caja clara-oscura

LPS: lipopolisacárido

MAGL: Monoacilglicerol lipasa

MAO: Monoaminoxidasa

Mhb: Habénula medial

MSDB: Núcleo de la banda diagonal

NAcc: Núcleo accumbens

NAPE-PL: N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D

NaSSA: Antidepresivo noradrenérgico y serotoninérgico específico

NFAT: Factor nuclear calcineurínico

NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico

NSFT: Ingesta Inhibida por la Novedad

OMS: Organización Mundial de la Salud

OF: Campo abierto

PET: Tomografía de positrones

PFC: corteza prefrontal

PHQ-9: Cuestionario de salud del paciente-9
POMC: proopiomelanocortina
PPAR α : receptor activado por proliferadores peroxisómicos
rCB1: receptor cannabinoide 1
rCB2: receptor cannabinoide 2
RIMA: Inhibidor selectivo y reversible de la monoaminoxidasa-A
SRT: Sertralina
TBP: Trastorno bipolar
TDM: Trastorno depresivo mayor
THC: tetrahidrocannabinol
TIA: tianeptina
TMS: Estimulación magnética transcraneal
TNF: Factor de necrosis tumoral
TRPV1: Receptor transitorio de canal catiónico vainilloide
TST: Suspensión por la cola
VEH: vehículo
VNS: Estimulación del nervio vago



II. Resumen

Los trastornos de ansiedad y depresión constituyen las enfermedades psiquiátricas más prevalentes. Aproximadamente el 4,1% de la población española presenta algún trastorno de depresión, siendo más prevalente en mujeres. Particularmente, el trastorno depresivo mayor afecta a más de 300 millones de personas a nivel global acarreado un gasto de 10 millones de euros anuales en la Unión Europea. A pesar del elevado número de fármacos antidepresivos disponibles, su eficacia es limitada y se asocia con la aparición de efectos adversos que conlleva al abandono del tratamiento por parte del paciente. Es por ello que es de suma importancia encontrar nuevas opciones terapéuticas que mejoren el tratamiento y la calidad de vida del paciente.

En este sentido, diversos estudios apuntan a que el cannabidiol (CBD), presente en la planta *Cannabis sativa*, presenta propiedades ansiolíticas y antidepresivas. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en modelos animales agudos, con menor poder de traslación clínica. Asimismo, no se ha explorado en detalle su mecanismo de acción. La presente tesis, presenta como objetivos profundizar en el mecanismo de acción del CBD y evaluar su eficacia, sólo o combinación con un antidepresivo de referencia, la sertralina (STR), en reducir las alteraciones comportamentales y moleculares inducidas por un modelo crónico de depresión (estrés crónico leve, ECL).

Los resultados indican que el CBD presenta efectos ansiolíticos y antidepresivos en modelos agudos de ansiedad y depresión, de manera dosis dependiente (**artículo 1**). El receptor cannabinoide CB1 parece ser una diana esencial para que el CBD ejerza su acción ansiolítica, como indican los experimentos realizados en ratones desprovistos del gen de este receptor (CB1KO) y con el antagonista del rCB1, SR141716A. Asimismo, se observan cambios en la expresión génica de las subunidades GABAérgicas alfa-2 y gamma-2 en el hipocampo (HIPP) y amígdala (AMY) tras la administración aguda de CBD, siendo necesario explorar su implicación en el mecanismo de acción del CBD en próximos estudios.

De manera adicional, los resultados obtenidos en la presente tesis ponen de manifiesto que el CBD es capaz de reducir las conductas ansiogénicas y depresogénicas inducidas por el ECL (**artículo 2**). Destaca que el CBD es más rápido y eficaz que la STR, presentando efecto a los 4 días de tratamiento en contraposición con los 14 días que requiere la STR. Adicionalmente, el CBD revierte todas las alteraciones inducidas por el ECL en dianas estrechamente relacionadas con la depresión, como el transportador de serotonina (5HTT) en el rafe dorsal, los receptores serotoninérgicos (5-HT1A y 5-HT2A) en el HIPP y AMY, el BDNF y Ppard en el HIPP. Mediante inmunohistoquímica se ha podido demostrar que el CBD es capaz de aumentar la inmunoreactividad para BDNF y reducir la del marcador de apoptosis caspasa-3 en el HIPP. Sin embargo, la STR no modula todas estas alteraciones. Este trabajo también indica que la combinación de CBD y STR presenta menor eficacia en modular las alteraciones comportamentales y neuromoleculares inducidas por el ECL en comparación con el CBD solo, lo que sugiere una potencial interacción entre ambos que es de sumo interés investigar en futuros estudios.

En su conjunto estos datos refuerzan el papel del CBD como una potencial herramienta terapéutica novedosa para el tratamiento de los trastornos depresivos.



III. Summary

Anxiety and depressive disorders are the most prevalent psychiatric illnesses. Approximately 4.1% of the Spanish population has a depressive disorder, being more prevalent in women. In particular, major depressive disorder affects more than 300 million people globally, costing 10 million euros per year in the European Union. Despite the large number of antidepressant drugs available, their efficacy is limited and is associated with the appearance of adverse effects that lead to treatment abandonment by the patient. It is, therefore, of utmost importance to find new therapeutic options that improve treatment and the patient's quality of life.

In this regard, several studies suggest that cannabidiol (CBD), present in the *Cannabis sativa* plant, has anxiolytic and antidepressant properties. Most of these studies have been conducted in acute animal models with less clinical translation power. Likewise, its mechanism of action has yet to be explored in detail. The present thesis aims to deepen the mechanism of action of CBD and to evaluate its efficacy, alone or in combination with a reference antidepressant, sertraline (STR), in reducing the behavioral and molecular alterations induced by a chronic model of depression (chronic mild stress, ECL).

The results indicate that CBD exhibits anxiolytic and antidepressant effects in acute models of anxiety and depression in a dose-dependent manner (article 1). The cannabinoid receptor 1 (CB1r) appears to be an essential target for CBD to exert its anxiolytic action, as indicated by experiments in mice lacking the gene for this receptor (CB1KO) and with the CB1r antagonist SR141716A. Likewise, changes in the gene expression of alpha-2 and gamma-2 GABAergic subunits in the hippocampus (HIPP) and amygdala (AMY) after acute administration of CBD have been observed. Their implication in the mechanism of action of CBD should be explored in future studies.

Additionally, the results obtained in the present thesis show that CBD can reduce the anxiogenic and depressogenic behaviors induced by ECL (article 2). Notably, CBD is faster and more effective than STR, showing effect after 4 days of treatment as opposed to the 14 days required by STR. Additionally, CBD reverses all ECL-induced alterations in targets closely related to depression, such as the serotonin transporter (5HTT) in the dorsal raphe, serotonergic receptors (5-HT1A and 5-HT2A) in HIPP and AMY, BDNF and Ppard in HIPP. By immunohistochemistry, it could be demonstrated that CBD increases the immunoreactivity for BDNF and reduces the apoptosis marker caspase-3 in HIPP. However, STR does not modulate all these alterations. This work also indicates that the combination of CBD and STR presents lower efficacy in modulating ECL-induced behavioral and neuromolecular alterations than CBD alone, suggesting a potential interaction between the two that is of great interest to investigate in future studies.

Taken together, these data reinforce the role of CBD as a potential novel therapeutic tool for the treatment of depressive disorders.



1. Introducción

1.1. Trastornos depresivos

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

La depresión es una enfermedad común que afecta aproximadamente a un 3,8% de la población mundial. Por edades, un 5.0% de la población adulta experimenta algún tipo de trastorno depresivo, y en mayores de 60 años, un 5.7% (OMS, 2023; [1]) (Figura 1). En España, un 2.5% de la población padece algún tipo de trastorno depresivo [2]. Atendiendo al sexo, las mujeres tienen el doble de probabilidades de ser diagnosticadas de depresión. En España, el porcentaje de prevalencia de trastornos depresivos entre mujeres y hombres es del 9.1% y 4.3%, respectivamente [2]. Diferentes factores parecen contribuir a estas diferencias en base al sexo, tales como circunstancias de vida o culturales (inequidad de género, sobrecarga laboral entre hogar y trabajo, abuso físico o sexual, otros trastornos emocionales — ansiedad, trastornos alimenticios, abuso de drogas o alcohol —) o cambios hormonales (pubertad, síndrome premenstrual, embarazo, depresión postparto, peri-menopausia o menopausia) [3] (Figura 2).

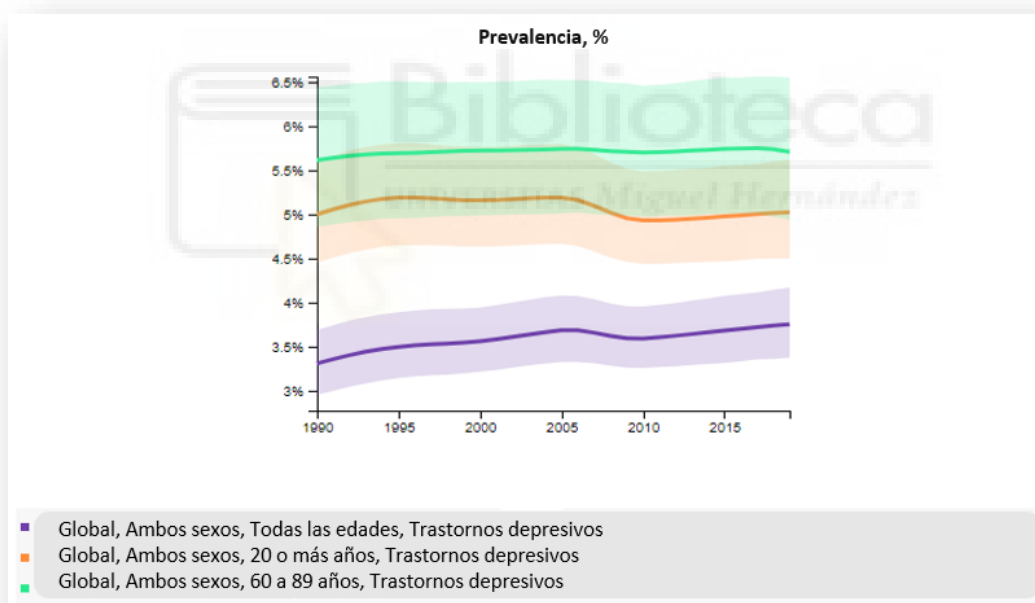


Figura 1. Prevalencia en porcentaje de trastornos depresivos en población mundial.
Imagen extraída y adaptada de Global Health Data Exchange, 2019 (GHDx, 2019).

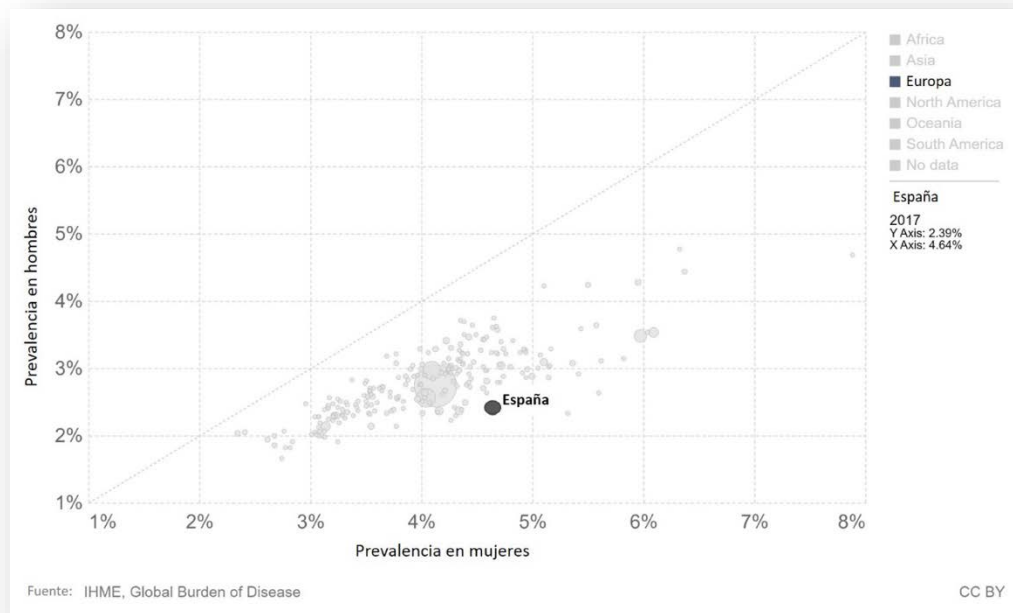


Figura 2. Prevalencia en porcentaje de hombres frente a mujeres que padecen trastornos depresivos. Imagen extraída y adaptada de Global Health Data Exchange, 2019 [4].

La depresión ha sido clasificada como la tercera causa de morbilidad en todo el mundo en 2008 por la OMS, y se estima que alcance el primer lugar para 2030 [5]. La depresión, con una intensidad moderada o severa, puede convertirse en un problema de salud grave y que puede conducir al suicidio. Más de 700.000 personas mueren por suicidio cada año y es la cuarta causa principal de muerte entre las personas de 15 a 29 años. En España, por media, cada día más de 10 personas fallecen por suicidio con una tasa de 7,68 casos por cada 100.000 habitantes y de acuerdo con datos de la Generalitat Valenciana (Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública) supone prácticamente 1 suicidio al día en esta.

Aunque existen tratamientos conocidos y eficaces para los trastornos depresivos, más del 75% de las personas de los países en vías de desarrollo no lo reciben adecuadamente [1]. Los impedimentos para una atención eficaz incluyen la falta de recursos, falta de proveedores de atención médica capacitados y el estigma social asociado con los trastornos mentales. Por lo que a menudo, los pacientes no son diagnosticados correctamente.

1.1.2. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO

Los trastornos depresivos se caracterizan por la expresión de tristeza y disminución del interés o del placer en actividades que antes se disfrutaban. Los síntomas más comunes son:

- 1) Estado de ánimo bajo, tristeza
- 2) Sentimientos de culpa, ineptitud y desesperanza
- 3) Desesperanza, pesimismo e irritabilidad
- 4) Disminución de interés o placer (anhedonia)
- 5) Cambios de energía y fatiga
- 6) Discapacidad de concentración y atención
- 7) Dolor, fatiga y debilidad física
- 8) Cambios de apetito y peso
- 9) Alteraciones del sueño (insomnio o hipersomnia)
- 10) Trastornos psicomotores
- 11) Pensamientos suicidas

En su conjunto, estos síntomas reducen significativamente la capacidad funcional del individuo [6, 7] y no deben relacionarse con la exposición a eventos aislados como crisis financieras, catástrofes naturales, enfermedades graves y fallecimiento de un ser querido, entre otros. Éstos últimos, a diferencia de los trastornos depresivos se resuelven cuando las circunstancias mejoran, y se pueden intercalar con períodos de emoción positiva y humor. Asimismo, no están acompañados por sentimientos generalizados de inutilidad y autodesprecio. Además, presenta una duración limitada, habitualmente de días, en lugar de semanas o meses. Por otro lado, las ideas o pensamientos suicidas y la pérdida de funcionalidad son menores, pero sí pueden provocar el desarrollo de un trastorno depresivo en personas vulnerables (con antecedentes familiares) [8]. Aunado a esto, el diagnóstico de un trastorno depresivo no debe ser atribuido a otros efectos fisiológicos como podría ser el abuso de sustancias u otro tipo de patologías médicas.

Durante un episodio depresivo, el paciente experimenta una dificultad significativa en su vida, traduciéndose en una pérdida del desarrollo y funcionamiento personal, familiar, social, educacional y ocupacional, entre otros.

Los trastornos depresivos se clasifican en: desregulación disruptiva del estado de ánimo, depresivo persistente (distimia), disfórico premenstrual, depresión atípica, afectivo estacional, postparto, por sustancias/medicamentos, por afección médica, otros específicos y no específicos y el trastorno depresivo mayor (TDM).

Una de las principales herramientas utilizadas para el diagnóstico de los trastornos depresivos es a través de la Clasificación Internacional de Enfermedades, decima edición (ICD-10, por sus siglas en inglés "International Classification of Diseases") y el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, quinta edición (DSM-5, por sus siglas en inglés "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders", editado por la Asociación Estadounidense de Psiquiatría) [5].

De manera complementaria, la gravedad de la depresión se evalúa comúnmente con la ayuda de otras escalas, como es la Escala de Depresión de Hamilton (HAMD, en sus siglas en inglés "Hamilton Depression Rating Scale") [9]. También, aunque con menor frecuencia, se usan cuestionarios como los auto informes del paciente: Cuestionario de Salud del Paciente-9 (PHQ-9, en inglés "Patient Health Questionnaire"); o el Inventario Rápido de Síntomas Depresivos-16 (QIDS, por sus siglas en inglés "Quick Inventory of Depressive Symptoms").

El TDM es el más representativo e incapacitante de los trastornos depresivos. Se caracteriza por la presencia de un episodio depresivo de una duración de al menos dos semanas consecutivas y la mayor parte del día de una alteración del estado de ánimo y/o por una disminución del placer. El estado de ánimo depresivo se debe a la presencia de tristeza, vacío, desesperanza o irritabilidad, siendo este último más característico en niños y adolescentes que la propia tristeza. Con respecto a la anhedonia (es decir, pérdida del interés o de placer), ésta se produce en mayor o menor grado en todas o casi todas las actividades. Sin embargo, es necesario que estén presentes de forma concomitante a estos dos últimos criterios, al menos cuatro de los siguientes síntomas: alteración del sueño, cambios en el apetito (hiperfagia o anorexia) y en el peso, pérdida de energía, fatiga, dificultades a la hora de pensar, concentrarse o tomar decisiones, sentimientos de inutilidad o culpabilidad, agitación o retraso psicomotor e ideación suicida recurrente.

Un diagnóstico basado en un solo episodio es posible, aunque el trastorno es recurrente en la mayoría de los casos. Se debe tener en consideración la diferencia entre la tristeza y el dolor normal (duelo) al de un episodio depresivo mayor. Cuando ocurren juntos, los síntomas depresivos y el deterioro funcional tiende a ser más grave y el pronóstico es peor.

En un estudio realizado en 2008, se compararon puntuaciones de discapacidad específicas causadas por diez enfermedades físicas crónicas y diez trastornos mentales. El TDM y el trastorno bipolar (TBP) fueron los trastornos mentales clasificados como graves con mayor frecuencia tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo y con puntuaciones de discapacidad más elevadas que las enfermedades físicas crónicas más incapacitantes (cáncer, diabetes y enfermedades cardíacas) [10]. Este deterioro conlleva a un serio impacto económico para el paciente, su familia y la sociedad. Aunque la mayor parte de los estudios sobre pérdidas económicas causadas por el TDM se realizan en Estados Unidos de América, se ha estimado que el valor perdido de acuerdo al capital humano equivalente al salario anual, se sitúa en el rango entre 30,1 a 51,5 mil millones de dólares [11, 12]. En España, se estima que el 2,2% del PIB representa a los trastornos mentales comunes y el 50% de estos costes es atribuido a una única enfermedad, la depresión [13], la primera causa de discapacidad.

1.1.3. ABORDAJE FARMACOLÓGICO

El tratamiento farmacológico de los trastornos afectivos se inició en la década de los años 50 del siglo pasado, con los antidepresivos tricíclicos (ADT), y los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAOs). Inicialmente, se observó que los fármacos iproniazida e isoniazida, utilizados como antituberculosos, inhibían la enzima monoaminoxidasa (MAO), implicada en la metabolización de las monoaminas, y mejoraban el estado del ánimo. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios graves, se retiraron del mercado y se desarrollaron otros fármacos como la fenelzina y la tranilcipromina, ya indicados para el tratamiento de la depresión.

El primer ADT, la imipramina, se desarrolló en el contexto de la investigación de fármacos antihistamínicos y sobre la evidencia de la eficacia del primer agente antipsicótico, la clorpromazina, con la que comparte ciertas características estructurales.

El uso de los IMAOs y ADT, se mantuvo durante tres décadas hasta la aparición de los primeros inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), como la fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina y citalopram. Posteriormente se desarrollaron los inhibidores reversibles de la MAO como la moclobemida y los inhibidores de la recaptación de serotonina y dopamina, como el bupropión.

En los años 90, se genera la mirtazapina (fármaco noradrenérgico y serotoninérgico específico, NaSSA), reboxetina (inhibidor de la recaptación de noradrenalina), venlafaxina y duloxetina (llamados duales por su doble acción inhibidora de recaptación de noradrenalina y serotonina) y por último la agomelatina (agonista de receptores de melatonina). Estos últimos fármacos han desplazado en la prescripción a los ADT y los IMAOs por la menor incidencia de efectos adversos. Sin embargo, la eficacia en la respuesta al tratamiento no ha variado significativamente en los pacientes con depresión.

La mayoría de los efectos adversos (Tabla 1) suelen disminuir durante las primeras semanas; pero como la efectividad del tratamiento es lenta, es importante extremar apoyo durante las primeras semanas para asegurar el cumplimiento del tratamiento en el paciente.

Tabla 1. Clasificación y efectos adversos de los antidepresivos

Tipo de antidepresivo	Fármacos	Efectos adversos	Tipo de antidepresivo	Fármacos	Efectos adversos
ISRS	Citalopram Escitalopram Fluoxetina Fluvoxamina Paroxetina Sertralina	Sequedad de boca Náuseas Dolores de cabeza Nerviosismo Inquietud Problemas del sueño Disfunción sexual Sudoración Hiponatremia <i>En tercera edad:</i> riesgo de hemorragias digestivas en combinación con AINES	RIMA	Bupropión Trazodona	Náuseas Fatiga Nerviosismo Sequedad de boca Diarrea Dolores cabeza Agitación Pérdida de apetito Problemas del sueño
IRSN	Duloxetina Venlafaxina Desvenlafaxina	Náuseas Pérdida del apetito Ansiedad y nerviosismo Dolores de cabeza Problemas del sueño Falta de energía Sequedad de boca Estreñimiento Pérdida de peso Disfunción sexual Aumento de la frecuencia cardiaca Aumento de los niveles de colesterol	NaSSA	Mirtazapina	Somnolencia Aumento de peso Aumento del apetito Sequedad de boca Cefalea Reducción de libido
ADT	Amitriptilina Clomipramina Desipramina Doxepina Imipramina Nortriptilina Protriptilina Trimipramina	Sequedad de boca Visión borrosa Estreñimiento Dificultad para orinar Deterioro cognitivo Cansancio Agravamiento del glaucoma	Agonista de receptores de melatonina	Agomelatina	Cefalea Mareos Nerviosismo
IMAOs	Isocarboxazida Fenelzina Selegilina Tranilcipromina	Debilidad Mareos Dolores de cabeza Temblores <i>En combinación con otros fármacos o dietas:</i> <i>síndrome serotoninérgico</i> Alucinaciones Cambios en la tensión arterial Agitación Fiebre Dolor abdominal Diarrea Sudoración profusa Taquicardia Irritabilidad Hostilidad Hiperpirexia, colapso cardiovascular y muerte	IRN	Reboxetina	Temblores Alteración de la presión sanguínea Taquicardias Síndrome pseudoanticolinérgico: sequedad de boca, estreñimiento y retención urinaria

ISRS: Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina; IRSN: Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina; ADT: antidepresivo tricíclico; IMAOs: Inhibidor de la monoaminoxidasa; RIMA: Inhibidores selectivos y reversibles de la monoaminoxidasa A (RIMA); NaSSA: Antidepresivo noradrenérgico y serotoninérgico específico; IRN: Inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina.

A pesar del amplio abanico de antidepresivos, la eficacia del tratamiento es limitada, especialmente en el TDM, donde solamente 1 de cada 3 pacientes responde al tratamiento. El concepto de depresión-resistente ha sido abordado en la literatura científica desde 1970. En el estudio “Sequenced Treatment Alternatives to relieve Depression (STAR*D, Susman 2007)” llevado a cabo en 3671 pacientes se evidenció que las tasas de remisión tras el primer y segundo tratamiento eran similares (32.9% y 30.6%), pero que descendían de forma importante después del tercer y cuarto intento (13.6% y 14.7%) [14, 15].

Se han establecido algunas de las intervenciones farmacológicas ante la depresión-resistente como el uso de IMAOs, con mayor eficacia en pacientes con depresión-resistente [16], combinar IRSR o ISHS con mianserina, mirtazapina o trazodona ([16-18]), añadir litio o un antipsicótico atípico (olanzapina, quetiapina, aripiprazol y risperidona) como estrategias de potenciación [19, 20]. Por último, se pueden realizar terapias de estimulación como son la estimulación cerebral (ECT), la estimulación magnética transcraneal (TMS) y la estimulación del nervio vago (VNS).

Cada una de estas alternativas farmacológicas debe de acompañarse de diferentes tipos de psicoterapia y terapia cognitiva [21].

Sin embargo, las directrices para el tratamiento de la depresión-resistente no cumplen con los criterios de la medicina basada en evidencia y se requiere de una mayor investigación con nuevas alternativas farmacológicas. Las principales necesidades en el campo de la investigación sobre la depresión deberían de estar enfocadas a una mejor comprensión sobre los circuitos neuronales involucrados. Por lo que resultaría interesante investigar otras dianas que participen en este trastorno para mejorar la terapia farmacológica, proporcionando nuevas opciones con mayor eficacia, que permita incrementar el porcentaje de remisión y la calidad de vida del paciente.

1.2. Sistema cannabinoide endógeno

La planta *Cannabis sativa*, también conocida como cáñamo, se conoce desde hace miles de años. Hoy en día, es una de las plantas recreativas y medicinales más populares. El cannabis se utilizaba como remedio analgésico, antirreumático, espasmolítico y psicotrópico [22] y se introdujo en la medicina americana y europea en el siglo XIX [23].

Entre 1840 y 1890, muchos informes médicos demostraron las propiedades curativas del cannabis, sugiriendo su uso en insomnio, migraña, tos, pérdida de apetito y convulsiones [24, 25]. En esta planta se han identificado más de 500 compuestos pertenecientes a diversos grupos químicos, entre ellos: terpenos, hidrocarburos, esteroides, ácidos grasos, flavonoides y sustancias únicas de esta planta, es decir, los cannabinoide. El delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ -9-THC) es el principal componente responsable de los efectos psicoactivos del cannabis y fue aislado en 1964 por Gaoni y Mechoulam. Sin embargo, el cannabidiol (CBD) es el siguiente compuesto mayoritario sin efectos psicotrópicos y aislado por primera vez por Adams y cols en 1940 [26], aunque su estructura química no se caracterizó completamente hasta 1963.

La identificación del THC dio lugar a la caracterización del sistema cannabinoide endógeno (SCE), una red neuromoduladora extensa involucrada en diversos procesos fisiológicos, como el procesamiento cognitivo [27] y la respuesta al estrés [28]. Asimismo, las investigaciones llevadas hasta la fecha han demostrado su papel en una variedad de trastornos mentales [29-31].

Este sistema está compuesto por ligandos endógenos de constitución lipídica denominados endocannabinoides (ECBs), de entre los que destacan la *N*-araquidoniletanolamina (anandamida, AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) [32], que provienen de la metabolización de fosfolípidos de membrana [33]. La AEA es metabolizada por la fosfodiesterasa selectiva de *N*-acilfosfatidiletanolamina (NAPE-PL) y el 2-AG por la diacilglicerol lipasa (DAGL) [34, 35]. Las enzimas responsables de la degradación de la AEA y del 2-AG son la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) [36, 37] y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) [38], respectivamente. Los principales receptores sobre los que ejercen su acción son los receptores cannabinoide 1 (rCB₁) y 2 (rCB₂). No obstante, también actúan sobre otros receptores, como el receptor de vaniloide TRPV1 [39] y los denominados receptores no-CB₁/CB₂, el GPR119 [40] y el GPR55 [41-45] (**Figura 3**).

El rCB₁ es el receptor cannabinoide más abundante en el sistema nervioso central. Se localiza en diversas áreas cerebrales como la corteza cingulada, corteza entorrinal, núcleo caudado y putamen, hipocampo (HIP), amígdala (AMY), tálamo, sustancia nigra, hipotálamo medial, globo pálido, núcleo entopeduncular, formación reticular, sustancia blanca del cuerpo calloso, tronco del encéfalo, núcleo del tracto solitario, cerebelo y sustancia gelatinosa de la médula espinal [46-48]. Debido a su elevada expresión, el rCB₁ se ha investigado como posible diana farmacológica para el tratamiento de náuseas y vómitos asociados a quimioterapia [49, 50], dolor crónico [51], algunos trastornos mentales como psicosis [52], ansiedad y depresión [53-55], entre otros. Actualmente están aprobados el dronabinol (Marinol[®] y Syndros[®]) y la nabilona (Cesamet[®] y Canemes[®]) para el tratamiento de vómitos asociados a la quimioterapia [56].

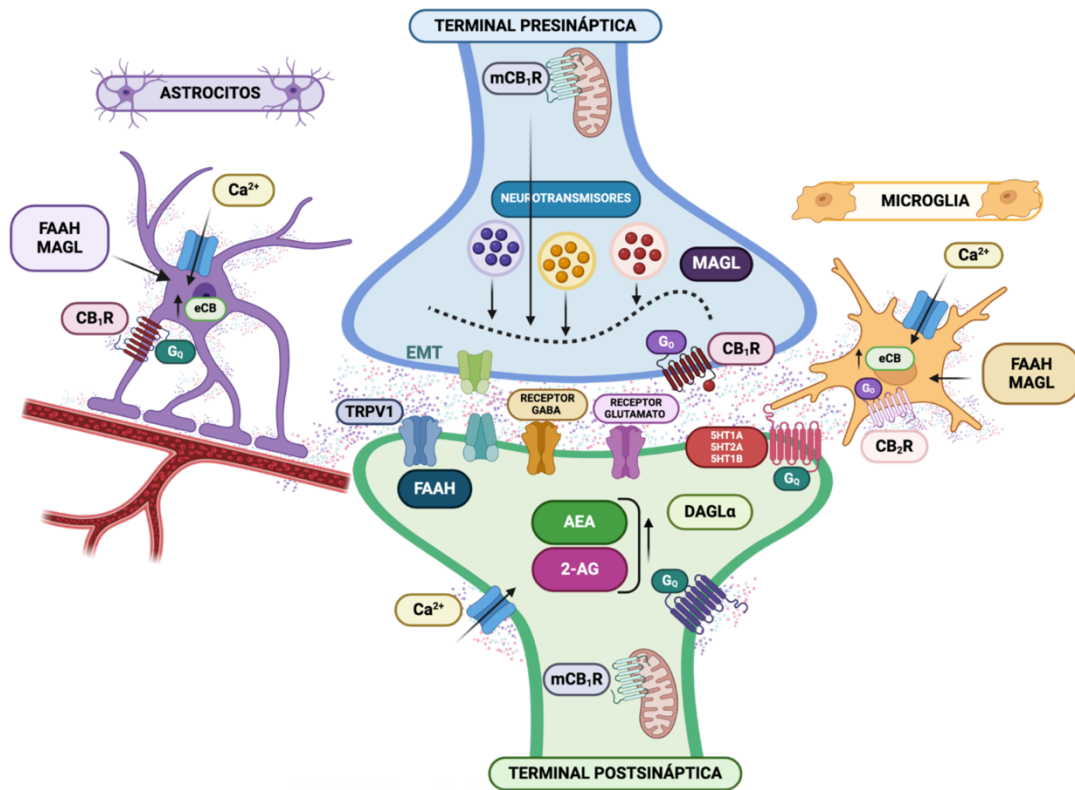


Figura 3. Imagen representativa del sistema cannabinoide endógeno. Imagen realizada en BioRender Scientific Image and Illustration Software. mCB₁R: ARN mensajero del receptor CB₁; Ca²⁺: calcio iónico; MAGL: monoacilglicerol lipasa; eCB: endocannabinoide; FAAH: amihidrolasa de ácidos grasos; AEA: anandamida; TRPV1: receptor de potencial transitorio vainilloide 1; 2-AG: 2-araquinoilglicerol; DAGLα: diacilglicerol lipasa; G_q: subunidad q de la proteína G.

Por lo que se refiere al rCB₂, inicialmente fue considerado el receptor cannabinoide periférico, al hallarse en el bazo y en determinadas poblaciones de leucocitos [57]. Los primeros estudios ecaminados a identificar su expresión en cerebro en condiciones basales resultaron fallidos, encontrándose solamente en condiciones patológicas como en las proximidades de tumores o en placas seniles en enfermedad de Alzheimer [58-62]. En el año 2005, se consiguió identificar, por primera vez, en neuronas del tronco cerebral de rata, ratón y hurón en condiciones basales [63]. Posteriormente, se realizó su completa caracterización en el cerebro de rata y ratón [64-66]. Al igual que el rCB₁, el rCB₂ está ampliamente diseminado en diferentes tipos celulares, neuronas, microglia y astrogía, y en diversas áreas cerebrales, como el cuerpo estriado, la corteza cerebral, AMY, HIP, sustancia nigra, tubérculo olfatorio, núcleos talámicos, núcleo ventromedial del hipotálamo, núcleo paralemniscal, núcleos pontinos, colículo inferior, núcleo espinal, núcleo paratroclear y cerebelo, entre otras. En consecuencia, el rCB₂ dejó de ser considerado solo como el receptor cannabinoide periférico, y se inició la investigación sobre su papel a nivel central [64, 66-70].

1.2.1. PAPEL FISIOLÓGICO Y TERAPÉUTICO DEL rCB1 EN ANSIEDAD Y DEPRESIÓN

En el modelo animal de estrés crónico leve (ECL), paradigma experimental ampliamente aceptado como un modelo animal de depresión [71], se observan alteraciones en la expresión del rCB₁ en regiones cerebrales estrechamente relacionadas con rasgos depresivos, como el estriado ventral e hipotálamo [72-74]. Curiosamente, los cambios en la expresión del rCB₁ son diferentes en función del sexo [74].

Diversos estudios realizados con ratones desprovistos del gen del rCB₁ (CB₁ -/-) demuestran como la ausencia de este receptor se relaciona con un fenotipo ansiogénico y depresogénico caracterizado por una mayor retención de memorias emocionales aversivas [75-78], disminución de la actividad sexual, de la ingesta de comida y pérdida de peso [79, 80], mayor vulnerabilidad frente a estímulos depresogénicos en pruebas como la natación forzada [81] y suspensión por la cola [82], anhedonia [83, 84] e hipersensibilidad al estrés en los paradigmas laberinto elevado en cruz, caja clara-oscura, campo abierto e interacción social y rasgos cognitivos [85-90]. Por el contrario, otros grupos de investigación no han observado cambios ante estímulos ansiogénicos [76, 91, 92]. Estas diferencias pueden deberse a diversos factores, como el tipo de modelo animal empleado. Por lo que, dependiendo de la situación estresante ésta podría o no desencadenar la producción de cannabinoides endógenos y éstos, a su vez, provocar una alteración de los mecanismos implicados en la respuesta al estrés [86].

Además de las alteraciones comportamentales, la ausencia del rCB₁ se asocia con cambios en dianas relacionadas con la respuesta al estrés, ansiedad y depresión. Por ejemplo, los ratones CB₁KO presentan una menor neurogénesis en el HIPP como consecuencia de la disminución de los niveles de BDNF [82, 93, 94]. De igual manera, los ratones CB₁KO muestran menores niveles del transportador de serotonina (5HTT) [95]. Curiosamente, la administración local de BDNF en el HIPP de estos animales revierte el fenotipo depresogénico [82]. Por otro lado, se han identificado alteraciones en la expresión génica de las subunidades gabaérgicas alfa 2 y gamma 2 que explicaría, al menos en parte, la ausencia de un efecto ansiolítico en estos roedores tras la administración de la benzodiazepina bromazepam y el ansiolítico buspirona [89].

Adicionalmente, la manipulación farmacológica mediante el uso de agonistas y/o antagonistas del rCB₁ ha permitido examinar sus efectos en diferentes paradigmas experimentales empleados para evaluar conductas ansiosas y depresogénicas en roedores. Los resultados indican que dependiendo de las dosis empleadas se producen efectos contrarios [96, 97]. La activación del rCB₁, mediante la administración del agonista CP-55,940 a dosis bajas, reduce los rasgos de ansiedad mientras que a mayor dosis se observa un efecto ansiogénico [98]. Un estudio posterior mostró como el efecto ansiolítico a bajas dosis con el agonista CP-55,940 estaba mediado por las neuronas glutamatérgicas corticales, mientras que la actividad ansiogénica a altas dosis lo mediaban los receptores GABA_B y rCB₁ en las terminales gabaérgicas [99].

Además del GABA, el rCB₁ se encuentra implicado en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) [100], principal mecanismo de respuesta ante estímulos estresantes. Los rCB₁ participan tanto en la activación como en la inhibición del eje. La activación de los rCB₁

presinápticos media una gran variedad de acciones de los glucocorticoides, especialmente la retroalimentación negativa del eje HPA que ejerce el cortisol y la movilización del 2-AG, para restaurar la homeostasis [101-103]. La administración sistémica de agonistas del rCB1 produce efectos bifásicos sobre la activación del eje HPA; bajas dosis reducen mientras que dosis elevadas aumentan los niveles circulantes de corticosterona en roedores. También se ha observado un aumento de los niveles de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) y glucocorticoides circulantes en la sangre, de la expresión génica del factor liberador de corticotropina (CRF) y proopiomelanocortina (POMC, precursor de ACTH) [81, 104-106]. Asimismo, el antagonismo del rCB1 aumenta los niveles de CORT y ACTH en rata. Estos cambios también se han observado en ratones CB1 ^{-/-}, donde los niveles plasmáticos de corticosterona y la expresión del CRF en el núcleo paraventricular aumentan. Estos cambios se acompañan de una reducción de la expresión génica de los receptores de glucocorticoides en la región CA1 del HIPP [82, 107]. El aumento de la actividad del eje HPA que induce dosis altas de agonistas del rCB1 parece ser secundario a la activación de vías noradrenérgicas y serotoninérgicas centrales [108].

La administración aguda y crónica de agonistas del rCB₁, puede evocar respuestas antidepresivas, disminuyendo el tiempo de inmovilidad en los paradigmas de la natación forzada y suspensión por la cola [109-114]. Es interesante mencionar que el agonista ACPA (araquidonil-ciclopropilamida) puede generar rasgos ansiogénicos, pero disminuye los rasgos de depresión en el paradigma de la natación forzada [115]. Además, el efecto antidepresivo producido por los agonistas también se produce cuando se administran en regiones cerebrales específicas, como el HIPP [116] y la PFC [109]. Estudios adicionales refuerzan que la activación del rCB1 se relaciona con efectos antidepresivos [115, 117-121].

La actividad antidepresiva de los agonistas del rCB₁ se ha asociado con la inhibición de la recaptación de 5-HT, NA y DA [122-124], de la actividad enzimática de la MAO [125, 126], incrementando la frecuencia de disparo de neuronas 5-TH en la región del rafe dorsal y de NAcc en el locus coeruleus (NAcc) [109, 110, 127, 128] y aumentando la neurogénesis al incrementar los niveles de BDNF en el HIPP [113, 129-131].

En cuanto al bloqueo farmacológico del rCB1, los resultados son contradictorios. El bloqueo del rCB1 mediante el antagonista SR141716A también produce un efecto ansiolítico y ansiogénico dependiendo de la dosis administrada [85, 132-138]. Estudios empleando el antagonista del rCB1, AM251, muestran como este compuesto puede generar efectos depresogénicos de manera dosis-dependiente en ratas sometidas a la privación de sueño [139]. Sin embargo, la administración aguda del AM251 provoca efectos antidepresivos en los paradigmas de la natación forzada y de la suspensión por la cola [140]. Por otro lado, la administración aguda y crónica del antagonista del rCB₁, SR141716-A, en ratas Wistar y ratones BALB/c, produce efectos antidepresivos [81, 140-142]. Sin embargo, en otros estudios se han observado efectos contrarios, al aumentar las conductas depresivas tras su administración crónica [142]. Esto concuerda con la aparición de efectos depresivos e ideación suicida en

pacientes obesos tratados con dicho fármaco (Rimonabant®, nombre de comercialización) [143, 144].

De manera complementaria, cabe destacar que la manipulación farmacológica del rCB₁ modifica la acción ansiolítica de las benzodiazepinas, demostrando la implicación de este receptor en ansiedad. El antagonista del rCB₁, AM251, es capaz de abolir por completo los efectos ansiolíticos y reducir el efecto amnésico y sedante inducido por el alprazolam [145, 146]. Por otro lado, el agonista del rCB₁, WIN55212-2, aumenta la acción ansiolítica del diazepam, obteniéndose un efecto sinérgico [147].

El rCB₁ también está implicado en la eficacia de los fármacos antidepresivos. Los ISRS producen una reducción de la señalización del rCB₁ en el HIPP y el núcleo paraventricular [148] y un aumento en la corteza frontal [72, 149]. Otros antidepresivos, como IMAO, inducen una disminución de la función del rCB₁ en el HIPP y la corteza prefrontal [150]. Por el contrario, el tratamiento crónico con antidepresivos tricíclicos, aumenta o reduce la función del rCB₁ en diferentes regiones cerebrales [72, 151].

Curiosamente, la eficacia de los antidepresivos tricíclicos de reducir la activación del eje HPA por estrés y de acrecentar el apetito y el peso [152] está mediada, al menos en parte por el rCB₁, puesto que estos efectos se bloquean con la administración de antagonistas del rCB₁. También, se ha observado que la administración con antidepresivos ISRS en ratones carentes del rCB₁, no genera incrementos en la transmisión en las neuronas serotoninérgicas de la corteza prefrontal [153]. Por lo tanto, la integridad del rCB₁ resulta importante para el efecto de los antidepresivos.

Más recientemente, diferentes estudios han contribuido a demostrar la importancia del rCB₁ en función de la región cerebral. La modulación del rCB₁ en las regiones cerebrales de la habénula medial (MHb), el septum medial y el núcleo de la banda diagonal (MSDB) está implicada en regular la ansiedad. La eliminación específica del rCB₁ o de la enzima MAGL en el MSDB de los roedores, moduló bidireccionalmente la señalización del 2-AG en MHb ventral dando lugar a cambios comportamentales opuestos, aumentando o reduciendo la aparición de conductas ansiosas y depresivas [154]. Estos estudios indican que la supresión de la liberación de GABA en la vía MSDB-MHb ventral pudiera ser uno de los mecanismos por los cuáles los ECBs ejercen sus efectos ansiolíticos y antidepresivos. También, se ha observado que la supresión del rCB₁ en neuronas que expresan CRF no ejerce un efecto sobre las conductas hacia el miedo o ansiedad en condiciones basales o posteriores a un evento traumático en roedores. Sin embargo, sí observaron que había diferencias significativas en la respuesta al sobresalto en los roedores machos [155]. Por lo que el rCB₁ tiene un papel importante en la interacción entre el sistema SCE y la regulación de la respuesta al estrés a través de las neuronas que expresan CRF.

Por otro lado, la administración de AEA, ACEA (agonista selectivo del rCB₁) o AM404 (inhibidor de la recaptación de AEA) en la región dorsolateral de la materia gris periacudectal presentó un efecto ansiolítico en diferentes modelos animales, el cuál fue bloqueado por el antagonista AM251, demostrando la implicación del rCB₁ [156-159]. Adicionalmente, el rCB₁

también media los efectos ansiolíticos inducidos por el 2-AG en el hipotálamo dorsomedial [160]. Asimismo, se ha observado que la activación del rCB₁ por el 2-AG en la amígdala basolateral (BLA) tiene una función importante sobre los efectos de la liberación de glucocorticoides por estrés ya que suprime la inhibición sináptica gabaérgica [161].

Otro estudio, reveló que la expresión del rCB₁ media las acciones del 2-AG en la habénula lateral en rata después de la exposición a un estrés agudo [162]. De igual manera, la administración del agonista del rCB₁, WIN-55,212, en la región del septo lateral produce respuestas ansiogénicas mediadas por el rCB₁ en el laberinto elevado en cruz y la administración de AM251 bloqueaba dicho efecto [163].

De manera complementaria, estudios adicionales han reforzado el papel del rCB₁ en áreas corticolímbicas como la corteza prefrontal, amígdala, núcleo accumbens e hipocampo [164-170]. Aunado a esto, se ha observado la conexión entre el rCB₁ con la liberación de neurotransmisores como la noradrenalina (NA) en el locus ceruleus y la serotonina (5HT) en el núcleo dorsal del rafe por una modulación de las terminales gabaérgicas y glutamatérgicas [171, 172].

En humanos, uno de los primeros estudios realizado en pacientes con trastorno de ansiedad evaluó los efectos del agonista parcial del rCB₁, nabilona, observándose una mejoría [173]. Posteriormente, se observó mediante las técnicas de imagen por resonancia magnética funcional y la tomografía de emisión por positrones (fMRI y PET, respectivamente) que los rasgos de ansiedad inducidos por la administración oral de THC son modulados por el rCB₁ en la AMY [174].

Adicionalmente, el polimorfismo rs7766029 del *CNR1*, se ha relacionado con una mayor vulnerabilidad por desarrollar depresión o ansiedad ante la exposición a un evento estresante [175]. Otro grupo de investigación analizó la interacción de las regiones promotoras de los genes del transportador de serotonina (*5-HTTLPR*) y de polimorfismos de *CNR1* asociados a la ansiedad. El alelo G del SNP rs2180619 en combinación con el polimorfismo *5-HTTLPR* SS se asociaron estrechamente con un riesgo alto de ansiedad. Además, se observó que cierto tipo de constelaciones de promotores para el rCB₁ y del transportador de serotonina 5-HTT promueven niveles extremadamente altos o bajos en las concentraciones sinápticas de 5HT, lo que podría relacionarse con mayor vulnerabilidad a experimentar un trastorno de ansiedad y depresión [176].

En el caso de pacientes con depresión, estudios postmortem han evidenciado una disminución en los niveles de expresión del rCB₁ en la corteza cingulada anterior [177], mientras que se observan niveles altos en la PFC [178]. Además, se ha encontrado una menor expresión proteica del rCB₁ en pacientes con depresión en la corteza prefrontal con respecto a los sujetos controles [179].

En cuanto a polimorfismos del rCB₁ se ha identificado una alta frecuencia en pacientes depresivos [180], relacionándose con una mayor vulnerabilidad [181]. Un estudio corroboró que los pacientes portadores del polimorfismo *CNR1* rs1049353 (G1359A) presentan mayor susceptibilidad por padecer algún trastorno emocional [182]. El alelo G está asociado con un mayor grado de sintomatología depresiva [183] y de generar resistencia al tratamiento

antidepresivo en mujeres con una comorbilidad de ansiedad [184]. Contrariamente, la presencia de dicho polimorfismo en hombres se asocia con una mejor respuesta al tratamiento antidepresivo con citalopram [185]. Aunado a esto, el alelo A del polimorfismo *CNR1* rs1049353 disminuye estos factores de riesgo [186].

1.2.2. PAPEL FISIOLÓGICO Y TERAPÉUTICO DEL rCB₂ EN ANSIEDAD Y DEPRESIÓN

Debido a la localización del rCB₂ en regiones cerebrales corticales y del sistema límbico (HIPP, AMY) [64, 187, 188], diferentes investigaciones se han centrado en esclarecer su papel fisiológico y terapéutico en una variedad de patologías psiquiátricas. El rCB₂ se encuentra implicado en esquizofrenia [67, 70, 189], alteraciones cognitivas [190], respuesta al estrés, trastornos de ansiedad y depresión [65, 187, 191-193].

En lo referente a los trastornos de ansiedad y depresión, gran parte de estos hallazgos provienen de estudios en los que se han empleado diferentes modelos y paradigmas experimentales en roedores que permiten evaluar la respuesta al estrés, observándose alteraciones en la expresión del rCB₂ en regiones cerebrales como HIPP, AMY, corteza frontal, estriado ventral y dorsal. Dentro de estos modelos podemos mencionar el modelo de privación materna, que permite evaluar los efectos tardíos del estrés ocasionado en las primeras etapas de la vida. Se han hallado cambios en la expresión y funcionalidad del rCB₂ [194]. En otro estudio se ha observado un incremento en la expresión del rCB₂ en el HIPP y corteza prefrontal [195]. De manera complementaria, en el modelo de ECL, se ha hallado una reducción de la expresión del rCB₂ en el HIPP de ratones [65]. En ratas sometidas a una bulbectomía olfatoria (OBX, por sus siglas en inglés), modelo de depresión, se ha observado una reducción de los niveles de expresión del rCB₂ en la PFC y en el HIPP (Smaga et al., 2017a). Asimismo, la administración crónica (14 días) con antidepresivos como el escitalopram (ESC 10 mg/kg) o la tianeptina (TIA 10 mg/kg), aumenta los niveles de expresión del rCB₂ en dichas regiones cerebrales (Smaga et al., 2017b).

Es de interés destacar que las alteraciones del rCB₂ como consecuencia de estímulos estresantes, también dependen del sexo. En un estudio realizado en ratas de ambos sexos expuestas al ECL, se observó una mayor reducción del rCB₂ en el HIPP de las hembras en comparación con los machos [196]. Asimismo, los cambios inducidos por la privación materna son diferentes en función del sexo, observándose un aumento de la expresión del rCB₂ en la corteza frontal, estriado ventral y dorsal, HIPP y AMY en los machos; si bien, en las hembras sólo se reflejaba este aumento significativo en el HIPP [197].

El empleo de ratones modificados genéticamente también ha permitido esclarecer el papel del rCB₂ en ansiedad y depresión. Ratones que sobreexpresan el rCB₂ en neuronas y glía (CB₂xP) presentan una mayor resistencia frente a estímulos ansiogénicos y depresogénicos [65] mientras que ratones desprovistos del rCB₂ (CB₂ -/-) se caracterizan por una mayor vulnerabilidad frente a los mismos [70]. En este sentido, cabe señalar que la administración intracerebroventricular de un oligonucleótido antisentido del rCB₂ induce efectos ansiolíticos [198].

De manera complementaria, estudios farmacológicos empleando agonistas y/o antagonistas del rCB₂ refuerzan la implicación de este receptor cannabinoide en ansiedad y depresión. La administración del agonista selectivo JWH015 [199] y del agonista no-selectivo WIN55,212-2 [98] produce un efecto ansiolítico. No obstante, la administración crónica del JWH015 induce efectos contrarios. Otros estudios empleando el agonista del rCB₂ beta-cariofileno muestran como este compuesto induce efectos ansiolíticos, los cuáles se revierten tras la administración previa del antagonista/agonista inverso del rCB₂, AM630, a dosis que no tiene efecto por sí mismo, corroborando la participación del rCB₂ en los efectos del beta-cariofileno [200, 201]. Asimismo, a dosis de 1 y 3 mg/kg, la administración aguda del AM630 presenta un efecto ansiogénico, que también es bloqueado si previamente se administra el agonista del rCB₂, el JWH133 [65].

De manera crónica, el JWH133 ejerce un efecto ansiogénico y, contrariamente, el AM630 presenta un efecto ansiolítico en ratones en las pruebas de la caja clara-oscuro y el laberinto elevado en cruz [65]. En este mismo estudio, se observó que la administración crónica de AM630 producía un incremento en la expresión proteica del rCB₂, GABA_Aα₂ y GABA_Aγ₂ en la AMY y corteza, mientras que el JWH133 ejercía el efecto contrario. El conjunto de estos resultados indica que los efectos del agonismo y antagonismo del rCB₂ depende de la duración del tratamiento. De manera aguda, los agonistas del rCB₂ presentan efectos ansiolíticos mientras que, en tratamientos crónicos, serían los antagonistas.

En cuanto a la administración de fármacos que actúan sobre el rCB₂ en modelos animales de depresión, existen resultados contradictorios. Por un lado, la administración aguda del AM630 en la prueba de la natación forzada presenta efectos antidepresivos al reducir el tiempo de inmovilidad a todas las dosis empleadas (1 y 3 mg/kg, ip) [65]. Cinco años después, otro estudio sugirió que la administración aguda del agonista del rCB₂ JWH133 (0.5 y 0.1 mg/kg) y del AM630 (0.5 mg/kg) presentaban una acción antidepresiva en la prueba de la natación forzada. Curiosamente, los efectos del JWH133 se bloquearon con la administración previa del AM630 a una dosis en la que no produce efecto por si mismo, reforzando la implicación del rCB₂ en los efectos del JWH133 [202].

Por otro lado, la administración de AM630 (3 mg/kg/24h) no ejercía efecto en el consumo de sacarosa en los roedores BALB/c expuestos al ECL [203]. Sin embargo, en otro estudio, la administración crónica, durante 4 semanas, del AM630 induce efectos antidepresivos, así como un aumento de la expresión del rCB₂ y del BDNF en el HIP de ratones expuestos al modelo ECL [65].

Cabe destacar que la manipulación farmacológica y genética del rCB₂ promueve respuestas neuroinflamatorias estrechamente relacionadas con la depresión. El JWH133 es capaz de prevenir las respuestas desencadenadas por un estrés inducido, ya que impidió el incremento de citoquinas proinflamatorias. También se observó que los ratones CB2XP presentan mayor protección frente a los daños producidos por la exposición al estrés. Sin embargo, los ratones CB2KO presentaban una mayor exacerbación de las respuestas neuroinflamatorias inducidas por el estrés [204].

El estrés crónico también incrementa el 2-AG, ligando endógeno del rCB_2 , en varias regiones cerebrales: AMY [205, 206], corteza prefrontal [63], hipotálamo [207] y el HIPP [208]. La administración crónica de corticosterona (20 mg/kg; 3 semanas) en ratas produce un incremento del 2-AG en la AMY [209]. Además, mediante el uso del ECL, este mismo grupo de investigación observó que el 2-AG disminuye significativamente en el HIPP [210]. Sin embargo, en el modelo del condicionamiento al miedo se observó que las concentraciones del 2-AG aumentaban significativamente en el HIPP, hipotálamo y la corteza frontal en ratones tras 7 sesiones de exposición al estímulo estresante [211].

Asimismo, los cambios en el 2-AG se relacionan con cambios en elementos del eje HPA. Tal es el caso del aumento del 2-AG y corticosterona en la corteza prefrontal media [212] y AMY [213], así como aumentos del 2-AG con el receptor de glucocorticoide en el HIPP como consecuencia del estrés [214]. En otro estudio se identificó una relación entre mayores niveles de 2-AG en AMY y mayores rasgos de ansiedad en ratas. Curiosamente, la administración farmacológica en la amígdala basolateral (BLA, por sus siglas en inglés) del inhibidor de la hidrólisis del 2-AG, KML29, redujo los comportamientos de tipo ansiogénico, especialmente bajo la presencia o en condiciones de adversidad ambiental [215].

Por otro lado, un estudio sugiere que la administración conjunta de dosis no efectivas de AM630 con antidepresivos atípicos (agomelatina y TIA), de manera aguda, presenta efectos antidepresivos en el paradigma de la natación forzada pero no en la suspensión por la cola [216]. En otro estudio, el efecto antidepresivo del escitalopram (10 mg/kg/día, 21 días), al ser coadministrado con AM630 (0.30 mg/kg), se redujo significativamente pero el efecto ansiolítico permaneció. Esta coadministración afectó a la proteína encargada de la migración neuronal, doblecortina, provocando una disminución de su expresión en las capas subgranulares y granulares del giro dentado. Esta atenuación de la neuroplasticidad en el HIPP sugiere que los efectos antidepresivos y pro-neurogénicos pero no los de carácter ansiolítico, promovidos por la acción de un antidepresivo están mediados por los rCB_2 [217].

En humanos, en un estudio postmortem realizado en suicidas, sin diagnóstico o tratamiento psiquiátrico alguno, se observó una menor expresión génica del rCB_2 en la corteza prefrontal dorsolateral y en la AMY, regiones implicadas en la toma de decisiones, impulsividad y reactividad emocional [218]. Esto otorga una importancia al papel del rCB_2 en la neurobiología del suicidio, estrechamente relacionado con los trastornos depresivos. No obstante, en otro estudio no se detectó ningún cambio en los niveles de expresión génica del rCB_2 en la corteza prefrontal dorsolateral (DLPFC, por sus siglas en inglés) de suicidas [178], si bien los pacientes recibían tratamiento, por lo que las discrepancias entre ambos estudios podrían deberse a las diferencias clínicas de los pacientes.

Además, existen evidencias de una alta incidencia de polimorfismos del rCB_2 en pacientes diagnosticados con trastorno depresivo. Tal es el caso del polimorfismo *CNR2* Q63R [199] así como del rs201210941 [219], ambos encontrados en pacientes japoneses con depresión mayor. También se ha identificado la existencia de más variantes, como es el *CNR2* rs2501432, el cual confiere un mayor riesgo por sufrir algún trastorno depresivo [220]. En otro estudio, se corroboró

que portadores de la variante *CNR2* rs2501431 presentan mayor puntaje en la Escala de Depresión Hamilton [185]. Las variantes genotípicas funcionales del rCB₂ y FAAH, R63Q y C385A respectivamente, también se relacionan con un mayor riesgo de depresión y ansiedad [221].

1.1.3. PAPEL FISIOLÓGICO Y TERAPÉUTICO DEL GPR55 EN ANSIEDAD Y DEPRESIÓN

Otra diana de interés es el receptor GPR55, que forma parte de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) [222, 223]. Es una proteína de 319 aminoácidos que fue identificada y clonada en 1999 [224]. Se caracterizó como receptor “huérfano”, al no identificarse un ligando específico que actúe sobre él. Sin embargo, se ha observado que este receptor es diana de cannabinoides endógenos (AEA y 2-AG) y exógenos (HU-210 y CP55,940) [225, 226]. Asimismo, el GPR55 forma complejos de heteromerización con los receptores rCB₁ [227, 228] y rCB₂ [229], convirtiéndolo en una diana de interés en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson [230], Alzheimer [231], y psiquiátricas como ansiedad y depresión [218, 232-235], entre otras [236, 237].

El GPR55 se encuentra expresado en numerosas células y tejidos del sistema nervioso central [238], tanto en neuronas como en glía [239]. Algunas de las regiones en la que se expresa son el ganglio de la raíz dorsal [41], el HIPP [240], núcleo caudado y putamen, núcleo accumbens [230], estriado [241], sustancia gris periacueductal [242], tálamo, cerebelo, corteza frontal e hipotálamo [43, 45, 224]. Algunas de sus implicaciones son en el desarrollo retinotalámico, en el crecimiento axonal [243] y en nocicepción [242, 244].

El primer ligando endógeno identificado para el receptor GPR55 fue el lípido L- α -lilfosfatidilinositol (LPI) [245], el cual no actúa sobre los rCB₁ y rCB₂ [41, 223, 227, 245]. Este compuesto promueve la protección del giro dentado en HIPP tras una lesión toxicológica, estudio que ha demostrado que el GPR55 está implicado en la comunicación entre la microglía y neuronas [246].

Una de las funciones que se ha observado de este receptor es que tras su activación permite la movilización intracelular de calcio (Ca²⁺) de manera dependiente en las neuronas presinápticas de la región del HIPP, mientras que la eliminación genética o el bloqueo farmacológico del GPR55 anula dicha movilización [246]. Asimismo, la activación del GPR55 estimula el factor nuclear calcineurínico (NFAT, por sus siglas en inglés), implicado en estimular la respuesta del sistema inmunológico en procesos neurodegenerativos como en la enfermedad de Alzheimer [247] y de Parkinson [248].

Estudios preliminares señalan la participación directa del GPR55 en ansiedad. En un primer estudio se identificó un incremento en la expresión del GPR55 en el HIPP de ratas hembras y en la corteza frontal en machos adolescentes tras la exposición al modelo de privación materna [197].

Estudios farmacológicos indican que la administración intracerebroventricular del agonista del GPR55, O-1602, produce una acción ansiolítica, que fue bloqueada por la administración previa del antagonista del GPR55, ML-193 [249]. En concordancia con lo anterior, en otra investigación

posterior se observó que el O-1602 disminuyó el comportamiento ansiogénico en ratones estresados, efecto que fue atenuado por la eliminación selectiva del GPR55 en la corteza orbitofrontal. Asimismo, administraron Y-27632 y U73122, el primero, un inhibidor selectivo de la proteína cinasa asociada a Rho y el segundo, un inhibidor de la fosfolipasa C (ROCK y PLC, por sus siglas en inglés; respectivamente). En ambos casos, la efectividad ocasionada por el O-1602 se vio atenuada. De esta manera, estos datos sugieren que el GPR55 desencadena, al menos, la activación dos vías de señalización, la vía $G_{\alpha 12/13}$ -RhoA-ROCK y la vía $G_{\alpha q}$ -PLC-PLK, estando ambas relacionadas con la alteración de la expresión de los receptores de glutamato, GluA1 y GluN2A, en la corteza orbitofrontal medial de ratones [250]. Por otro lado, el bloqueo del GPR55 mediante la administración del antagonista ML-193 aumenta los rasgos de ansiedad y evoca respuestas agresivas defensivas en ratas expuestas previamente a un consumo crónico de alcohol [251].

No obstante, en un estudio previo en ratones carentes de este receptor, GPR55 KO, no se detectó una diferencia en los rasgos de ansiedad y actividad motora al compararlos con los ratones controles [252].

También se ha estudiado la implicación del GPR55 en la respuesta neuroinflamatoria y en la alteración de neurogénesis en el HIPP. En el paradigma de derrota social por estrés crónico, no solo se observaron conductas ansiogénicas y depresivas en los roedores, sino que la expresión de GPR55 disminuyó significativamente en el HIPP en los ratones vulnerables, mientras que la expresión de citocinas proinflamatorias aumentó (IL-1 β , IL-6, iNOS y TNF α) y las citocinas antiinflamatorias disminuyeron (IL-4 e IL-10). También, se identificó un deterioro en la neurogénesis del HIPP [235].

El GPR55 promueve efectos pro- y antiinflamatorios dependiendo de la causa de la inflamación y de la región afectada en el organismo. En particular, se ha observado que la expresión de GPR55 está regulada a la baja tras un tratamiento con LPS o IFN γ [239], muestra una actividad neuroprotectora de manera dependiente de la microglía [246], y regula la proliferación y diferenciación de precursores neurales. El tratamiento con el agonista O-1602 bloquea la reducción del número de neuronas causada por la IL-1 β *in vitro* y por la inflamación crónica producida por LPS *in vivo* [253]. Además, otras evidencias científicas sugieren que la activación del GPR55 aumenta la liberación de neurotransmisores y modula la plasticidad sináptica en la región CA1 del HIPP [240, 254]. Más recientemente, se ha demostrado que la administración intravenosa de este mismo agonista durante 7 días reduce la conducta depresiva y la neuroinflamación en ratas Wistar [255].

En humanos, en un estudio postmortem realizado en pacientes fallecidos por suicidio, sin diagnóstico de patología psiquiátrica previa y sin tratamiento con psicotrópicos, se detectó una reducción de la expresión génica del rCB $_2$ y del GPR55 en la DLPFC [218]. Asimismo, se demostró por primera vez la co-expresión de dímeros entre el rCB $_2$ y el GPR55 en neuronas y astrocitos en dicha región cerebral, estando aumentado el número de dímeros en los suicidas. Estos resultados sugieren una estrecha colaboración entre ambos tipos de receptores.

1.2.4. FITOCANNABINOIDES: CANNABIDIOL

Durante los últimos años se ha estudiado la potencial utilidad terapéutica del CBD en diferentes enfermedades, destacando su eficacia antimicrobiana, inmunosupresora, antiemética, antirresortiva, espasmolítica, antitumoral, antifibrótica, antiinflamatoria y anticonvulsivante [24, 25, 256, 257]. Actualmente hay dos fármacos aprobados que contienen CBD. El Sativex, indicado para el tratamiento de la espasticidad en la esclerosis múltiple (Sativex®, [258]) y, el Epidiolex®, para el tratamiento de las convulsiones asociadas con el síndrome de Lennox-Gastaut o Dravet en niños [259]. Además, otros informes sugieren que el CBD puede ser útil para tratar trastornos neurodegenerativos [260-263] y psiquiátricos [24, 55, 264]. Tanto estudios en animales como clínicos han señalado la importancia de las propiedades que presenta el CBD para los trastornos de ansiedad, depresión y psicosis.

1.2.4.1. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS DEL CBD

Como la mayoría de los fitocannabinoides, el CBD presenta una alta liposolubilidad ($k_{w/o}$ 6-7) y baja biodisponibilidad (6-19%) [265] debido principalmente al metabolismo de primer paso, por lo que se recomienda administrarlo junto con la comida. El CBD presenta una alta distribución (Vd: 32 L/kg) con gran acumulación en cerebro y tejido adiposo, debido a su alta liposolubilidad [266-268]. El CBD se metaboliza en el hígado mediante oxidación, β -oxidación, hidroxilación, conjugación con glucurónido y epoxidación [265, 269] y se elimina por orina sin metabolizar o como derivado de glucurónidos [265, 269, 270]. Existen diferentes metabolitos del CBD (alrededor de 53), algunos de ellos en estudio para determinar su potencial implicación en sus acciones terapéuticas. Finalmente, las evidencias sobre su seguridad y tolerabilidad se limitan a estudios preclínicos y clínicos. No se han descrito efectos secundarios significativos [271, 272] solo diarrea, somnolencia y disminución del apetito informados en los ensayos clínicos en niños con Síndrome de Lennox-Gastaut [259]. El CBD es un potente inhibidor competitivo de ciertas isoformas del citocromo P450 (CYP2C y CYP3A), lo que aumenta el riesgo de interacciones farmacológicas cuando se administra junto con otros fármacos como son el midazolam, omeprazol, rufinamida, sirolimus, tacrolimus, tamoxifen, topiramato, warfarina, zonisamida, y la fenitoína aumentando su concentración plasmática, y algunos medicamentos sedantes como el clobazam que aumenta la incidencia de los efectos de somnolencia y sedación [265, 269, 270, 273].

1.2.4.2. PROPIEDADES FARMACODINÁMICAS DEL CBD

El CBD tiene la peculiaridad de actuar en más de 65 dianas terapéuticas, dentro de las que se incluye el receptor serotoninérgico 1A (5-HT_{1A}), el GPR55, el TRPV1, la proteína de unión de ácidos grasos, los canales de calcio activados por voltaje tipo T, los receptores de adenosina y glicina, y los receptores opioides mu y delta, entre otros [274].

En estudios *in vivo* se ha demostrado que el CBD presenta baja afinidad por los dos receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ [22, 23, 275]. Aunque se ha observado que actúa más como un modulador alostérico negativo del rCB₁ [276]. En contraste, algunos estudios indican que el CBD inhibe la recaptación de AEA y su metabolización por la FAAH, incrementando los niveles de AEA, la cuál activaría al rCB₁ [277]. En el caso del rCB₂, el CBD parece actuar como agonista inverso o antagonista [278]. En los receptores GPR55 actuaría como antagonista [240, 279, 280].

El CBD parece inhibir la recaptación de dopamina y glutamato [281, 282], y modula alostéricamente a los receptores opioides mu y delta [283, 284]. Actúa como agonista parcial de los receptores de dopamina D₂, reforzando su potencial efecto antipsicótico [285, 286]. Además, estudios *in vivo* han demostrado que el CBD induce respuestas fisiológicas a través de los receptores de serotonina 5-HT_{1A} [287, 288], una diana importantemente inmiscuida en los trastornos de ansiedad y depresión.

1.2.4.3. PAPEL DEL CBD EN TRASTORNOS DE ANSIEDAD Y DEPRESIÓN

Las posibles propiedades ansiolíticas y antidepresivas del CBD se han examinado en varios modelos animales desde finales de los años 1970. Se ha demostrado que el CBD induce un efecto ansiolítico que sigue una curva en forma de “U” invertida, resultando eficaz en dosis intermedias, pero no a dosis bajas o altas [289-291]. El CBD también atenúa las respuestas fisiológicas y conductuales a situaciones estresantes, reduciendo el estrés y las respuestas cardiovasculares y ansiogénicas [292] al bloquear la activación del eje HPA [293] (101) y activar el receptor 5-HT_{1A} [292].

Resultados complementarios indican que la cepa y el patrón de administración (agudo o crónico) pueden afectar las acciones del CBD. En ratones macho C57BL/J y ratas espontáneamente hipertensas, el CBD no logró inducir ningún efecto [291, 294]. Sin embargo, el tratamiento crónico con CBD indujo un efecto ansiolítico [295].

La administración de CBD también produce efectos diversos en regiones específicas del cerebro. Las microinyecciones en el núcleo del lecho de la estría terminal [296] y la sustancia gris periacueductal [297, 298] mostraron efectos ansiolíticos. Por otro lado, la inyección del CBD en la corteza prefrontal medial bloqueó la activación autonómica y las respuestas ansiogénicas [299, 300]. Estos efectos parecen estar relacionados con los receptores 5-HT_{1A} [296, 298, 299].

Junto con sus propiedades ansiolíticas, el CBD también ha demostrado tener eficacia antidepresiva en diferentes modelos animales de depresión, induciendo un efecto antidepresivo cuando se administra solo [301] o en combinación con dosis subeficaces de los antidepresivos fluoxetina o desipramina [180], principalmente a través de la activación de los receptores 5-HT_{1A} [301]. Más importante aún, el CBD mostró un efecto antidepresivo rápido y sostenido. Una dosis única de CBD indujo un efecto antidepresivo dependiente de la dosis en ratones Swiss, incluso 7 días después de su administración. Se han encontrado también resultados similares en ratas Flinders Sensibles (FSL) y Resistentes (FRL) y ratas Wistar [302]. También se han asociado cambios en la neuroplasticidad en la PFC e HIPP tras la administración de CBD. Este efecto implica la activación de la señalización del receptor quinasa B de tropomiosina/en mamíferos de

rapamicina (TrkB/mTOR). Otro estudio apoya la implicación de mecanismos epigenéticos en las propiedades antidepresivas del CBD [303].

En ratones C57BL/6J sometidos a una bulbectomía olfativa, un modelo de depresión en roedores, la administración única y crónica de CBD indujo efectos ansiolíticos y antidepresivos acompañados de aumentos de los niveles de serotonina y glutamato en la PFC y de la función del receptor 5-HT_{1A} en la región del rafe dorsal, en las regiones CA1 y CA2 del HIPP, AMY y PFC medial [304]. De igual manera, se observaron respuestas similares en ratas Wistar [305], ratas Wistar-Kyoto, en un modelo genético de depresión [306] y en modelos que mostraban síntomas similares a los depresivos como en las ratas diabéticas y normoglucémicas [307].

Por último, también se han evaluado los efectos del CBD en el modelo de ECL, diferentes dosis y vías de administración de CBD previnieron comportamientos ansiogénicos y depresogénicos, aunado a efectos de neuroprotección [308-310] por medio del rCB₁ y rCB₂ [308, 311] (116, 131).

En humanos, las primeras evidencias indicaron que el CBD aliviaba la ansiedad inducida por THC en voluntarios sanos [312, 313]. Posteriormente, en otro estudio clínico se observó que la administración oral de CBD disminuyó la ansiedad en sujetos sanos en la prueba de simulación de hablar en público [314]. De manera complementaria, en otro estudio doble ciego, el CBD redujo significativamente la ansiedad subjetiva, evaluada mediante la escala visual analógica del estado de ánimo. Estos efectos se asociaron con una menor actividad en la parte temporal medial (complejo amígdala-hipocampo izquierdo, que se extiende hasta el hipotálamo) y en la circunvolución del cíngulo posterior izquierdo, y con una alta actividad en la circunvolución parahipocampal izquierda.

En un ensayo doble ciego, aleatorizado y con grupo placebo realizado en voluntarios sanos que habían consumido cannabis sativa 15 veces o menos, el CBD no indujo ninguna alteración en la activación cerebral regional ni conductual en la tarea de aprendizaje verbal en comparación con el placebo [315].

También se ha evaluado la eficacia ansiolítica del CBD en pacientes diagnosticados con ansiedad generalizada que no habían recibido tratamiento previo, donde el CBD redujo la ansiedad subjetiva [316, 317].

En una gran serie de casos retrospectivos que incluyeron a pacientes psiquiátricos cuya principal preocupación era la ansiedad o la falta de sueño, se observó que el CBD disminuía la ansiedad de manera rápida y sostenida, además de mejorar los trastornos del sueño durante el primer mes de tratamiento [318]. Resultados adicionales respaldan las propiedades ansiolíticas del CBD reduciendo la ansiedad y los síntomas de abstinencia a cannabis [319].

En cuanto a las evidencias de las acciones antidepresivas del CBD en humanos aún son escasas. En pacientes con neurofibromatosis y con dolor musculoesquelético asociado a enfermedades reumatoides, el CBD funcionó como estabilizador del ánimo [320, 321]. Sin embargo, en pacientes con fibromialgia no se encontraron cambios estadísticamente significativos [322]. Curiosamente, el CBD de manera oral, disminuyó significativamente los estados depresivos y psicóticos en consumidores de cannabis [323] (164), mejorando la

atención, el aprendizaje verbal y la memoria [324]. En pacientes con abstinencia al cannabis, redujo significativamente la depresión [319].

En otro ensayo aleatorio, doble-ciego y con placebo, publicado a finales del año pasado, se incluyeron a un total de 35 participantes para identificar la eficacia del CBD (150 y 300 mg/día) en la depresión bipolar. Las puntuaciones en la escala de depresión de Montgomery-Asperg disminuyeron significativamente desde el inicio hasta el final (placebo, -14,56; CBD -15,38), pero no hubo diferencias significativas entre los grupos CBD. Sin embargo, en un estudio exploratorio se mostró un efecto significativo cuando se administraba una dosis de 300 mg/día de CBD en las puntuaciones de dicha escala desde la segunda semana hasta la octava (placebo -6,63; CBD -13,72) sin tener diferencias significativas en el desarrollo de síntomas maníacos, por lo que se sugirió un estudio más a fondo con dosis más altas que pudieran controlar mejor la respuesta en los pacientes [325].



1.3. Modelos animales de ansiedad y depresión

Los modelos animales facilitan el estudio de estas patologías a través de la simulación de algunos signos y síntomas permitiendo la caracterización de los elementos implicados en la neurobiología y etiopatogenia del trastorno, la identificación de posibles dianas terapéuticas, la predicción del curso de la enfermedad, así como la extrapolación a un posible tratamiento en pacientes.

Para poder alcanzar todos estos objetivos, el modelo animal debe de cumplir los siguientes criterios de validez [326, 327]:

- 1) *Validez de semejanza o analogía*: Compara la semejanza entre la conducta observada en el modelo animal con la sintomatología observada en el trastorno afectivo. Una de las principales desventajas es la simulación de los síntomas subjetivos como euforia, actitud depresiva, fatiga, falta de valor, culpa e ideación suicida, entre otras; ya que la mayoría de los modelos están condicionadas a medir sólo un número limitado de éstas.
- 2) *Validez causal y validez de constructo*: Que los elementos que inducen el modelo animal corresponden con los elementos desencadenantes del trastorno afectivo, basado en conocimientos previos. Debido a la escasez de conocimiento sobre el origen y la fisiopatología de los trastornos afectivos, los modelos animales facilitan la investigación sobre los posibles elementos causales y su neurobiología.
- 3) *Validez de predicción o correlación*: Se refiere a la correlación de los efectos de los fármacos en el modelo animal con lo observado en la clínica.

1.3.1. PARADIGMAS EMPLEADOS PARA EVALUAR LA ANSIEDAD

Los modelos de ansiedad se basan en el desarrollo de conductas ansiosas ante la exposición a estímulos estresantes. Algunos ejemplos son las pruebas del laberinto elevado en cruz (EPM), caja clara-oscura (LDT) y campo abierto (OF). Estas pruebas se basan en el equilibrio entre la preferencia de los roedores por evitar la exposición a espacios abiertos y su tendencia a explorar nuevos espacios. Estas pruebas comportamentales fueron desarrolladas para detectar fármacos ansiolíticos como las benzodiazepinas.

1.1.3.1. Campo abierto (OF)

Descrito por Hall en 1934 para la evaluación de la actividad motora y rasgos ansiogénicos en un ambiente desconocido dentro del cual el animal no puede escapar [328]. Los roedores se colocan individualmente en una caja cuadrada de dimensiones específicas y se miden parámetros como la velocidad y la distancia total recorrida para realizar una evaluación motora. Como consecuencia de la aversión innata ante los espacios abiertos e iluminados, los roedores evitan la zona central, de tal manera que la distancia recorrida y la velocidad en la zona central se consideran parámetros representativos de ansiedad. Este paradigma ha permitido evaluar la respuesta de diferentes fármacos ansiolíticos como benzodiazepinas.

Además, dado que otras pruebas empleadas para la evaluación ansiogénica requieren la realización de determinadas tareas, alteraciones de la actividad locomotora inducidos por el fármaco en estudio podría generar un sesgo a la hora de interpretar los resultados. Por tanto, el campo abierto se realiza con el objetivo de descartar posibles cambios en la actividad motora de los roedores en estudio.

1.1.3.2. Caja clara-oscura (LDB)

Este paradigma se basa en la aversión natural de los roedores por lugares iluminados y abiertos. Se emplea una caja con dos compartimentos, uno abierto y fuertemente iluminado con una intensidad de luz controlada y otro oscuro y cerrado, ambos entrelazados por un túnel opaco que permite el movimiento libre del roedor entre las dos cámaras.

Durante la prueba, el roedor es colocado en el compartimento iluminado y se mide el tiempo de permanencia en el lado claro y el número de transiciones entre los dos compartimentos durante 5 minutos. El tiempo de permanencia en el compartimento iluminado permite evaluar el nivel de ansiedad, de tal manera que, menor tiempo en el lado claro indicaría un mayor nivel de ansiedad. Fármacos ansiolíticos como las benzodiazepinas aumentan el tiempo de permanencia en el lado claro, así como agonistas y antagonistas de receptores serotoninérgicos y antagonistas de receptores de colecistoquinina [329].

1.1.3.3. Laberinto elevado en cruz (EPM)

Descrito por Montgomery [330] y modificado por Handley [331] en rata [332] y ratón [333], consiste en dos brazos cruzados y elevados respecto al suelo. Dos de los brazos son cerrados y los otros dos brazos abiertos. Su fundamento se basa en la aversión que presentan los roedores por la altura y los espacios abiertos [332]. Durante un tiempo de 5 minutos se mide el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y el número de transiciones entre los brazos abiertos y cerrados, este último indicativo de la actividad locomotora [331, 332, 334, 335]. Fármacos con potencial actividad ansiolítica, como las benzodiazepinas, permiten reducir la aversión a los brazos abiertos, aumentando el tiempo de permanencia en los mismos [336].

1.3.2. PARADIGMAS EMPLEADOS PARA EVALUAR LA DEPRESIÓN

Aunque se ha aprendido mucho sobre los circuitos neuronales que comprenden el estado de ánimo basándose en estudios de imágenes cerebrales, y se han descrito una serie de alteraciones neuroquímicas y neuroendócrinas en pacientes deprimidos, ninguna anomalía ha demostrado ser lo suficientemente sólida o consistente como para diagnosticar la depresión mayor en humanos o para validar un modelo animal. Además, los casos de depresión en pacientes son heterogéneos en términos de influencias genéticas, progresión clínica, cambios neurobiológicos y respuestas al tratamiento con antidepresivos. Estas consideraciones resaltan el desafío de construir y validar modelos animales de depresión.

Gran parte del trabajo en modelización animal se ha basado en la observación de que el estrés y las pérdidas emocionales son importantes factores de riesgo. Asimismo, una parte importante de los modelos animales de depresión evalúan rasgos como la anhedonia, reducción de la interacción social y conducta sexual, alteraciones del sueño, del ritmo circadiano y de la alimentación, comunes en pacientes con un trastorno depresivo.

A continuación, se detallan los más importantes:

1.1.3.4. MODELOS AGUDOS DE DEPRESIÓN

Las pruebas de comportamiento más ampliamente conocidas y utilizadas son la natación forzada, la suspensión por la cola, la ingesta inhibida por la novedad y la desesperanza aprendida. Sin embargo, no son modelos de depresión per se. Fueron desarrollados para detectar compuestos con actividad antidepresiva. Una limitación importante de estas pruebas es que son agudas, en contraposición con el tiempo necesario para observar un efecto antidepresivo en pacientes, que oscila entre 3-4 semanas. Por tanto, la capacidad de los antidepresivos para producir una respuesta rápida después de dosis únicas en estas pruebas contrasta dramáticamente con la necesidad bien establecida de usar antidepresivos de forma crónica para obtener una respuesta eficaz en la clínica. No obstante, estas pruebas comportamentales ayudan a identificar nuevos compuestos farmacológicos cuando son empleadas en combinación con otros modelos crónicos.

1.1.3.4.1. Natación forzada

Es el modelo animal de depresión más conocido y uno de los más utilizados de manera rutinaria en el cribaje de fármacos antidepresivos [337-339]. En esta prueba los ratones se colocan en el interior de un tanque (cilíndrico de metacrilato de 65 cm de alto por 30 cm de diámetro) lleno de agua a una temperatura de 25°C, con una separación de 14 cm entre el agua y la parte superior del tanque [340]. Durante un periodo de 5 minutos, se cuantifica el tiempo de inmovilidad como una medida de la desesperanza que experimenta el roedor ante una situación de la que no puede escapar. El tiempo de inmovilidad se reduce considerablemente en los animales tratados con antidepresivos como fluoxetina y desipramina [341], inhibidores de la óxido nítrico sintasa [342], hormonas sexuales como la progesterona [343], el neuropéptido Y [344], la melatonina [345] o el zinc [346].

1.1.3.4.2. Suspensión por la cola (TST)

De manera similar a test de natación forzada, este modelo permite evaluar la desesperanza que experimenta el roedor ante una situación de la que no puede escapar [347]. Durante esta prueba, los ratones son suspendidos por la cola midiéndose el tiempo de inmovilidad durante 6 minutos. La exposición de los roedores ante una situación sin escapatoria desencadena un estado de desesperanza que reduce las conductas de escape, consecuentemente el tiempo de inmovilidad aumenta, asociado con altos niveles de depresión. El tratamiento con antidepresivos disminuye dicho parámetro [347].

1.1.3.4.3. Ingesta inhibida por la novedad (NSFT)

En este modelo se expone a los roedores a un ambiente nuevo y desconocido. Previamente, los roedores se someten a un ayuno de 24 horas y, en la prueba, se coloca un pellet de comida de peso conocido. Durante la realización de la prueba, los roedores entran en conflicto entre la aversión inherente al espacio abierto, nuevo e iluminado, con la tendencia a explorar y la necesidad de comer. El tiempo de latencia y la cantidad de comida consumida son los parámetros evaluados que permiten determinar el estado depresivo. Además, tras un tratamiento crónico con fármacos antidepresivos se ha observado que el tiempo de latencia se reduce y aumenta la cantidad de comida consumida [348].

1.1.3.5. MODELOS CRÓNICOS DE DEPRESIÓN: ESTRÉS CRÓNICO LEVE

Si bien existen varios modelos crónicos, el *modelo de estrés crónico leve (ECL)* se ha convertido en uno de los que ostenta mayor relevancia traslacional para estudiar la fisiopatología de la depresión y nuevos tratamientos.

Este modelo se fundamenta en la exposición crónica a estímulos estresantes que desencadena alteraciones en los sistemas de respuesta al estrés y, en última instancia, conduce al desarrollo de conductas depresivas en roedores. Durante el protocolo, los animales están expuestos diariamente y de manera aleatoria a diferentes estímulos estresantes ambientales y sociales leves. Un factor crucial que realza la relevancia de este modelo radica en el alto grado de imprevisibilidad del momento en que son aplicados estos estímulos.

A continuación, se enumeran los principales estímulos estresantes que se emplean y la duración:

a) *Restricción de movimiento (1 hora)*: En este modelo, los roedores se colocan dentro de un cilindro de diámetro variable dotado de agujeros para permitir la respiración durante 60 min [349].

b) *Lecho húmedo (12 horas)*: Se humedece el lecho con agua de tal manera que esté húmedo, pero no encharcado. Al finalizar el estímulo se seca bien a los animales y se cambia la jaula.

c) *Jaula inclinada (12 horas)*: Las jaulas se inclinan aproximadamente 45°.

d) *Inversión del ciclo de luz-oscuridad (8 horas)*: Se amplía la fase de luz o de oscuridad durante 8 horas. Después se devuelven a los animales al ciclo normal.

e) *Exposición a orina de un depredador (zorro) (1 hora)*: Se introduce olores como orina de zorro durante 1 hora.

f) *Estrés acústico (2 horas)*: Los roedores son expuestos a un sonido de intensidad de 60dB [350]. La exposición aguda a sonidos induce estrés que se refleja en un aumento de presión sanguínea y frecuencia cardíaca [351]. Además, se produce un aumento de las concentraciones plasmáticas de catecolaminas, corticosteroides y ACTH [352-354].

g) *Destellos de luz (2-4 horas)*: Los ratones son expuestos a destellos de luz. La luz intermitente induce respuestas anormales retrasadas en la corteza visual tanto en roedores como en humanos. Además, durante un tiempo prolongado de exposición a dicho estímulo puede tener la capacidad de inducir alteraciones en la plasticidad neuronal y conducta dependientes del receptor NMDA [355].

h) *Restricción de comida (8 horas)*: Durante la noche se retira la comida de las jaulas manteniéndose el agua *ad libitum*. La privación de alimento desencadena alteraciones en el sueño [356, 357] y una actividad locomotora mayor [357-359], lo que sugiere un aumento en el comportamiento de búsqueda del alimento. Además, los roedores exhiben un aumento en el nivel de glucocorticoides en plasma [360] y alteraciones en el sistema dinorfina/KOR [360].

Los síntomas característicos de los trastornos depresivos han podido ser reproducidos con notoriedad en este modelo, reforzando su validez experimental. En los ratones expuestos al ECL se observa pérdida de peso [361], reducción de la actividad motora [362] (Gorka et al., 1996), fluctuaciones en el ciclo circadiano [363], alteraciones del sueño y disminución del sueño REM [364, 365], reducción de la conducta sexual y aumento de la agresividad en roedores macho [366] y alteraciones cardíacas [367, 368]. Además, se producen cambios en los niveles de citoquinas [369, 370], en el eje HPA [371] e hipersecreción de corticosterona [372].

Otro rasgo que permite simular el modelo es la anhedonia, pérdida de interés o incapacidad para experimentar placer ante estímulos apetitivos como la comida [373]. Tras varias semanas de exposición al ECL, los roedores presentan una reducción de sacarosa [374].

La reducción en el consumo de sacarosa puede ser revertida por la administración crónica de fármacos antidepresivos como son ATC [374-376], ISRS [374, 377, 378], antidepresivos atípicos [379], IMAOs [376, 380], litio [376], buspirona (agonista 5-HT_{1A}) [381] y antagonistas competitivos NMDA [382].

Se han descrito alteraciones cerebrales tras el modelo de ECL en roedores similares a las observadas en pacientes con trastornos depresivos. Entre estas anomalías destacan la reducción del volumen hipocampal y una reducción del 53% de la neurogénesis de células granulares en el giro dentado [383], cambios relacionados con la disminución de BDNF. De manera complementaria, se producen cambios en el sistema serotoninérgico [384, 385] con un aumento de los receptores corticales 5-HT₂, revertida tras un tratamiento con imipramina [386].

Se ha observado atrofia y alteración de la arborización dendrítica de neuronas piramidales del CA3 [387] e hiperactividad del eje HPA [388]. Sin embargo, aunque el ECL normalmente aumenta la concentración plasmática de los niveles de corticosterona [389, 390], existen publicaciones donde no se producen cambios [374, 391]. Esto puede ser debido a que los picos

de corticosterona se provocan en respuesta a la aparición de cada factor estresante [390, 392], siendo crítico el tiempo en el que se miden los niveles de corticosterona.

El ECL aumenta la actividad de la amígdala junto con un aumento del CRF, estos cambios se relacionan con una disminución en la actividad de las células dopaminérgicas mesolímbicas y en el área tegmental ventral [393] y disminución de la expresión de los receptores D2 en el núcleo accumbens [394, 395].



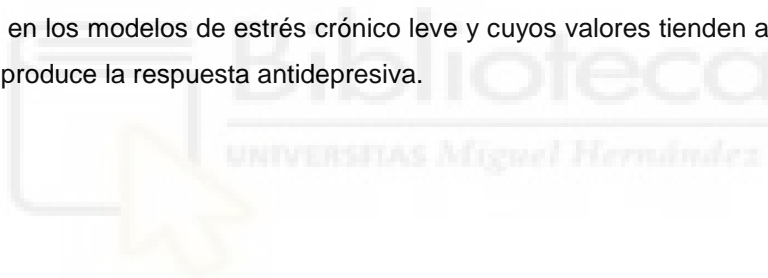
2. Hipótesis

Hasta la fecha, diferentes estudios indican que el CBD presenta propiedades ansiolíticas y antidepresivas. Si bien se han descrito más de 63 dianas sobre las que actuaría el CBD, su mecanismo completo queda pendiente de caracterizar. El principal receptor que se ha relacionado con dichas propiedades del CBD es el receptor 5-HT_{1A}, aunque otros receptores como los rCB₁ y rCB₂ parecen estar implicados.

La mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo empleando modelos agudos de depresión en roedor, con menor poder de traslación clínica.

Considerando estos hechos, es plausible plantear la hipótesis de que, en modelos animales crónicos (4-7 semanas de duración) y por lo tanto con un carácter más traslacional, como el modelo de estrés crónico leve, el CBD se comporte como un fármaco antidepresivo. Además, planteamos la posibilidad de emplear una administración crónica de CBD durante un periodo de 2-4 semanas. Es también posible que la administración conjunta de CBD y de un antidepresivo conocido (como un inhibidor de la recaptación de serotonina) pueda resultar en un efecto aditivo o sinérgico que mejore la respuesta clínica antidepresiva.

La acción antidepresiva podría deberse a la acción indirecta del CBD sobre dianas relacionadas con ansiedad y depresión, y neurogénesis que suelen estar modificadas funcionalmente en los modelos de estrés crónico leve y cuyos valores tienden a normalizarse a medida que se produce la respuesta antidepresiva.



3. Objetivos

3.1 **Objetivo general 1: Evaluar la implicación de los receptores rCB1, rCB2 y GPR55 en los efectos ansiolíticos y antidepresivos del CBD en roedores.**

3.1.1. *Objetivo específico 1.1.:* Realizar una curva dosis respuesta de CBD para evaluar sus efectos ansiolíticos y antidepresivos en ratones.

3.1.2. *Objetivo específico 1.2.:* Evaluar los efectos ansiolíticos y antidepresivos del CBD en ratones CB1 $-/-$, CB2 $-/-$ y GPR55 $-/-$.

3.1.3. *Objetivo específico 1.3.:* Identificar los mecanismos moleculares del CBD sobre diferentes marcadores relacionados con la ansiedad y depresión (receptores cannabinoides rCB1 y rCB2, GPR55; sistema GABAérgico (subunidades $\alpha 2$ y $\gamma 2$) mediante PCR a tiempo real.

3.2 **Objetivo general 2: Evaluar la eficacia antidepresiva del CBD en un modelo de estrés crónico leve en ratón.**

3.2.1. *Objetivo específico 2.1.:* Estudiar los efectos antidepresivos del CBD sólo o asociado a fármacos antidepresivos (ISRS), en el modelo de estrés crónico leve.

3.2.2. *Objetivo específico 2.2.:* Identificar los mecanismos neuroquímicos del CBD sobre diferentes marcadores moleculares y bioquímicos relacionados con la depresión (receptores cannabinoides rCB1 y rCB2, GPR55; sistema serotoninérgico (transportador de serotonina, 5-HT1A, 5-HT2A y 5-HTT); plasticidad neuronal (BDNF, NeuN, Capsasa-3, VGlut1 y PPARd) mediante PCR a tiempo real e inmunohistoquímica.

4. Resumen global de materiales y métodos

4.1. Animales

Se utilizaron 172 ratones machos adultos (5-6 semanas), 40 de la cepa CD1 obtenidos de los laboratorios Charles Rivers (Lodi, Italia) para los estudios de dosis respuesta del CBD, 32 CD1 para los estudios farmacológicos con el antagonista selectivo (SR141716A) y 60 para el estudio con el modelo ECL. Para los estudios en ratones transgénicos se emplearon 21 ratones CB1 -/- (previamente descrito por Ledent en 1999 [92]) y 19 ratones CB2 -/- desarrollados por nuestro laboratorio (cedidos amablemente por Nancy E. Buckley, Cal State Polytechnic Univ., Pomona, CA, EEUU) ambos genotipos se cruzaron con ratones CD1, Charles River Francia, hasta la sexta generación de ratones heterocigotos donde fueron criados en la base CD1 en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad Miguel Hernández y los homocigotos de la misma generación fueron seleccionados para nuestros experimentos. Los ratones GPR55 -/- fueron otorgados amablemente por el Dr. Andrei Kolovko del Instituto de Medicina Genómica (TIGM, Houston, TX), de los cuales, 18 de ellos fueron criados en las instalaciones del animalario de la Universidad Miguel Hernández. Los animales fueron estabulados en el animalario del campus de San Juan de Alicante de la Universidad Miguel Hernández donde se controló la temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), la humedad ($65 \pm 10\%$) y el ciclo de luz-oscuridad (8:00 h a 20:00 luces encendidas). Las pruebas de conducta y el cuidado de los animales se llevaron a cabo cumpliendo los aspectos éticos recogidos en el Real Decreto 53/2013 de 8 de febrero (BOE-A-2013-1337), y serán aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Miguel Hernández.

4.2. Fármacos

El CBD (CBD, Jazz Pharmaceuticals; Dublin, Irlanda) se disolvió en etanol:cremofor:salino (1:1:18) para las dosis requeridas de 10, 20 y 30 mg/kg administradas intraperitonealmente (10 ml/kg, 0.3 ml por ratón). De acuerdo a su farmacocinética, CBD fue administrado 1h y media previa a la evaluación comportamental.

El antagonista SR141716A fue comprado en Sigma-Aldrich (Madrid, España) y disuelto en etanol:cremofor y salino (1:1:18) para obtener la dosis deseada de 2 mg/kg administrada intraperitonealmente 30 min antes de la administración del CBD y 2h antes de la evaluación de conducta.

La sertralina (STR) fue adquirida por los laboratorios Besitran, Pfizer en una solución concentrada de 20 mg/ml, se disolvió en agua y administrada oralmente a la dosis de 10 mg/kg (0.3 ml una vez al día). Dicha dosis fue seleccionada en base a estudios previos (Lu et al., 2019; Zhang et al., 2022).

4.3. Modelo de estrés crónico leve (ECL)

Los ratones fueron expuestos al modelo de estrés crónico leve [396] durante 8 semanas que consistió en la exposición a varios estímulos estresantes de naturaleza diversa (restricción de movimiento, luz estroboscópica (150 flashes/min), ruido (90-105 dB), lecho húmedo y jaula inclinada 45°C de forma impredecible para evitar la habituación de los ratones. De manera periódica se evaluaron a los roedores mediante las pruebas conductuales de ansiedad y

depresión. Una vez instaurado el estado depresivo (4 semanas) se inició la administración del tratamiento (CBD y/o STR). La exposición a los estímulos estresantes se mantuvo a lo largo del tratamiento.

4.4. Paradigmas comportamentales de ansiedad y depresión

4.4.1. CAJA CLARA-OSCURA (LDB)

La evaluación del estado ansiogénico se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Crawley y Goodwin [329]. Consiste en 2 cajas de metacrilato, una transparente iluminada y otra negra opaca, separadas por un túnel opaco. Se midió el tiempo de permanencia de los animales en la zona clara y el número de transiciones entre las dos zonas, durante un tiempo total de 5 minutos.

4.4.2. LABERINTO ELEVADO EN CRUZ (EPM):

Se empleó el método descrito por Lister y colaboradores (1987) [333]. Consiste en dos brazos abiertos y dos brazos cerrados perpendiculares horizontalmente situados a 50 cm sobre el suelo. La unión de los cuatro brazos forma una plataforma central (5 cm x 5 cm). Se midió el tiempo de permanencia de los animales en los brazos abiertos y el número de transiciones entre los brazos abiertos y cerrados durante un total de 5 minutos.

4.4.3. TEST DE SUSPENSIÓN POR LA COLA (TST):

Se empleó el método descrito por Steru y colaboradores (1985) Consiste en la suspensión por la cola del ratón mediante cinta adhesiva, de forma que quede a 35 cm de una superficie de apoyo. Se evaluó el tiempo de inmovilidad durante un período de 6 minutos.

4.4.4. TEST DE INGESTA INHIBIDA POR LA NOVEDAD (NSFT):

Se empleó el modelo definido por Surget y colaboradores (2008) [397]. La prueba se realizó en una caja cuadrada de metacrilato transparente (40 x 40 x 50 cm), en el centro se coloca sobre una superficie un pellet de comida previamente pesado. Tras un período de privación de comida (24h), los ratones son expuestos de manera individualizada, midiéndose la latencia entre el comienzo de la prueba y la ingesta hasta un máximo de 10 minutos, así como la cantidad de comida ingerida durante 5 minutos.

4.4.5. RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

Modelo descrito por Holloway y Thor [398] y Gheusi G y Robert Dantzer [399]. Se habitúa al roedor en una caja de metacrilato transparente (40 x 40 x 50 cm) junto con dos objetos idénticos en textura, color, tamaño y forma (objeto familiar) durante 5 min. En el segundo día, día de la evaluación, uno de los objetos es intercambiado por otro diferente en cuanto a textura, color, tamaño y forma (objeto novedoso) por 5 min para evaluar el deterioro cognitivo en la memoria a largo plazo (24h). En ambas fases se cuantifica el tiempo de exploración (orientación de la nariz al objeto, olerlo o tocarlo) por parte del roedor en cada objeto (familiar y novedoso). Se calculó el índice de discriminación entre el objeto familiar y novedoso $[(\text{Object B} - \text{Object A}) / (\text{Object A} + \text{Object B})]$. Un valor cercano a 0 indica preferencia por el objeto familiar (mayor deterioro

cognitivo) mientras que cercano a 1 indica mayor preferencia por el objeto novedoso (menor deterioro cognitivo).

4.4.6. CONSUMO DE UNA SOLUCIÓN DE SACAROSA 1%

Se empleó el método descrito por Li y colaboradores (2007) [400] mediante el cual, tras un período de privación de comida y agua (18 h), se evalúa la preferencia y el consumo de una solución de sacarosa al 1% durante un periodo total de 1h.

4.5. Identificación de los biomarcadores de respuesta al tratamiento que subyacen a la potencial eficacia ansiolítica y antidepresiva del CBD

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos relacionados con la eficacia ansiolítica y antidepresiva del CBD, sólo y asociado a STR, se analizaron las posibles alteraciones en dianas estrechamente relacionadas con la respuesta al estrés, ansiedad y depresión mediante estudios de PCR a tiempo real e inmunohistoquímica.

4.5.1. EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Los estudios de PCR a tiempo real permitieron analizar cambios en la expresión génica de genes que regulan el sistema endocannabinoide (rCB1, rCB2 y rGPR55), serotoninérgico (5-HTT, 5-HT1A y 5-HT2A), gabaérgico (GABA(A) subunidades $\alpha 2$ y $\gamma 2$), plasticidad neuronal (BDNF, PPAR δ y mvglut1). Brevemente, tras la finalización de cada procedimiento conductual, se sacrificaron a los ratones mediante dislocación cervical e inmediatamente después se extrajeron los cerebros siendo almacenados a -80°C. Para obtener con exactitud las regiones de interés (AMY, HIPPOCÁMPUS, DG) se utilizó como guía el atlas del cerebro de ratón de Paxinos [401], realizando cortes coronales de 500 μ m en un criostato. Los cortes obtenidos se microdisecionaron siguiendo el método de Palkovits [402] modificado. El ARN total de los núcleos microdisecionados se aisló utilizando el reactivo Tri Reagent® (ThermoScientific), que posteriormente se retrotranscribió a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc). Mediante el StepOne® (Life Technologies) y empleando la tecnología TaqMan®, se realizó mediante Rt-PCR una cuantificación relativa de los genes de interés, ya antes mencionados. Como gen de referencia se empleó el gen ribosomal 18S para llevar a cabo la cuantificación relativa de la expresión génica entre los distintos grupos de tratamiento, utilizando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ [403].

4.5.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó la caracterización de las proteínas BDNF, NeuN y Caspasa-3 mediante inmunohistoquímica en el HIPPOCÁMPUS (giro dentado, CA1, CA2 y CA3). Los ratones fueron perfundidos y sus cerebros postfijados con paraformaldehído al 4%, transfiriéndose a PBS con azida a 4°C para su almacenamiento. Los cortes de 50 μ m obtenidos mediante vibratomo (Leica VT1000S, Leica Microsystems, Bannockburn, IL) fueron lavados con PBS 1X e incubados con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche en agitación a 4°C. Los cortes fueron marcados mediante incubación en el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente incubados en extravidina (Sigma-Aldrich,

España). Las secciones se colocan sobre portaobjetos gelatinizados, secados, deshidratados y finalmente se montan con DPX para su posterior visualización y análisis al microscopio.

4.6. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico mediante el programa informatizado Sigmaplot 11, utilizando la prueba de la t de Student cuando se compararon dos grupos, o ANOVA de una o dos vías seguido de la prueba Student-Newman-Keul cuando se compararon tres o más grupos, dependiendo del diseño experimental. Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad de error era menor al 5%.



5. Resumen de los resultados

5.1. Artículo 1: Cannabinoid CB1 receptor involvement in the actions of CBD on anxiety and coping behaviors in mice (Anexo 1)

Hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones han demostrado la participación del receptor 5-HT1A en los efectos ansiolíticos y antidepresivos del CBD. Sin embargo, el CBD se ha descrito como modulador alostérico no competitivo del rCB1, agonista inverso del rCB2 y como antagonista del receptor GPR55. Teniendo en cuenta la implicación de estos receptores en la respuesta al estrés, ansiedad, depresión, y cognición, el presente trabajo se centro en evaluar la implicación de los receptores cannabinoides rCB1 y rCB2, y del GRP55 en los efectos ansiolíticos y antidepresivos del CBD.

En primera instancia, se realizó un estudio dosis respuesta (10, 20 y 30 mg/kg, i.p.) para evaluar los efectos agudos del CBD en animales wild type (CD1) en diferentes paradigmas para evaluar rasgos de ansiedad (LDB y EPM) y depresión (NSFT y TST).

En la LDB, los ratones tratados con una única dosis de 10 o 20 mg/kg de CBD permanecieron mayor tiempo en el lado claro respecto a los tratados con vehículo, lo que es representativo de un efecto ansiolítico (VEH) (Anexo 1, Artículo 1, Figura 1A). Sin embargo, no se observó ningún efecto con la dosis más alta (30 mg/kg) (Anexo 1, Artículo 1, Figura 1A). De manera similar, en el EPM, las dos primeras dosis mostraron actividad ansiolítica, al aumentar el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, con la diferencia que la dosis de 20 mg/kg fue más pronunciada en comparación con la dosis de 10 mg/kg. Nuevamente, la dosis de 30 mg/kg no produjo cambio alguno en comparación con el grupo VEH. Ninguna de las dosis provocó cambios en el número de transiciones durante la evaluación de los paradigmas (Anexo 1, Artículos 1, Figuras 1B y 1D), por lo que se descarta que el CBD, a las dosis evaluadas, pueda producir efectos sobre la actividad motora que puedan enmascarar los resultados obtenidos en estas pruebas.

En resumen, el CBD a dosis baja e intermedia (10 y 20 mg/kg, respectivamente) produjo un efecto ansiolítico mientras que a dosis más altas (30 mg/kg) no. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se ha demostrado que el CBD es capaz de inducir efectos ansiolíticos siguiendo una curva de dosis en forma de "U" invertida, por lo que las dosis intermedias son capaces de producir dicho efecto pero no las dosis muy bajas (100 y 150 mg en humanos; 0.5-1 mg/kg roedores) ni muy altas (600 y 900 mg en humanos; 30-60 mg/kg en roedores).

Para identificar la posible actividad antidepresiva del CBD se realizaron los paradigmas de TST y NSFT. En la prueba comportamental del TST, el pre-tratamiento con CBD fue capaz de provocar un efecto antidepresivo, solamente a la dosis de 20 mg/kg, la única que redujo significativamente el tiempo de inmovilidad con respecto al grupo VEH (Anexo 1, Artículo 1, Figura 2).

En el caso del NSFT, los ratones tratados con CBD mostraron una latencia menor para empezar a comer (Anexo 1, Artículo 1, Figura 3A) y un mayor consumo de alimento (mg) (Anexo

1, Artículo 1, Figura 3B) a las dosis de 10 y 20 mg/kg en comparación con el grupo control. Por el contrario, la dosis de 30 mg/kg no produjo ningún efecto en comparación con el grupo VEH. En resumen, la dosis intermedia de CBD (20 mg/kg) es la que presenta un efecto antidepresivo más robusto en comparación con la dosis más baja (10 mg/kg).

De manera complementaria y considerando el papel de los rCB1, rCB2, y GPR55 en la modulación de la respuesta emocional, ya que éstos a su vez constituyen una parte importante de la actividad directa o indirecta ejercida por el CBD, exploramos la participación de estos receptores en sus efectos ansiolíticos y antidepresivos. Para ello, se evaluaron los efectos del CBD a la dosis de 20 mg/kg, con la que se obtuvo un efecto ansiolítico y antidepresivo más robusto, en la LDB y el TST en ratones CB1 -/-, CB2 -/- y GPR55 -/-.

En el paradigma del LBD, el CBD no produjo un efecto ansiolítico en los roedores carentes del rCB1 comparados con el grupo control (Anexo 1, Artículo 1, Figura 4A), en contraposición a lo observado en los ratones CB2-/- (Anexo 1, Artículo 1, Figura 4C) y GPR55-/- (Anexo 1, Artículo 1, Figura 4E). No se observaron cambios en el número de transiciones entre los ratones tratados con CBD y VEH (Anexo 1, Artículo 1, Figura 4B, 4D, 4F).

En la prueba del TST, con la misma dosis efectiva (20 mg/kg), el CBD provocó un efecto antidepresivo en los tres genotipos estudiados, CB1-/- (Anexo 1, Artículo 1, Figura 5A), CB2-/- (Anexo 1, Artículo 1, Figura 5B) y GPR55-/- (Anexo 1, Artículo 1, Figura 5C).

El conjunto de estos resultados indica que el rCB1 podría ser una diana importante para los efectos ansiolíticos del CBD, al no observarse dicho efecto en los ratones CB1KO. Para explorar con mayor detalle la participación de este receptor, se realizó un experimento adicional el que se bloqueó previamente a la administración del CBD (20mg/kg, ip), el rCB1 con el antagonista selectivo del rCB1, SR141716A. La administración del antagonista por sí sola no modificó el tiempo de permanencia en el lado claro en comparación con los ratones control tratados con VEH, demostrando que la dosis seleccionada era adecuada. El CBD produjo su efecto ansiolítico; curiosamente, este efecto se bloqueó por completo cuando el CBD fue administrado después del antagonista SR141716A, induciendo, incluso, un efecto ansiogénico de manera leve debido a una disminución en el tiempo de permanencia de los roedores en el lado claro respecto al grupo control (Anexo 1, Artículo 1, Figura 6A). Al igual que en los anteriores resultados, el número de transiciones efectuadas por los roedores fueron similares y sin cambios significativos entre los grupos (Anexo 1, Artículo 1, Figura 6B). En virtud de estos resultados, se pudo demostrar que el bloqueo del rCB1 evita que el CBD induzca sus efectos ansiolíticos en el paradigma del LDB, reforzando la implicación de este receptor.

Para profundizar en el mecanismo de acción del CBD, se analizaron cambios en la expresión del rCB1, rCB2 y del GRP55, así como de las subunidades GABAérgicas $\alpha 2$ y $\gamma 2$ en el HIPP y la AMY mediante PCR a tiempo real. El CBD (10, 20 y 30 mg/kg) indujo una disminución dosis-dependiente en la expresión génica del *Cnr1* en la AMY (Anexo 1, Artículo 1, Figura 7A). El mismo efecto fue observado en el HIPP, pero solo a la dosis más alta de CBD (30 mg/kg, ip) (Anexo 1, Artículo 1, Figura 7D). En cuanto al *Cnr2*, se detectó un incremento en su expresión génica en la AMY, con todas las dosis, (Anexo 1, Artículo 1, Figura 7B) y en el HIPP, con la dosis

de 20 y 30 mg/Kg (Anexo 1, Artículo 1, Figura 7E). En el caso del *Gpr55*, la dosis de 30 mg/kg fue la única en generar un incremento significativo en la AMY (Anexo 1, Artículo 1, Figura 7C). De manera opuesta, las tres dosis redujeron su expresión en el HIPP (Anexo 1, Artículo 1, Figura 7F).

Por otro lado, la administración de CBD a las dosis de 20 y 30 mg/kg disminuyó la expresión génica de GABA(A) $\alpha 2$ en la AMY, siendo la dosis de 30 mg/kg la que produjo mayor reducción (Anexo 1, Artículo 1, Figura 8A). En el HIPP, dicha disminución se observó con cada una de las dosis probadas (Anexo 1, Artículo 1, Figura 8C). Además, la expresión génica de la subunidad GABA(A) $\gamma 2$, también disminuyó de manera dosis-dependiente en ambas regiones de la AMY (dosis de 20 y 30 mg/kg) (Figura 8B) y del HIPP (dosis de 10, 20 y 30 mg/kg) (Anexo 1, Artículo 1, Figura 8D).

En su conjunto, los estudios de PCR a tiempo real, indican que la administración aguda de CBD es capaz de modificar la expresión génica del *Cnr1*, *Cnr2* y *Gpr55* en las regiones de la AMY e HIPP de manera dosis dependiente. En el caso de las subunidades del sistema GABAérgico estudiadas, $\alpha 2$ y $\gamma 2$, se demostró que la administración aguda de CBD es capaz de regular negativamente la expresión génica de ambas subunidades en la AMY e HIPP.

Los datos de los resultados expuestos tanto de la parte comportamental como en los estudios de expresión genética realizados respaldan aún más la compleja red entramada por la que participa y actúa el CBD.



5.2. Artículo 2: Unveiling behavioral and molecular neuroadaptations related to the antidepressant action of cannabidiol in the unpredictable chronic mild stress model (Anexo 1)

Estudios previos indican que el CBD presenta efectos antidepresivos, si bien la mayoría de los estudios se han realizado en modelos agudos, con menor poder de traslación clínica. Son pocos los estudios que han evaluado el efecto antidepresivo del CBD en el ECL, ampliamente aceptado como un modelo animal de depresión gracias a su validez de constructo y predictiva. Si bien los resultados de estos estudios eran prometedores, presentaban ciertas limitaciones, como el hecho de que el CBD se administraba desde el inicio del ECL, impidiendo evaluar su eficacia en revertir el deterioro de la conducta inducido por el ECL. Por ello, el principal objetivo de este trabajo era evaluar el efecto antidepresivo del CBD en modular las alteraciones comportamentales y moleculares inducidas por el ECL, comparando su eficacia con un antidepresivo de referencia, la sertralina (STR).

En primera instancia, para comprobar la reproducibilidad del ECL, se realizaron diferentes paradigmas que permitieron evaluar rasgos ansiogénicos y depresogénicos en los roedores expuestos al ECL. Se emplearon los paradigmas LDB (10 días) y EPM (16 días), para evaluar la ansiedad, y el TST (22 días) y de ingesta de sacarosa (28 días), para evaluar conductas depresogénicas (Anexo 1, Artículo 2, Figura 1).

En la prueba del LDB, los ratones expuestos al ECL permanecieron menos tiempo en el lado claro en comparación con el grupo control no estresado (NO-ECL) (Anexo 1, Artículo 2, Figura 2A), sin encontrar cambios en el número de transiciones (Anexo 1, Artículo 2, Figura 2B). Resultados similares se obtuvieron en la prueba comportamental del EPM, ya que los ratones expuestos al ECL mostraron una reducción significativa en el porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos en comparación con el grupo NO-ECL (Anexo 1, Artículo 2, Figura 2C). De igual forma, no se observaron diferencias respecto al número de transiciones (Anexo 1, Artículo 2, Figura 2D).

En cuanto a los paradigmas que miden rasgos depresogénicos, a partir del día 22 se produjo un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad en la prueba del TST en los roedores sometidos al ECL en comparación con el grupo control (Anexo 1, Artículo 2, Figura 2E). Aunado a ello, en el paradigma de la ingesta de sacarosa, el grupo ECL mostró una reducción significativa en la ingesta de sacarosa (sacarosa (mg)/ peso corporal (g)) en comparación con el grupo NO-ECL (Anexo 1, Artículo 2, Figura 2F).

Una vez establecido el ECL en los roedores, se procedió a evaluar el posible efecto antidepresivo del CBD, solo o asociado al antidepresivo de referencia sertralina (STR). Primero, se evaluó si existía una posible diferencia en la velocidad de acción entre el CBD y el fármaco de referencia, STR, a través del paradigma del LBD tras 4 días de tratamiento. Los resultados reflejaron que los ratones expuestos al ECL y tratados con VEH permanecieron un tiempo reducido en el lado claro en comparación con los ratones NO-ECL tratados con VEH (Anexo 1, Artículo 2, Figura 3A). Sin haber cambio en el número de transiciones entre estos grupos (Anexo

1, Artículo 2, Figura 3D). De manera interesante, el tratamiento con CBD administrado solo o en combinación con STR, aumentó el tiempo de permanencia en el lado claro de manera significativa. Sin embargo, en el grupo ECL tratado con STR no se detectaron diferencias con respecto al grupo ECL-VEH (Anexo 1, Artículo 2, Figura 3C). En cuanto al número de transiciones, no hubo diferencias entre los diferentes grupos (Anexo 1, Artículo 2, Figura 3D).

Tras 7 días de tratamiento, los ratones expuestos al ECL y tratados con VEH presentaron rasgos depresivos como indica el aumento del tiempo de inmovilidad en la prueba del TST en comparación con los ratones NO-ECL y tratados con VEH (Anexo 1, Artículo 2, Figura 3E). Curiosamente, el CBD redujo significativamente el tiempo de inmovilidad, solo o en combinación con STR. El grupo de roedores tratados solo con STR, no presentó diferencias en comparación con el grupo control sometido al ECL y tratado con VEH (Anexo 1, Artículo 2, Figura 3F).

Tras 14 días de tratamiento los ratones fueron expuestos a la prueba del EPM para observar los posibles cambios en los rasgos de ansiedad. Los ratones expuestos al ECL y tratados con VEH, nuevamente, presentaron una disminución significativa en el porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos con respecto al grupo NO-ECL VEH (Anexo 1, Artículo 2, Figura 3G). No se encontraron diferencias entre el número de transiciones entre los dos grupos (Anexo 1, Artículo 2, Figura 3I). Mientras que notablemente, los tres grupos expuestos al ECL y tratados con CBD, STR o su respectiva combinación, aumentaron el porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (Anexo 1, Artículo 2, Figura 3H). De igual manera, el número de transiciones no se vio afectado entre los diferentes grupos (Anexo 1, Artículo 2, Figura 3J).

Tras 18 días de tratamiento los ratones expuestos al ECL tratados con VEH presentaron una reducción significativa del índice de discriminación en comparación con su grupo control correspondiente, NO-ECL, en la prueba del NOR. A pesar de que la STR aumentó este índice de discriminación, dicho cambio no fue suficiente para alcanzar el nivel estadístico de significación en comparación con los ratones expuestos al ECL y tratados con VEH. Sin embargo, el tratamiento con CBD restauró dicha alteración ya que los ratones expuestos al ECL y con tratamiento con el CBD o su combinación con STR, presentaron un aumento estadísticamente significativo en el índice de discriminación en comparación con los roedores expuestos al ECL y tratados con VEH y STR (Anexo 1, Artículo 2, Figura 4B).

Por último, los ratones expuestos al ECL y tratados con VEH mostraron anhedonia, reflejado por una reducción significativa en el consumo de sacarosa comparado con el grupo control NO-ECL y tratado con VEH (Anexo 1, Artículo 2, Figura 4C). Por el contrario, la STR, el CBD y su combinación ejerció un aumento estadísticamente significativo en la ingesta de sacarosa. Sin embargo, el CBD fue el fármaco que indujo el mayor cambio con respecto a los otros grupos experimentales tratados farmacológicamente con STR y la combinación de STR con CBD (Anexo 1, Artículo 2, Figura 4D).

Como parte complementaria, se analizaron cambios moleculares inducidas por el ECL en dianas relacionados con depresión, con el objetivo de evaluar si variaban tras el tratamiento farmacológico aplicado, mediante PCR a tiempo real. En primera instancia, se analizó la expresión genética en dianas implicadas en el sistema serotoninérgico. Los resultados mostraron

que el ECL reduce los niveles de la expresión del gen *Scl6a4* que codifica para el transportador de la recaptación de serotonina, en la región del rafe dorsal (DR) (Anexo 1, Artículo 2, Figura 5A). El tratamiento con STR, CBD y la combinación de ambos, revirtieron significativamente ese cambio. En concreto, el aumento inducido por el CBD, solo o en combinación con STR, fue más significativo que el causado por la administración de STR (Anexo 1, Artículo 2, Figura 5B). En la región del HIPP, el ECL incrementó los niveles de la expresión génica de los receptores serotoninérgicos 5HT1A (Figura 5C) y 5HT2A (Anexo 1, Artículo 2, Figura 5E). Entre todos los tratamientos, el CBD fue el único que redujo el cambio en el 5HT1A (Anexo 1, Artículo 2, Figura 5D). Mientras que para el receptor 5-HT2A, todas las intervenciones farmacológicas redujeron el aumento ocasionado por el ECL sin haber diferencias entre ellos (Anexo 1, Artículo 2, Figura 5F). Por otro lado, en la región de la AMY, el ECL indujo efectos distintos a los observados en el HIPP, ya que la expresión génica del 5-HT1A se redujo (Anexo 1, Artículo 2, Figura 5G) y hubo un aumento en el 5-HT2A (Anexo 1, Artículo 2, Figura 5I). De hecho, también se encontraron diferencias entre los diferentes abordajes farmacológicos analizados. Por una parte, el CBD y la STR aumentaron la expresión del gen 5-HT1A, pero en el caso de su combinación, no se encontraron cambios estadísticamente significativos (Anexo 1, Artículo 2, Figura 5H). En cambio, con respecto al 5-HT2A, no se observaron cambios en los grupos ECL tratados con STR o su combinación con CBD, comparados con el grupo ECL tratado con VEH. El CBD sí fue capaz de reducir la expresión del 5-HT2A (F Anexo 1, Artículo 2, igura 5J).

En el caso de la neuroplasticidad, la expresión génica relativa del BDNF en el HIPP se redujo en los ratones expuestos al ECL en comparación con el grupo ECL VEH (Anexo 1, Artículo 2, Figura 6A). Impresionantemente, nuevamente el tratamiento con la administración única de CBD revirtió esta alteración, aumentando los niveles del BDNF, lo que no sucedió ni con la STR ni con la combinación CBD+STR (Figura 6B). El ECL también produjo una reducción significativa en la expresión génica relativa del gen *PPARdelta* en el HIPP (Anexo 1, Artículo 2, Figura 6C). Destacando, nuevamente, que esta alteración fue revertida por el CBD, sin cambios con el resto de los tratamientos farmacológicos analizados (Anexo 1, Artículo 2, Figura 6D). En lo relativo al *mVglut1*, se observó una reducción importante en el grupo de roedores expuestos al ECL VEH respecto al NO-ECL VEH (Anexo 1, Artículo 2, Figura 6E). En este caso, el CBD, la STR y su combinación, revirtieron dichas alteraciones inducidas por el ECL, ya que aumentaron significativamente la expresión del gen *mVglut1*, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Anexo 1, Artículo 2, Figura 6F).

En cuanto a los estudios de inmunohistoquímica, se observó una reducción de la inmunoreactividad para el BDNF (ir-BDNF) en todas las áreas del HIPP en el grupo ECL tratado con VEH en comparación con el grupo control NO-ECL (Anexo1, Artículo 2, Figura 7A y B). Curiosamente, todos los enfoques farmacológicos aumentaron la ir-BDNF en comparación con los ratones expuestos al modelo y tratados con VEH. Sin embargo, los grupos tratados con CBD, solo o en combinación con STR, aumentaron la intensidad de marcaje de BDNF en el área piramidal y las células granulares con respecto al grupo tratado solamente con STR (Anexo1, Artículo 2, Figura 7C-E).

A mayor aumento en las imágenes pudimos observar que la ir-BDNF en el hilio y las células granulares del giro dentado aumentó su intensidad de marcaje con cada uno de los tratamientos comparado con el grupo expuesto al ECL y tratado con VEH (Anexo1, Artículo 2, Figuras 7F a J), siendo mayor en los grupos tratados con CBD, solo o asociado a la STR, en la capa granular del giro dentado (flecha indicadas en el Anexo1, Artículo 2, Figuras 7H-J). Todos estos resultados revelaron una mayor supervivencia celular y mayor plasticidad en los ratones expuestos al ECL y tratados con los diferentes enfoques farmacológicos comparados con el grupo ECL y tratado solo con VEH pero la intensidad de marcaje fue aún más significativa en ratones tratados con CBD y su combinación que con el tratamiento individual de cada compuesto.

Para poder estudiar la muerte celular y apoptosis, se realizó una inmunohistoquímica con NeuN y Caspase-3. Observamos que los ratones ECL-VEH presentaron una disminución en la intensidad del marcaje de NeuN (ir-NeuN) en las áreas CA1, y CA3, el hilio y las células granulares del giro dentado (Anexo 1, Artículo 2, Figura 8A, C, E, G, I) en comparación con su correspondiente grupo control tratado con VEH y no expuesto al ECL. Curiosamente, CBD, STR y su combinación aumentaron dicha intensidad de marcaje. Por otro lado, la inmunoreactividad para caspasa-3 (ir-caspasa-3) aumentó en el grupo ECL-VEH en comparación con los ratones no expuestos al modelo (Anexo 1, Artículo 2, Figura 8B, D). Por el contrario, la Caspasa-3-ir fue de menor intensidad para cada uno de los grupos tratados farmacológicamente en comparación con su grupo control (flechas señaladas en Anexo 1, Artículo 2, Figuras 8D, F, H, J). Correlacionado con los resultados anteriores, pudimos observar que, entre estos tratamientos, el CBD, solo o asociado, tuvo un mayor efecto respecto al grupo tratado solo con STR, ya que la ir-Caspasa-3 fue de menor intensidad (flechas señaladas en Anexo 1, Artículo 2, Figuras 8F, H, J). Estos resultados revelan una mayor muerte celular, como se señala en la disminución de ir-NeuN y por el aumento de ir-Caspasa-3 en los ratones expuestos al modelo de ECL en comparación con el grupo control. El grupo tratado con CBD presento una mayor recuperación de estas alteraciones ocasionadas por la exposición al ECL en comparación con la STR (flechas señaladas en Anexo 1, Artículo 2, Figuras 8F, H, I).

6. Discusión global

Los resultados de la presente tesis ponen de manifiesto el potencial terapéutico del CBD para el tratamiento de trastornos emocionales como la ansiedad y depresión, y de la implicación del rCB1 en sus efectos ansiolíticos. Asimismo, expande el conocimiento sobre otras dianas como las subunidades GABAérgicas $\alpha 2$ y $\gamma 2$, y relacionadas con la neuroplasticidad, que mediarían, al menos en parte, sus efectos ansiolíticos y antidepresivos. Dicha declaración se confirma con las evidencias del **artículo 1**: 1) A dosis agudas bajas e intermedias (10 y 20 mg/kg) el CBD induce efectos ansiolíticos y antidepresivos en los paradigmas comportamentales evaluados en ratones WT; 2) La administración aguda de CBD (20 mg/kg) no logra inducir ningún efecto en los ratones que no expresan al rCB₁, ratones CB1KO, mientras que sí ejerce un efecto ansiolítico en los roedores carentes del rCB₂ (CB2 -/-) y GPR55 (GPR55 -/-); 3) La administración del antagonista específico del rCB₁, SR141716A, bloqueó la acción ansiolítica del CBD; 4) El CBD presenta un efecto antidepresivo en todos los roedores modificados genéticamente utilizados; 5) La administración de CBD modula la expresión génica tanto de los receptores cannabinoides, rCB₁ y rCB₂, del GRP55 y de otras dianas implicadas en los procesos de ansiedad, como las subunidades GABAérgicas $\alpha 2$ y $\gamma 2$ en la AMY e HIPP. Las principales evidencias del **artículo 2** son: 1) El CBD reduce la ansiedad y los rasgos depresogénicos inducidos por el ECL el a los 4, 7 y 14 días de tratamiento, mientras que la STR requirió 14 días para modular la ansiedad inducida por el ECL, 2) El CBD fue más eficaz en modular el deterioro cognitivo y la anhedonia de los ratones sometidos al ECL que el antidepresivo de referencia STR, 3) El CBD normalizó todas las alteraciones de la expresión génica inducidas por el ECL en elementos críticos del sistema serotoninérgico (Scl6a4, 5-HT1A y 5-HT2A) en el DR, HIPP y AMY en comparación con la STR, 4) El CBD aumentó las expresiones de los genes del BDNF y PPARdelta en el HIPP de ratones sometidos al ECL, mientras que STR no tuvo efectos, 5) El CBD aumentó el BDNF y redujo la inmunoreactividad de la caspasa-3 en HIPP más que el tratamiento con STR sola, 6) La combinación de CBD más STR mostró un efecto similar a la eficacia proporcionada por el CBD individual en la caja clara-oscura, la suspensión por la cola y el laberinto elevado en cruz, sin embargo, se observó un peor resultado en la mejora del deterioro cognitivo y la anhedonia, y 7) La combinación de CBD más STR no revirtió las alteraciones inducidas por el ECL en 5-HT1A, BDNF y PPARdelta en el HIPP, y 5-HT1A y 5-HT2A en la AMY; y en menor medida produjo un aumento en la inmunoreactividad del BDNF y una reducción de la caspasa-3 en el HIPP.

Estudios previos han demostrado que el CBD induce efectos ansiolíticos y antidepresivos en forma de una curva de "U" invertida, siendo efectivo a dosis intermedias, pero no altas o bajas [289-291, 404]. De acuerdo con estos estudios, en el artículo 1, encontramos que la dosis baja de 10 mg/kg y la dosis intermedia de 20 mg/kg indujeron un efecto ansiolítico, en los paradigmas LBD y EPM. Además, el CBD a la dosis de 20 mg/kg también produjo efectos antidepresivos en la prueba del TST y NSFT, mientras que a la dosis de 10 mg/kg solo lo produjo en el NSFT. En ninguna de las pruebas comportamentales realizadas, el CBD a la dosis más alta (30 mg/kg) muestra algún efecto ansiolítico o antidepresivo, concordando con lo descrito anteriormente por

el grupo de investigación de Schiavon y cols. [405]. Sin embargo, en otros estudios realizados, con la misma dosis, se produjo un efecto ansiolítico [406, 407] o antidepresivo [301, 302, 306, 408]. Las diferencias en los procedimientos metodológicos, como las diferentes especies de animales (ratas y ratones), cepas (ratas Wistar, C57Bl6J, ICR), pruebas de comportamiento aplicadas y/o el patrón de administración del CBD, entre otros factores [30], podrían justificar las discrepancias entre los resultados.

A pesar de la evidencia existente que respalda las propiedades ansiolíticas y antidepresivas del CBD, la caracterización de los mecanismos de acción subyacentes aún no está del todo elucidado. En este sentido, para el siguiente objetivo se decidió explorar más a fondo las implicaciones de dianas del SCE como el rCB₁, rCB₂ y el GPR55 en el efecto ansiolítico del CBD, dado el papel crítico que presentan sobre la reactividad emocional como es la ansiedad y los trastornos del estado de ánimo [66, 146, 218, 249, 250, 409-412]. Para ello se realizaron estudios en ratones modificados genéticamente, CB1 -/-, CB2 -/- y GPR55 -/-. Es bien conocido que la carencia de los rCB₁ y CB₂ aumenta la conducta ansiogénica y depresogénica. Además, en estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación, se demuestra que los ratones GRP55KO exhiben mayor nivel de ansiedad. El CBD a la dosis efectiva de 20 mg/kg, indujo efectos ansiolíticos en todos los ratones KO menos en los roedores carentes del rCB₁. Posteriormente, el estudio farmacológico con el antagonista del rCB₁ SR141716A, demostró que el bloqueo del receptor evita los efectos ansiolíticos inducidos por el CBD en el paradigma LBD. Es importante resaltar que la dosis del antagonista SR141715A no indujo ningún efecto cuando fue administrado solo. De esta manera, tanto el enfoque genético en ratones KO como el enfoque farmacológico (antagonista específico del rCB₁), demuestran que el receptor CB₁ media indudablemente las propiedades ansiolíticas del CBD. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran la participación del rCB₁ en las acciones ansiolíticas del CBD [146, 308, 413-415].

Sin embargo, los antidepresivos del CBD evaluados por medio del paradigma TST en los diferentes ratones knockout, se mantuvieron. Por lo tanto, en base a estos últimos resultados, es tentador especular que los rCB₁, rCB₂ y GPR55 no serían críticos en la acción antidepresiva del CBD. Por consiguiente, dentro de las más de 65 dianas terapéuticas estudiadas sobre las que actúa el CBD [24, 274, 416], el 5-HT_{1A} parece ser el principal en sus efectos antidepresivos [301, 304, 417].

Por otro lado, los análisis de PCR a tiempo real revelaron que la administración aguda de CBD modificaba la expresión genética de Cnr1, Cnr2 y Gpr55 de manera dependiente de la dosis y de la región cerebral. Los análisis en HIPP y AMY mostraron que el CBD redujo la expresión del Cnr1 y aumentó la del Cnr2 de manera dosis dependiente, siendo la dosis de más alta (30 mg/kg) la que produce los efectos más pronunciados. Estos resultados concuerdan con estudios previos de nuestro grupo y otros que demuestran que el tratamiento con CBD reduce la expresión de Cnr1 [418] y aumenta la expresión de Cnr2 en diferentes áreas cerebrales [419]. Estas alteraciones son compatibles con que el CBD actúe como agonista del rCB₁ (directa o indirectamente) y como antagonista del rCB₂. Con respecto al Gpr55, se observaron resultados

opuestos en AMY e HIPP. Por un lado, el CBD regula al alza el Gpr55 a la dosis de 30mg/kg en la AMY, mientras que, por otro lado, su expresión se reduce en el HIPP con cada una de las dosis probadas, y sin diferencia entre ellas. De manera similar, estudios anteriores publicados por nuestro grupo de investigación, mostraron que el CBD reduce la expresión del Gpr55 en la NAcc de ratones expuestos al paradigma de autoadministración oral con etanol [419]. Es necesario explorarlo con más detalle el mecanismo exacto por el que el CBD induce estos efectos opuestos en la expresión del gen Gpr55 en diferentes regiones cerebrales.

Por otro lado, el sistema GABAérgico juega un papel esencial en la regulación de las respuestas emocionales, y su modulación farmacológica a través de las benzodiazepinas es crucial para controlar la ansiedad [418]. El efecto ansiolítico de estos fármacos está mediado por las subunidades $\alpha 2$ y $\gamma 2$ de los receptores GABA_A, con una alta expresión en el sistema límbico y la corteza [420-423]. Los receptores GABA_A están formados por el ensamblaje de diferentes subunidades de $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ en combinación con las subunidades β y $\gamma 2$. A pesar de la escasa información sobre la participación de ellos en la depresión, se ha encontrado que existe una disminución de los niveles de GABA en pacientes con el TDM y que son normalizados tras tratamiento crónico con antidepresivos [420, 421]. Además, ratones knockout heterocigóticos para $\alpha 2$ y $\gamma 2$ exhiben una mayor vulnerabilidad por desarrollar conductas ansiogénicas y depresivas. Existen evidencias sobre una estrecha interacción entre los receptores cannabinoides y el sistema GABAérgico, ya que se han observado alteraciones en las subunidades de los receptores GABA en ratones CB1 $-/-$ [424] y en ratones con sobreexpresión del rCB2 [66]. Fármacos que actúan sobre los rCB₁ y rCB₂ también se modifican la respuesta al estrés, ansiedad y la desesperanza, e inducen cambios en las subunidades $\alpha 2$ y $\gamma 2$ del GABA(A) [85, 410, 425, 426]. En base a todo ello, se analizaron los cambios en la expresión génica de ambas subunidades en la AMY e HIPP de los ratones WT tratados con las diferentes dosis de CBD. De esta manera, pudimos observar que la administración aguda del CBD produjo una reducción en la expresión génica de ambas subunidades GABAérgicas en la AMY y el HIPP con cada una de las dosis administradas. Estos resultados sugieren el CBD podría estar regulando de manera directa o indirectamente la neurotransmisión GABAérgica. En línea con esta idea, estudios previos indican que el CBD inhibe la absorción de GABA en los sinaptosomas de cerebros de ratas a una concentración de 0,1mM [122]. Posteriormente, en un estudio fisiológico se comparó las acciones del CBD y del 2-AG en receptores GABA(A) recombinantes humanos expresados en ovocitos de *Xenopus*, demostrando que el CBD actuaba como un modulador alostérico positivo en los receptores con las subunidades $\alpha 2$.

En su conjunto, los estudios de expresión génica realizados respaldan aún más la compleja red por la que el CBD actuaría como ansiolíticas y antidepresivos. Aunque son necesarios futuros estudios para entender mejor el papel modulador del CBD en los receptores de interés para los trastornos emocionales, parece que el CBD tendría un mecanismo de acción multimodal involucrando diferentes dianas terapéuticas en distintas regiones del cerebro [427] para poder efectuar las acciones ansiolíticas y antidepresivas observadas.

En el artículo 2 se profundiza sobre el efecto del CBD como antidepresivo y su mecanismo de acción. Se evaluaron los efectos antidepresivos de la administración crónica de CBD en comparación con STR, así como la combinación de ambos fármacos en ratones previamente expuestos al ECL [376, 428]. El inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, STR, se seleccionó por ser el tratamiento de primera línea del trastorno depresivo mayor [429] y uno de los antidepresivos más comunes para el tratamiento de otras enfermedades psiquiátricas como es el trastorno obsesivo-compulsivo [430], el trastorno de pánico [431], trastorno de estrés postraumático [431] y el trastorno de ansiedad social.

Es conocido que los tratamientos antidepresivos actuales, como la STR, requieren varias semanas para empezar a reducir la sintomatología depresiva en pacientes y ratas expuestos al ECL [432, 433]. De acuerdo con las pruebas comportamentales LBD y TST el CBD normalizaba los efectos ansiogénicos y depresogénicos inducidos por el ECL tan solo tras 4 y 7 días de tratamiento, respectivamente. Por el contrario, fueron necesarios 14 días de tratamiento con la STR para producir una acción antidepresiva significativa. Esta es la primera evidencia del efecto antidepresivo del CBD como un agente de acción rápida comparado con un antidepresivo común y de referencia. Además, el CBD parece presentar una acción antidepresiva más completa que la STR, al restaurar el deterioro cognitivo inducido por el ECL, mientras que la STR no alcanzó una diferencia estadísticamente significativa. Este hallazgo contradice resultados anteriores que muestran que la STR es capaz de revertir los deterioros cognitivos causados por el ECL en ratas [434]. Estas discrepancias pueden estar relacionadas con diferencias en las cepas utilizadas (ratones CD1 vs ratas Sprague-Dawley), duración del ECL (4 o 6 semanas) antes del inicio del tratamiento farmacológico, las dosis empleadas de STR (10 mg/kg vs 5 mg/kg) y/o la prueba de comportamiento utilizada (reconocimiento de objetos vs Laberinto de Morris y prueba del descenso inhibido de la plataforma). Los resultados hallados en esta tesis aportan nueva información relevante sugiriendo que la administración crónica de CBD revierte todas las alteraciones del comportamiento (el aumento de ansiedad, la desesperanza, el deterioro cognitivo y la anhedonia) inducidas por el ECL de manera más rápida y eficaz que la STR.

Para dilucidar el mecanismo de acción del CBD se evaluaron cambios en la expresión de genes y proteínas de elementos clave estrechamente relacionados con la depresión. En este sentido, dado que los neurotransmisores monoaminérgicos, especialmente la serotonina (5-HT), han estado ampliamente implicados en la fisiopatología de los trastornos depresivos [435]) fueron tenidos en cuenta para ser estudiados en este apartado. A pesar de algunos datos contradictorios, se ha detectado una reducción de la actividad de vías serotoninérgicas y alteraciones en el 5-HTT en pacientes depresivos [436, 437]. En los roedores expuestos al ECL, las concentraciones de 5-HT [438-440], la densidad del 5-HTT y su expresión genética se hayan reducidos en varias regiones del cerebro [441-444]. En este estudio, la expresión génica del 5-HTT (SIC6a4) se redujo significativamente en el DR de los ratones expuestos al ECL en comparación con los no estresados. El aumento del 5-HTT se relaciona con la reducción de conductas de tipo depresivo y de anhedonia, tras la administración de antidepresivos [445, 446]. Curiosamente el CBD y la STR aumentaron la expresión del gen Scl6a4, aunque el efecto fue

más pronunciado con el CBD. Esto puede explicarse, al menos en parte, por qué el CBD muestra una mayor eficacia que STR en el control de las alteraciones inducidas por el ECL.

Dentro de los receptores serotoninérgicos, se seleccionaron el 5-HT_{1A} y el 5-HT_{2A}. El 5-HT_{1A} que juega un papel crucial en el control de la disponibilidad de 5-HT, expresándose en diferentes regiones del sistema límbico [447]. Esta implicado en la regulación de la ansiedad, la depresión y la neuroplasticidad tanto en humanos como en roedores [448-457]. En nuestro estudio, el ECL aumentó la expresión génica del receptor 5-HT_{1A} en el HIPP y lo redujo en la AMY. Estos resultados son consistentes con estudios anteriores que sugieren que los estímulos estresantes inducen cambios opuestos en la expresión del gen 5-HT_{1A} dependiendo de la región cerebral analizada [452, 458]. El CBD revirtió ambas alteraciones, mientras que la STR solo aumento el 5-HT_{1A} en la AMY. Esto concuerda con las evidencias publicadas anteriormente que indican que el CBD es un agonista del receptor 5-HT_{1A}, acción que se ha relacionado con sus propiedades antidepresivas [288, 301, 304, 417, 459]. Los antidepresivos ISRS modifican de manera significativa la actividad funcional del receptor 5-HT_{1A} en varias regiones del cerebro [447, 460], mediando, al menos en parte, sus efectos antidepresivos. En los núcleos cerebrales del rafe, el aumento de las concentraciones de 5-HT inducidos por la inhibición del 5-HTT, estimulan a los receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos presinápticos. Esta acción resulta en una inhibición de la liberación de 5-HT, que consecuentemente retrasa la activación del efecto antidepresivo. Sin embargo, el tratamiento crónico con los ISRS, desensibiliza a los receptores 5-HT_{1A} incrementando, así, las concentraciones de 5-HT en la sinapsis que subsecuentemente activan a los receptores 5-HT_{1A} post-sinápticos, acción que se relaciona con la aparición de los efectos antidepresivos [461-463]. Así, el agonismo del receptor 5-HT_{1A}, en combinación con la inhibición del 5-HTT, se relacionan con una acción antidepresiva más rápida [463-465]. También, se ha observado que el tratamiento con CBD de manera repetida incrementa la actividad de disparo de neuronas serotoninérgicas [466] debido a una desensibilización de los auto-receptores 5-HT_{1A} [467]. Este mecanismo se asoció con reducción de la ansiedad en un modelo de dolor neuropático en ratas [466]. Por tanto, es posible hipotetizar que las acciones eficiencia y eficacia más rápidas del CBD en comparación con la STR se deban a la activación de los receptores 5-HT_{1A}. Es importante mencionar, que es necesario estudiar más en profundidad la implicación del 5-HT_{1A} en los efectos antidepresivos del CBD mediante, por ejemplo, el bloqueo del receptor 5-HT_{1A} en ratones expuestos al ECL y tratados con CBD.

El receptor 5-HT_{2A} se modifica por el estrés y está involucrado en múltiples trastornos psiquiátricos. Además, la activación de este receptor en la AMY se ha relacionado estrechamente con trastornos de ansiedad generalizada [468, 469], trastornos de la personalidad [470] y con el trastorno de estrés post-traumático [471]. También, se ha identificado un aumento del 5-HT_{2A} en la corteza de pacientes fallecidos por suicidio [472, 473] y en varias regiones cerebrales en roedores expuestos al ECL [474, 475]. En línea con estos hallazgos, en esta tesis, el ECL aumentó significativamente al receptor 5-HT_{2A} en el HIPP y AMY. La administración crónica del CBD fue capaz de revertir estas alteraciones, mientras que la STR solo disminuyó la expresión génica del 5-HT_{2A} en el HIPP. Evidencias anteriores indican que el aumento de la expresión del

receptor 5-HT_{2A} está asociado con el estrés, aumentando la intensidad y las consecuencias de este en cerebros post-mortem de víctimas de suicidio [476]. Por lo tanto, es tentador especular que la reducción de 5-HT_{2A} inducida por el CBD puede contribuir a una eficacia más significativa con respecto a la STR para revertir las alteraciones de comportamiento producidas por el ECL. Sin embargo, no hay información sobre cómo el CBD interactúa con el receptor 5-HT_{2A}. El hecho de que reduzca su expresión indicaría que actúa como agonista de este receptor, siendo necesario explorarlo más a fondo en estudios futuros.

Por otro lado, y curiosamente, el tratamiento con CBD aumentó la expresión del gen BDNF en el HIPP, a diferencia de la STR. Además, los estudios inmunohistoquímicos revelaron que el tratamiento con CBD aumentó la intensidad de marcaje para BDNF en el HIPP de manera más significativa que con STR. Estos resultados están de acuerdo con estudios anteriores que muestran que el CBD aumenta la expresión del gen BDNF y la sinaptofisina en la PFC y el HIPP de ratones ICR expuestos al ECL [309]. Además, la administración aguda del CBD produjo efectos antidepresivos asociados con un aumento de la sinaptofisina y de PSD95 en la mPFC y de la expresión proteica del BDNF en la mPFC e HIPP [302]. Adicionalmente, en modelos animales de isquemia cerebral, el CBD es capaz de incrementar los niveles del BDNF hipocampal, estimulando la neurogénesis y promoviendo la reestructuración dendrítica [477]. De manera similar, en un modelo de manía en roedores inducido por D-anfetamina, se observó un incremento en la expresión del BDNF en el HIPP tras la administración del CBD [478]. Además, el tratamiento con CBD aumentó la intensidad de marcaje para NeuN y disminuyó el marcaje de la caspasa-3 de manera más significativa que con STR. Por lo tanto, el CBD fue más eficaz para revertir el aumento de la apoptosis y pérdida neuronal que la STR en el ECL.

Por otro lado, los análisis de la expresión del gen PPARdelta en el GD del HIPP proporcionaron más información sobre la mejora de la neuroplasticidad mediada por el CBD. El PPARdelta pertenece a la familia de receptores PPAR con una amplia distribución cerebral [479, 480]. Recientemente, se ha visto que este receptor regula el 5-HTT en el HIPP [481] y es esencial para reducir los síntomas de tipo depresivo inducidos por estrés [482]. Además, la activación del PPARdelta induce neuroprotección y revierte la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer [483], la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington [484]. Notablemente, el tratamiento con CBD fue el único capaz de revertir la reducción de la expresión génica del PPARdelta en el HIPP generada por el ECL.

Se analizaron también posibles cambios del mVGlut1 en el HIPP. Este transportador de glutamato está ubicado en las neuronas presinápticas de glutamato, estando implicado en llevar el glutamato a las vesículas presinápticas y promover la liberación sináptica de glutamato [485]. El control de los niveles de glutamato es fundamental para proteger el cerebro de la excitotoxicidad, que puede conducir a la muerte celular [486]. Se ha propuesto que el desequilibrio entre la neurotransmisión inhibitoria (glutamatérgica) y excitatoria (GABAérgica) está implicada en diferentes trastornos psiquiátricos, incluidos los trastornos depresivos [421, 487]. Recientemente, la modulación de la neurotransmisión del glutamato se ha relacionado con los efectos antidepresivos de la ketamina y sus efectos sobre la neuroplasticidad [488, 489]. En

este estudio, el ECL redujo la expresión del gen mVGlut1, que puede estar relacionado con cambios en las concentraciones de glutamato en la hendidura sináptica, mientras que el CBD y la STR aumentaron la expresión de este gen en el HIPP.

Otra parte desarrollada en la presente tesis, y que resultó ser particularmente interesante, fue la combinación del CBD con STR para identificar si dicha combinación era capaz de mostrar efectos potencialmente aditivos o sinérgicos. La combinación entre medicamentos es un procedimiento estándar en la clínica, especialmente para el tratamiento de los trastornos depresivos e indicado para lograr una mayor eficacia y menor número de efectos adversos que con terapias farmacológicas individuales. Sin embargo, de manera inesperada, la combinación de CBD con STR resultó ser menos efectiva que el CBD administrado individualmente en la modulación de las alteraciones comportamentales y moleculares causadas por el ECL. Estos resultados, plantean la pregunta sobre la naturaleza de la interacción entre ambos fármacos. Una posible explicación sería una interacción farmacocinética, ya que ambos son metabolizados hepáticamente por el mismo citocromo P450 (CYP2C19) [273, 490, 491]. En este sentido, recientemente tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han señalado que el CBD inhibe significativamente al CYP2C19, disminuyendo el metabolismo de STR y los ISRS [491, 492]. Esto conllevaría a aumentar las concentraciones de STR y serotonina. De esta manera, aparentemente la combinación del CBD más la STR aumentaría el riesgo de efectos secundarios por parte de los ISRS debido a su elevada concentración [493, 494]. Recientemente se ha publicado un caso clínico de un paciente con trastorno de depresión y ansiedad tratado con STR durante más de 20 años, que ingresa en el hospital por una disfunción cognitiva inducida por hiponatremia. El paciente inició tratamiento por cuenta propia con CBD, el cual produjo una inhibición del CYP2C19, aumentando los niveles de STR y estos a su vez de 5-HT, produciendo la hiponatremia y el déficit cognitivo [495].

Cabe destacar que el CBD y la STR se unen a proteínas plasmáticas [496, 497], por lo que podría existir también una interacción entre ambos fármacos a este nivel, que podría explicar, al menos en parte, por qué su combinación tiene menos eficacia que la administración individual del CBD.

Por otro lado, también podría existir una interacción farmacodinámica entre el CBD y la STR. Al inicio del tratamiento (durante los días 1 al 14), el CBD con la STR mostró la misma eficacia que el CBD solo, mientras que la STR administrada individualmente no. A los 14 días de tratamiento, la STR comienza a tener efecto por sí misma, y la combinación empieza a ser menos efectiva que el CBD. A partir de este punto temporal, la combinación da como resultado una eficacia menor que el CBD, como se muestra en los paradigmas de reconocimiento de objetos y de ingesta de sacarosa.

De manera global, los resultados revelan que el CBD es capaz de inducir un efecto antidepresivo acompañado de cambios en dianas clave del sistema serotoninérgico y de la neuroplasticidad, lo que amplía el conocimiento sobre su posible mecanismo de acción. El CBD parece presentar ventajas como antidepresivo comparado con la STR, como su velocidad de acción más rápida y su eficiencia, modulando todas las alteraciones de conducta y moleculares

analizadas en este estudio. Asimismo, es importante destacar que se debe prestar especial atención a la combinación de CBD con antidepresivos, ya que parece producir un impacto negativo en el tratamiento. Sería necesario realizar en un futuro cercano estudios que permitan determinar el posible posicionamiento terapéutico del CBD para el tratamiento de los trastornos depresivos y de ansiedad.

7. Futuras direcciones

Los resultados de la presente tesis suponen el primer paso para el desarrollo de estudios pre-clínicos y clínicos sobre el potencial terapéutico del CBD en el tratamiento de los trastornos de ansiedad y depresión en humanos. Esto es factible ya que actualmente el CBD se encuentra aprobado por la AEM y la FDA en el tratamiento de la espasticidad en esclerosis múltiple (Sativex®, CBD:THC 1:1) y para el tratamiento de diferentes síndromes epilépticos en niños (Epidiolex®). Dado que tiene un perfil de seguridad alto, sin destacar efectos adversos graves, se hace factible realizar un estudio piloto para evaluar su eficacia en ansiedad y depresión.

Además de las dianas más destacadas e implicadas en la depresión y estudiadas en esta tesis, sería de relevancia realizar nuevas investigaciones encaminadas a identificar otras dianas que permitieran elucidar el mecanismo de acción completo del CBD como antidepresivo.



8. Conclusiones finales

1. El CBD presenta efectos ansiolíticos y antidepresivos en modelos agudos de ansiedad y depresión a través de una dosis-respuesta en forma de “U” invertida, siendo las dosis medias las más eficaces.
2. El rCB1 es necesario para los efectos ansiolíticos del CBD. En ratones CB1 -/- o tratados con el antagonista del rCB1, SR141716A, el CBD no presenta efecto ansiolítico.
3. La actividad antidepresiva del CBD estaría modulada por otras dianas terapéuticas, dado que la carencia de los receptores rCB1, rCB2 y GPR55 no evitó la respuesta antidepresiva del mismo.
4. La administración aguda del CBD es capaz de modular la expresión génica de dianas del sistema endocannabinoide (rCB1, rCB2 y GPR55) y de las subunidades GABAérgicas alfa2 y gamma2 en la AMY e HIPP, lo que indica que podría regular de manera directa o indirecta la neurotransmisión mediada por el GABA.
5. El CBD administrado crónicamente presenta un claro efecto antidepresivo, modulando las alteraciones comportamentales y neuromoleculares inducidas por el ECL.
6. El CBD presenta un efecto antidepresivo más rápido y eficaz que la STR.
7. La combinación CBD y STR presenta menor eficacia que el CBD solo, siendo necesario explorar que interacciones existen entre ambos compuestos que expliquen estos hallazgos.
8. En su conjunto, los resultados de la presente tesis ponen de manifiesto las propiedades ansiolíticas y antidepresivas del CBD, suponiendo un avance para el desarrollo de ensayos clínicos en humanos.

9. Referencias

1. Evans-Lacko, S., et al., *Socio-economic variations in the mental health treatment gap for people with anxiety, mood, and substance use disorders: results from the WHO World Mental Health (WMH) surveys*. *Psychol Med*, 2018. **48**(9): p. 1560-1571.
2. ENSE *Salud Mental*. 2017.
3. Kuehner, C., *Why is depression more common among women than among men?* *Lancet Psychiatry*, 2017. **4**(2): p. 146-158.
4. Saloni Dattani, H.R.a.M.R. *Mental Health*. 2021.
5. Malhi, G.S. and J.J. Mann, *Depression*. *Lancet*, 2018. **392**(10161): p. 2299-2312.
6. Ormel, J., R.C. Kessler, and R. Schoevers, *Depression: more treatment but no drop in prevalence: how effective is treatment? And can we do better?* *Curr Opin Psychiatry*, 2019. **32**(4): p. 348-354.
7. Bains, N. and S. Abdijadid, *Major Depressive Disorder*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
8. Association, A.P. and A.P.A.D.-T. Force, *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales: DSM-5*. 2018: Editorial Médica Panamericana.
9. Tolentino, J.C. and S.L. Schmidt, *DSM-5 Criteria and Depression Severity: Implications for Clinical Practice*. *Front Psychiatry*, 2018. **9**: p. 450.
10. Ormel, J., et al., *Disability and treatment of specific mental and physical disorders across the world*. *Br J Psychiatry*, 2008. **192**(5): p. 368-75.
11. Stewart, W.F., et al., *Cost of lost productive work time among US workers with depression*. *JAMA*, 2003. **289**(23): p. 3135-44.
12. Greenberg, P.E., et al., *The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000?* *J Clin Psychiatry*, 2003. **64**(12): p. 1465-75.
13. Paloma Ruiz-Rodríguez, A.C.-V., Roger Muñoz Navarro, Leonardo Medrano, Juan Antonio Moriana, Carlos Bulza Aguado, Gonzalo Jiménez Cabré, César González-Blanch, Grupo de Investigación PsciAP *Impacto económico y carga de los trastornos mentales comunes en España: una revisión sistemática y crítica*. *Ansiedad y Estrés*, 2017. **23**(2-3): p. 118-123.
14. Rush, A.J., et al., *Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report*. *Am J Psychiatry*, 2006. **163**(11): p. 1905-17.
15. Warden, D., et al., *Predictors of attrition during initial (citalopram) treatment for depression: a STAR*D report*. *Am J Psychiatry*, 2007. **164**(8): p. 1189-97.
16. Carvalho, S., et al., *Memories of shame experiences with others and depression symptoms: the mediating role of experiential avoidance*. *Clin Psychol Psychother*, 2015. **22**(1): p. 32-44.
17. Dold, M., et al., *Pharmacological treatment strategies in unipolar depression in European tertiary psychiatric treatment centers - A pharmacoepidemiological cross-sectional multicenter study*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2016. **26**(12): p. 1960-1971.
18. Fagiolini, A., et al., *Role of trazodone in treatment of major depressive disorder: an update*. *Ann Gen Psychiatry*, 2023. **22**(1): p. 32.
19. Farooq, S. and S.P. Singh, *Fixed dose-combination products in psychiatry: Systematic review and meta-analysis*. *J Psychopharmacol*, 2015. **29**(5): p. 556-64.
20. Shelton, R.C., et al., *Olanzapine/fluoxetine combination for treatment-resistant depression: a controlled study of SSRI and nortriptyline resistance*. *J Clin Psychiatry*, 2005. **66**(10): p. 1289-97.
21. Pandarakalam, J.P., *Challenges of Treatment-resistant Depression*. *Psychiatr Danub*, 2018. **30**(3): p. 273-284.

22. Izzo, A.A., et al., *Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(10): p. 515-27.
23. Mechoulam, R., et al., *Cannabidiol--recent advances*. Chem Biodivers, 2007. **4**(8): p. 1678-92.
24. Pisanti, S., et al., *Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications*. Pharmacol Ther, 2017. **175**: p. 133-150.
25. Aviello, G., et al., *Chemopreventive effect of the non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(8): p. 925-34.
26. Mechoulam, R. and Y. Shvo, *Hashish. I. The structure of cannabidiol*. Tetrahedron, 1963. **19**(12): p. 2073-8.
27. Batalla, A., et al., *The Impact of Cannabidiol on Human Brain Function: A Systematic Review*. Front Pharmacol, 2020. **11**: p. 618184.
28. Henson, J.D., et al., *Enhancing Endocannabinoid Control of Stress with Cannabidiol*. J Clin Med, 2021. **10**(24).
29. Navarrete, F., et al., *Role of Cannabidiol in the Therapeutic Intervention for Substance Use Disorders*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 626010.
30. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders*. Biomolecules, 2020. **10**(11).
31. Dammann, I., C. Rohleder, and F.M. Leweke, *Cannabidiol and its Potential Evidence-Based Psychiatric Benefits - A Critical Review*. Pharmacopsychiatry, 2024. **57**(3): p. 115-132.
32. Hillard, C.J., *Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. **61**(1-2): p. 3-18.
33. Piomelli, D., *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(11): p. 873-84.
34. Devane, W.A., et al., *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1946-9.
35. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature, 1993. **365**(6441): p. 61-5.
36. Cravatt, B.F., et al., *Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides*. Nature, 1996. **384**(6604): p. 83-7.
37. Bracey, M.H., et al., *Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1793-6.
38. Dinh, T.P., T.F. Freund, and D. Piomelli, *A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation*. Chem Phys Lipids, 2002. **121**(1-2): p. 149-58.
39. Starowicz, K., S. Nigam, and V. Di Marzo, *Biochemistry and pharmacology of endovanilloids*. Pharmacol Ther, 2007. **114**(1): p. 13-33.
40. Overton, H.A., et al., *Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 167-75.
41. Lauckner, J.E., et al., *GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(7): p. 2699-704.
42. Johns, D.G., et al., *The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(5): p. 825-31.
43. Baker, D., et al., *In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(1): p. 1-4.
44. Staton, P.C., et al., *The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain*. Pain, 2008. **139**(1): p. 225-236.
45. Brown, A.J., *Novel cannabinoid receptors*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(5): p. 567-75.

46. Herkenham, M., et al., *Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat*. Brain Res, 1991. **547**(2): p. 267-74.
47. Mailleux, P. and J.J. Vanderhaeghen, *Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry*. Neuroscience, 1992. **48**(3): p. 655-68.
48. Glass, M., M. Dragunow, and R.L. Faull, *Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain*. Neuroscience, 1997. **77**(2): p. 299-318.
49. Heim, M.E., W. Queisser, and H.P. Altenburg, *Randomized crossover study of the antiemetic activity of levonantradol and metoclopramide in cancer patients receiving chemotherapy*. Cancer Chemother Pharmacol, 1984. **13**(2): p. 123-5.
50. Walsh, D., K.A. Nelson, and F.A. Mahmoud, *Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology*. Support Care Cancer, 2003. **11**(3): p. 137-43.
51. Wallace, M.S., et al., *Efficacy of Inhaled Cannabis on Painful Diabetic Neuropathy*. J Pain, 2015. **16**(7): p. 616-27.
52. Leweke, F.M., *Anandamide dysfunction in prodromal and established psychosis*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(32): p. 5188-93.
53. El-Alfy, A.T., et al., *Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from Cannabis sativa L*. Pharmacol Biochem Behav, 2010. **95**(4): p. 434-42.
54. Gomes, F.V., L.B. Resstel, and F.S. Guimaraes, *The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors*. Psychopharmacology (Berl), 2011. **213**(2-3): p. 465-73.
55. de Mello Schier, A.R., et al., *Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of cannabidiol: a chemical compound of Cannabis sativa*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014. **13**(6): p. 953-60.
56. Cancer, N.I.o. *Cannabis and cannabinoids*. 2024; Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/mca/paciente/cannabis-pdq>.
57. Jorda, M.A., et al., *Identification, characterization, and function of a novel oncogene: the peripheral cannabinoid receptor Cb2*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **996**: p. 10-6.
58. Chakrabarti, A., E.S. Onaivi, and G. Chaudhuri, *Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein*. DNA Seq, 1995. **5**(6): p. 385-8.
59. Derocq, J.M., et al., *Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations*. FEBS Lett, 1995. **369**(2-3): p. 177-82.
60. Schatz, A.R., et al., *Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system*. Toxicol Appl Pharmacol, 1997. **142**(2): p. 278-87.
61. Griffin, G., et al., *An investigation into the structural determinants of cannabinoid receptor ligand efficacy*. Br J Pharmacol, 1999. **126**(7): p. 1575-84.
62. Carlisle, S.J., et al., *Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation*. Int Immunopharmacol, 2002. **2**(1): p. 69-82.
63. Van Sickle, M.D., et al., *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. Science, 2005. **310**(5746): p. 329-32.
64. Gong, J.P., et al., *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain*. Brain Res, 2006. **1071**(1): p. 10-23.
65. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(7): p. 1773-84.
66. Garcia-Gutierrez, M.S. and J. Manzanares, *Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice*. J Psychopharmacol, 2011. **25**(1): p. 111-20.

67. Ishiguro, H., et al., *Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia*. Biol Psychiatry, 2010. **67**(10): p. 974-82.
68. Onaivi, E.S., et al., *Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 434-49.
69. Ishiguro, H., et al., *A nonsynonymous polymorphism in cannabinoid CB2 receptor gene is associated with eating disorders in humans and food intake is modified in mice by its ligands*. Synapse, 2010. **64**(1): p. 92-6.
70. Ortega-Alvaro, A., et al., *Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice*. Neuropsychopharmacology, 2011. **36**(7): p. 1489-504.
71. Antoniuk, S., et al., *Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability*. Neurosci Biobehav Rev, 2019. **99**: p. 101-116.
72. Hill, M.N., et al., *Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment*. J Neurochem, 2008. **106**(6): p. 2322-36.
73. Hill, M.N. and B.B. Gorzalka, *Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression?* Behav Pharmacol, 2005. **16**(5-6): p. 333-52.
74. Reich, C.G., M.E. Taylor, and M.M. McCarthy, *Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats*. Behav Brain Res, 2009. **203**(2): p. 264-9.
75. Kamprath, K., et al., *Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes*. J Neurosci, 2006. **26**(25): p. 6677-86.
76. Marsicano, G., et al., *Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1*. J Neurochem, 2002. **80**(3): p. 448-56.
77. Plendl, W. and C.T. Wotjak, *Dissociation of within- and between-session extinction of conditioned fear*. J Neurosci, 2010. **30**(14): p. 4990-8.
78. Marsicano, G., et al., *The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories*. Nature, 2002. **418**(6897): p. 530-4.
79. Gorzalka, B.B. and M.N. Hill, *Putative role of endocannabinoid signaling in the etiology of depression and actions of antidepressants*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011. **35**(7): p. 1575-85.
80. Ravinet Trillou, C., et al., *CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28**(4): p. 640-8.
81. Steiner, M.A., et al., *Antidepressant-like behavioral effects of impaired cannabinoid receptor type 1 signaling coincide with exaggerated corticosterone secretion in mice*. Psychoneuroendocrinology, 2008. **33**(1): p. 54-67.
82. Aso, E., et al., *BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice*. J Neurochem, 2008. **105**(2): p. 565-72.
83. Martin, M., et al., *Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour*. Psychopharmacology (Berl), 2002. **159**(4): p. 379-87.
84. Sanchis-Segura, C., et al., *Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **176**(2): p. 223-32.
85. Haller, J., et al., *The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(7): p. 1395-8.
86. Haller, J., et al., *Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(7): p. 1906-12.
87. Liberatore, F., et al., *Targeting mGlu1 Receptors in the Treatment of Motor and Cognitive Dysfunctions in Mice Modeling Type 1 Spinocerebellar Ataxia*. Cells, 2022. **11**(23).
88. Martin, B.R., et al., *Assessment of structural commonality between tetrahydrocannabinol and anandamide*. Eur J Pharmacol, 2002. **435**(1): p. 35-42.

89. Uriguen, L., et al., *Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors*. *Neuropharmacology*, 2004. **46**(7): p. 966-73.
90. Haller, J., et al., *CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents*. *Behav Pharmacol*, 2004. **15**(4): p. 299-304.
91. Houchi, H., et al., *CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D2 receptors*. *Neuropsychopharmacology*, 2005. **30**(2): p. 339-49.
92. Ledent, C., et al., *Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice*. *Science*, 1999. **283**(5400): p. 401-4.
93. Dubreucq, S., et al., *CB1 receptor deficiency decreases wheel-running activity: consequences on emotional behaviours and hippocampal neurogenesis*. *Exp Neurol*, 2010. **224**(1): p. 106-13.
94. Steiner, M.A., et al., *Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice*. *Pharmacogenomics J*, 2008. **8**(3): p. 196-208.
95. Burokas, A., et al., *Relationships between serotonergic and cannabinoid system in depressive-like behavior: a PET study with [11C]-DASB*. *J Neurochem*, 2014. **130**(1): p. 126-35.
96. Viveros, M.P., E.M. Marco, and S.E. File, *Endocannabinoid system and stress and anxiety responses*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005. **81**(2): p. 331-42.
97. Komaki, A., et al., *Study the Effect of Endocannabinoid System on Rat Behavior in Elevated Plus-Maze*. *Basic Clin Neurosci*, 2015. **6**(3): p. 147-53.
98. Lisboa, S.F., et al., *Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2*. *Neuropsychopharmacology*, 2018. **43**(9): p. 1924-1933.
99. Rey, A.A., et al., *Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission*. *Neuropsychopharmacology*, 2012. **37**(12): p. 2624-34.
100. Lee, T.T. and B.B. Gorzalka, *Evidence for a Role of Adolescent Endocannabinoid Signaling in Regulating HPA Axis Stress Responsivity and Emotional Behavior Development*. *Int Rev Neurobiol*, 2015. **125**: p. 49-84.
101. Gray, J.M., et al., *Corticotropin-releasing hormone drives anandamide hydrolysis in the amygdala to promote anxiety*. *J Neurosci*, 2015. **35**(9): p. 3879-92.
102. Gray, J.M., et al., *Sustained glucocorticoid exposure recruits cortico-limbic CRH signaling to modulate endocannabinoid function*. *Psychoneuroendocrinology*, 2016. **66**: p. 151-8.
103. Di, S., et al., *Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism*. *J Neurosci*, 2003. **23**(12): p. 4850-7.
104. Corchero, J., J.A. Fuentes, and J. Manzanares, *Chronic treatment with CP-55,940 regulates corticotropin releasing factor and proopiomelanocortin gene expression in the hypothalamus and pituitary gland of the rat*. *Life Sci*, 1999. **64**(11): p. 905-11.
105. Corchero, J., et al., *Time-dependent differences of repeated administration with Delta9-tetrahydrocannabinol in proenkephalin and cannabinoid receptor gene expression and G-protein activation by mu-opioid and CB1-cannabinoid receptors in the caudate-putamen*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999. **67**(1): p. 148-57.
106. Weidenfeld, J., et al., *Characterization of the 2-deoxyglucose effect on the adrenocortical axis*. *Endocrinology*, 1994. **134**(4): p. 1924-31.
107. Cota, D., et al., *Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function*. *Endocrinology*, 2007. **148**(4): p. 1574-81.
108. McLaughlin, R.J., M.N. Hill, and B.B. Gorzalka, *Monoaminergic neurotransmission contributes to cannabinoid-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **624**(1-3): p. 71-6.

109. Bambico, F.R., et al., *Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex*. J Neurosci, 2007. **27**(43): p. 11700-11.
110. Gobbi, G., et al., *Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18620-5.
111. Hill, M.N. and B.B. Gorzalka, *Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test*. Eur Neuropsychopharmacol, 2005. **15**(6): p. 593-9.
112. Zong, Y., et al., *Cannabinoids Regulate the Diameter of Pericyte-Containing Retinal Capillaries in Rats*. Cell Physiol Biochem, 2017. **43**(5): p. 2088-2101.
113. Jiang, W., et al., *Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3104-16.
114. Morrish, A.C., et al., *Protracted cannabinoid administration elicits antidepressant behavioral responses in rats: role of gender and noradrenergic transmission*. Physiol Behav, 2009. **98**(1-2): p. 118-24.
115. Ebrahimi-Ghiri, M., M. Nasehi, and M.R. Zarrindast, *Anxiolytic and antidepressant effects of ACPA and harmaline co-treatment*. Behav Brain Res, 2019. **364**: p. 296-302.
116. McLaughlin, R.J., et al., *Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect*. Behav Pharmacol, 2007. **18**(5-6): p. 431-8.
117. Adamczyk, P., et al., *Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats*. J Physiol Pharmacol, 2008. **59**(2): p. 217-28.
118. ElBatsh, M.M., et al., *Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2012. **221**(2): p. 239-47.
119. Elbatsh, M.M., et al., *Antidepressant-like effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and rimonabant in the olfactory bulbectomised rat model of depression*. Pharmacol Biochem Behav, 2012. **102**(2): p. 357-65.
120. Haj-Mirzaian, A., et al., *Activation of cannabinoid receptors elicits antidepressant-like effects in a mouse model of social isolation stress*. Brain Res Bull, 2017. **130**: p. 200-210.
121. Segev, A., et al., *Cannabinoid receptor activation prevents the effects of chronic mild stress on emotional learning and LTP in a rat model of depression*. Neuropsychopharmacology, 2014. **39**(4): p. 919-33.
122. Banerjee, S.P., S.H. Snyder, and R. Mechoulam, *Cannabinoids: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes*. J Pharmacol Exp Ther, 1975. **194**(1): p. 74-81.
123. Steffens, M. and T.J. Feuerstein, *Receptor-independent depression of DA and 5-HT uptake by cannabinoids in rat neocortex--involvement of Na(+)/K(+)-ATPase*. Neurochem Int, 2004. **44**(7): p. 529-38.
124. Velenovska, M. and Z. Fisar, *Effect of cannabinoids on platelet serotonin uptake*. Addict Biol, 2007. **12**(2): p. 158-66.
125. Levy, R., et al., *Impairment of ADP-induced platelet aggregation by hashish components*. Thromb Haemost, 1976. **36**(3): p. 634-40.
126. Mazor, M., et al., *Effect of cannabinoids on the activity of monoamine oxidase in normal human platelets*. Arch Int Physiol Biochim, 1982. **90**(1): p. 15-20.
127. Mendiguren, A. and J. Pineda, *Systemic effect of cannabinoids on the spontaneous firing rate of locus coeruleus neurons in rats*. Eur J Pharmacol, 2006. **534**(1-3): p. 83-8.
128. Palazzo, E., et al., *Neuropathic pain and the endocannabinoid system in the dorsal raphe: pharmacological treatment and interactions with the serotonergic system*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(7): p. 2011-20.

129. Derkinderen, P., et al., *Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus*. J Neurosci, 2003. **23**(6): p. 2371-82.
130. Marchalant, Y., et al., *Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis*. Neurobiol Dis, 2009. **34**(2): p. 300-7.
131. Marchalant, Y., H.M. Brothers, and G.L. Wenk, *Cannabinoid agonist WIN-55,212-2 partially restores neurogenesis in the aged rat brain*. Mol Psychiatry, 2009. **14**(12): p. 1068-9.
132. Arevalo, C., R. de Miguel, and R. Hernandez-Tristan, *Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters*. Pharmacol Biochem Behav, 2001. **70**(1): p. 123-31.
133. Navarro, M., et al., *Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat*. Neuroreport, 1997. **8**(2): p. 491-6.
134. Degroot, A. and G.G. Nomikos, *Genetic deletion and pharmacological blockade of CB1 receptors modulates anxiety in the shock-probe burying test*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(4): p. 1059-64.
135. Genn, R.F., et al., *Effects of nicotine and a cannabinoid receptor agonist on negative contrast: distinction between anxiety and disappointment?* Psychopharmacology (Berl), 2004. **177**(1-2): p. 93-9.
136. Hill, M.N. and B.B. Gorzalka, *Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress*. Eur J Pharmacol, 2004. **499**(3): p. 291-5.
137. Rodgers, R.J., P.M. Evans, and A. Murphy, *Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naive and plus-maze-experienced mice*. Behav Pharmacol, 2005. **16**(5-6): p. 405-13.
138. Sink, K.S., et al., *Potential anxiogenic effects of cannabinoid CB1 receptor antagonists/inverse agonists in rats: comparisons between AM4113, AM251, and the benzodiazepine inverse agonist FG-7142*. Eur Neuropsychopharmacol, 2010. **20**(2): p. 112-22.
139. Rezaie, M., et al., *The interaction effect of sleep deprivation and cannabinoid type 1 receptor in the CA1 hippocampal region on passive avoidance memory, depressive-like behavior and locomotor activity in rats*. Behav Brain Res, 2021. **396**: p. 112901.
140. Shearman, L.P., et al., *Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice*. Behav Pharmacol, 2003. **14**(8): p. 573-82.
141. Griebel, G., J. Stemmelin, and B. Scatton, *Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents*. Biol Psychiatry, 2005. **57**(3): p. 261-7.
142. Takahashi, E., et al., *Additive subthreshold dose effects of cannabinoid CB(1) receptor antagonist and selective serotonin reuptake inhibitor in antidepressant behavioral tests*. Eur J Pharmacol, 2008. **589**(1-3): p. 149-56.
143. Christensen, R., et al., *[A meta-analysis of the efficacy and safety of the anti-obesity agent Rimonabant]*. Ugeskr Laeger, 2007. **169**(50): p. 4360-3.
144. Nissen, S.E., et al., *Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial*. JAMA, 2008. **299**(13): p. 1547-60.
145. Batista, L.A. and F.A. Moreira, *Cannabinoid CB(1) receptors mediate the anxiolytic effects induced by systemic alprazolam and intra-periaqueductal gray 5-HT(1A) receptor activation*. Neurosci Lett, 2019. **703**: p. 5-10.
146. Garcia-Gutierrez, M.S. and J. Manzanares, *The cannabinoid CB1 receptor is involved in the anxiolytic, sedative and amnesic actions of benzodiazepines*. J Psychopharmacol, 2010. **24**(5): p. 757-65.
147. Naderi, N., et al., *Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice*. Pharmacol Biochem Behav, 2008. **89**(1): p. 64-75.

148. Hesketh, S.A., et al., *Effects of chronic treatment with citalopram on cannabinoid and opioid receptor-mediated G-protein coupling in discrete rat brain regions*. Psychopharmacology (Berl), 2008. **198**(1): p. 29-36.
149. Mato, S., et al., *Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(3): p. 424-34.
150. Hill, M.N., et al., *Differential effects of the antidepressants tranylcypromine and fluoxetine on limbic cannabinoid receptor binding and endocannabinoid contents*. J Neural Transm (Vienna), 2008. **115**(12): p. 1673-9.
151. Hill, M.N., et al., *Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(12): p. 2591-9.
152. Gobshtis, N., S. Ben-Shabat, and E. Fride, *Antidepressant-induced undesirable weight gain: prevention with rimonabant without interference with behavioral effectiveness*. Eur J Pharmacol, 2007. **554**(2-3): p. 155-63.
153. Aso, E., et al., *Lack of CB1 receptor activity impairs serotonergic negative feedback*. J Neurochem, 2009. **109**(3): p. 935-44.
154. Vickstrom, C.R., et al., *Role of endocannabinoid signaling in a septohabenular pathway in the regulation of anxiety- and depressive-like behavior*. Mol Psychiatry, 2021. **26**(7): p. 3178-3191.
155. Ruat, J., et al., *CB1 receptors in corticotropin-releasing factor neurons selectively control the acoustic startle response in male mice*. Genes Brain Behav, 2021. **20**(8): p. e12775.
156. Moreira, F.A., D.C. Aguiar, and F.S. Guimaraes, *Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray*. Neuropharmacology, 2007. **52**(3): p. 958-65.
157. Batista, P.A., M.V. Fogaca, and F.S. Guimaraes, *The endocannabinoid, endovanilloid and nitroergic systems could interact in the rat dorsolateral periaqueductal gray matter to control anxiety-like behaviors*. Behav Brain Res, 2015. **293**: p. 182-8.
158. Viana, T.G., et al., *Anti-aversive role of the endocannabinoid system in the periaqueductal gray stimulation model of panic attacks in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2015. **232**(9): p. 1545-53.
159. Lisboa, S.F., et al., *Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test*. Eur J Pharmacol, 2008. **593**(1-3): p. 73-8.
160. Viana, T.G., et al., *Hypothalamic endocannabinoid signalling modulates aversive responses related to panic attacks*. Neuropharmacology, 2019. **148**: p. 284-290.
161. Di, S., et al., *Acute Stress Suppresses Synaptic Inhibition and Increases Anxiety via Endocannabinoid Release in the Basolateral Amygdala*. J Neurosci, 2016. **36**(32): p. 8461-70.
162. Berger, A.L., et al., *The Lateral Habenula Directs Coping Styles Under Conditions of Stress via Recruitment of the Endocannabinoid System*. Biol Psychiatry, 2018. **84**(8): p. 611-623.
163. Hajizadeh Moghaddam, A., et al., *Cannabinoid system of the lateral septum in the modulation of anxiety-like behaviors in rats*. Arch Iran Med, 2013. **16**(12): p. 711-6.
164. Rubino, T., et al., *Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex*. Cereb Cortex, 2008. **18**(6): p. 1292-301.
165. Rubino, T., et al., *Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats*. Neuropsychopharmacology, 2007. **32**(9): p. 2036-45.

166. Hartmann, A., et al., *Cannabidiol attenuates aggressive behavior induced by social isolation in mice: Involvement of 5-HT1A and CB1 receptors*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2019. **94**: p. 109637.
167. Kochenborger, L., et al., *The microinjection of a cannabinoid agonist into the accumbens shell induces angiogenesis in the elevated plus-maze*. Pharmacol Biochem Behav, 2014. **124**: p. 160-6.
168. Lisboa, S.F., et al., *Cannabinoid CB1 receptors in the dorsal hippocampus and prelimbic medial prefrontal cortex modulate anxiety-like behavior in rats: additional evidence*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2015. **59**: p. 76-83.
169. Remmers, F., et al., *Addressing sufficiency of the CB1 receptor for endocannabinoid-mediated functions through conditional genetic rescue in forebrain GABAergic neurons*. Brain Struct Funct, 2017. **222**(8): p. 3431-3452.
170. Rubino, T., et al., *CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour*. Neuropharmacology, 2008. **54**(1): p. 151-60.
171. Mendiguren, A., E. Aostri, and J. Pineda, *Regulation of noradrenergic and serotonergic systems by cannabinoids: relevance to cannabinoid-induced effects*. Life Sci, 2018. **192**: p. 115-127.
172. Haring, M., et al., *Cannabinoid type-1 receptor signaling in central serotonergic neurons regulates anxiety-like behavior and sociability*. Front Behav Neurosci, 2015. **9**: p. 235.
173. Fabre, L.F. and D. McLendon, *The efficacy and safety of nabilone (a synthetic cannabinoid) in the treatment of anxiety*. J Clin Pharmacol, 1981. **21**(S1): p. 377S-382S.
174. Bhattacharyya, S., et al., *Acute induction of anxiety in humans by delta-9-tetrahydrocannabinol related to amygdalar cannabinoid-1 (CB1) receptors*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 15025.
175. Gonda, X., et al., *Effects of Different Stressors Are Modulated by Different Neurobiological Systems: The Role of GABA-A Versus CB1 Receptor Gene Variants in Anxiety and Depression*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 138.
176. Lazary, J., et al., *Promoter variants of the cannabinoid receptor 1 gene (CNR1) in interaction with 5-HTTLPR affect the anxious phenotype*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2009. **150B**(8): p. 1118-27.
177. Koethe, D., et al., *Expression of CB1 cannabinoid receptor in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression*. J Neural Transm (Vienna), 2007. **114**(8): p. 1055-63.
178. Choi, K., et al., *Expression pattern of the cannabinoid receptor genes in the frontal cortex of mood disorder patients and mice selectively bred for high and low fear*. J Psychiatr Res, 2012. **46**(7): p. 882-9.
179. Rodriguez-Munoz, M., et al., *Schizophrenia and depression, two poles of endocannabinoid system deregulation*. Transl Psychiatry, 2017. **7**(12): p. 1291.
180. !!! INVALID CITATION !!! {}.
181. Juhasz, G., et al., *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**(8): p. 2019-27.
182. Monteleone, P., et al., *Investigation of CNR1 and FAAH endocannabinoid gene polymorphisms in bipolar disorder and major depression*. Pharmacol Res, 2010. **61**(5): p. 400-4.
183. Schennach, R., et al., *The CNR1 gene in depression and schizophrenia - is there an association with early improvement and response?* Psychiatry Res, 2012. **196**(1): p. 160.
184. Domschke, K., et al., *Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression*. Eur Neuropsychopharmacol, 2008. **18**(10): p. 751-9.

185. Mitjans, M., et al., *Genetic variability in the endocannabinoid system and 12-week clinical response to citalopram treatment: the role of the CNR1, CNR2 and FAAH genes.* J Psychopharmacol, 2012. **26**(10): p. 1391-8.
186. Agrawal, A., et al., *Cannabinoid receptor genotype moderation of the effects of childhood physical abuse on anhedonia and depression.* Arch Gen Psychiatry, 2012. **69**(7): p. 732-40.
187. Brusco, A., et al., *Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 450-7.
188. Brusco, A., et al., *Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus.* Synapse, 2008. **62**(12): p. 944-9.
189. Bangalore, S.S., et al., *Cannabis use and brain structural alterations in first episode schizophrenia--a region of interest, voxel based morphometric study.* Schizophr Res, 2008. **99**(1-3): p. 1-6.
190. Fernandez-Espejo, E., et al., *Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia.* Psychopharmacology (Berl), 2009. **206**(4): p. 531-49.
191. Vetulani, J., [*Neurochemistry of impulsiveness and aggression*]. Psychiatr Pol, 2013. **47**(1): p. 103-15.
192. Llorente-Berzal, A., et al., *Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure.* Pharmacol Res, 2013. **74**: p. 23-33.
193. Morcuende, A., et al., *Immunomodulatory Role of CB2 Receptors in Emotional and Cognitive Disorders.* Front Psychiatry, 2022. **13**: p. 866052.
194. Llorente-Berzal, A., et al., *Sex-dependent effects of early maternal deprivation on MDMA-induced conditioned place preference in adolescent rats: possible neurochemical correlates.* Toxicology, 2013. **311**(1-2): p. 78-86.
195. Marco, E.M., et al., *Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats.* Neuropharmacology, 2013. **68**: p. 223-31.
196. Marco, E.M., et al., *Sex-dependent influence of chronic mild stress (CMS) on voluntary alcohol consumption; study of neurobiological consequences.* Pharmacol Biochem Behav, 2017. **152**: p. 68-80.
197. Marco, E.M., et al., *Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain.* Behav Pharmacol, 2014. **25**(5-6): p. 547-56.
198. Onaivi, E.S., *Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain.* Neuropsychobiology, 2006. **54**(4): p. 231-46.
199. Onaivi, E.S., et al., *Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects.* PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1640.
200. Bahi, A., et al., *beta-Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice.* Physiol Behav, 2014. **135**: p. 119-24.
201. Romero, T.R., et al., *Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats.* J Neurosci Res, 2012. **90**(7): p. 1474-9.
202. Kruk-Slomka, M., A. Michalak, and G. Biala, *Antidepressant-like effects of the cannabinoid receptor ligands in the forced swimming test in mice: mechanism of action and possible interactions with cholinergic system.* Behav Brain Res, 2015. **284**: p. 24-36.
203. Onaivi, E.S., et al., *Behavioral effects of CB2 cannabinoid receptor activation and its influence on food and alcohol consumption.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 426-33.
204. Zoppi, S., et al., *Regulatory role of the cannabinoid CB2 receptor in stress-induced neuroinflammation in mice.* Br J Pharmacol, 2014. **171**(11): p. 2814-26.
205. Patel, S., et al., *Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling.* Eur J Neurosci, 2005. **21**(4): p. 1057-69.

206. Hill, M.N., et al., *Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): p. 9406-11.
207. Surkin, P.N., et al., *Pharmacological augmentation of endocannabinoid signaling reduces the neuroendocrine response to stress*. Psychoneuroendocrinology, 2018. **87**: p. 131-140.
208. Robertson, J.M., et al., *Anxious behavior induces elevated hippocampal Cb(2) receptor gene expression*. Neuroscience, 2017. **352**: p. 273-284.
209. Hill, M.N., et al., *Chronic corticosterone treatment increases the endocannabinoid 2-arachidonylethanolamide in the rat amygdala*. Eur J Pharmacol, 2005. **528**(1-3): p. 99-102.
210. Hill, M.N., et al., *Altered responsiveness of serotonin receptor subtypes following long-term cannabinoid treatment*. Int J Neuropsychopharmacol, 2006. **9**(3): p. 277-86.
211. Dubreucq, S., et al., *Genetic dissection of the role of cannabinoid type-1 receptors in the emotional consequences of repeated social stress in mice*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(8): p. 1885-900.
212. Hill, M.N., et al., *Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response*. J Neurosci, 2011. **31**(29): p. 10506-15.
213. Rademacher, D.J., et al., *Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice*. Neuropharmacology, 2008. **54**(1): p. 108-16.
214. Wang, D.J., et al., *Cytosolic phospholipase A2 alpha/arachidonic acid signaling mediates depolarization-induced suppression of excitation in the cerebellum*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e41499.
215. Morena, M., et al., *Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System*. Neuropsychopharmacology, 2016. **41**(1): p. 80-102.
216. Poleszak, E., et al., *Influence of the CB(1) and CB(2) cannabinoid receptor ligands on the activity of atypical antidepressant drugs in the behavioural tests in mice*. Pharmacol Biochem Behav, 2020. **188**: p. 172833.
217. Ribeiro, M.A., et al., *Spontaneous Activity of CB(2) Receptors Attenuates Stress-Induced Behavioral and Neuroplastic Deficits in Male Mice*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 805758.
218. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Alterations in Gene and Protein Expression of Cannabinoid CB(2) and GPR55 Receptors in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Suicide Victims*. Neurotherapeutics, 2018. **15**(3): p. 796-806.
219. Onaivi, E.S., et al., *Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1074**: p. 514-36.
220. Minocci, D., et al., *Genetic association between bipolar disorder and 524A>C (Leu133Ile) polymorphism of CNR2 gene, encoding for CB2 cannabinoid receptor*. J Affect Disord, 2011. **134**(1-3): p. 427-30.
221. Lazary, J., et al., *A functional variant of CB2 receptor gene interacts with childhood trauma and FAAH gene on anxious and depressive phenotypes*. J Affect Disord, 2019. **257**: p. 716-722.
222. Khan, M.Z. and L. He, *Neuro-psychopharmacological perspective of Orphan receptors of Rhodopsin (class A) family of G protein-coupled receptors*. Psychopharmacology (Berl), 2017. **234**(8): p. 1181-1207.
223. Henstridge, C.M., et al., *The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca2+ signaling and NFAT activation*. FASEB J, 2009. **23**(1): p. 183-93.
224. Sawzdargo, M., et al., *Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **64**(2): p. 193-8.
225. Pertwee, R.G., *Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond*. Addict Biol, 2008. **13**(2): p. 147-59.

226. Pertwee, R.G., *Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists*. *Curr Med Chem*, 2010. **17**(14): p. 1360-81.
227. Waldeck-Weiermair, M., et al., *Integrin clustering enables anandamide-induced Ca²⁺ signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 10): p. 1704-1717.
228. Martinez-Pinilla, E., et al., *Expression of cannabinoid CB(1) R-GPR55 heteromers in neuronal subtypes of the Macaca fascicularis striatum*. *Ann N Y Acad Sci*, 2020. **1475**(1): p. 34-42.
229. Balenga, N.A., et al., *Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB2 receptors modulates signalling*. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(23): p. 5387-406.
230. Martinez-Pinilla, E., et al., *Expression of GPR55 and either cannabinoid CB(1) or CB(2) heteroreceptor complexes in the caudate, putamen, and accumbens nuclei of control, parkinsonian, and dyskinetic non-human primates*. *Brain Struct Funct*, 2020. **225**(7): p. 2153-2164.
231. Medina-Vera, D., et al., *The Expression of the Endocannabinoid Receptors CB2 and GPR55 Is Highly Increased during the Progression of Alzheimer's Disease in App(NL-G-F) Knock-In Mice*. *Biology (Basel)*, 2023. **12**(6).
232. Bambico, F.R., et al., *Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(14): p. 1623-46.
233. Kirilly, E., L. Hunyady, and G. Bagdy, *Opposing local effects of endocannabinoids on the activity of noradrenergic neurons and release of noradrenaline: relevance for their role in depression and in the actions of CB(1) receptor antagonists*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2013. **120**(1): p. 177-86.
234. Hill, J.D., et al., *Activation of GPR55 induces neuroprotection of hippocampal neurogenesis and immune responses of neural stem cells following chronic, systemic inflammation*. *Brain Behav Immun*, 2019. **76**: p. 165-181.
235. Shen, S.Y., et al., *The neuroprotective effects of GPR55 against hippocampal neuroinflammation and impaired adult neurogenesis in CSDS mice*. *Neurobiol Dis*, 2022. **169**: p. 105743.
236. Alavi, M.S., et al., *Orphan G protein-coupled receptors: The role in CNS disorders*. *Biomed Pharmacother*, 2018. **98**: p. 222-232.
237. Perez-Olives, C., et al., *Recent Advances in the Potential of Cannabinoids for Neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's Diseases*. *Adv Exp Med Biol*, 2021. **1264**: p. 81-92.
238. Henstridge, C.M., et al., *Minireview: recent developments in the physiology and pathology of the lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55*. *Mol Endocrinol*, 2011. **25**(11): p. 1835-48.
239. Pietr, M., et al., *Differential changes in GPR55 during microglial cell activation*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(12): p. 2071-6.
240. Sylantsev, S., et al., *Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(13): p. 5193-8.
241. Martinez-Pinilla, E., et al., *CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum*. *Exp Neurol*, 2014. **261**: p. 44-52.
242. Deliu, E., et al., *The Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55 Modulates Pain Perception in the Periaqueductal Gray*. *Mol Pharmacol*, 2015. **88**(2): p. 265-72.
243. Cherif, H., et al., *Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation*. *eNeuro*, 2015. **2**(5).
244. Guy, A.T., et al., *NEURONAL DEVELOPMENT. Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord*. *Science*, 2015. **349**(6251): p. 974-7.

245. Oka, S., et al., *Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(4): p. 928-34.
246. Kallendrusch, S., et al., *The G protein-coupled receptor 55 ligand 1-alpha-lysophosphatidylinositol exerts microglia-dependent neuroprotection after excitotoxic lesion*. *Glia*, 2013. **61**(11): p. 1822-31.
247. Abdul, H.M., et al., *Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in calcineurin/NFAT signaling*. *J Neurosci*, 2009. **29**(41): p. 12957-69.
248. Celorrio, M., et al., *GPR55: A therapeutic target for Parkinson's disease?* *Neuropharmacology*, 2017. **125**: p. 319-332.
249. Rahimi, A., A. Hajizadeh Moghaddam, and A. Roohbakhsh, *Central administration of GPR55 receptor agonist and antagonist modulates anxiety-related behaviors in rats*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2015. **29**(2): p. 185-90.
250. Shi, Q.X., et al., *The novel cannabinoid receptor GPR55 mediates anxiolytic-like effects in the medial orbital cortex of mice with acute stress*. *Mol Brain*, 2017. **10**(1): p. 38.
251. Vazquez-Leon, P., et al., *Blockade of GPR55 in dorsal periaqueductal gray produces anxiety-like behaviors and evokes defensive aggressive responses in alcohol-pre-exposed rats*. *Neurosci Lett*, 2021. **764**: p. 136218.
252. Wu, C.S., et al., *GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e60314.
253. Hill, J.D., et al., *Activation of GPR55 increases neural stem cell proliferation and promotes early adult hippocampal neurogenesis*. *Br J Pharmacol*, 2018. **175**(16): p. 3407-3421.
254. Hurst, K., et al., *A putative lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates hippocampal synaptic plasticity*. *Hippocampus*, 2017. **27**(9): p. 985-998.
255. Wrobel, A., et al., *O-1602, an Agonist of Atypical Cannabinoid Receptors GPR55, Reverses the Symptoms of Depression and Detrusor Overactivity in Rats Subjected to Corticosterone Treatment*. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 1002.
256. El-Remessy, A.B., et al., *Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(1): p. 235-44.
257. Karmaus, P.W., et al., *Cannabidiol (CBD) enhances lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation in C57BL/6 mice*. *J Immunotoxicol*, 2013. **10**(3): p. 321-8.
258. Syed, Y.Y., K. McKeage, and L.J. Scott, *Delta-9-tetrahydrocannabinol/cannabidiol (Sativex(R)): a review of its use in patients with moderate to severe spasticity due to multiple sclerosis*. *Drugs*, 2014. **74**(5): p. 563-78.
259. Devinsky, O., et al., *Effect of Cannabidiol on Drop Seizures in the Lennox-Gastaut Syndrome*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(20): p. 1888-1897.
260. Martin-Moreno, A.M., et al., *Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease*. *Mol Pharmacol*, 2011. **79**(6): p. 964-73.
261. Iuvone, T., et al., *Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders?* *CNS Neurosci Ther*, 2009. **15**(1): p. 65-75.
262. Kozela, E., et al., *Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice*. *Br J Pharmacol*, 2011. **163**(7): p. 1507-19.
263. Perez, M., et al., *Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats*. *Eur J Neurosci*, 2013. **38**(10): p. 3424-34.
264. Iseger, T.A. and M.G. Bossong, *A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans*. *Schizophr Res*, 2015. **162**(1-3): p. 153-61.
265. Lucas, C.J., P. Galettis, and J. Schneider, *The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids*. *Br J Clin Pharmacol*, 2018. **84**(11): p. 2477-2482.
266. Devinsky, O., et al., *Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders*. *Epilepsia*, 2014. **55**(6): p. 791-802.

267. Reddy, D.S., *The Utility of Cannabidiol in the Treatment of Refractory Epilepsy*. Clin Pharmacol Ther, 2017. **101**(2): p. 182-184.
268. Ohlsson, A., et al., *Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration*. Biomed Environ Mass Spectrom, 1986. **13**(2): p. 77-83.
269. Di Salvo, A., M.B. Conti, and G. Della Rocca, *Pharmacokinetics, efficacy, and safety of cannabidiol in dogs: an update of current knowledge*. Front Vet Sci, 2023. **10**: p. 1204526.
270. Ujvary, I. and L. Hanus, *Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy*. Cannabis Cannabinoid Res, 2016. **1**(1): p. 90-101.
271. Bergamaschi, M.M., et al., *Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent*. Curr Drug Saf, 2011. **6**(4): p. 237-49.
272. Zuardi, A.W., et al., *Antipsychotic effect of cannabidiol*. J Clin Psychiatry, 1995. **56**(10): p. 485-6.
273. Jiang, R., et al., *Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes*. Life Sci, 2011. **89**(5-6): p. 165-70.
274. Ibeas Bih, C., et al., *Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders*. Neurotherapeutics, 2015. **12**(4): p. 699-730.
275. McPartland, J.M., et al., *Are cannabidiol and Delta(9) -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(3): p. 737-53.
276. Laprairie, R.B., et al., *Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(20): p. 4790-805.
277. Stern, C.A.J., et al., *Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors*. Neuropharmacology, 2017. **125**: p. 220-230.
278. De Petrocellis, L., et al., *Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(7): p. 1479-94.
279. Whyte, L.S., et al., *The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16511-6.
280. Sylantsev, S.R., RA; Rusakov DA, *The enigmatic receptor GPR55 potentiates neurotransmitter release at central synapses*, in *Neuroscience Meeting Planner*. 2011, Society for Neuroscience: Washington, DC.
281. Poddar, M.K. and W.L. Dewey, *Effects of cannabinoids on catecholamine uptake and release in hypothalamic and striatal synaptosomes*. J Pharmacol Exp Ther, 1980. **214**(1): p. 63-7.
282. Pandolfo, P., et al., *Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum*. Eur J Pharmacol, 2011. **655**(1-3): p. 38-45.
283. Vaysse, P.J., E.L. Gardner, and R.S. Zukin, *Modulation of rat brain opioid receptors by cannabinoids*. J Pharmacol Exp Ther, 1987. **241**(2): p. 534-9.
284. Kathmann, M., et al., *Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2006. **372**(5): p. 354-61.
285. Seeman, P., *Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose*. Transl Psychiatry, 2016. **6**(10): p. e920.
286. Rock, E.M., et al., *Cannabidiol, a non-psychotropic component of cannabis, attenuates vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT(1A) somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(8): p. 2620-34.
287. Kinghorn AD, F.H., Gibbons S, Kobayashi J, *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis Sativa*, ed. S.I. Publishing. 2017, Berlin/Heidelberg, Germany.

288. Russo, E.B., et al., *Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors*. *Neurochem Res*, 2005. **30**(8): p. 1037-43.
289. Guimaraes, F.S., et al., *Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990. **100**(4): p. 558-9.
290. Onaivi, E.S., M.R. Green, and B.R. Martin, *Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990. **253**(3): p. 1002-9.
291. Almeida, V., et al., *Cannabidiol exhibits anxiolytic but not antipsychotic property evaluated in the social interaction test*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013. **41**: p. 30-5.
292. Resstel, L.B., et al., *5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats*. *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(1): p. 181-8.
293. Viudez-Martinez, A., M.S. Garcia-Gutierrez, and J. Manzanares, *Cannabidiol regulates the expression of hypothalamus-pituitary-adrenal axis-related genes in response to acute restraint stress*. *J Psychopharmacol*, 2018. **32**(12): p. 1379-1384.
294. Todd, S.M. and J.C. Arnold, *Neural correlates of interactions between cannabidiol and Delta(9) -tetrahydrocannabinol in mice: implications for medical cannabis*. *Br J Pharmacol*, 2016. **173**(1): p. 53-65.
295. Long, L.E., et al., *A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2010. **13**(7): p. 861-76.
296. Gomes, F.V., et al., *Cannabidiol administration into the bed nucleus of the stria terminalis alters cardiovascular responses induced by acute restraint stress through 5-HT_{1A} receptor*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2013. **23**(9): p. 1096-104.
297. Campos, A.C. and F.S. Guimaraes, *Involvement of 5HT_{1A} receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008. **199**(2): p. 223-30.
298. Soares Vde, P., et al., *Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT_{1A} receptors*. *Behav Brain Res*, 2010. **213**(2): p. 225-9.
299. Fogaca, M.V., et al., *Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: involvement of 5HT_{1A} receptors and previous stressful experience*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014. **24**(3): p. 410-9.
300. Granjeiro, E.M., et al., *Effects of intracisternal administration of cannabidiol on the cardiovascular and behavioral responses to acute restraint stress*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011. **99**(4): p. 743-8.
301. Zanelati, T.V., et al., *Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors*. *Br J Pharmacol*, 2010. **159**(1): p. 122-8.
302. Sales, A.J., et al., *Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex*. *Mol Neurobiol*, 2019. **56**(2): p. 1070-1081.
303. Sales, A.J., F.S. Guimaraes, and S.R.L. Joca, *CBD modulates DNA methylation in the prefrontal cortex and hippocampus of mice exposed to forced swim*. *Behav Brain Res*, 2020. **388**: p. 112627.
304. Linge, R., et al., *Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT_{1A} receptors*. *Neuropharmacology*, 2016. **103**: p. 16-26.
305. Reus, G.Z., et al., *Administration of cannabidiol and imipramine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases brain-derived neurotrophic factor levels in the rat amygdala*. *Acta Neuropsychiatr*, 2011. **23**(5): p. 241-8.
306. Shoval, G., et al., *Prohedonic Effect of Cannabidiol in a Rat Model of Depression*. *Neuropsychobiology*, 2016. **73**(2): p. 123-9.

307. de Morais, H., et al., *Sub-chronic treatment with cannabidiol but not with URB597 induced a mild antidepressant-like effect in diabetic rats*. *Neurosci Lett*, 2018. **682**: p. 62-68.
308. Fogaca, M.V., et al., *The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling*. *Neuropharmacology*, 2018. **135**: p. 22-33.
309. Xu, C., et al., *Pharmacokinetics of oral and intravenous cannabidiol and its antidepressant-like effects in chronic mild stress mouse model*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019. **70**: p. 103202.
310. Campos, A.C., et al., *The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013. **16**(6): p. 1407-19.
311. Wolf, S.A., et al., *Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis*. *Cell Commun Signal*, 2010. **8**: p. 12.
312. Karniol, I.G., et al., *Cannabidiol interferes with the effects of delta 9 - tetrahydrocannabinol in man*. *Eur J Pharmacol*, 1974. **28**(1): p. 172-7.
313. Zuardi, A.W., et al., *Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1982. **76**(3): p. 245-50.
314. Zuardi, A.W., et al., *Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety*. *J Psychopharmacol*, 1993. **7**(1 Suppl): p. 82-8.
315. Bhattacharyya, S., et al., *Modulation of mediotemporal and ventrostriatal function in humans by Delta9-tetrahydrocannabinol: a neural basis for the effects of Cannabis sativa on learning and psychosis*. *Arch Gen Psychiatry*, 2009. **66**(4): p. 442-51.
316. Crippa, J.A., et al., *Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report*. *J Psychopharmacol*, 2011. **25**(1): p. 121-30.
317. Bergamaschi, M.M., et al., *Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients*. *Neuropsychopharmacology*, 2011. **36**(6): p. 1219-26.
318. Shannon, S., et al., *Cannabidiol in Anxiety and Sleep: A Large Case Series*. *Perm J*, 2019. **23**: p. 18-041.
319. Allsop, D.J., et al., *Nabiximols as an agonist replacement therapy during cannabis withdrawal: a randomized clinical trial*. *JAMA Psychiatry*, 2014. **71**(3): p. 281-91.
320. Hegazy, O. and H. Platnick, *Cannabidiol (CBD) for Treatment of Neurofibromatosis-related Pain and Concomitant Mood Disorder: A Case Report*. *Cureus*, 2019. **11**(12): p. e6312.
321. Boehnke, K.F., W. Hauser, and M.A. Fitzcharles, *Cannabidiol (CBD) in Rheumatic Diseases (Musculoskeletal Pain)*. *Curr Rheumatol Rep*, 2022. **24**(7): p. 238-246.
322. Boehnke, K.F., et al., *Cannabidiol Product Dosing and Decision-Making in a National Survey of Individuals with Fibromyalgia*. *J Pain*, 2022. **23**(1): p. 45-54.
323. Beale, C., et al., *Prolonged Cannabidiol Treatment Effects on Hippocampal Subfield Volumes in Current Cannabis Users*. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2018. **3**(1): p. 94-107.
324. Solowij, N., et al., *Therapeutic Effects of Prolonged Cannabidiol Treatment on Psychological Symptoms and Cognitive Function in Regular Cannabis Users: A Pragmatic Open-Label Clinical Trial*. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2018. **3**(1): p. 21-34.
325. Pinto, J.V., et al., *Cannabidiol as an Adjunctive Treatment for Acute Bipolar Depression: A Pilot Study: Le cannabidiol comme traitement d'appoint de la depression bipolaire aigue : une etude pilote*. *Can J Psychiatry*, 2024. **69**(4): p. 242-251.
326. Matthysse, S., *Animal models in psychiatric research*. *Prog Brain Res*, 1986. **65**: p. 259-70.
327. Willner, P., *Animal models as simulations of depression*. *Trends Pharmacol Sci*, 1991. **12**(4): p. 131-6.

328. Hall CS, B.E., *A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology*. University of California Publications in Psychology, 1932. **6**: p. 1-12.
329. Crawley, J. and F.K. Goodwin, *Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines*. Pharmacol Biochem Behav, 1980. **13**(2): p. 167-70.
330. Montgomery, K.C., *The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior*. J Comp Physiol Psychol, 1955. **48**(4): p. 254-60.
331. Handley, S.L. and S. Mithani, *Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1984. **327**(1): p. 1-5.
332. Pellow, S., et al., *Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat*. J Neurosci Methods, 1985. **14**(3): p. 149-67.
333. Lister, R.G., *The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse*. Psychopharmacology (Berl), 1987. **92**(2): p. 180-5.
334. Belzung, C. and G. Le Pape, *Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety*. Physiol Behav, 1994. **56**(3): p. 623-8.
335. Prunell, M., et al., *Differential interactions between ethanol and Ro 15-4513 on two anxiety tests in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 1994. **47**(1): p. 147-51.
336. Weiss, S.M., et al., *Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety*. Neurosci Biobehav Rev, 1998. **23**(2): p. 265-71.
337. Borsini, F., et al., *Evidence that imipramine activates 5-HT_{1C} receptor function*. Eur J Pharmacol, 1991. **203**(3): p. 359-63.
338. Wong, E.H., et al., *Reboxetine: a pharmacologically potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor*. Biol Psychiatry, 2000. **47**(9): p. 818-29.
339. Healy, D.G., et al., *Metyrapone displays antidepressant-like properties in preclinical paradigms*. Psychopharmacology (Berl), 1999. **145**(3): p. 303-8.
340. Weiss, J.M., M.A. Cierpial, and C.H. West, *Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression*. Pharmacol Biochem Behav, 1998. **61**(1): p. 49-66.
341. Hedou, G., et al., *An automated analysis of rat behavior in the forced swim test*. Pharmacol Biochem Behav, 2001. **70**(1): p. 65-76.
342. Harkin, A.J., et al., *Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test*. Eur J Pharmacol, 1999. **372**(3): p. 207-13.
343. Martinez-Mota, L., C.M. Contreras, and M. Saavedra, *Progesterone reduces immobility in rats forced to swim*. Arch Med Res, 1999. **30**(4): p. 286-9.
344. Stogner, K.A. and P.V. Holmes, *Neuropeptide-Y exerts antidepressant-like effects in the forced swim test in rats*. Eur J Pharmacol, 2000. **387**(2): p. R9-10.
345. Brotto, L.A., A.M. Barr, and B.B. Gorzalka, *Sex differences in forced-swim and open-field test behaviours after chronic administration of melatonin*. Eur J Pharmacol, 2000. **402**(1-2): p. 87-93.
346. Krocicka, B., et al., *Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swim test*. Brain Res Bull, 2001. **55**(2): p. 297-300.
347. Vaugois, J.M., et al., *Individual differences in response to imipramine in the mouse tail suspension test*. Psychopharmacology (Berl), 1997. **134**(4): p. 387-91.
348. Bodnoff, S.R., et al., *The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety*. Psychopharmacology (Berl), 1988. **95**(3): p. 298-302.
349. Kvetnansky, R., et al., *[Catecholamines in the adrenal medulla and morphological changes of the adrenal medulla in the course of adaptation to repeated immobilization stress]*. Bratisl Lek Listy, 1966. **46**(1): p. 35-41.

350. van Raaij, M.T., et al., *Hormonal status and the neuroendocrine response to a novel heterotypic stressor involving subchronic noise exposure*. *Neuroendocrinology*, 1997. **65**(3): p. 200-9.
351. Wu, C.C., S.J. Chen, and M.H. Yen, *Effects of noise on blood pressure and vascular reactivities*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1992. **19**(12): p. 833-8.
352. Campeau, S. and S.J. Watson, *Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress*. *J Neuroendocrinol*, 1997. **9**(8): p. 577-88.
353. De Boer, S.F., J. Van der Gugten, and J.L. Slangen, *Plasma catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats*. *Physiol Behav*, 1989. **45**(4): p. 789-95.
354. Engeland, W.C., P. Miller, and D.S. Gann, *Pituitary-adrenal and adrenomedullary responses to noise in awake dogs*. *Am J Physiol*, 1990. **258**(3 Pt 2): p. R672-7.
355. Minamisawa, G., et al., *Flashing Lights Induce Prolonged Distortions in Visual Cortical Responses and Visual Perception*. *eNeuro*, 2017. **4**(3).
356. Borbely, A.A., *Sleep in the rat during food deprivation and subsequent restitution of food*. *Brain Res*, 1977. **124**(3): p. 457-71.
357. Dewasmes, G., C. Duchamp, and Y. Minaire, *Sleep changes in fasting rats*. *Physiol Behav*, 1989. **46**(2): p. 179-84.
358. Mabry, P.D. and B.A. Campbell, *Food-deprivation-induced behavioral arousal: mediation by hypothalamus and amygdala*. *J Comp Physiol Psychol*, 1975. **89**(1): p. 19-38.
359. Moskowitz, M.J., *Running-wheel activity in the white rat as a function of combined food and water deprivation*. *J Comp Physiol Psychol*, 1959. **52**: p. 621-5.
360. Blokland, A., W. Honig, and J. Prickaerts, *Effects of haloperidol and d-amphetamine on working and reference memory performance in a spatial cone field task*. *Behav Pharmacol*, 1998. **9**(5-6): p. 429-36.
361. Willner, P., et al., *Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight*. *Physiol Behav*, 1996. **60**(1): p. 129-34.
362. Gorka, Z., E. Moryl, and M. Papp, *Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996. **54**(1): p. 229-34.
363. D'Aquila, P.S., J. Newton, and P. Willner, *Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference*. *Physiol Behav*, 1997. **62**(2): p. 421-6.
364. Cheeta, S., et al., *Changes in sleep architecture following chronic mild stress*. *Biol Psychiatry*, 1997. **41**(4): p. 419-27.
365. Moreau, J.L., et al., *Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment*. *Behav Pharmacol*, 1995. **6**(7): p. 682-687.
366. D'Aquila, P.S., P. Brain, and P. Willner, *Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression*. *Physiol Behav*, 1994. **56**(5): p. 861-7.
367. Grippo, A.J., J.A. Moffitt, and A.K. Johnson, *Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002. **282**(5): p. R1333-41.
368. Grippo, A.J., et al., *The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia*. *Biol Psychiatry*, 2006. **59**(4): p. 309-16.
369. Grippo, A.J., et al., *Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia*. *Physiol Behav*, 2005. **84**(5): p. 697-706.
370. Li, J.M., et al., *Behavioral and biochemical studies on chronic mild stress models in rats treated with a Chinese traditional prescription Banxia-houpu decoction*. *Life Sci*, 2003. **74**(1): p. 55-73.

371. Muscat, R., et al., *Similar effects of chronic unpredictable mild stress and chronic imipramine administration on release of mesolimbic dopamine*. J Psychopharmacol, 1992. **6**(1): p. 114.
372. Ayensu, W.K., et al., *Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats*. Physiol Behav, 1995. **57**(1): p. 165-9.
373. Loas, G., *Vulnerability to depression: a model centered on anhedonia*. J Affect Disord, 1996. **41**(1): p. 39-53.
374. Willner, P., et al., *Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant*. Psychopharmacology (Berl), 1987. **93**(3): p. 358-64.
375. Moreau, J.L., et al., *Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats*. Eur Neuropsychopharmacol, 1992. **2**(1): p. 43-9.
376. Papp, M., E. Moryl, and P. Willner, *Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression*. Eur J Pharmacol, 1996. **296**(2): p. 129-36.
377. Marona-Lewicka, D. and D.E. Nichols, *The Effect of Selective Serotonin Releasing Agents in the Chronic Mild Stress Model of Depression in Rats*. Stress, 1997. **2**(2): p. 91-100.
378. Muscat, R., M. Papp, and P. Willner, *Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline*. Psychopharmacology (Berl), 1992. **109**(4): p. 433-8.
379. Moreau, J.L., et al., *Curative effects of the atypical antidepressant mianserin in the chronic mild stress-induced anhedonia model of depression*. J Psychiatry Neurosci, 1994. **19**(1): p. 51-6.
380. Moreau, J.L., et al., *Effects of moclobemide, a new generation reversible Mao-A inhibitor, in a novel animal model of depression*. Pharmacopsychiatry, 1993. **26**(1): p. 30-3.
381. Papp, M., et al., *The 5-HT_{1A} receptor biased agonists, NLX-204 and NLX-101, like ketamine, elicit rapid-acting antidepressant activity in the rat chronic mild stress model via cortical mechanisms*. J Psychopharmacol, 2024: p. 2698811241254832.
382. Papp, M. and E. Moryl, *Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression*. Eur J Pharmacol, 1994. **263**(1-2): p. 1-7.
383. Alonso, R., et al., *Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(3): p. 278-86, 224.
384. Moreau, J.L., et al., *5HT_{2C} receptor agonists exhibit antidepressant-like properties in the anhedonia model of depression in rats*. Eur Neuropsychopharmacol, 1996. **6**(3): p. 169-75.
385. Kang, M., et al., *Nelumbinis Semen reverses a decrease in hippocampal 5-HT release induced by chronic mild stress in rats*. J Pharm Pharmacol, 2005. **57**(5): p. 651-6.
386. Klimek, V. and M. Papp, *The effect of MK-801 and imipramine on beta-adrenergic and 5-HT₂ receptors in the chronic mild stress model of depression in rats*. Pol J Pharmacol, 1994. **46**(1-2): p. 67-9.
387. Magarinos, A.M., A. Deslandes, and B.S. McEwen, *Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress*. Eur J Pharmacol, 1999. **371**(2-3): p. 113-22.
388. Azpiroz, A., et al., *Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice*. Psychoneuroendocrinology, 1999. **24**(3): p. 345-61.

389. Goshen, I., et al., *Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression*. Mol Psychiatry, 2008. **13**(7): p. 717-28.
390. Sapolsky, R.M., L.C. Krey, and B.S. McEwen, *Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain*. Endocrinology, 1984. **114**(1): p. 287-92.
391. Remus, J.L., et al., *Interaction of metabolic stress with chronic mild stress in altering brain cytokines and sucrose preference*. Behav Neurosci, 2015. **129**(3): p. 321-30.
392. Magarinos, A.M., et al., *Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews*. J Neurosci, 1996. **16**(10): p. 3534-40.
393. Chang, C.H. and A.A. Grace, *Amygdala-ventral pallidum pathway decreases dopamine activity after chronic mild stress in rats*. Biol Psychiatry, 2014. **76**(3): p. 223-30.
394. Papp, M., V. Klimek, and P. Willner, *Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine*. Psychopharmacology (Berl), 1994. **115**(4): p. 441-6.
395. Dziejzicka-Wasylewska, M., P. Willner, and M. Papp, *Changes in dopamine receptor mRNA expression following chronic mild stress and chronic antidepressant treatment*. Behav Pharmacol, 1997. **8**(6-7): p. 607-18.
396. Willner, P., *The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage*. Neurobiol Stress, 2017. **6**: p. 78-93.
397. Surget, A., et al., *Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal*. Biol Psychiatry, 2008. **64**(4): p. 293-301.
398. Holloway, W.R., Jr. and D.H. Thor, *Social memory deficits in adult male rats exposed to cadmium in infancy*. Neurotoxicol Teratol, 1988. **10**(3): p. 193-7.
399. Gheusi, G., et al., *Ethological study of the effects of tetrahydroaminoacridine (THA) on social recognition in rats*. Psychopharmacology (Berl), 1994. **114**(4): p. 644-50.
400. Li, S., et al., *Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms*. Life Sci, 2007. **80**(15): p. 1373-81.
401. Paxinos, G., K.B.J. Franklin, and K.B.J. Franklin, *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed. 2001, San Diego: Academic Press.
402. Palkovits, M., *Punch sampling biopsy technique*. Methods Enzymol, 1983. **103**: p. 368-76.
403. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
404. Blessing, E.M., et al., *Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders*. Neurotherapeutics, 2015. **12**(4): p. 825-36.
405. Schiavon, A.P., et al., *Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2016. **64**: p. 27-34.
406. Moreira, F.A., D.C. Aguiar, and F.S. Guimaraes, *Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2006. **30**(8): p. 1466-71.
407. Assareh, N., et al., *Cannabidiol disrupts conditioned fear expression and cannabidiolic acid reduces trauma-induced anxiety-related behaviour in mice*. Behav Pharmacol, 2020. **31**(6): p. 591-596.
408. Shbiro, L., et al., *Effects of cannabidiol in males and females in two different rat models of depression*. Physiol Behav, 2019. **201**: p. 59-63.
409. Yin, A.Q., F. Wang, and X. Zhang, *Integrating endocannabinoid signaling in the regulation of anxiety and depression*. Acta Pharmacol Sin, 2019. **40**(3): p. 336-341.
410. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA(A) receptors*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(4): p. 951-64.

411. Gomes-de-Souza, L., et al., *CB(1) and CB(2) receptors in the bed nucleus of the stria terminalis differently modulate anxiety-like behaviors in rats*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2021. **110**: p. 110284.
412. Ivy, D., et al., *Cannabinoid CB(2) receptors mediate the anxiolytic-like effects of monoacylglycerol lipase inhibition in a rat model of predator-induced fear*. Neuropsychopharmacology, 2020. **45**(8): p. 1330-1338.
413. Silva-Cardoso, G.K., et al., *Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors*. Neuropharmacology, 2021. **197**: p. 108712.
414. Casarotto, P.C., et al., *Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors*. Behav Pharmacol, 2010. **21**(4): p. 353-8.
415. Do Monte, F.H., et al., *Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors*. Behav Brain Res, 2013. **250**: p. 23-7.
416. Elsaid, S., S. Kloiber, and B. Le Foll, *Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2019. **167**: p. 25-75.
417. Sartim, A.G., F.S. Guimaraes, and S.R. Joca, *Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex-Possible involvement of 5-HT1A and CB1 receptors*. Behav Brain Res, 2016. **303**: p. 218-27.
418. Fogaca, M.V. and R.S. Duman, *Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 87.
419. Viudez-Martinez, A., M.S. Garcia-Gutierrez, and J. Manzanares, *Gender differences in the effects of cannabidiol on ethanol binge drinking in mice*. Addict Biol, 2020. **25**(3): p. e12765.
420. Sanacora, G., et al., *Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors*. Am J Psychiatry, 2002. **159**(4): p. 663-5.
421. Duman, R.S., G. Sanacora, and J.H. Krystal, *Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments*. Neuron, 2019. **102**(1): p. 75-90.
422. Earnheart, J.C., et al., *GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states*. J Neurosci, 2007. **27**(14): p. 3845-54.
423. Vollenweider, I., et al., *Antidepressant-like properties of alpha2-containing GABA(A) receptors*. Behav Brain Res, 2011. **217**(1): p. 77-80.
424. Uriguen, L., M.S. Garcia-Gutierrez, and J. Manzanares, *Decreased GABAA and GABAB receptor functional activity in cannabinoid CB1 receptor knockout mice*. J Psychopharmacol, 2011. **25**(1): p. 105-10.
425. Moreira, F.A. and B. Lutz, *The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction*. Addict Biol, 2008. **13**(2): p. 196-212.
426. Gaetani, S., V. Cuomo, and D. Piomelli, *Anandamide hydrolysis: a new target for anti-anxiety drugs?* Trends Mol Med, 2003. **9**(11): p. 474-8.
427. Alexander, C. and M. Vasefi, *Cannabidiol and the corticorape circuit in post-traumatic stress disorder*. IBRO Neurosci Rep, 2021. **11**: p. 88-102.
428. Willner, P., *Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation*. Psychopharmacology (Berl), 1997. **134**(4): p. 319-29.
429. Cipriani, A., et al., *Sertraline versus other antidepressive agents for depression*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(4): p. CD006117.
430. Fenske, J.N. and T.L. Schwenk, *Obsessive compulsive disorder: diagnosis and management*. Am Fam Physician, 2009. **80**(3): p. 239-45.
431. Buhmann, C.B. and H.S. Andersen, *[Diagnosing and treating post-traumatic stress disorder]*. Ugeskr Laeger, 2017. **179**(24).

432. Ramanathan, M., S.N. Kumar, and B. Suresh, *Evaluation of cognitive function of fluoxetine, sertraline and tianeptine in isolation and chronic unpredictable mild stress-induced depressive Wistar rats*. Indian J Exp Biol, 2003. **41**(11): p. 1269-72.
433. Lu, Y., et al., *Sertraline ameliorates inflammation in CUMS mice and inhibits TNF-alpha-induced inflammation in microglia cells*. Int Immunopharmacol, 2019. **67**: p. 119-128.
434. Luo, Y., et al., *The mechanism of 5-lipoxygenase in the impairment of learning and memory in rats subjected to chronic unpredictable mild stress*. Physiol Behav, 2016. **167**: p. 145-153.
435. Cowen, P.J. and M. Browning, *What has serotonin to do with depression?* World Psychiatry, 2015. **14**(2): p. 158-60.
436. Newberg, A.B., et al., *123I-ADAM binding to serotonin transporters in patients with major depression and healthy controls: a preliminary study*. J Nucl Med, 2005. **46**(6): p. 973-7.
437. Savitz, J.B. and W.C. Drevets, *Neuroreceptor imaging in depression*. Neurobiol Dis, 2013. **52**: p. 49-65.
438. Gamaro, G.D., et al., *Reduction of hippocampal Na+, K+-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression*. Neurochem Res, 2003. **28**(9): p. 1339-44.
439. Bekris, S., et al., *Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains*. Behav Brain Res, 2005. **161**(1): p. 45-59.
440. Chengfeng, S., et al., *Hyperhomocysteinemia is a result, rather than a cause, of depression under chronic stress*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e106625.
441. Grecksch, G., et al., *Influence of olfactory bulbectomy and subsequent imipramine treatment on 5-hydroxytryptaminergic presynapses in the rat frontal cortex: behavioural correlates*. Br J Pharmacol, 1997. **122**(8): p. 1725-31.
442. Jahng, J.W., et al., *Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter*. Brain Res, 2007. **1150**: p. 100-7.
443. Lee, J.H., et al., *Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation*. Neurosci Res, 2007. **58**(1): p. 32-9.
444. Liang, B.F., et al., *Involvement of norepinephrine and serotonin system in antidepressant-like effects of hederagenin in the rat model of unpredictable chronic mild stress-induced depression*. Pharm Biol, 2015. **53**(3): p. 368-77.
445. Tang, M., et al., *Stress-induced anhedonia correlates with lower hippocampal serotonin transporter protein expression*. Brain Res, 2013. **1513**: p. 127-34.
446. Qiu, H.M., et al., *Upregulating serotonin transporter expression and downregulating monoamine oxidase-A and indoleamine 2, 3-dioxygenase expression involved in the antidepressant effect of sodium valproate in a rat model*. Neuroreport, 2014. **25**(17): p. 1338-43.
447. Hjorth, S., et al., *Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action*. J Psychopharmacol, 2000. **14**(2): p. 177-85.
448. Savitz, J., I. Lucki, and W.C. Drevets, *5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder*. Prog Neurobiol, 2009. **88**(1): p. 17-31.
449. Gross, C., et al., *Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult*. Nature, 2002. **416**(6879): p. 396-400.
450. Zhang, H., et al., *Differential involvement of 5-HT(1A) and 5-HT(1B/1D) receptors in human interferon-alpha-induced immobility in the mouse forced swimming test*. Arzneimittelforschung, 2010. **60**(3): p. 109-15.
451. Albert, P.R., F. Vahid-Ansari, and C. Luckhart, *Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression*. Front Behav Neurosci, 2014. **8**: p. 199.

452. Bravo, J.A., T.G. Dinan, and J.F. Cryan, *Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain*. *Front Mol Neurosci*, 2014. **7**: p. 24.
453. Puglisi-Allegra, S. and D. Andolina, *Serotonin and stress coping*. *Behav Brain Res*, 2015. **277**: p. 58-67.
454. Carneiro-Nascimento, S., et al., *Region- and receptor-specific effects of chronic social stress on the central serotonergic system in mice*. *IBRO Neurosci Rep*, 2021. **10**: p. 8-16.
455. Hale, L.H., M.C. Tickerhoof, and A.S. Smith, *Chronic intranasal oxytocin reverses stress-induced social avoidance in female prairie voles*. *Neuropharmacology*, 2021. **198**: p. 108770.
456. Meltzer, C.C., et al., *Serotonin 1A receptor binding and treatment response in late-life depression*. *Neuropsychopharmacology*, 2004. **29**(12): p. 2258-65.
457. Drevets, W.C., et al., *Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review*. *Nucl Med Biol*, 2007. **34**(7): p. 865-77.
458. Viudez-Martinez, A., et al., *Effects of cannabidiol plus naltrexone on motivation and ethanol consumption*. *Br J Pharmacol*, 2018. **175**(16): p. 3369-3378.
459. Marinho, A.L., et al., *Effects of intra-infralimbic prefrontal cortex injections of cannabidiol in the modulation of emotional behaviors in rats: contribution of 5HT(1)A receptors and stressful experiences*. *Behav Brain Res*, 2015. **286**: p. 49-56.
460. Nugent, A.C., et al., *Mood stabilizer treatment increases serotonin type 1A receptor binding in bipolar depression*. *J Psychopharmacol*, 2013. **27**(10): p. 894-902.
461. Dong, J., C. De Montigny, and P. Blier, *Assessment of the serotonin reuptake blocking property of YM992: electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe*. *Synapse*, 1999. **34**(4): p. 277-89.
462. El Mansari, M., et al., *Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: an in vivo electrophysiological study in rat brain*. *Neuropsychopharmacology*, 2005. **30**(7): p. 1269-77.
463. Montalbano, A., et al., *Dual inhibitory action of trazodone on dorsal raphe serotonergic neurons through 5-HT1A receptor partial agonism and alpha1-adrenoceptor antagonism*. *PLoS One*, 2019. **14**(9): p. e0222855.
464. Albert, U., P. Lamba, and S.M. Stahl, *Early response to trazodone once-a-day in major depressive disorder: review of the clinical data and putative mechanism for faster onset of action*. *CNS Spectr*, 2021. **26**(3): p. 232-242.
465. Hughes, Z.A., et al., *Neurochemical evaluation of the novel 5-HT1A receptor partial agonist/serotonin reuptake inhibitor, vilazodone*. *Eur J Pharmacol*, 2005. **510**(1-2): p. 49-57.
466. De Gregorio, D., et al., *Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain*. *Pain*, 2019. **160**(1): p. 136-150.
467. Blier, P. and C. de Montigny, *Effects of quipazine on pre- and postsynaptic serotonin receptors: single cell studies in the rat CNS*. *Neuropharmacology*, 1983. **22**(4): p. 495-9.
468. Nikolaus, S., et al., *Cortical GABA, striatal dopamine and midbrain serotonin as the key players in compulsive and anxiety disorders--results from in vivo imaging studies*. *Rev Neurosci*, 2010. **21**(2): p. 119-39.
469. Baeken, C., et al., *Hostility in medication-resistant major depression and comorbid generalized anxiety disorder is related to increased hippocampal-amygdala 5-HT(2A) receptor density*. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2021. **271**(7): p. 1369-1378.
470. Soloff, P.H., et al., *5HT2A receptor binding is increased in borderline personality disorder*. *Biol Psychiatry*, 2007. **62**(6): p. 580-7.
471. Murnane, K.S., *Serotonin 2A receptors are a stress response system: implications for post-traumatic stress disorder*. *Behav Pharmacol*, 2019. **30**(2 and 3-Spec Issue): p. 151-162.

472. Underwood, M.D., et al., *Serotonin receptors and suicide, major depression, alcohol use disorder and reported early life adversity*. *Transl Psychiatry*, 2018. **8**(1): p. 279.
473. Odagaki, Y., et al., *5-HT(2A) receptor- and M(1) muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of Galpha(q/11) in postmortem dorsolateral prefrontal cortex of opiate addicts*. *Pharmacol Rep*, 2021. **73**(4): p. 1155-1163.
474. McKittrick, C.R., et al., *Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress*. *Biol Psychiatry*, 1995. **37**(6): p. 383-93.
475. Ossowska, G., et al., *Brain monoamine receptors in a chronic unpredictable stress model in rats*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2001. **108**(3): p. 311-9.
476. Pandey, G.N., et al., *Higher expression of serotonin 5-HT(2A) receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims*. *Am J Psychiatry*, 2002. **159**(3): p. 419-29.
477. Mori, M.A., et al., *Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017. **75**: p. 94-105.
478. Valvassori, S.S., et al., *Effects of cannabidiol on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania*. *J Psychopharmacol*, 2011. **25**(2): p. 274-80.
479. Girroir, E.E., et al., *Quantitative expression patterns of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) protein in mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **371**(3): p. 456-61.
480. Tyagi, S., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases*. *J Adv Pharm Technol Res*, 2011. **2**(4): p. 236-40.
481. Liu, Z., et al., *Serotonin regulation in a rat model of exercise-induced chronic fatigue*. *Neuroscience*, 2017. **349**: p. 27-34.
482. Ji, M.J., et al., *Hippocampal PPARdelta Overexpression or Activation Represses Stress-Induced Depressive Behaviors and Enhances Neurogenesis*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015. **19**(1).
483. Tong, M., et al., *Targeting Alzheimer's Disease Neuro-Metabolic Dysfunction with a Small Molecule Nuclear Receptor Agonist (T3D-959) Reverses Disease Pathologies*. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*, 2016. **6**(3).
484. Dickey, A.S., et al., *PPAR-delta is repressed in Huntington's disease, is required for normal neuronal function and can be targeted therapeutically*. *Nat Med*, 2016. **22**(1): p. 37-45.
485. Trudeau, L.E. and S. El Mestikawy, *Glutamate Cotransmission in Cholinergic, GABAergic and Monoamine Systems: Contrasts and Commonalities*. *Front Neural Circuits*, 2018. **12**: p. 113.
486. Shigeri, Y., R.P. Seal, and K. Shimamoto, *Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004. **45**(3): p. 250-65.
487. Rivero, O., et al., *Cadherin-13, a risk gene for ADHD and comorbid disorders, impacts GABAergic function in hippocampus and cognition*. *Transl Psychiatry*, 2015. **5**(10): p. e655.
488. Aleksandrova, L.R., A.G. Phillips, and Y.T. Wang, *Antidepressant effects of ketamine and the roles of AMPA glutamate receptors and other mechanisms beyond NMDA receptor antagonism*. *J Psychiatry Neurosci*, 2017. **42**(4): p. 222-229.
489. Silberbauer, L.R., et al., *Effect of Ketamine on Limbic GABA and Glutamate: A Human In Vivo Multivoxel Magnetic Resonance Spectroscopy Study*. *Front Psychiatry*, 2020. **11**: p. 549903.
490. Wang, J.H., et al., *Pharmacokinetics of sertraline in relation to genetic polymorphism of CYP2C19*. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. **70**(1): p. 42-7.
491. Jiang, R., et al., *Cannabidiol is a potent inhibitor of the catalytic activity of cytochrome P450 2C19*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2013. **28**(4): p. 332-8.
492. Anderson, L.L., et al., *Citalopram and Cannabidiol: In Vitro and In Vivo Evidence of Pharmacokinetic Interactions Relevant to the Treatment of Anxiety Disorders in Young People*. *J Clin Psychopharmacol*, 2021. **41**(5): p. 525-533.

493. Jakubovski, E., et al., *Systematic Review and Meta-Analysis: Dose-Response Relationship of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Major Depressive Disorder*. *Am J Psychiatry*, 2016. **173**(2): p. 174-83.
494. Vaughn, D.M., L.J. Paulionis, and J.E. Kulpa, *Randomized, placebo-controlled, 28-day safety and pharmacokinetics evaluation of repeated oral cannabidiol administration in healthy dogs*. *Am J Vet Res*, 2021. **82**(5): p. 405-416.
495. Nanan, J.C., S. Crosby, and M.J. Schuh, *Hyponatremic Cognitive Dysfunction Resulting from Drug-Drug-Gene Interaction between Sertraline and Cannabidiol in an Intermediate CYP2C19 Metabolizer Patient*. *Innov Pharm*, 2022. **13**(3).
496. Liu, C., et al., *Characterization of molecular interactions between cannabidiol and human plasma proteins (serum albumin and gamma-globulin) by surface plasmon resonance, microcalorimetry, and molecular docking*. *J Pharm Biomed Anal*, 2022. **214**: p. 114750.
497. Shahlaei, M., et al., *Exploring binding properties of sertraline with human serum albumin: Combination of spectroscopic and molecular modeling studies*. *Chem Biol Interact*, 2015. **242**: p. 235-46.





IV. ANEXO I

IV.I. ARTÍCULO 1

Pharmaceuticals (Basel). 2022 Apr 13;15(4):473. doi: 10.3390/ph15040473.PMID: 35455470

Cannabinoid CB1 Receptor Involvement in the Actions of CBD on Anxiety and Coping Behaviors in Mice

Amaya Austrich-Olivares¹, María Salud García-Gutiérrez^{1,2,3}, Lucía Illescas¹, Ani Gasparyan^{1,2} and Jorge Manzanares^{1,2,3*}

¹ Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda de Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, Alicante, Spain.

² Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS), Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain.

³ Instituto de Investigación, Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, Spain.

* Correspondence: jmanzanares@umh.es; Tel.: +34 965 91 92 52.

Abstract: The anxiolytic and antidepressant properties of cannabidiol (CBD) have been evaluated in several studies. However, the molecular mechanisms involved in these actions remain unclear. A total of 130 male mice were used. CBD's ability to modulate emotional disturbances (anxiety and depressive-like behaviors) was evaluated at different doses in wild-type (CD1; 10, 20 and 30 mg/kg; i.p.) and knockout (CB1KO, CB2KO; GPR55KO; 20 mg/kg) mice. Moreover, CBD effects (20 mg/kg; i.p.) were evaluated in mice previously treated with the CB1r-antagonist SR141716A (2mg/kg; i.p.). Relative gene expression analyses of Cnr1 and Cnr2, Gpr55 and GABA(A) α 2 and γ 2 receptor subunits were performed in the amygdala (AMY) and hippocampus (HIP) of CD1 mice. CBD (10 and 20 mg/kg) showed anxiolytic and antidepressant actions in CD1 mice, being more effective at 20 mg/kg. Its administration did not induce anxiolytic actions in CB1KO mice, contrary to CB2KO and GPR55KO. In all of them, the lack of cannabinoid receptors did not modify the antidepressant activity of CBD. Interestingly, the administration of the CB1r antagonist SR141716A blocked the anxiolytic-like activity of CBD. Real-time PCR studies revealed a significant reduction in Cnr1 and GABA(A) α 2 and γ 2 gene expression in the HIP and AMY of CD1 mice treated with CBD. Opposite changes were observed in the Cnr2. Indeed, Gpr55 was increased in the AMY and reduced in the HIP. CB1r appears to play a relevant role in modulating the anxiolytic actions of CBD. Moreover, this study revealed that CBD also modified the gene expression of GABA(A) subunits α 2 and γ 2 and CB1r, CB2r and GPR55, in a dose- and brain-region-dependent manner, supporting a multimodal mechanism of action for CBD.

Keywords: cannabidiol; anxiety; depression; cannabinoid receptor 1; cannabinoid receptor 2; G-protein-coupled receptor 55; GABA(A) receptor

1. Introduction

Mood disorders are considered one of the most prevalent psychiatric disorders with a high socioeconomic and health impact. Anxiety and depression are the most common, with an estimated 280 million people suffering from each [1–6]. The treatment of both includes complex pharmacological strategies combined with cognitive-behavioral therapies. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are the most commonly used antidepressant drugs, with significant limitations regarding their therapeutic effectiveness. Indeed, up to 30% of patients with major depression develop treatment resistance to the first-line selected drugs [7–11]. On the other hand, benzodiazepines, the most commonly prescribed anxiolytic drugs, are limited because of their high risk of abuse and adverse effects [12,13]. Thus, the therapeutic limitations in treating these disorders highlight the need to develop new, more effective and safer pharmacological strategies.

In recent years, the endocannabinoid system (ECS) has attracted interest because of its implication in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders, including mood disorders [14–19]. Thus, the modulation of this system could be an exciting tool for their treatment. Cannabidiol (CBD) is one of the main compounds of the *Cannabis sativa* plant without properties as a drug of abuse [20]. This drug can interact with more than 65 different targets, such as G-protein-coupled receptor 55 (GPR55), vanilloid receptors (TRPV1), serotonergic receptor 5-HT_{1A}, mu and delta-opioid receptors and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) [21–27]. Notably, CBD acts as a non-competitive allosteric modulator of cannabinoid receptor 1 (CB1r) [21,28] and as an inverse agonist of cannabinoid receptor 2 (CB2r) [25]. Several clinical and preclinical studies showed that CBD presents antidepressant, anxiolytic, antipsychotic and neuroprotective actions, presenting an attractive potential therapeutic strategy for treating mood disorders [29–31]. In this respect, its possible utility in anxiety and depression has been evaluated in several animal models, with promising results [32–37]. The involvement of 5-HT_{1A} receptors in CBD's mechanism of action has been proposed [32,33,36]. Additional studies revealed the involvement of CB1r in the anxiolytic activity of CBD [38–40].

Cumulative evidence supports the role of cannabinoid receptors (CB1 and CB2) in regulating the response to stress, anxiety, depression, schizophrenia and in cognition [41–47]. Interestingly, both cannabinoid receptors are associated with significant alterations in the expression of anxiolytic-mediated subunits of the GABA(A) receptor [42,48,49] and with the anxiolytic action of benzodiazepines [41,42]. More recently, additional receptors on which endocannabinoids also act, such as the GPR55 receptor, have been associated with the regulation of emotional reactivity [50–52] and hippocampal plasticity [53]. Interestingly, previous studies have demonstrated that CBD modifies the gene expression of these targets in animal models of PTSD [54], alcohol consumption [55,56] and spontaneous cannabinoid withdrawal [57], in which CBD showed efficacy.

The present study aimed to characterize the mechanisms by which CBD exhibits its anxiolytic and antidepressant actions, emphasizing CB1r, CB2r and GPR55. In the first part, we evaluated dose-response acute CBD effects in wild-type animals (WT) in a battery of tests for assessing anxiety and coping-like behavior. In the second part, CBD effects were evaluated in genetically modified mice lacking CB1r (CB1KO), CB2r (CB2KO), and GPR55 (GPR55KO) exposed to representative behavioral tests for measuring anxiogenic- and coping-like behaviors. In addition, pharmacological studies using the CB1r-antagonist, SR141716A, were carried out to further clarify the role of CB1r in CBD effects. Finally, gene expression studies were conducted to analyze potential changes in *Cnr1*, *Cnr2*, *Gpr55* and GABA(A) genes induced by acute CBD administration in WT animals using real-time PCR.

2. Results

2.1. Behavioral Evaluation of CBD Actions in WT Mice

We first wanted to evaluate the acute anxiolytic and antidepressant-like effects of CBD. For this purpose, we chose well-accepted animal models for assessing anxiety-like behaviors, using the light-dark box (LDB), the elevated plus maze (EPM) test and novelty suppressed feeding (NSFT) test, coping behavior, and tail suspension test (TST) in rodents. These studies were designed to help further characterize the acute effects of CBD in the modulation of anxiety and depressive-like behaviors in mice.

2.1.1. Light-Dark Box Test (LDB)

Mice treated with CBD at 10 and 20 mg/kg doses spent more time in the lighted box than vehicle (VEH)-treated mice. Interestingly, these anxiolytic actions were not observed at a dose of 30 mg/kg (Figure 1A, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,39) = 10.124$, $p < 0.001$) ($n = 9–10$ /group). In addition, no changes were observed in the number of transitions between groups (Figure 1B, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,39) = 0.421$, $p = 0.739$) ($n = 9–10$ /group).

2.1.2. Elevated Plus Maze Test (EPM)

CBD exerted an anxiolytic-like effect after a dose of 10 mg/kg, increasing the percentage of time spent in the open arms compared to controls. Interestingly, a dose of 20 mg/kg induced a more pronounced anxiolytic action than for CBD-10 mg/kg-treated mice (Figure 1C, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,38) = 66,908$, $p < 0.001$) ($n = 9–10$ /group). In contrast, no effect was observed at the highest dose of CBD (30 mg/kg) compared to the VEH group. No differences were observed in the number of transitions between all four groups (Figure 1D, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,35) = 2.056$, $p = 0.126$) ($n = 9–10$ /group).

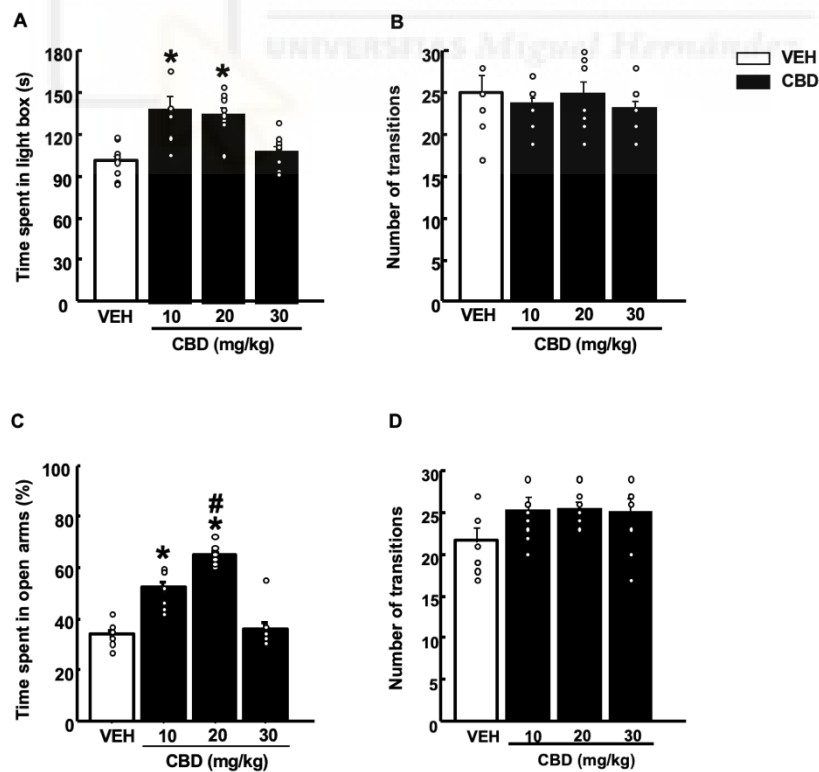


Figure 1. Effects of a single administration of cannabidiol (CBD) (10, 20 and 30 mg/kg, i.p.) on anxiety-like behaviors in the light-dark box (A,B) and elevated plus maze (C,D) paradigms. The behavioral evaluation was developed 1 h and 30 min after the administration of CBD (or vehicle (VEH)). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of (A) the time in the lighted box (s); (B) the number of transitions in the

light-dark box test; (C) the percentage of time in the open arms (%); and (D) the number of transitions in the elevated plus-maze test. * Values from CBD-treated mice that were different ($p < 0.05$) from VEH-treated mice and # values from CBD-20 mg/kg-treated mice that were different from CBD-10 mg/kg-treated mice (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

2.1.3. Tail Suspension Test (TST)

Treatment with CBD significantly reduced the immobility time at a dose of 20 mg/kg. Interestingly, the lower and the higher doses of CBD (10 and 30 mg/kg) did not induce any effects (Figure 2, One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,38) = 3.364$, $p = 0.029$) ($n = 9–10$ /group).

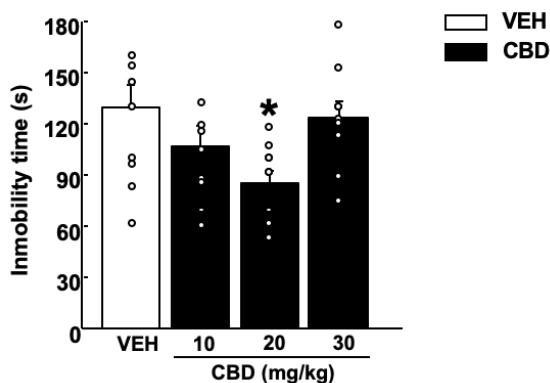


Figure 2. Effects of a single administration of cannabidiol (CBD) (10, 20 and 30 mg/kg, i.p.) on coping behaviors in the tail suspension test paradigm. The behavioral evaluation was developed 1 h and 30 min after the administration of CBD (or vehicle (VEH)). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of immobility time (s). * Values from CBD-20 mg/kg-treated mice that were different ($p < 0.05$) from VEH-treated group (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

2.1.4. Novelty Suppressed Feeding Test (NSFT)

Mice showed significantly shorter latency time and increased consumption of food pellets (mg) with a dose of 10 mg/kg of CBD compared with the control group. The 20 mg/kg intermediate dose revealed major anxiolytic and hedonic actions. In contrast, the dose of 30 mg/kg did not induce any differences compared with VEH-treated mice (latency time: Figure 3A, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,36) = 19.411$, $p < 0.001$; Food consumption: Figure 3B, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,37) = 16.840$, $p < 0.001$) ($n = 9–10$ /group).

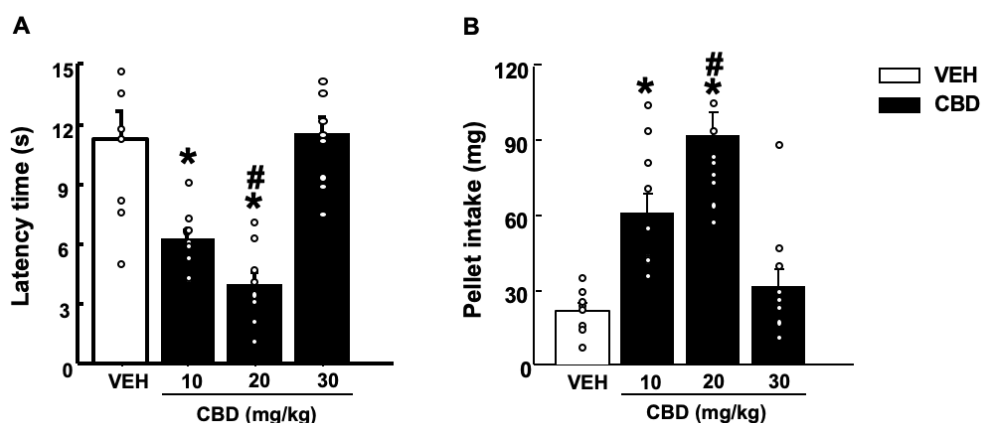


Figure 3. Effect of a single administration of cannabidiol (CBD) (10, 20 and 30 mg/kg, i.p.) on anxiety-like behaviors in the novelty suppressed feeding test. The behavioral evaluation was developed 1 h and 30 min after the administration of CBD (or vehicle (VEH)). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of (A) latency time (s) and (B) pellet intake (mg). * Values from CBD-treated mice that were different ($p < 0.05$) from VEH-treated mice, and # values from 20 mg/kg of CBD-treated mice that were different from mice

treated with the lower dose of CBD (10 mg/kg) (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

2.2. Effects of CBD on Anxiety and Coping-Like Behaviors in Mice Lacking CB1r, CB2r and GPR55

Considering the role of CB1r, CB2r and GPR55 in modulating emotional reactivity, and that they are proposed targets on which CBD directly or indirectly acts, we aimed to explore their involvement in the anxiolytic and antidepressant-like effects of CBD. For this purpose, we evaluated the effects of CBD in the LDB and the TST in mice lacking the CB1r (CB1KO), CB2r (CB2KO) and GPR55 (GPR55KO) receptors. These results enable an improved understanding of the mechanism of action of CBD.

2.2.1. Light-Dark Box (LDB)

Acute CBD (20 mg/kg) administration did not modify anxiety-like behaviors in CB1KO mice compared to the control group (Figure 4A, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test: genotype $F(1,40) = 263.42$, $p < 0.001$; treatment $F(1,40) = 12.386$, $p = 0.001$; genotype x treatment: $F(1,40) = 13.242$, $p < 0.001$) ($n = 10–11$). In contrast, in CB2KO and GPR55KO mice an anxiolytic effect was observed after CBD administration (CB2KO: Figure 4C, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test: genotype $F(1,38) = 180.23$, $p < 0.001$; treatment $F(1,40) = 56.126$, $p < 0.001$; genotype x treatment: $F(1,40) = 4.829$, $p = 0.035$) ($n = 9–10$ /group); GPR55KO: Figure 4E, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test: genotype $F(1,37) = 23.265$, $p < 0.001$; treatment $F(1,37) = 53.020$, $p < 0.001$; genotype x treatment: $F(1,37) = 1.555$, $p = 0.221$) ($n = 8–10$ /group).

No changes were observed in the number of transitions between CBD- and VEH-treated mice (CB1KO: Figure 4B, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test: genotype $F(1,40) = 39.216$, $p < 0.001$; treatment $F(1,40) = 0.580$, $p = 0.451$; genotype x treatment $F(1,40) = 0.407$, $p = 0.528$) (CB2KO: Figure 4D, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test: genotype $F(1,38) = 6.762$, $p = 0.014$; treatment $F(1,38) = 0.899$, $p = 0.349$; genotype x treatment $F(1,38) = 1.146$, $p = 0.292$) (GPR55KO: Figure 4E, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test: genotype $F(1,37) = 24.433$, $p < 0.001$; treatment $F(1,37) = 0.429$, $p = 0.517$; genotype x treatment $F(1,37) = 0.306$, $p = 0.584$).

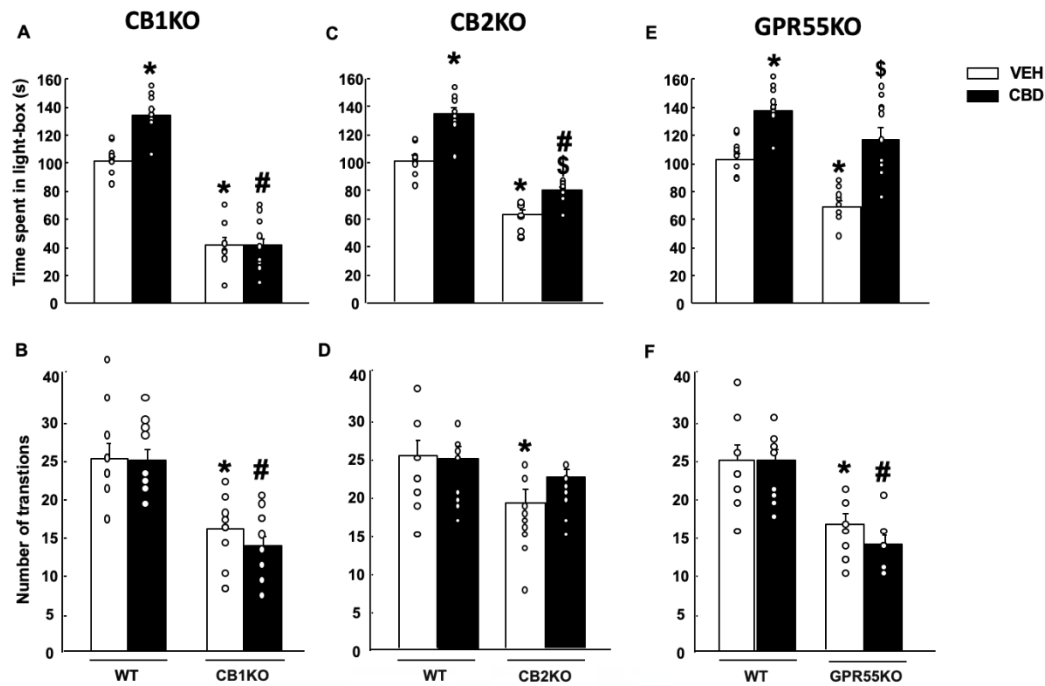


Figure 4. Effects of a single administration of cannabidiol (CBD) at a dose of 20 mg/kg (i.p.) on anxiety-like behaviors in the light-dark box in mice lacking the cannabinoid receptor 1 (CB1KO) (A,B), lacking the cannabinoid receptor 2 (CB2KO) (C,D), and lacking the G-protein-coupled receptor 55 (GPR55KO) (E,F) mice. The behavioral evaluation was developed 1 h and 30 min after the administration of CBD (or vehicle (VEH)). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of the time in the lighted box (s) (A,C,E) and the number of transitions (B,D,F). Results from CD1 VEH and CBD (20 mg/kg) groups have been included for comparative purposes. * Values from groups that were different from wild-type (WT)-VEH treated mice (two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$). $\$$ Values from groups that were different from KO-VEH treated mice (two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$). # Values from groups that were different from WT-CBD-treated mice (two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

2.2.2. Tail Suspension Test (TST)

CBD at the dose of 20 mg/kg elicited antidepressant-like effects among all CB1KO, CB2KO and GPR55KO mice (CB1KO: Figure 5A, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test: genotype $F(1,40) = 9.878$, $p = 0.003$; treatment $F(1,40) = 23.176$, $p < 0.001$; genotype \times treatment $F(1,40) = 0.390$, $p = 0.536$; $n = 10$ – 11) (CB2KO: Figure 5B, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test: genotype $F(1,38) = 22.938$, $p < 0.001$; treatment $F(1,38) = 17.379$, $p < 0.001$; genotype \times treatment $F(1,38) = 0.278$, $p = 0.601$; $n = 9$ – 10) (GPR55KO: Figure 5C, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test: genotype $F(1,37) = 16.233$, $p < 0.001$; treatment $F(1,37) = 14.633$, $p < 0.001$; genotype \times treatment $F(1,37) = 0.0389$, $p = 0.845$; $n = 8$ – 9).

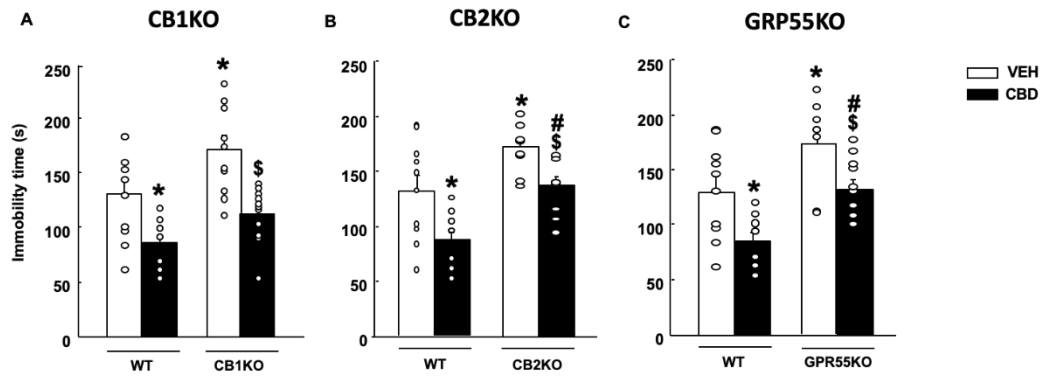


Figure 5. Effects of a single administration of cannabidiol (CBD) at 20 mg/kg (i.p.) on coping behaviors in the tail suspension test in mice lacking the cannabinoid receptor 1 (CB1KO) (A), lacking the cannabinoid receptor 2 (CB2KO) (B) and lacking the G-protein-coupled receptor 55 (GPR55KO) (C). The behavioral evaluation was developed 1 h and 30 min after administration of CBD (or vehicle (VEH)). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of immobility time (s). Results from CD1-VEH and CBD (20 mg/kg) groups have been included for comparative purposes. * Values from groups that were different from wild-type (WT)-VEH-treated mice (two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$). \$ Values from groups that were different from KO-VEH treated mice (two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$). # Values from groups that were different from WT CBD-treated mice (two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

2.3. Effects of CBD in Combination with a Selective CB1r Antagonist on Anxiety-Like Behaviors in WT Mice

Considering that CBD did not show any anxiolytic-like effect in CB1KO mice, we thoroughly explored the role of CB1r in CBD properties by administering the CB1r-antagonist SR141716A before CBD administration in CD1 mice and evaluated its effects in the LBD test. The results would demonstrate the involvement of CB1r in CBD anxiolytic properties.

The administration of SR141716A did not modify the time spent in the lighted box in the LDB paradigm. In contrast, CBD showed an anxiolytic action at 20 mg/kg. Interestingly, this effect was completely blocked when combined with the CB1r-antagonist, inducing even a mild anxiogenic effect (Figure 6A, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, SR: (1,31) $F = 22,002$, $p < 0.001$; CBD: (1,31) $F = 0.0427$, $p = 0.838$; SR \times CBD: (1,31) $F = 10,226$, $p = 0.003$) ($n = 8$ /group). No differences were observed in the number of transitions between groups (Figure 6B, two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, SR: $F(1,31) = 2.080$, $p = 0.160$; CBD: $F(1,31) = 0.382$, $p = 0.542$; SR \times CBD: (1,31) $F = 0.308$, $p = 0.584$) ($n = 8$ /group).

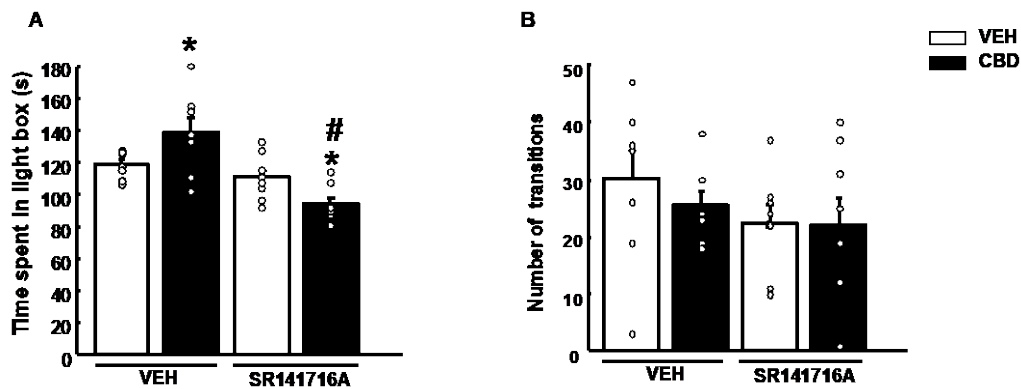


Figure 6. Effects of a single administration of cannabidiol (CBD) (20 mg/kg, i.p.) in mice pre-treated with the cannabinoid receptor 1 (CB1r)-antagonist SR141716A (2 mg/kg, i.p.) on the light-dark box test. The behavioral evaluation was developed 2 h after SR141716A (or vehicle) and 1 h and 30 min after the administration of CBD (or vehicle (VEH)). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of the time in the lightbox (s) (A) and the number of transitions (B). * Values from CBD-treated mice that were different ($p < 0.05$) from vehicle (VEH)-treated mice, and # values from SR141716A + CBD-treated mice that were different from VEH + CBD and SR141716A + VEH-treated animals (two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

2.4. Gene Expression Studies of Cnr1, Cnr2, Gpr55 and GABA (A) α 2 and γ 2 Subunits in Wt Mice Treated with CBD

Additionally, we carried out gene expression studies to identify alterations in key targets closely related to emotional reactivity and anxiety, such as Cnr1, Cnr2, Gpr55 and the α 2 and γ 2 subunits of GABA(A) receptors in the amygdala (AMY) and hippocampus (HIP) of mice treated with CBD, and two brain corticolimbic regions involved in a broad range of behavioral and cognitive functions, including emotional regulation. We chose real-time PCR to measure these targets' relative gene expression.

2.4.1. Cannabinoid Receptors

CBD administration induced a dose-dependent decrease in Cnr1 gene expression in the AMY at all doses (Figure 7A, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,35) = 6.699$, $p < 0.001$) ($n = 9–10$ /group). The same effect was observed in the HIP but only at the highest dose of CBD (Figure 7D, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,36) = 4.692$, $p = 0.008$) ($n = 9–10$ /group). This reduction was accompanied by an increase in gene expression of Cnr2 (at all 3 doses) in the AMY (Figure 7B, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,34) = 8.910$, $p < 0.001$) ($n = 9–10$ /group) and HIP (at 20 and 30 mg/kg) (Figure 7E, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,36) = 7.178$, $p < 0.001$) ($n = 9–10$ /group).

Gpr55 only increased at a dose of 30 mg/kg (Figure 7C, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,35) = 3.521$, $p = 0.026$) ($n = 9–10$ /group) in the AMY, whereas in the HIP, a significant reduction was observed at all doses tested (Figure 7F, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,36) = 4.948$, $p = 0.006$) ($n = 9–10$ /group).

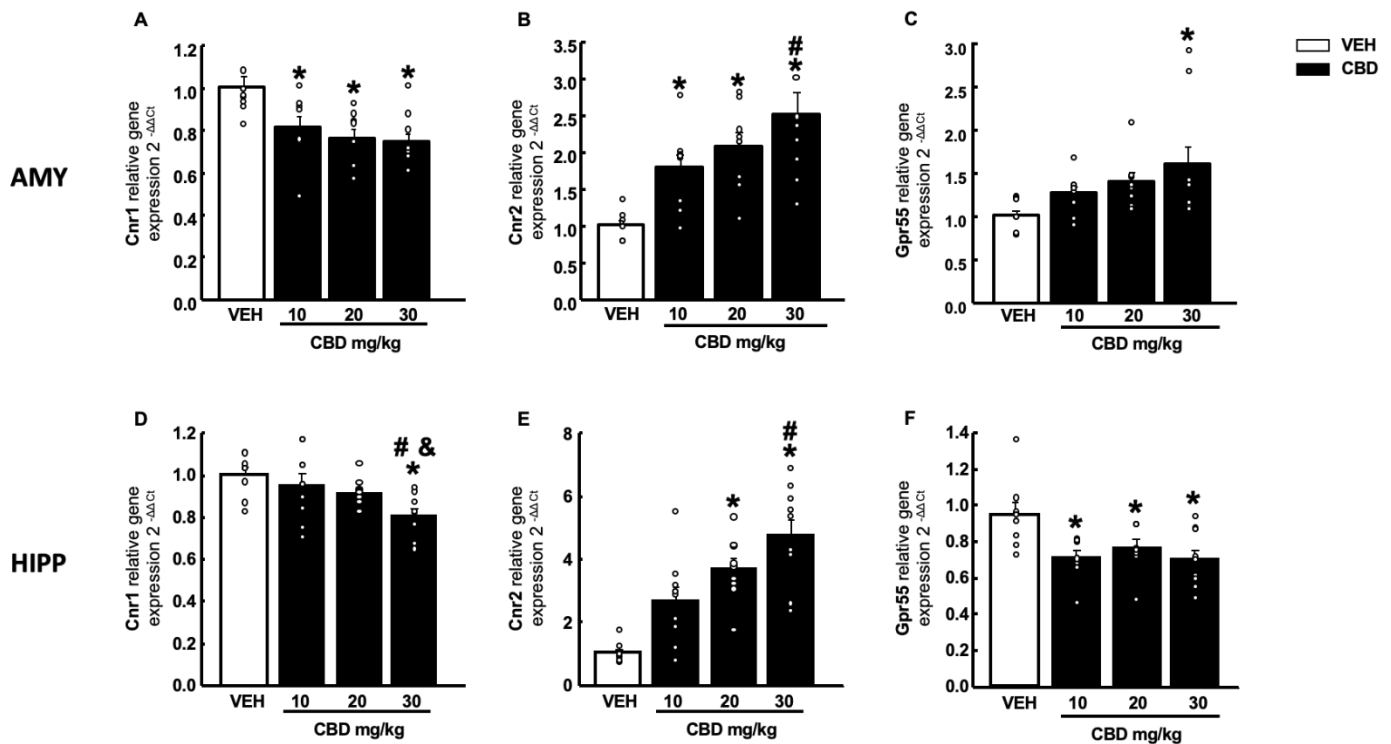


Figure 7. Effects of a single administration of cannabidiol (CBD) (10, 20 and 30 mg/kg, i.p.) on the relative gene expression of cannabinoid receptor 1 (Cnr1), cannabinoid receptor 2 (Cnr2) and G-protein-coupled receptor 2 (GPR55) in the amygdala (AMY) (A–C) and hippocampus (HIPP) (D–F). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of the relative gene expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). * Values from CBD-treated mice that were different from vehicle (VEH)-treated mice, and # values from 30 mg/kg of CBD-treated mice that were different from the lower dose of CBD (10 mg/kg) treated animals. & Values from 30 mg/kg of CBD-treated mice that were different from the CBD (20 mg/kg) treated mice (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

2.4.2. GABA (A) Receptor Subunits

CBD administration at doses of 20 and 30 mg/kg decreased GABA(A) α 2 gene expression in the AMY, this reduction being more pronounced with the highest dose of 30 mg/kg (Figure 8A, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,35) = 7.048$, $p < 0.001$) ($n = 9$ – 10 /group). Similarly, in the HIPP, a reduction of GABA(A) α 2 was observed at all doses of CBD tested (Figure 8C, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,36) = 6.759$, $p < 0.001$) ($n = 9$ – 10 /group). In addition, for GABA(A) γ 2 gene a dose-dependent decrease was observed in both regions, AMY (Figure 8B, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,35) = 6.899$, $p < 0.001$) ($n = 9$ – 10 /group) and HIPP (Figure 8D, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $F(3,36) = 4.460$, $p = 0.010$) ($n = 9$ – 10 /group).

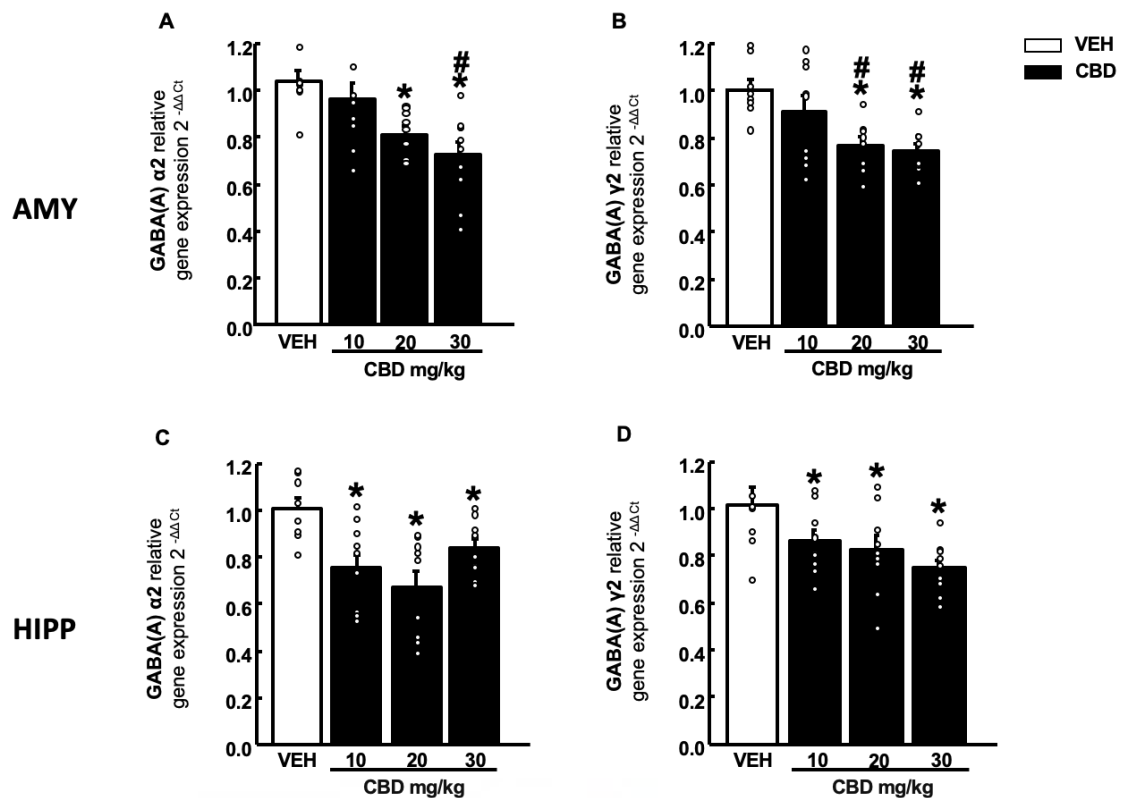


Figure 8. Effects of a single administration of CBD (10, 20 and 30 mg/kg, i.p.) on the relative gene expression of GABA(A) $\alpha 2$ and $\gamma 2$ in the amygdala (AMY) (A,C) and hippocampus (HIPP) (B,D). Columns represent the means and vertical lines \pm SEM of the relative gene expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). * Values from CBD-treated mice that were different from vehicle (VEH)-treated mice and # values from CBD (20 or 30 mg/kg)-treated mice that were different from the lower dose of CBD (10 mg/kg) treated animals (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

3. Discussion

The present study results confirm that CBD may significantly promote anxiolytic- and antidepressant-like effects in mice in a dose-dependent manner, effects that are mediated, at least in part, by CB1r. This statement is based on the following observations: (1) Low and intermediate acute doses of CBD (10 and 20mg/kg) induced anxiolytic- and antidepressant-like effects in the behavioral tests assessed in WT mice; (2) Acute CBD administration (20 mg/kg) failed to induce any anxiolytic-like effects in CB1KO mice, whereas it was observed in CB2KO and GPR55KO mice; (3) the administration of the CB1r-antagonist, SR141716A, blocked the anxiolytic action of CBD; (4) CBD presented an antidepressant-like effect in all the knockout mice used; and (4) the administration of CBD reduced *Cnr1*, GABA(A) $\alpha 2$ and GABA(A) $\gamma 2$ gene expression in the AMY and HIPP, whereas it increased *Cnr2* in both regions. In contrast, *Gpr55* gene expression increased in the AMY but decreased in the HIPP after administration of CBD.

Previous studies have shown that CBD induced anxiolytic- and antidepressant-like effects following an inverted U-shape curve, being effective at intermediate but not at very low or high doses [31,58–60]. In agreement with these studies, we found that low (10 mg/kg) and intermediate doses (20 mg/kg) induced an anxiolytic-like effect, since both doses increased the exploration time in anxiogenic environments in the LDB and EPM test. Moreover, CBD at these doses also reduced the latency in the NSFT, increasing the food intake. The intermediate CBD dose presented a more robust antidepressant-like effect than the lower dose since it significantly reduced coping behavior, indirectly measured by the immobility time in the TST.

In none of the behavioral tests performed, did CBD at the highest dose (30 mg/kg) show any anxiolytic or antidepressant-like effect, as described previously [61]. However, opposite results were found in other studies in which the same dose induced an anxiolytic- [34,62] or antidepressant-like effect [35,36,63,64]. These discrepancies may be due to differences in methodological procedures, such as different animal species (rats and mice), strains (Wistar rats, C57Bl6J, ICR), behavioral tests applied, and/or the pattern of administration (for more details, see [30]).

Despite evidence supporting the anxiolytic and antidepressant properties of CBD under certain experimental conditions, the complete characterization of the underlying mechanisms of action is still pending. In this respect, 5-HT_{1A} is one of the main targets studied among the more than 65 targets on which CBD acts [29,65,66], demonstrating the involvement of this receptor in its anxiolytic [32,67–70] and antidepressant-like effects [33,36,40]. Here, we aimed to explore further the implication of additional CBD proposed targets, such as CB_{1r}, CB_{2r} and GPR55, given the critical role these receptors play in emotional reactivity, anxiety and mood disorders [14,42,44,48,51,52,71–73]. Studies on genetically modified mice have provided evidence, since CB₁KO [47,74–76] and CB₂KO mice [45,77] showed increased anxiety and depressive-like behaviors. Moreover, recent studies carried out by our group demonstrated that GPR55KO mice also displayed anxiogenic-like responses (to be published).

Genetic (CB₁KO) and pharmacological (SR141716A) approaches show CB_{1r} as an undoubtedly active receptor mediating the anxiolytic properties of CBD. Thus, we evaluated the effects of the effective CBD dose (20 mg/kg) in CB₁KO, CB₂KO and GPR55KO mice. CBD induced anxiolytic-like effects in CB₂KO and GPR55KO but did not affect CB₁KO mice. Moreover, a pharmacological study using the CB_{1r}-antagonist SR141716A demonstrated that the blockade of CB_{1r} avoids CBD-induced anxiolytic-like effects in the LBD test. Importantly, SR141716A did not induce any effect when it was given alone. These results agree with previous studies demonstrating the involvement of CB_{1r} in the anxiolytic actions of CBD [40,78–81]. However, when evaluating the effects of CBD on coping behaviors in the tail suspension test in the different knockout mice, the lack of these receptors did not prevent CBD antidepressant effects. Therefore, based on these results, it is tempting to speculate that other receptors, such as the 5-HT_{1A} receptor described above, may be even more critical in understanding the antidepressant action of CBD.

Real-time PCR analyses revealed that acute CBD administration modified gene expression of *Cnr1*, *Cnr2* and *Gpr55* in a dose- and brain-region-dependent manner. AMY and HIPP analyses showed that CBD downregulated *Cnr1* and increased *Cnr2* gene expression dose-dependently, with the most pronounced effects occurring with the highest dose (30 mg/kg). These results agree with previous studies of our group and others demonstrating that CBD treatment reduced *Cnr1* [56,82] and increased *Cnr2* gene expression in different brain areas [56]. These alterations are compatible with CBD acting as a CB_{1r}-agonist (directly or indirectly) and as a CB_{2r}-antagonist.

Regarding *Gpr55*, opposite results were observed in the AMY and HIPP. On the one hand, CBD significantly upregulated *Gpr55* at the highest dose in the AMY. On the other hand, *Gpr55* expression was significantly reduced in the HIPP at all doses tested, with no differences between them. Similarly, our previous studies revealed that CBD reduced *Gpr55* in the NAcc of mice exposed to the oral ethanol self-administration paradigm [56]. The exact mechanism by which CBD induced these opposite changes in *Gpr55* gene expression between the two brain regions needs to be further explored.

The GABAergic system plays an essential role in the regulation of emotional responses. It is a crucial therapeutic target for controlling anxiety and mood disorders and the critical target by which benzodiazepines (BZD) exert their anxiolytic properties [82]. The anxiolytic effect of BZD is mediated by GABA(A) receptors containing $\alpha 2$ and $\gamma 2$ subunits, with high expression in the limbic system and cortex [83–86]. The pentameric GABA(A) receptors are formed by the assembly of different subunits containing $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ or $\alpha 5$, in combination with β and $\gamma 2$ subunits. Despite less information about the involvement of GABA(A) receptors in depression, studies carried out

in patients with major depressive disorder revealed reduced GABA levels, which were normalized after chronic treatment with antidepressants [83,84]. In addition, heterozygous $\gamma 2$ [85] and $\alpha 2$ [86] knockout mice exhibited more vulnerability to developing anxiety and depressive-like behaviors.

Furthermore, a close interaction between cannabinoid receptors and the GABA system has been demonstrated. Alterations in GABA subunits have been observed in CB1KO knockout mice [49] and mice overexpressing the CB2r (CB2xP) [42]. Interestingly, these mice also showed an impaired anxiolytic action of BZD [41,42]. Pharmacological studies using drugs acting on CB1r and CB2r also showed modified response to stress, anxiety and behavioral despair, and gene expression of GABA(A) subunits, including $\alpha 2$ and $\gamma 2$ [48,74,87,88]. Thus, considering the role of GABA(A) in anxiety and mood disorders and the crosstalk between GABAergic and cannabinoid systems, we analyzed changes in GABA(A) $\alpha 2$ and GABA(A) $\gamma 2$ gene expression in the AMY and HIPP of WT mice treated with CBD.

Acute administration of CBD downregulated the gene expression of both GABAergic subunits in the AMY and HIPP at all doses tested. Despite studies of CBD effects in mice lacking $\alpha 2$ and $\gamma 2$, it would be of great interest to elucidate the exact role of these GABA(A) subunits in CBD anxiolytic properties; it is tempting to speculate that CBD regulates, directly or indirectly, GABA(A) neurotransmission. In line with these findings, previous studies have revealed that CBD inhibited GABA uptake in rat brain synaptosomes at 0.1mM [89]. More recently, an electrophysiological study comparing the actions of CBD and 2-AG on human recombinant GABA(A) receptors expressed on *Xenopus* oocytes showed that CBD acts as a positive allosteric modulator at GABA(A) receptors containing $\alpha 2$ subunits. This study supported the fact that the site of action of CBD is different from the classic BZD site [90]. Altogether the results obtained suggest that the effects of CBD on GABAergic neurotransmission may be a potential target for its anxiolytic and antidepressant properties that deserve to be explored in future studies.

Overall, the gene expression studies undertaken here further support the complex network through which CBD acts. Behavioral studies revealed that CBD induced anxiolytic- and antidepressant-like effects in WT mice at low and intermediate doses (10 and 20 mg/kg), whereas the highest dose (30 mg/kg) did not induce any behavioral effect. Gene expression studies showed that CBD modified the gene expression of *Cnr1*, *Cnr2* and *Gpr55* depending on the doses and the brain region analyzed. Curiously, the highest dose induced the most pronounced changes. Consequently, the study's main limitation is that gene expression alterations in almost all the targets analyzed were induced by different doses of CBD, making it difficult to correlate some of these biological alterations with the anxiolytic or antidepressant-like effects of CBD. Although future studies are necessary to understand the role of each receptor on CBD actions, based on our results, it is tempting to speculate that the anxiolytic and antidepressant-like effects of CBD may be due to a multimodal mechanism involving different key targets and brain regions, as has been proposed recently [91].

In conclusion, the present study demonstrated that acute administration of CBD produced anxiolytic and antidepressant-like effects in a dose-dependent manner, suggesting that CB1r is one of the crucial targets involved in its anxiolytic properties. Moreover, this study revealed that CBD also modified the gene expression of GABA(A) subunits $\alpha 2$ and $\gamma 2$ and *Cnr1*, *Cnr2* and *Gpr55*, in a dose and brain region-dependent manner, indicating that CBD presents a multimodal mechanism of action (Figure 9).

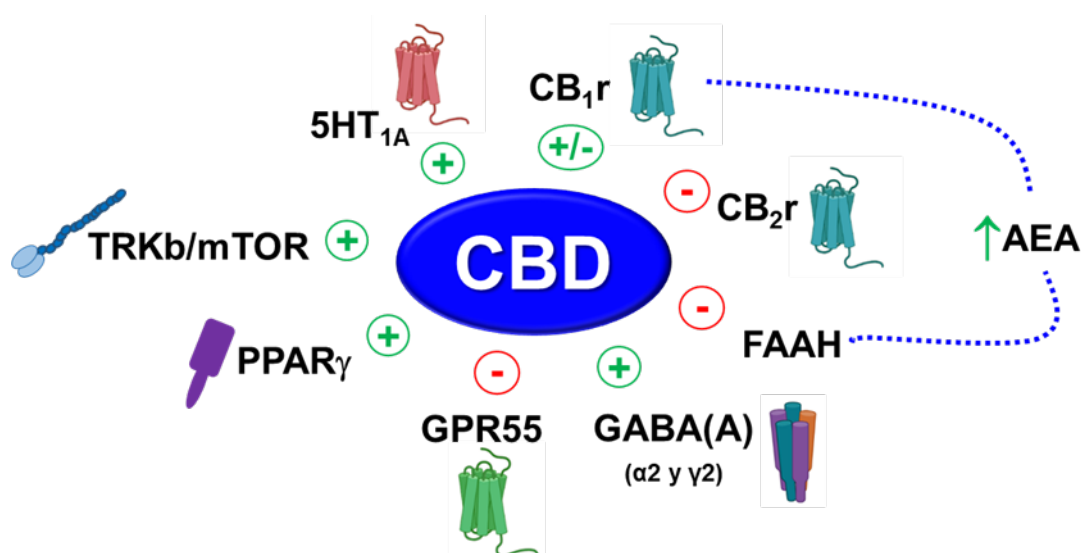


Figure 9. Main targets involved in the anxiolytic and antidepressant actions of CBD. A summary of previously published data and those supported by the present work. 5-HT_{1A}: serotonin 1A receptor; CB₁r: cannabinoid 1 receptor; CB₂r: cannabinoid 2 receptor; AEA: anandamide; FAAH: fatty acid amide hydrolase; GPR55: G-protein-coupled receptor 55; PPAR_γ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; TRKb/mTOR: Tropomyosin receptor kinase B/mammalian target of rapamycin.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

A total of 130 mice were used in the present study. Forty Swiss CD1 mice were purchased from Charles River Laboratories (Lodi, Italy) to develop the dose-response study with CBD. An additional set of 32 CD1 male mice was used to conduct the pharmacological study with the CB₁ receptor antagonist (SR141716A) and CBD. We used twenty-one CB₁KO [41,92] and nineteen CB₂KO mice [43,44] generated in our laboratory. Dr. Andrei Kolovko kindly provided GPR55KO mice at the Institute of Genomic Medicine. Eighteen of them, bred at our animal vivarium, were used in the present study (TIGM, Houston, TX) [92]. All mice were males and between 2–3 months of age. At the beginning of the experiments, mice were five weeks old and weighed 25–30 g. All animals were maintained under controlled temperature (23 ± 2 °C) and with a light-dark cycle from 0800 to 2000 h, with free access to food (commercial diet for rodents A04 Panlab, Barcelona, Spain) and water. All animal care and experimental studies complied with the Spanish Royal Decree 53/2013, the Spanish Law 32/2007, and the European Union Directive of 22 September 2010 (2010/63/UE), regulating the care of experimental animals and were approved by the Ethics Committee of Miguel Hernández University (ref. UMH.IN.JM.02.17).

4.2. Treatment

CBD was obtained from Jazz Pharmaceuticals (Dublin, Ireland) and dissolved in ethanol: cremophor: saline (1:1:18) to obtain the required doses of 10, 20 and 30 mg/kg for wild-type (WT) animals, and the dose of 20 mg/kg for knockout mice (CB₁KO, CB₂KO and GPR55KO). The drug was prepared immediately before its intraperitoneal (i.p.) administration at a volume of 10 mL/kg of weight (0.3 mL for each mouse). According to its pharmacokinetic properties, CBD was administered 1h and a half before the behavioral evaluation [54,93].

The CB₁r-antagonist SR141716A was purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and dissolved in ethanol, cremophor and saline (1:1:18) to obtain the required dose of 2 mg/kg for its i.p. administration 30 min before CBD administration and 2 h before the behavioral evaluation. The dose of SR141716A was selected based on previous studies demonstrating that this dose does not produce any effects by itself [94,95].

4.3. Behavioral Analyses

Mice were randomly divided into groups and subjected to different experimental paradigms to evaluate the anxiolytic and antidepressant actions of the acute administration of CBD. Before every behavioral test, mice were brought to the experimental room in their home cages and were given 60 min to adapt to the environmental conditions of the testing room. The same conditions were maintained for all the behavioral tests. Each test was assessed during the light cycle between 0900 and 1200 h. After each evaluation, mice were undisturbed for 2 to 3 days to allow pharmacokinetic clearance of CBD [93]. WT mice were subjected to a wide range of behavioral evaluations, including the light-dark box (LDB), elevated plus maze (EPM), tail suspension test (TST) and novelty suppressed feeding test (NSFT). According to the results obtained in these studies, only two (LDB and TST) were selected to analyze the emotional behavior in knockout animals (CB1KO, CB2KO and GPR55KO) and CBD's ability to modulate it. The selective CB1r-antagonist (SR141716A) was used to further evaluate the implication of CB1r in CBD anxiolytic-like effects (20 mg/kg) in the LDB paradigm. For this, WT mice were randomly assigned into four groups: control group (VEH + VEH), CBD group (VEH + CBD), antagonist group (SR-141716A + VEH) or the combination of both drugs (SR-141716A + CBD). The antagonist SR141716 was administered 30 min before CBD, and the behavioral evaluation was carried out 1 h and 30 min after CBD administration.

4.3.1. Light-Dark Box (LDB)

This test uses the natural aversion of rodents to bright areas compared with darker ones [48,96]. The apparatus consisted of two methacrylate boxes (20 × 20 × 15 cm), one transparent and one black and opaque, separated by an opaque tunnel (4 cm). Light from a 60 W desk lamp placed 25 cm above the lightbox provided room illumination. Mice were individually tested in 5 min sessions. At the beginning of the session, mice were placed in the lightbox facing the tunnel that connects to the dark box. The time spent in the lightbox and the number of transitions between the two compartments were recorded in this period. A mouse whose four paws were in the new box was considered to have changed boxes. The apparatus was cleaned between sessions with ethanol 70%.

4.3.2. Elevated Plus Maze Test (EPM)

The EPM consists of two open arms and two enclosed horizontal perpendicular arms 50 cm above the floor [48,97]. The junction of four arms formed a central squared platform (5 × 5 cm). The test began with the animal being placed in the center of the apparatus facing one of the enclosed arms and allowed to explore freely for 5 min. During this period, the time spent in the open arms (as a percentage of total test time) and the number of entries from open arms to closed arms (and vice versa) were recorded. An arm entry was considered an entry of four paws into the arm. The apparatus was cleaned between sessions with ethanol 70%.

4.3.3. Novelty Suppressed Feeding Test (NSFT)

The NSFT was used to measure anxiety-induced hyponeophagia, which is the inhibition of ingestion and approach to food pellets when exposed to an anxiety-provoking novel environment. The testing apparatus consisted of a square, transparent methacrylate cage 40 × 40 × 50 cm, with a food pellet on the white platform in the center of the cage [44,98]. Before the experiment, mice were deprived of food for 24 h, and then each mouse was placed in the corner of the apparatus. The latency time before the mouse started to eat the pellet was recorded up to 5 min. Once the mice began to eat, the total amount of pellets was measured over 5 min. The decrease or increase in the latency time indicates anxiolytic or anxiogenic actions of different drugs, respectively. The anhedonia was measured by calculating the food pellet intake (mg), which increased when mice presented more motivation or ability to experience pleasure.

4.3.4. Tail Suspension Test (TST)

TST is a widely accepted test to evaluate depressive-like behaviors by measuring the immobility time [44,99]. Mice were individually suspended by the tail at the edge of a lever above the tabletop (the distance to the table surface was 35 cm), affixed with the adhesive tape placed approximately 1–2 cm from the tip of the tail. In this situation, mice develop escape-orientated behaviors interspersed with temporally increasing bouts of immobility. The immobility time was measured for 6 min.

4.4. Relative Gene Expression Analyses by Real-Time PCR

Relative gene expression analyses of GABA(A) α 2 and γ 2 subunits, Cnr1, Cnr2 and Gpr55 in the AMY and HIPP, were carried out in WT mice to assess changes in these targets under anxiety or depressive-like conditions and the ability of CBD to modulate them. Briefly, mice were sacrificed 150 min after the administration of CBD (or vehicle) and brain samples were removed from the skull and frozen at -80°C . These samples were used to obtain coronal sections (500 μm) of regions of interest in a cryostat (-10°C) according to Paxinos and Franklin's atlas [100]. Brain nuclei of interest were microdissected following Palkovit's method as previously modified by our group [101,102]. Total RNA was extracted from brain micropunches with TRI Reagent (Applied Biosystems, Madrid, Spain) and reverse transcription was carried out to obtain the complementary DNA (cDNA) (4374966, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, Applied Biosystems, Madrid, Spain). To perform the real-time PCR, 6.25 μL of water with DEPC (diethylpyrocarbonate, RNAase inhibitor), 5 μL of the cDNA, 11.25 μL of the TaqmanTM Master Mix (4369514, Applied Biosystems, Madrid, Spain), and 1.25 μL of the corresponding Taqman assay were added in each well (4346907, Applied Biosystems, Madrid, Spain). Quantitative analyses of the relative expression of GABA(A) α 2 (Mm00433435_m1) and γ 2 subunits (Mm00433489_m1), Cnr1 (Mn00432621_s1), Cnr2 (Mm00438286_m1) and Gpr55 (Mm02621622_s1) genes were performed on the StepOne Sequence Detector System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). All reagents were used following the manufacturer's instructions. The reference gene used was 18S rRNA (Mm03928990_g1), and data for each target was normalized to the endogenous reference gene. The fold change in target gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [103].

4.5. Data and Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls post hoc test for comparing four groups affected by the treatment with CBD (and vehicle). Moreover, for the behavioral assay with the antagonist SR141716A, a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls post hoc test was assessed for comparing four groups affected by the individual treatment with CBD, SR141716A or its combination. Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%. SigmaPlot 11 software (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) was used.

5. Conclusions

CBD induced anxiolytic- and antidepressant-like effects in a dose-dependent manner, the intermediate dose (20mg/kg) being the one that produced these effects most robustly. CB1r appears to be an essential key target for CBD anxiolytic properties.

Changes in Cnr1, Cnr2, Gpr55, GABA(A) subunits α 2 and γ 2 in limbic areas, including the AMY and HIPP, also suggest that these targets may contribute to CBD effects. Further studies are necessary to understand the specific role of each target and brain region on CBD anxiolytic and antidepressant properties.

Author Contributions: All named authors made an active contribution to the study. Conceptualization: J.M.; methodology, investigation and analyses: A.A.-O., M.S.G.-G., L.I. and A.G.; writing—original draft preparation: A.A.-O., M.S.G.-G., L.I. and A.G.; writing—review and editing, supervision, funding acquisition: J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by “Instituto de Salud Carlos III” (RD. PI18/00576, Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación) and RD21/0009/0008 “Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones”) to J.M.

Institutional Review Board Statement: All animal care and experimental studies complied with the Spanish Royal Decree 53/2013, the Spanish Law 32/2007, and the European Union Directive of 22 September 2010 (2010/63/UE), regulating the care of experimental animals and approved by the Ethics Committee of Miguel Hernández University (ref. UMH.IN.JM.02.17).

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: The data is contained within the article.

Acknowledgments: The authors would like to thank the PFIS fellowship “Contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud” (PFIS) granted to AAO (FI19/00170).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.



References

1. Kessler, R.C.; Chiu, W.T.; Demler, O.; Merikangas, K.R.; Walters, E.E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry* **2005**, *62*, 617–627.
2. Wang, P.S.; Aguilar-Gaxiola, S.; Alonso, J.; Angermeyer, M.C.; Borges, G.; Bromet, E.J.; Bruffaerts, R.; de Girolamo, G.; de Graaf, R.; Gureje, O.; et al. Use of mental health services for anxiety, mood, and substance disorders in 17 countries in the WHO world mental health surveys. *Lancet* **2007**, *370*, 841–850. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61414-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61414-7).
3. Anseau, M.; Fischler, B.; Dierick, M.; Albert, A.; Leyman, S.; Mignon, A. Socioeconomic correlates of generalized anxiety disorder and major depression in primary care: The GADIS II study (Generalized Anxiety and Depression Impact Survey II). *Depress. Anxiety* **2008**, *25*, 506–513. <https://doi.org/10.1002/da.20306>.
4. Auerbach, R.P.; Mortier, P.; Bruffaerts, R.; Alonso, J.; Benjet, C.; Cuijpers, P.; Demyttenaere, K.; Ebert, D.D.; Green, J.G.; Hasking, P.; et al. WHO World Mental Health Surveys International College Student Project: Prevalence and distribution of mental disorders. *J. Abnorm. Psychol.* **2018**, *127*, 623–638. <https://doi.org/10.1037/abn0000362>.
5. Evans-Lacko, S.; Aguilar-Gaxiola, S.; Al-Hamzawi, A.; Alonso, J.; Benjet, C.; Bruffaerts, R.; Chiu, W.T.; Florescu, S.; de Girolamo, G.; Gureje, O.; et al. Socio-economic variations in the mental health treatment gap for people with anxiety, mood, and substance use disorders: Results from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. *Psychol. Med.* **2018**, *48*, 1560–1571. <https://doi.org/10.1017/S0033291717003336>.
6. Charlson, F.; van Ommeren, M.; Flaxman, A.; Cornett, J.; Whiteford, H.; Saxena, S. New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: A systematic review and meta-analysis. *Lancet* **2019**, *394*, 240–248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30934-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30934-1).
7. Wang, S.M.; Han, C.; Bahk, W.M.; Lee, S.J.; Patkar, A.A.; Masand, P.S.; Pae, C.U. Addressing the Side Effects of Contemporary Antidepressant Drugs: A Comprehensive Review. *Chonnam. Med. J.* **2018**, *54*, 101–112. <https://doi.org/10.4068/cmj.2018.54.2.101>.
8. Pandarakalam, J.P. Challenges of Treatment-resistant Depression. *Psychiatr. Danub.* **2018**, *30*, 273–284. <https://doi.org/10.24869/psyd.2018.273>.
9. Fava, M. Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. *Biol. Psychiatry* **2003**, *53*, 649–659. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(03\)00231-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(03)00231-2).
10. Gaynes, B. Assessing the risk factors for difficult-to-treat depression and treatment-resistant depression. *J. Clin. Psychiatry* **2016**, *77* (Suppl. 1), 4–8. <https://doi.org/10.4088/JCP.14077su1c.01>.
11. Ionescu, D.F.; Rosenbaum, J.F.; Alpert, J.E. Pharmacological approaches to the challenge of treatment-resistant depression. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2015**, *17*, 111–126.
12. Uzun, S.; Kozumplik, O.; Jakovljevic, M.; Sedic, B. Side effects of treatment with benzodiazepines. *Psychiatr. Danub.* **2010**, *22*, 90–93.
13. Stewart, S.A. The effects of benzodiazepines on cognition. *J. Clin. Psychiatry* **2005**, *66* (Suppl. 2), 9–13.
14. Yin, A.Q.; Wang, F.; Zhang, X. Integrating endocannabinoid signaling in the regulation of anxiety and depression. *Acta Pharmacol. Sin.* **2019**, *40*, 336–341. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0051-5>.
15. Marco, E.M.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Bermudez-Silva, F.J.; Moreira, F.A.; Guimaraes, F.; Manzanares, J.; Viveros, M.P. Endocannabinoid system and psychiatry: In search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. *Front. Behav. Neurosci.* **2011**, *5*, 63. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00063>.
16. Chadwick, V.L.; Rohleder, C.; Koethe, D.; Leweke, F.M. Cannabinoids and the endocannabinoid system in anxiety, depression, and dysregulation of emotion in humans. *Curr. Opin. Psychiatry* **2020**, *33*, 20–42. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000562>.
17. Navarrete, F.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Jurado-Barba, R.; Rubio, G.; Gasparyan, A.; Austrich-Olivares, A.; Manzanares, J. Endocannabinoid System Components as Potential Biomarkers in Psychiatry. *Front. Psychiatry* **2020**, *11*, 315. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00315>.
18. Lisboa, S.F.; Gomes, F.V.; Terzian, A.L.; Aguiar, D.C.; Moreira, F.A.; Resstel, L.B.; Guimaraes, F.S. The Endocannabinoid System and Anxiety. *Vitam. Horm.* **2017**, *103*, 193–279. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.09.006>.
19. Huang, W.J.; Chen, W.W.; Zhang, X. Endocannabinoid system: Role in depression, reward and pain control (Review). *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 2899–2903. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5585>.
20. Viudez-Martinez, A.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Medrano-Relinque, J.; Navarron, C.M.; Navarrete, F.; Manzanares, J. Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior. *Acta Pharmacol. Sin.* **2019**, *40*, 358–364. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0032-8>.
21. Bisogno, T.; Hanus, L.; De Petrocellis, L.; Tchilibon, S.; Ponde, D.E.; Brandi, I.; Moriello, A.S.; Davis, J.B.; Mechoulam, R.; Di Marzo, V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect

- on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 845–852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>.
22. Russo, E.B.; Burnett, A.; Hall, B.; Parker, K.K. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem. Res.* **2005**, *30*, 1037–1043. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-6978-1>.
 23. Kathmann, M.; Flau, K.; Redmer, A.; Trankle, C.; Schlicker, E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2006**, *372*, 354–361. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0033-x>.
 24. Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjogren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N.O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>.
 25. Thomas, A.; Baillie, G.L.; Phillips, A.M.; Razdan, R.K.; Ross, R.A.; Pertwee, R.G. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB₁ and CB₂ receptor agonists in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 613–623. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707133>.
 26. Campos, A.C.; Moreira, F.A.; Gomes, F.V.; Del Bel, E.A.; Guimaraes, F.S. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *367*, 3364–3378. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0389>.
 27. Izzo, A.A.; Borrelli, F.; Capasso, R.; Di Marzo, V.; Mechoulam, R. Non-psychotropic plant cannabinoids: New therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.006>.
 28. Laprairie, R.B.; Bagher, A.M.; Kelly, M.E.; Denovan-Wright, E.M. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB₁ receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 4790–4805. <https://doi.org/10.1111/bph.13250>.
 29. Elsaid, S.; Kloiber, S.; Le Foll, B. Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2019**, *167*, 25–75. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.06.005>.
 30. Garcia-Gutierrez, M.S.; Navarrete, F.; Gasparyan, A.; Austrich-Olivares, A.; Sala, F.; Manzanares, J. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1575. <https://doi.org/10.3390/biom10111575>.
 31. Blessing, E.M.; Steenkamp, M.M.; Manzanares, J.; Marmar, C.R. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 825–836. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0387-1>.
 32. Fogaca, M.V.; Reis, F.M.; Campos, A.C.; Guimaraes, F.S. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: Involvement of 5HT_{1A} receptors and previous stressful experience. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2014**, *24*, 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.10.012>.
 33. Linge, R.; Jimenez-Sanchez, L.; Campa, L.; Pilar-Cuellar, F.; Vidal, R.; Pazos, A.; Adell, A.; Diaz, A. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: Role of 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology* **2016**, *103*, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.017>.
 34. Moreira, F.A.; Aguiar, D.C.; Guimaraes, F.S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2006**, *30*, 1466–1471. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.06.004>.
 35. Sales, A.J.; Fogaca, M.V.; Sartim, A.G.; Pereira, V.S.; Wegener, G.; Guimaraes, F.S.; Joca, S.R.L. Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 1070–1081. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1143-4>.
 36. Zanelati, T.V.; Biojone, C.; Moreira, F.A.; Guimaraes, F.S.; Joca, S.R. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: Possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159*, 122–128. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00521.x>.
 37. Zieba, J.; Sinclair, D.; Sebree, T.; Bonn-Miller, M.; Gutterman, D.; Siegel, S.; Karl, T. Cannabidiol (CBD) reduces anxiety-related behavior in mice via an FMRP-independent mechanism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2019**, *181*, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.05.002>.
 38. Malvestio, R.B.; Medeiros, P.; Negrini-Ferrari, S.E.; Oliveira-Silva, M.; Medeiros, A.C.; Padovan, C.M.; Luongo, L.; Maione, S.; Coimbra, N.C.; de Freitas, R.L. Cannabidiol in the prelimbic cortex modulates the comorbid condition between the chronic neuropathic pain and depression-like behaviour in rats: The role of medial prefrontal cortex 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. *Brain Res. Bull.* **2021**, *174*, 323–338. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.06.017>.
 39. Hartmann, A.; Lisboa, S.F.; Sonogo, A.B.; Coutinho, D.; Gomes, F.V.; Guimaraes, F.S. Cannabidiol attenuates aggressive behavior induced by social isolation in mice: Involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2019**, *94*, 109637. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109637>.

40. Sartim, A.G.; Guimaraes, F.S.; Joca, S.R. Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex-Possible involvement of 5-HT1A and CB1 receptors. *Behav. Brain Res.* **2016**, *303*, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.033>.
41. Uriguen, L.; Perez-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.
42. Garcia-Gutierrez, M.S.; Manzanares, J. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J. Psychopharmacol.* **2011**, *25*, 111–120.
43. Garcia-Gutierrez, M.S.; Ortega-Alvaro, A.; Busquets-Garcia, A.; Perez-Ortiz, J.M.; Caltana, L.; Ricatti, M.J.; Brusco, A.; Maldonado, R.; Manzanares, J. Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. *Neuropharmacology* **2013**, *73*, 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.034>.
44. Garcia-Gutierrez, M.S.; Perez-Ortiz, J.M.; Gutierrez-Adan, A.; Manzanares, J. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 1773–1784.
45. Ortega-Alvaro, A.; Aracil-Fernandez, A.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Navarrete, F.; Manzanares, J. Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* **2011**, *36*, 1489–1504.
46. Jacob, W.; Marsch, R.; Marsicano, G.; Lutz, B.; Wotjak, C.T. Cannabinoid CB1 receptor deficiency increases contextual fear memory under highly aversive conditions and long-term potentiation in vivo. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2012**, *98*, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.04.008>.
47. Haller, J.; Varga, B.; Ledent, C.; Barna, I.; Freund, T.F. Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *19*, 1906–1912.
48. Garcia-Gutierrez, M.S.; Garcia-Bueno, B.; Zoppi, S.; Leza, J.C.; Manzanares, J. Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA(A) receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 951–964. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01625.x>.
49. Uriguen, L.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Manzanares, J. Decreased GABAA and GABAB receptor functional activity in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *J. Psychopharmacol.* **2011**, *25*, 105–110. <https://doi.org/10.1177/0269881109358204>.
50. Vazquez-Leon, P.; Miranda-Paez, A.; Calvillo-Robledo, A.; Marichal-Cancino, B.A. Blockade of GPR55 in dorsal periaqueductal gray produces anxiety-like behaviors and evokes defensive aggressive responses in alcohol-pre-exposed rats. *Neurosci. Lett.* **2021**, *764*, 136218. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136218>.
51. Shi, Q.X.; Yang, L.K.; Shi, W.L.; Wang, L.; Zhou, S.M.; Guan, S.Y.; Zhao, M.G.; Yang, Q. The novel cannabinoid receptor GPR55 mediates anxiolytic-like effects in the medial orbital cortex of mice with acute stress. *Mol. Brain* **2017**, *10*, 38. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0318-7>.
52. Rahimi, A.; Hajizadeh Moghaddam, A.; Roohbakhsh, A. Central administration of GPR55 receptor agonist and antagonist modulates anxiety-related behaviors in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2015**, *29*, 185–190. <https://doi.org/10.1111/fcp.12099>.
53. Hurst, K.; Badgley, C.; Ellsworth, T.; Bell, S.; Friend, L.; Prince, B.; Welch, J.; Cowan, Z.; Williamson, R.; Lyon, C.; et al. A putative lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* **2017**, *27*, 985–998. <https://doi.org/10.1002/hipo.22747>.
54. Gasparyan, A.; Navarrete, F.; Manzanares, J. Cannabidiol and Sertraline Regulate Behavioral and Brain Gene Expression Alterations in an Animal Model of PTSD. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 694510. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.694510>.
55. Viudez-Martinez, A.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Manzanares, J. Gender differences in the effects of cannabidiol on ethanol binge drinking in mice. *Addict. Biol.* **2020**, *25*, e12765. <https://doi.org/10.1111/adb.12765>.
56. Viudez-Martinez, A.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Navarron, C.M.; Morales-Calero, M.I.; Navarrete, F.; Torres-Suarez, A.I.; Manzanares, J. Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice. *Addict. Biol.* **2018**, *23*, 154–164. <https://doi.org/10.1111/adb.12495>.
57. Navarrete, F.; Aracil-Fernandez, A.; Manzanares, J. Cannabidiol regulates behavioural alterations and gene expression changes induced by spontaneous cannabinoid withdrawal. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 2676–2688. <https://doi.org/10.1111/bph.14226>.
58. Guimaraes, F.S.; Chiaretti, T.M.; Graeff, F.G.; Zuardi, A.W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* **1990**, *100*, 558–559.
59. Onaivi, E.S.; Green, M.R.; Martin, B.R. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *253*, 1002–1009.
60. Almeida, V.; Levin, R.; Peres, F.F.; Niigaki, S.T.; Calzavara, M.B.; Zuardi, A.W.; Hallak, J.E.; Crippa, J.A.; Abilio, V.C. Cannabidiol exhibits anxiolytic but not antipsychotic property evaluated in the social

- interaction test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2013**, *41*, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.10.024>.
61. Schiavon, A.P.; Bonato, J.M.; Milani, H.; Guimaraes, F.S.; Weffort de Oliveira, R.M. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2016**, *64*, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.017>.
 62. Assareh, N.; Gururajan, A.; Zhou, C.; Luo, J.L.; Kevin, R.C.; Arnold, J.C. Cannabidiol disrupts conditioned fear expression and cannabidiolic acid reduces trauma-induced anxiety-related behaviour in mice. *Behav. Pharmacol.* **2020**, *31*, 591–596. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000565>.
 63. Shbiro, L.; Hen-Shoval, D.; Hazut, N.; Rapps, K.; Dar, S.; Zalsman, G.; Mechoulam, R.; Weller, A.; Shoval, G. Effects of cannabidiol in males and females in two different rat models of depression. *Physiol. Behav.* **2019**, *201*, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.12.019>.
 64. Shoval, G.; Shbiro, L.; HersHKovitz, L.; Hazut, N.; Zalsman, G.; Mechoulam, R.; Weller, A. Prohedonic Effect of Cannabidiol in a Rat Model of Depression. *Neuropsychobiology* **2016**, *73*, 123–129. <https://doi.org/10.1159/000443890>.
 65. Pisanti, S.; Malfitano, A.M.; Ciaglia, E.; Lamberti, A.; Ranieri, R.; Cuomo, G.; Abate, M.; Faggiana, G.; Proto, M.C.; Fiore, D.; et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *175*, 133–150. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.041>.
 66. Ibeas Bih, C.; Chen, T.; Nunn, A.V.; Bazelot, M.; Dallas, M.; Whalley, B.J. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 699–730. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0377-3>.
 67. Marinho, A.L.; Vila-Verde, C.; Fogaca, M.V.; Guimaraes, F.S. Effects of intra-infralimbic prefrontal cortex injections of cannabidiol in the modulation of emotional behaviors in rats: Contribution of 5HT(1)A receptors and stressful experiences. *Behav. Brain Res.* **2015**, *286*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.023>.
 68. Campos, A.C.; Ferreira, F.R.; Guimaraes, F.S. Cannabidiol blocks long-lasting behavioral consequences of predator threat stress: Possible involvement of 5HT1A receptors. *J. Psychiatr. Res.* **2012**, *46*, 1501–1510. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.08.012>.
 69. Gomes, F.V.; Resstel, L.B.; Guimaraes, F.S. The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology* **2011**, *213*, 465–473. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2036-z>.
 70. Campos, A.C.; Guimaraes, F.S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* **2008**, *199*, 223–230. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1168-x>.
 71. Garcia-Gutierrez, M.S.; Navarrete, F.; Navarro, G.; Reyes-Resina, I.; Franco, R.; Lanciego, J.L.; Giner, S.; Manzanares, J. Alterations in Gene and Protein Expression of Cannabinoid CB2 and GPR55 Receptors in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Suicide Victims. *Neurotherapeutics* **2018**, *15*, 796–806. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0610-y>.
 72. Gomes-de-Souza, L.; Bianchi, P.C.; Costa-Ferreira, W.; Tomeo, R.A.; Cruz, F.C.; Crestani, C.C. CB1 and CB2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis differently modulate anxiety-like behaviors in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2021**, *110*, 110284. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110284>.
 73. Ivy, D.; Palese, F.; Vozella, V.; Fotio, Y.; Yalcin, A.; Ramirez, G.; Mears, D.; Wynn, G.; Piomelli, D. Cannabinoid CB2 receptors mediate the anxiolytic-like effects of monoacylglycerol lipase inhibition in a rat model of predator-induced fear. *Neuropsychopharmacology* **2020**, *45*, 1330–1338. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0696-x>.
 74. Haller, J.; Bakos, N.; Szirmay, M.; Ledent, C.; Freund, T.F. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur. J. Neurosci.* **2002**, *16*, 1395–1398.
 75. Martin, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Maldonado, R.; Valverde, O. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology* **2002**, *159*, 379–387.
 76. Burokas, A.; Martin-Garcia, E.; Gutierrez-Cuesta, J.; Rojas, S.; Herance, J.R.; Gispert, J.D.; Serra, M.A.; Maldonado, R. Relationships between serotonergic and cannabinoid system in depressive-like behavior: A PET study with [11C]-DASB. *J. Neurochem.* **2014**, *130*, 126–135. <https://doi.org/10.1111/jnc.12716>.
 77. Zoppi, S.; Madrigal, J.L.; Caso, J.R.; Garcia-Gutierrez, M.S.; Manzanares, J.; Leza, J.C.; Garcia-Bueno, B. Regulatory role of the cannabinoid CB2 receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 2814–2826. <https://doi.org/10.1111/bph.12607>.
 78. Casarotto, P.C.; Gomes, F.V.; Resstel, L.B.; Guimaraes, F.S. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: Involvement of CB1 receptors. *Behav. Pharmacol.* **2010**, *21*, 353–358.

79. Silva-Cardoso, G.K.; Lazarini-Lopes, W.; Hallak, J.E.; Crippa, J.A.; Zuardi, A.W.; Garcia-Cairasco, N.; Leite-Panissi, C.R.A. Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors. *Neuropharmacology* **2021**, *197*, 108712. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108712>.
80. Fogaca, M.V.; Campos, A.C.; Coelho, L.D.; Duman, R.S.; Guimaraes, F.S. The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. *Neuropharmacology* **2018**, *135*, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.03.001>.
81. Do Monte, F.H.; Souza, R.R.; Bitencourt, R.M.; Kroon, J.A.; Takahashi, R.N. Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. *Behav. Brain Res.* **2013**, *250*, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.045>.
82. Fogaca, M.V.; Duman, R.S. Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 87. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00087>.
83. Sanacora, G.; Mason, G.F.; Rothman, D.L.; Krystal, J.H. Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. *Am. J. Psychiatry* **2002**, *159*, 663–665. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.4.663>.
84. Duman, R.S.; Sanacora, G.; Krystal, J.H. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron* **2019**, *102*, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.013>.
85. Earnheart, J.C.; Schweizer, C.; Crestani, F.; Iwasato, T.; Itohara, S.; Mohler, H.; Luscher, B. GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 3845–3854. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3609-06.2007>.
86. Vollenweider, I.; Smith, K.S.; Keist, R.; Rudolph, U. Antidepressant-like properties of alpha2-containing GABA(A) receptors. *Behav. Brain Res.* **2011**, *217*, 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.009>.
87. Moreira, F.A.; Kaiser, N.; Monory, K.; Lutz, B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology* **2008**, *54*, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.005>.
88. Gaetani, S.; Cuomo, V.; Piomelli, D. Anandamide hydrolysis: A new target for anti-anxiety drugs? *Trends Mol. Med.* **2003**, *9*, 474–478.
89. Banerjee, S.P.; Snyder, S.H.; Mechoulam, R. Cannabinoids: Influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1975**, *194*, 74–81.
90. Bakas, T.; van Nieuwenhuijzen, P.S.; Devenish, S.O.; McGregor, I.S.; Arnold, J.C.; Chebib, M. The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABAA receptors. *Pharmacol. Res.* **2017**, *119*, 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.022>.
91. Alexander, C.; Vasefi, M. Cannabidiol and the corticosterone circuit in post-traumatic stress disorder. *IBRO Neurosci. Rep.* **2021**, *11*, 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2021.08.001>.
92. Sisay, S.; Pryce, G.; Jackson, S.J.; Tanner, C.; Ross, R.A.; Michael, G.J.; Selwood, D.L.; Giovannoni, G.; Baker, D. Genetic background can result in a marked or minimal effect of gene knockout (GPR55 and CB2 receptor) in experimental autoimmune encephalomyelitis models of multiple sclerosis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076907>.
93. Deiana, S.; Watanabe, A.; Yamasaki, Y.; Amada, N.; Arthur, M.; Fleming, S.; Woodcock, H.; Dorward, P.; Pigliacampo, B.; Close, S.; et al. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Delta(9)-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology* **2012**, *219*, 859–873. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2415-0>.
94. Biala, G.; Budzynska, B.; Staniak, N. Effects of rimonabant on the reinstatement of nicotine-conditioned place preference by drug priming in rats. *Behav. Brain Res.* **2009**, *202*, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.042>.
95. Ray, A.P.; Griggs, L.; Darmani, N.A. Delta 9-tetrahydrocannabinol suppresses vomiting behavior and Fos expression in both acute and delayed phases of cisplatin-induced emesis in the least shrew. *Behav. Brain Res.* **2009**, *196*, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.07.028>.
96. Crawley, J.; Goodwin, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1980**, *13*, 167–170.
97. Lister, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* **1987**, *92*, 180–185.

98. Surget, A.; Saxe, M.; Leman, S.; Ibarguen-Vargas, Y.; Chalon, S.; Griebel, G.; Hen, R.; Belzung, C. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol. Psychiatry* **2008**, *64*, 293–301.
99. Vaugeois, J.M.; Passera, G.; Zuccaro, F.; Costentin, J. Individual differences in response to imipramine in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology* **1997**, *134*, 387–391.
100. Paxinos, G.; Franklin, K.B.J.; Franklin, K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2001.
101. Palkovits, M. Punch sampling biopsy technique. *Methods Enzymol.* **1983**, *103*, 368–376.
102. Navarrete, F.; Perez-Ortiz, J.M.; Manzanares, J. Pregabalin- and topiramate-mediated regulation of cognitive and motor impulsivity in DBA/2 mice. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01981.x>.
103. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.



IV.II. ARTÍCULO 2

Front Pharmacol. 2023 Apr 18;14:1171646. doi: 10.3389/fphar.2023.1171646. eCollection 2023

Unveiling behavioral and molecular neuroadaptations related to the antidepressant action of cannabidiol in the unpredictable chronic mild stress model.

María Salud García-Gutiérrez^{1,2,3}, Daniela Navarro^{1,2,3}, Amaya Austrich-Olivares¹ and Jorge Manzanares^{1,2,3*}

¹Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández, Av Ramón y Cajal s/n, San Juan de Alicante, Alicante, Spain

²Research Network on Primary Addictions, Instituto de Salud Carlos III, MICINN and FEDER, Madrid, Spain

³Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, Spain.

* Correspondence:

Jorge Manzanares jmanzanares@umh.es

Keywords: cannabidiol, unpredictable chronic mild stress model, sertraline, neuroplasticity, mice, antidepressant properties.

Abstract

Introduction: This study aims to further characterize cannabidiol's pharmacological and molecular profile as an antidepressant.

Methods: Effects of cannabidiol (CBD), alone or combined with sertraline (STR), were evaluated in male CD1 mice (n=48) exposed to an unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedure. Once the model was established (4 weeks), mice received CBD (20 mg·kg⁻¹, i.p.), STR (10 mg·kg⁻¹, p.o.) or its combination for 28 days. The efficacy of CBD was evaluated using the light-dark box (LDB), elevated plus maze (EPM), tail suspension (TS), sucrose consumption (SC) and novel object recognition (NOR) tests. Gene expression changes in the serotonin transporter, 5-HT1A and 5-HT2A receptors, BDNF, VGlut1 and PPARdelta, were evaluated in the dorsal raphe, hippocampus (Hipp) and amygdala by real-time PCR. Besides, BDNF, NeuN and caspase-3 immunoreactivity were assessed in the Hipp.

Results: CBD exerted anxiolytic and antidepressant-like effects at 4 and 7 days of treatment in the LDB and TS tests, respectively. In contrast, STR required 14 days of treatment to show efficacy. CBD improved cognitive impairment and anhedonia more significantly than STR. CBD plus STR showed a similar effect than CBD in the LDB, TST and EPM. However, a worse outcome was observed in the NOR and SI tests. CBD modulates all molecular disturbances induced by UCMS, whereas STR and the combination could not restore 5-HT1A, BDNF and PPARdelta in the Hipp.

Discussion: These results pointed out CBD as a potential new antidepressant with faster action and efficiency than STR. Particular attention should be given to the combination of CBD with current SSRI since it appears to produce a negative impact on treatment.

1. Introduction

Major depressive disorder (MDD) is one of the most frequently diagnosed mental diseases, affecting more than 260 million people worldwide. According to World Health Organization, this psychiatric disorder presents devastating prevalence, mortality, morbidity, and disability rates (1). With a lifetime prevalence of up to 17%, MDD is the leading cause of disability worldwide and the fourth leading cause of disease burden (1, 2). Suffering MDD reduces average life expectancy by 10 to 12 years (3). Its high comorbidity with other psychiatric diseases, such as anxiety disorders, is one of the main factors contributing to the increased mortality and disability associated with this disorder (4-7). The complex symptomatology of this disease, often chronic or recurrent, limits patients' functioning, affecting their social relationships, including family breakdown, absence from work, and reduced productivity in the workplace. Likewise, depressive disorders represent one of the main risk factors for suicide (8).

Despite the significant impact of MDD, the biological bases of this disease remain incompletely understood. This lack of knowledge is the main reason for the low clinical response rate of current antidepressant drugs. Indeed, only one-third of patients achieve complete remission. A series of trials sponsored by the National Institute of Mental Health (NIMH) in the USA provided relevant data. In the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR*D) study, only 31% of patients with MDD were in remission after treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor for 14 weeks (9-11). All these results highlight the urgent need to identify new drugs with a different mechanism of action than classical antidepressants that improve the clinical outcome and our understanding of the molecular mechanisms of depression.

Cannabidiol (CBD), one of the main compounds in the plant *Cannabis sativa*, presents a wide range of pharmacological properties, such as anxiolytic, antidepressant, antipsychotic, anticonvulsant and neuroprotective (12-19). These actions have considerably increased the number of studies aimed at clarifying its therapeutic role in various neuropsychiatric diseases, including depressive disorders. Besides, CBD does not display potential as a drug of abuse according to animal models (20-22) and open trials carried out with healthy volunteers (23-25).

Cumulative evidence showed that CBD reduces anxiety and behavioral despair in rats and mice, depending on the dose and the strain of rodents evaluated (26-31). However, most of these studies used acute behavioral tests with little power of clinical translation because they partially reproduce the clinical condition (32). In this respect, the unpredictable chronic mild stress model (UCMS) is a well-validated animal model of depression due to its reliable predictive face and construct validities. It is the ideal model for selecting optimal antidepressants (33-35). To date, only a few studies have evaluated CBD effects using this animal model. The results reported by these studies indicate that both acutely and chronically CBD administration reduces depressive-like behaviors, including anhedonia. Although these results appear promising, they also present certain limitations. Gall et al. (36) administered CBD from the beginning of the UCMS, hampering the possibility of evaluating

its ability to modulate depressive-like behaviors once already established. In the study by Xu et al. (37), CBD was administered weekly for two weeks, starting the treatment from the second week of the UCMS, evaluating CBD effects only on the forced swimming test. Finally, Ma et al. (38) only assessed the impact of an acute administration of CBD, remaining to be demonstrated its sustained and long-term effects of a chronic administration. More importantly, CBD has not been compared to any reference antidepressant drug.

This study aims to answer fundamental aspects necessary to further characterize CBD's pharmacological and molecular profile as an antidepressant. Thus, we evaluated CBD antidepressant-like effects in mice exposed to the UCMS. The treatment started on the 4-week of the UCMS, once the model was established, and was given for 28 days. Antidepressant-like effects were assessed by using a complete behavioral test battery evaluating anxiety (light-dark box and elevated plus maze), behavioral despair (tail suspension test), cognitive impairment (novel object recognition) and anhedonia (sucrose intake). Furthermore, we compared if CBD displays antidepressant-like effects faster than sertraline (STR), an antidepressant reference drug, and/or its effectiveness in modulating the behavioral and molecular disturbances induced by the UCMS was different. In addition, we analyzed if the combination of CBD and STR may present additive or synergistic effects. The molecular neuroadaptations closely related to its mechanism of action were analyzed by measuring changes in the gene expression of key targets of the serotonergic system (serotonin transporter reuptake (Scl6a4), 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptors), neuroplasticity (BDNF, VGlut1, PPARdelta) in the dorsal raphe (DR), hippocampus (Hipp), and amygdala (AMY) of stressed mice by real-time PCR. Immunohistological studies also evaluated BDNF, NeuN and caspase-3 immunoreactivity in the Hipp.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Male CD1 mice were used in all experiments (Charles River, Barcelona, Spain). At the beginning of the experiments, mice were 5 weeks old and weighed 20-25 g. All animals were maintained under a controlled temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) and with a light-dark cycle from 08.00 to 20.00 h, with free access to food (commercial diet for rodents A04 Panlab, Barcelona, Spain) and water. All the behavioral tests were carried out between 8.00 and 14.00 h. All the studies were conducted in compliance with the Spanish Royal Decree 1201/2005, the Spanish Law 32/2007, and the European Union Directive of September 22, 2010 (2010/63/UE), regulating the care of experimental animals.

2.2 Treatments

CBD was obtained from STI Pharmaceuticals (Essex, United Kingdom), dissolved in ethanol:cremophor:saline (1:1:18) and injected i.p. at the correspondent dose (20 mg·kg⁻¹ in 0.3 ml of solution, twice daily). This dose was selected based on our previous dose-response experiments in CD1-stressed mice exposed to the UCMS (Supplementary figure 1).

STR was purchased (Besitran, Pfizer, 20 mg·ml⁻¹, concentrated oral solution), dissolved in water and administered p.o. at the corresponding dose (10 mg·kg⁻¹ in 0.3 ml of solution, once daily). This dose was selected based on previous studies (39, 40).

For mice receiving the combination of CBD and STR, drugs were prepared as described above and given CBD + STR during the morning and CBD + VEH during the evening.

2.3 Behavioral analyses

2.3.1 Chronic unpredictable mild stress

Mice were exposed to UCMS for 8 weeks, following the previously published protocol with some modifications (35, 41, 42). Briefly, mice were exposed several times a day to one or more of the following stressful stimuli (stressors): wet cage, food deprivation, restraint stress, period of stroboscopic illumination (150 flashes·min⁻¹), inversion of light/dark cycle, tilted cage (45°), loud noise (90-105 dB) and fox urine exposure. All stressors and/or sequences were applied at different time points to avoid habituation and add unpredictability to the stressors (Table 1).

During the exposure to the UCMS, behavioral alterations were analyzed using different tests at various time points (figure 1). Once the UCMS was established (4 weeks), drug treatment was initiated, randomly dividing the mice into the following groups: 1) VEH-treated UCMS, 2) CBD-treated UCMS, 3) CBD+STR-treated UCMS, 4) STR-treated UCMS. Mice not exposed to the UCMS were also treated with the VEH of CBD and the VEH of STR (VEH-treated non-UCMS). Treatment was given for a total of 28 days.

2.3.2 Light-dark box test (LDB)

This test uses the natural aversion of rodents to bright areas compared with darker ones (43, 44). In a two-compartment box, rodents prefer dark areas, whereas anxiolytic drugs should increase the time spent in the light compartment. The apparatus consisted of two methacrylate boxes (20 x 20 x 15 cm), one transparent and one black and opaque, separated by an opaque tunnel (4 cm). Light from 60 W desk lamp placed 25 cm above the light box provided room illumination. Mice were individually tested in 5 min sessions. During this period, the time spent in the light box and the number of transitions between the two compartments were recorded. A mouse whose four paws were in the new box was considered as having changed boxes. The floor of each box was cleaned between sessions with paper towels moistened with ethanol 70% and thoroughly dried. At the beginning of the session, mice were placed in the lightbox facing the tunnel that connects to the dark box.

2.3.3 Elevated plus maze (EPM)

This test consisted of two open arms and two enclosed horizontal perpendicular arms 50 cm above the floor (44, 45). The junction of four arms formed a central squared platform (5 x 5 cm). The test began with the animal being placed in the center of the apparatus facing one of the enclosed arms and allowed to explore freely for 5 min. During this period, the time spent in the open arms (as percentages of total test time) and the number of entries from open arms

to closed arms (and vice versa) were recorded. An arm entry was considered the entry of four paws into the arm. The floor of each arm was cleaned between sessions with paper towels moistened with ethanol 70% and fully dried.

2.3.4 Tail suspension test (TST)

Mice were individually suspended by the tail at the edge of a lever above the table top (the distance to the table surface was 35 cm), affixed with the adhesive tape placed approximately 1-2 cm from the tip of the tail (42, 46). The duration of immobility was measured for 6 min. In this situation, mice develop escape-orientated behaviors interspersed with temporally increasing bouts of immobility.

2.3.5 Novel object recognition test (NOR)

Rodents have an innate preference towards novelty, meaning less cognitive impairment. This paradigm is based on the natural tendency of mice to explore new objects and environments and compare them with familiar ones (47, 48). The NOR was carried out in an open field cage of 40 x 40 x 50 cm of transparent methacrylate with two identical objects in texture, color, size, and shape: Object A (familiar) on the habituation day. On the trial day, one of Objects A remained, and the other was changed with a new different object in texture, color, size and shape: Object B (novel). On the first day, mice were habituated to the arena with two identical Objects A for 5 min. To long-term assessed memory, 24 hours later, the habituation took place, mice were exposed to one Object A (familiar object) and Object B (novel object), again for 5 min. In both sessions, the exploration time for each object was quantified. Exploration time was defined as when the animal orientates the nose, sniffs, or touches the object with its front legs at a less or equal distance to 1 cm. The discrimination index was calculated as the difference between time spent exploring the novel and familiar object divided by the total exploration time of the two objects: $[(\text{Object B} - \text{Object A}) / (\text{Object A} + \text{Object B})]$ (or see formula). Values for the discrimination ratio ranged from 0 to 1, where a score closer to 0 indicated a preference for the familiar object, while a score closer to 1 indicated a greater preference for the novel object. This way, high discrimination index reflects better memory retention for the familiar object.

$DI = ((\text{Object B} - \text{Object A}) / (\text{Object A} + \text{Object B}))$

2.3.6 Sucrose consumption test (SC)

Sucrose intake (5% sucrose solution) was measured after 18 h of food and water deprivation during a period of 1 h (49). Consumption of sucrose solution was estimated simultaneously in the control and experimental groups by measuring and comparing the volume before and after the 1-h window. Sucrose intake was expressed as mg sucrose·g⁻¹ body weight.

2.4 Gene expression studies by real-time PCR

Mice were killed 2 h and a half after the last administration of CBD, STR, its combination or vehicle. Briefly, brains were removed from the skull, frozen over dry ice, and stored at -80°C until the day of the assay. Brain sections of $500\ \mu\text{m}$ were cut at different levels containing the regions of interest (AMY, Hipp and DR), according to Paxinos and Franklin (50). Sections were mounted on slides and stored at -80°C . One section of each level was dissected following the method described by Palkovits (51). Total RNA was obtained from brain punches using Biozol® Total RNA extraction reagent (Bioflux, Inilab, Madrid, Spain) in the AMY, Hipp and DR areas. After DNase digestion, reverse transcription was carried out to obtain the complementary DNA (cDNA) following the manufacturer's instructions (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, Applied Biosystems, Madrid, Spain). Quantitative analyses of the relative gene expression of *Scl6a4* (Mm00439391_m1), 5-HT1A (*Mm00434106_s1*), 5-HT2A (*Mm00555764_m1*), BDNF (*Mm00432069_m1*), PPARdelta (*Mm00803184_m1*), and mVglut1 (*Mm00812886_m1*) were measured using Taqman Gene Expression assay (Applied Biosystems, Madrid, Spain) as a double-stranded DNA-specific fluorescent dye and performed on the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). The reference gene was 18S rRNA, detected using Taqman ribosomal RNA control reagents. Briefly, the data for each target gene were normalized to the endogenous reference gene, and the fold change in target gene abundance was determined using the $2\Delta\Delta\text{Ct}$ method (44).

2.5 Conventional histology and immunohistochemistry

The general criteria reported by Amaral and Witter (52) were used to define the hippocampal areas and strata. The study focused on the dentate gyrus (DG) and the CA3 and CA1 regions of Cornu Ammonis (CA). Briefly, after 12-14h of the last administration of the corresponding drug and/or exposure to stressful stimuli, mice were weighed, anesthetized with isoflurane, and intracardially perfused with 50 ml of saline followed by 200 ml of 4% paraformaldehyde, 0.1M sucrose, and 0.002% CaCl_2 in 0.1M phosphate buffer (PB; 1.4% K_2HPO_4 14 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ~3 g/L to pH 7.3–7.4). Brains were dissected, post-fixed by immersion in the same perfusion medium at room temperature for 4h and then stored in 0.05% sodium azide in PB at 4°C . Eight parallel series of coronal sections containing the DG and CA rostromedial portion were cut with a Microm HM 650 V vibratome (Thermo Fisher Scientific, Inc., Barcelona, Spain) at $50\ \mu\text{m}$ and stored in 0.05% sodium azide in PB at 4°C . For BDNF, one series was immunostained with rabbit anti-BDNF polyclonal antibody (1:400; EMO, Millipore, USA). All sections were then incubated with goat anti-rabbit antibody, Alexa Fluor 488, labeled (1:200, Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain) and mounted using ProLong Gold (Molecular Probes, Invitrogen).

The adjacent series were double immunostained for fluorescence, starting with mouse anti-neurons neuronal nuclei (NeuN) monoclonal Ab (mAb) (1:400; Chemicon International Inc., Temecula, CA) and rabbit anti-Caspase 3 (1: 300, Cell Signaling Technology, USA). All sections were then incubated with goat anti-mouse antibody, Alexa Fluor Rhodamine Red

labeled (1:200, Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain), followed by goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 labeled (1:200, Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain).

All samples were examined in a Leica SPEII confocal laser fluorescence microscope, with images captured using Leica Application Suite X software.

2.6 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Student t-test for comparing two groups, and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls posthoc test for comparing four groups of stressed mice treated with VEH, CBD, STR or its combination. Differences were considered significant if the error probability was less than 5%. SigmaPlot 11 software (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) was used to analyze the data and create the graphs.

3. Results

Assessment of behavioral alterations in mice exposed to the UCMS before pharmacological administration

In UCMS, anxiogenic- and depressogenic-like behaviors were evaluated at different time points using the LDB (10 days) and EPM (16 days), and the TST (22 days) and sucrose intake tests (28 days), respectively.

3.1.1 LBD and EPM tests

In the LDB, stressed mice spent less time in the lighted box compared to the non-UCMS group (Figure 2A) (Student t-test: $t=3.641$, 57 df, $p<0.001$) ($n=12$ non-UCMS; $n=48$ UCMS). No difference was found in the number of transitions (Figure 2B) (Student t-test: $t=-0.352$, 57df, $p=0.726$) ($n=12$ non-UCMS; $n=48$ UCMS).

Similar results were obtained in the EPM since mice exposed to the UCMS showed a significant reduction in the time spent (%) in the open arms in comparison with the non-UCMS group (Figure 2C) (Student t-test: $t=4.873$, 57df, $p<0.001$) ($n=12$ non-UCMS; $n=48$ UCMS). No difference was observed in the number of transitions (Figure 2D) (Student t-test: $t=-1.279$, 57df, $p=0.206$) ($n=12$ non-UCMS; $n=48$ UCMS).

3.1.2 TS test

On day 22, a significant increase in the immobility time was found in mice exposed to the UCMS compared with its corresponding control group (Figure 2E) (Student t-test: $t=-4.587$, 57 df, $p<0.001$) ($n=12$ non-UCMS; $n=48$ UCMS).

3.1.3 Sucrose intake test

On day 28, stressed mice displayed a significant reduction of sucrose intake (mg sucrose·g⁻¹ body weight) compared with the non-UCMS group (Figure 2F) (Student t-test: $t=6.051$, 57 df, $p<0.001$) ($n=12$ non-UCMS; $n=48$ UCMS).

3.2 Effects of chronic CBD, STR and its combination administration on modulating behavioral alterations induced by the UCMS

3.2.1 Effects at 4 days of treatment: LDB test

Firstly, we evaluated if there was a difference in the speed with which the antidepressant-like effect was established between CBD and the reference drug STR using the LDB after 4 days of treatment.

As expected, VEH-treated UCMS mice presented a reduced time spent in the lighted box compared with the VEH-treated non-UCMS mice (Figure 3A) (Student t-test: $t=2.452$, 22df, $p=0.023$) ($n = 12$ /group). No differences were found in the number of transitions between both groups (Figure 3D) (Student t-test: $t=0.915$, 22df, $p=0.371$) ($n = 12$ /group).

CBD treatment, alone or combined with STR, increased the time spent in the lighted box. Interestingly, no statistically significant differences were found between the STR-treated UCMS group and the vehicle-treated UCMS group (Figure 3C) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,44)=3.753$, $p=0.018$) ($n= 12$ /group). Regarding the number of transitions, there were no differences between the different groups (Figure 3D) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,44)= 2.469$, $p=0.075$) ($n= 12$ /group).

3.2.2 Effects at 7 days of treatment: TS test

Stressed mice treated with vehicle increased immobility time in the TS test compared to VEH-treated non-UCMS mice (Figure 3E) (Student t-test $t=-3.209$, 19df, $p=0.005$) ($n = 11$ VEH-treated non UCMS; $n= 12$ VEH-treated UCMS).

Curiously, after 7 days of treatment, CBD significantly reduced the immobility time, alone or in combination with STR. In contrast, STR failed to induce any effect in comparison to its corresponding control group, UCMS treated with VEH (Figure 3F) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,40)= 7.991$, $p<0.001$) ($n = 12$ /group).

3.2.3 Effects at 14 days of treatment: EPM test

Mice exposed to the UCMS and treated with VEH increased the time spent (%) in open arms compared to VEH non-UCMS mice (Figure 3G) (Student t-test $t=3.970$, 22df, $p<0.001$) ($n= 12$ /group). No differences were found in the number of transitions between both groups (Figure 3I) (Student t-test $t=-0.213$, 22df, $p=0.833$) ($n= 12$ /group).

Notably, the three pharmacological treatments significantly increased the time spent (%) in the open arms (Figure 3H) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,44)= 7.373$, $p<0.001$) ($n= 12$ /group). No differences were identified in the number of transitions between the different groups (Figure 3J) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,44)= 0.792$, $p=0.505$) ($n= 12$ /group).

3.2.4 Effects at 18 days of treatment: NOR test

As shown in Figure 4A, VEH-treated UCMS mice presented a significant reduction of the discrimination index compared with its corresponding control group, VEH-treated non-UCMS (Student t-test, $t=4.179$, 22df, $p<0.001$) ($n = 12$ /group).

The statistical analysis revealed that despite STR increased the discrimination index, this change did not reach statistical significance compared to VEH-treated UCMS mice. The treatment with CBD restored this alteration since CBD- and CBD + STR-treated UCMS mice showed a significant increase in the discrimination index compared to VEH- and STR-treated UCMS groups (Figure 4B) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,44)=9.783$, $p<0.001$) ($n = 12$ /group).

3.2.5 Effects at 26 days of treatment: SC test

Mice exposed to the UCMS and treated with VEH showed a significant reduction in sucrose consumption compared to the VEH-treated non-UCMS group (Figure 4C) (Student t-test, $t=16.183$, 22df, $p=0.001$) ($n= 12$ /group). STR, CBD and their combination significantly increased sucrose intake. Nonetheless, CBD was the drug that induced the most significant increase, being statistically significant compared to the groups treated with STR and CBD+STR (Figure 4D) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,44)=212.745$, $p<0.001$) ($n= 12$ /group).

3.2.6 Gene expression analyses by Rt-PCR

3.2.6.1 Scl6a4, 5-HT1A and 5-HT2A in the DR, Hipp and AMY

The results revealed that UCMS significantly reduced Scl6a4 gene expression levels in the DR (Figure 5A, Student t-test, $t=6.876$, 19df, $p<0.001$) ($n= 11$ /group). Interestingly, STR, CBD and their combination significantly reversed that reduction. Notably, the increase induced by CBD, alone or in combination with STR, was more significant than that caused by STR alone (Figure 5B) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,40)=15.626$, $p<0.001$) ($n= 11$ /group).

In the Hipp, UCMS induced a significant increase of both 5-HT1A (Figure 5C) (Student t-test $t=-2.923$, 16df, $p=0.01$) ($n= 9$ /group) and 5-HT2A gene expressions (Figure 5E) (Student t-test $t=-3.375$, 18df, $p=0.003$) ($n= 11$ VEH-treated non-UCMS; $n=9$ VEH-treated UCMS). Among all treatments, only CBD reduced 5HT1A gene expression. No change was found in the UCMS groups treated with STR or with the CBD + STR combination (Figure 5D) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,32)=9.554$, $p<0.001$) ($n= 9$ /group). All the pharmacological interventions reduced 5-HT2A gene expression without any differences among them (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,29)=8.404$, $p<0.001$) ($n= 9$ VEH-treated UCMS; $n=8$ STR-, CBD- and CBD+STR-treated UCMS groups).

In the AMY, UCMS induced opposite effects in the gene expression of both serotonergic receptors since it reduced 5-HT1A (Figure 5G) (Student t-test $t=3.447$, 18df, $p=0.003$) ($n= 10$ /group) but increased 5-HT2A gene expression (Figure 5I) (Student t-test $t=-3.453$, 18df, $p=0.003$) ($n= 10$ /group). Indeed, differences were also found between the different

pharmacological approaches tested. On the one hand, CBD and STR increased 5-HT1A gene expression; however, in the case of the CBD+STR combination, no statistically significant change was found, although there was a tendency to reduce it (Figure 5H) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,34)= 3.861$, $p=0.018$) ($n = 10$ VEH-, STR- and CBD-treated UCMS groups; $n= 8$ CBD+STR treated UCMS). On the other hand, no change in 5-HT2A was found in the UCMS groups treated with STR or with the CBD + STR combination compared to VEH-treated UCMS mice. Notably, CBD was the only treatment reducing 5-HT2A gene expression, being this change statistically different from the other groups (Figure 5J) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,37)= 7.932$, $p<0.001$) ($n= 11$ VEH-treated UCMS; $n= 10$ STR-treated UCMS; $n= 12$ CBD-treated UCMS; $n=8$ CBD+STR-treated UCMS).

3.2.6.2 BDNF, PPARdelta and mVglut1 in the Hipp

As shown in Figure 6A, relative gene expression of BDNF in the Hipp was reduced in mice exposed to the UCMS compared with the non-UCMS group (Figure 6A) (Student t-test, $t= 5.281$, $19df$, $p<0.001$) ($n= 12$ VEH-treated non-UCMS; $n= 11$ VEH-treated UCMS). Surprisingly, only CBD treatment reversed this alteration, increasing BDNF levels. No changes were induced by STR or the combination CBD + STR compared with the VEH-treated UCMS group (Figure 6B) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,38)= 19.676$, $p<0.001$) ($n= 11$ VEH-, STR- and CBD-treated UCMS groups; $n=9$ CBD+STR UCMS).

Similarly, UCMS significantly reduced the relative gene expression of PPARdelta in the Hipp (Figure 6C) (Student t-test, $t= 3.898$, $19df$, $p<0.001$) ($n= 12$ VEH-treated non-UCMS; $n= 11$ VEH-treated UCMS). Notably, this alteration was reversed only by CBD treatment, with no effect induced by STR or CBD+STR combination. Besides, there was a statistical difference between CBD- and STR-treated UCMS mice (Figure 6D) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,34)= 5.288$, $p=0.004$) ($n= 11$ VEH- and CBD-treated UCMS groups; $n= 8$ CBD-treated UCMS and CBD+STR-treated UCMS).

Regarding mVglut1, there was a reduction in the UCMS group compared to VEH non-UCMS group (Figure 6E) (Student t-test, $t=2.203$, $17df$, $p=0.042$) ($n = 10$ /group). All pharmacological treatments reversed the effects induced by UCMS since they significantly increased mVglut1 gene expression. No differences were found among the different pharmacological approaches (Figure 6F) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,33)=4.691$, $p=0.008$) ($n= 10$ VEH-treated UCMS and $n=9$ STR-, CBD- and CBD+STR-treated groups).

3.2.7 Conventional and confocal immunohistochemistry

3.2.7.1 BDNF immunoreactive in the Hipp

BDNF immunostaining revealed a lower labeling intensity of the cells in all Hipp areas in the VEH-treated UCMS group compared with VEH-treated non-UCMS mice at low magnification (Figure 7 A-B). On the other hand, a decrease of BDNF-ir cells in the hilus and

granular layer of DG (double arrow Figure 7 A-E), and the pyramidal layer of CA1 and CA3 was found in VEH-treated UCMS compared with VEH-treated non-UCMS. Interestingly, all the pharmacological approaches increased BDNF-ir compared with VEH-treated UCMS mice. In CBD- and CBD + STR-treated UCMS groups, the labeling intensity of BDNF-ir in pyramidal and granular cells was higher than in the STR-treated UCMS mice (Figure 7 C-E). On the other hand, BDNF-ir in CA1 and CA3 decreased in VEH-treated UCMS compared with the VEH-treated non-UCMS group (Figure 6 A-B). All the treatments increased BDNF-immunostained in both fields of Hipp (arrowhead in Figure 6 C-E). Likewise, BDNF-ir in the hilus and the DG areas (arrow and double arrow Figure 6 C-E) were decreased in the VEH-treated UCMS group (Figure 7B).

At high magnification, BDNF-ir in the hilus and the granular cells of DG in CBD-, STR- and CBD + STR UCMS groups increased compared with VEH-treated UCMS (Figure 7 F-J). Even though BDNF-immunostained intensity was higher in STR-treated UCMS than in VEH-treated UCMS, the increase was more significant in the granular layer of DG in CBD and CBD + STR groups compared with STR-treated UCMS mice (arrow in Figure 7 H-J). All these results revealed increased cell survival and plasticity in the UCMS mice treated with the different pharmacological approaches compared with VEH-treated UCMS mice. This increase was even more significant in mice treated with CBD and CBD + STR than with STR alone.

3.2.7.2 NeuN and Caspase-3 immunoreactive in the Hipp

In VEH-treated UCMS mice, the results of NeuN-Caspase-3 double-immunostained sections at low magnification (Figure 8 A, C, E, G, I) revealed a decrease in NeuN-ir in CA1, CA3 and the hilus and granular cells of DG (arrows in Figure 8 A, C, E, G, I) compared with its corresponding control group, VEH-treated non-UCMS. Interestingly, CBD, STR and the combination CBD+STR increased NeuN-ir.

On the other hand, Caspase-3-ir increased in VEH-treated UCMS compared to VEH-treated non-UCMS mice (Figure 8 B, D). In contrast, Caspase-3-ir was lower in CBD-, STR-, and CBD + STR-treated mice compared with the VEH-treated UCMS group (arrows in Figure 8 D, F, H, J). Between treatments, Caspase-3-ir was lower in UCMS mice treated with CBD- or CBD + STR than in those treated with STR alone (arrows in Figure 8 F, H, J). Details of the CA1 region showed a decrease in NeuN-ir pyramidal cells in CA1 and an increase of Caspase-3-ir in VEH-treated UCMS compared with non-UCMS. Both CBD and STR, as well as their combination, reversed these alterations (arrow in Figure 8 A, C, E, G, I). These results revealed higher cellular death, as noted by the decrease in NeuN-ir and the increase of Caspase-3-ir in VEH-treated UCMS compared with the VEH-treated non-UCMS group. Notably, the number of apoptotic cells decreased in mice treated with CBD- or CBD + STR even more than in those treated only with STR (arrows in Figure 8 F, H, I).

4. Discussion

The present study revealed that the antidepressant action of CBD is faster and more effective than the reference drug used, STR, in modulating the behavioral and molecular disturbances induced by the UCMS. Indeed, the combination of CBD plus STR showed a worse outcome than CBD alone. These assumptions are based on the following observations: 1) CBD reversed anxiety and behavioral despair of stressed mice at 4, 7 and 14 days of treatment, while STR required 14 days to modulate the anxiogenic-like behavior induced by UCMS, 2) CBD significantly improved cognitive impairment and anhedonia of UCMS mice more than STR, 3) CBD normalized all the gene expression disturbances induced by the UCMS in critical elements within the serotonergic system (5-HT_{1A} and 5-HT_{2A}) in the DR, Hipp and AMY compared to STR, 4) CBD increased BDNF and PPAR δ gene expressions in the Hipp of UCMS mice, whereas STR was without effects, 5) CBD increased BDNF and reduced caspase-3 immunoreactivities in the Hipp more than STR, 6) the combination of CBD plus STR showed a similar efficacy than CBD alone in the LBD, TST and EPM, however, a worse outcome was found in the improvement of cognitive impairment and anhedonia, and 8) the combination of CBD plus STR did not reverse the alterations induced by the UCMS in 5-HT_{1A}, BDNF and PPAR δ in the Hipp, and 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} in the AMY; and increased BDNF and caspase-3 immunoreactivities in the Hipp less than CBD alone.

This study evaluated the antidepressant-like effects of chronic CBD administration compared with STR and the combination of both drugs in mice previously exposed to the UCMS experimental paradigm (35, 53). The selective reuptake inhibitor STR was selected based on the fact that it is the first-line treatment of major depressive disorder (54) and one of the most common antidepressant drugs for treating other psychiatric diseases such as obsessive-compulsive disorder (55), panic disorder (56), posttraumatic stress disorder (57) and social anxiety disorder.

Current antidepressant treatments, such as STR, require several weeks to reduce depressive symptomatology in patients and rats exposed to the UCMS, as previously reported (40, 58, 59). The LBD and TS tests revealed that CBD normalized the anxiogenic- and depressogenic-like effects induced by UCMS after 4 and 7 days of treatment, respectively. In contrast, the administration of STR required 14 days to produce a significant antidepressant action. This is the first evidence of the faster antidepressant-like effect of CBD compared to a reference antidepressant as STR.

In addition, CBD restored the cognitive impairments induced by UCMS, whereas STR tended to improve the cognitive impairment without reaching statistical significance. This finding contradicts previous results showing that STR reversed cognitive impairments caused by the UCMS in rats in the Water Morris and step-down inhibitory avoidance (SDIA) tests (60). These discrepancies may be due to differences in the strain used (CD1 mice vs. Sprague-Dawley rats), the duration of the UCMS (4 or 6 weeks) before the beginning of the pharmacological treatment, the STR doses (10 mg/kg vs. 5 mg/kg), and/or the behavioral test used (NOR vs. Water Morris and SDIA).

The results found in this study provide new relevant information suggesting that chronic CBD administration reversed all the behavioral alterations (increased anxiety, behavioral despair, cognitive impairment and anhedonia) induced by UCMS earlier than STR. Thus, these results lay the groundwork for future studies to explore the antidepressant profile of CBD, which could provide a better clinical benefit by inducing the effects faster and more effectively than other antidepressants.

The mechanisms of action of CBD were explored by measuring changes in the gene and protein expression of key targets closely related to depression. In this respect, monoaminergic neurotransmitters, especially serotonin (5-HT), have been widely involved in the pathophysiology of depressive disorders (61). Recent studies have suggested that dopamine receptors D2 and D3 are involved in the mechanism of action of CBD (62, 63). Despite inconclusive results, numerous studies identified reduced activity of serotonin pathways, disruption of the 5-HTT and serotonin imbalance in depressive patients (64, 65). In rodents exposed to the UCMS, 5-HT concentrations (66-68), 5-HTT density and gene expression were reduced in several brain regions (69-72). In this study, 5-HTT (Slc6a4) gene expression was significantly reduced in the DR of mice exposed to the UCMS compared with non-UCMS. Several reports related the increase of 5-HTT produced by antidepressants with the reduction of depressive-like behaviors and anhedonia (73, 74). Interestingly, CBD and STR increased Slc6a4 gene expression, although the effect was more pronounced with CBD. This may explain, at least in part, why CBD displays higher efficacy than STR in controlling the behavioral alterations induced by the UCMS.

Fourteen serotonin receptor subtypes have been identified. Among them, the 5-HT_{1A} receptor plays a crucial role in controlling the concentrations of 5-HT. This receptor is widely distributed in the brain, with postsynaptic receptors in the cortex, Hipp and AMY, and somatodendritic autoreceptors in the raphe nucleus (75). Several studies support the involvement of the 5-HT_{1A} receptor in the regulation of anxiety and depression, and neuroplasticity (76-80). Alterations of 5-HT_{1A} gene expression and binding were found in the brain of rodents exposed to chronic stress (81-85). PET studies showed alterations of 5-HT_{1A} binding in cortical and raphe regions of depressive patients (86, 87). In our study, UCMS increased 5-HT_{1A} receptor gene expression in the Hipp and decreased in the AMY. These results are consistent with previous reports suggesting that stressful stimuli induced opposite changes in 5-HT_{1A} gene expression depending on the brain region analyzed (28, 85). CBD reversed both alterations, while STR only increased 5-HT_{1A} in AMY. Based on previous studies, it is possible to suggest that CBD behaves as an agonist of the 5-HT_{1A} receptor, which is responsible for its antidepressant properties (88-93). Mood stabilizers and antidepressants significantly modify 5-HT_{1A} functional activity in several brain regions (75, 94). In general, the antidepressant effects of SSRIs are potentially mediated by 5-HT_{1A} receptors. In the raphe nuclei, the increase of serotonin concentrations induced by the inhibition of 5-HTT stimulates the presynaptic somatodendritic 5-HT_{1A} receptors. This action results in an inhibition of serotonin release, which consequently delays the onset of antidepressant action. However, in chronic treatment, desensitization of the presynaptic 5-

HT1A receptors occurs, increasing 5-HT concentrations in the synapse with the subsequent activation of postsynaptic 5-HT1A receptors and the appearance of antidepressant actions (95, 96). Thus, the agonism of the 5-HT1A receptor, in combination with the 5-HTT inhibition, has been proposed to contribute to a faster antidepressant action (97-99). Recently, it has been observed that repeated CBD treatment increased 5-HT firing activity by desensitizing 5-HT1A autoreceptors (100, 101), and this mechanism was associated with relieving pain-induced anxiety-like behavior in a rat model of neuropathic pain (100). Thus, it is possible to hypothesize that the most efficient actions of CBD compared with STR on 5-HTT gene expression in the DR and the normalization of 5-HT1A gene expression alterations in Hipp and AMY produced by UCMS may be due to the activation of the 5-HT1A receptor. Future studies, for example, by blocking the 5-HT1A receptor in mice exposed to the UCMS and treated with CBD, are required to determine the significance of this serotonin receptor in the antidepressant effects of CBD.

An additional serotonin receptor affected by stress and involved in multiple psychiatric disorders is the 5-HT2A. Activation of this receptor in the AMY has been closely related to generalized anxiety disorder (GAD) (102, 103), borderline personality disorders (104) and PTSD (105). Besides, cortical 5-HT2A increase was reported in suicide victims (106, 107) and several brain areas of rodents exposed to UCMS (108, 109). In line with these findings, UCMS significantly increased 5-HT2A in the Hipp and AMY. Chronic CBD administration reduced these alterations, while STR decreased 5-HT2A gene expression only in the Hipp. Previous reports indicated that the increased expression of 5-HT2A is associated with unmitigated stress, increasing the intensity and consequences of stress rather than the relief of stress consequences (110). Thus, it is tempting to speculate that reducing 5-HT2A induced by CBD may contribute to a more significant efficacy in reversing the behavioral disturbances induced by UCMS compared to STR. However, there is no information on how CBD interacts with the 5-HT2A receptor. The fact that it reduces the expression of 5-HT2A would indicate that it acts more as an antagonist of this receptor. This should be further explored due to the emerging interest in 5-HT2A antagonists for treating anxiety and depression, such as the LSD-like psychedelic drugs that acting as 5-HT2A antagonists display rapid antidepressant effects related to their neuroplastic actions (111-113).

Impairment in brain neuroplasticity is one of the main etiopathogenic mechanisms underlying depressive disorders. It is known that the antidepressants' efficacy lies in their ability to increase neuroplasticity. BDNF is a crucial regulator of synaptic plasticity, neurite outgrowth and neuronal connections in the brain (114-116) and mediates the plastic changes induced by antidepressants (117-119). In animal stress models, BDNF is downregulated in the Hipp (117, 120-123). The involvement of hippocampal BDNF in antidepressant efficacy has been demonstrated in different previous studies (118, 123-126). In this study, BDNF gene and protein expressions were significantly reduced in the Hipp of mice exposed to the UCMS.

Interestingly, CBD treatment increased BDNF gene expression in the Hipp, in contrast to STR. Moreover, immunohistological studies revealed that the treatment with CBD increased

BDNF immunoreactivity in different fields of the Hipp more significantly than STR. Our results are in agreement with previous reports showing that CBD increased BDNF gene expression and synaptophysin in the PFC and Hipp of ICR mice exposed to the UCMS (37). Besides, acute administration of CBD showed antidepressant effects associated with increased synaptophysin and PSD95 in the mPFC and BDNF protein expression in mPFC and Hipp (127). In additional animal models of brain ischemia, CBD increased hippocampal BDNF protein levels, stimulated neurogenesis and promoted dendritic restructuring (128). Similarly, in an animal model of mania induced by D-amphetamine, CBD increased BDNF expression in the Hipp (129). Furthermore, CBD treatment increased NeuN-ir and decreased caspase-3-ir more significantly than STR. Therefore, CBD was more effective in reversing the UCMS-induced increase in apoptosis and neuronal loss than STR.

The analyses of PPARdelta gene expression in the DG of the Hipp provided different results about the significant enhancement of neuroplasticity by CBD. PPARdelta belongs to the PPAR nuclear receptor family with a widespread brain distribution (130, 131). Recently, this receptor that regulates 5-HTT in the Hipp (132) is essential in reducing depressive-like behaviors (133) induced by stress. Moreover, the activation of PPARdelta induces neuroprotection and reverses neurodegeneration in Alzheimer's disease (134), Parkinson's disease (135) and Huntington's disease (136). Notably, the treatment with CBD was the only one that reversed the reduction of PPARdelta gene expression in the Hipp induced by the UCMS.

Potential changes in the vesicular glutamate transporter 1, mVGlut1, were also analyzed. This glutamate transporter is located in the presynaptic glutamate-releasing neurons, transporting glutamate into presynaptic vesicles and promoting synaptic glutamate release (137). The control of glutamate levels is essential to protect the brain from excess synaptic glutamate and excitotoxicity, which can lead to cell death (138). Unbalance between inhibitory and excitatory neurotransmission has been proposed to be involved in different psychiatric conditions, including depressive disorders (139, 140). Recently, the modulation of glutamate neurotransmission has been related to the antidepressant effects of ketamine and its effects on neuroplasticity (141, 142). In this study, UCMS reduced mVGlut1 gene expression, which may be related to changes in glutamate concentrations in the synaptic cleft, whereas CBD and STR increased the expression of this gene in the Hipp. It is remarkable to mention that CBD was the only drug that reversed all the molecular alterations induced by the UCMS.

Another aspect analyzed in the present study was if the combination of CBD and STR may show additive or synergistic potential. Combining different drugs is a standard procedure for treating depressive disorders to achieve a more significant effect than individual drug therapies. This strategy also prevents specific dose-related side effects. Unexpectedly, the combination of CBD plus STR resulted in less effective than CBD modulating behavioral and molecular disturbances induced by UCMS, and similar, in some respects, to STR. These results raise the question about the nature of the interaction between STR and CBD, which makes their combination less valuable than CBD alone. One possible explanation is a

potential pharmacokinetic interaction between CBD and STR since both drugs are hepatically metabolized by the cytochrome P450 (CYP450) enzymes (143-145). Recently, *in vivo* and *in vitro* studies pointed out that CBD significantly inhibits CYP2C19, decreasing the metabolism of STR and additional SSRIs (146, 147). This would increase plasma STR concentration and serotonin concentrations, reducing tolerability secondary to activation. Thus, the combined use of CBD plus STR appears to increase the risk of concentration-related SSRI side effects (148, 149). A recent case report showed a pharmacokinetic interaction between CBD and STR in a patient treated with STR for depression and anxiety. CBD inhibited CYP2C19 increasing STR exposure, producing hyponatremia and subsequent cognitive dysfunction (150). This fact may be critical since the behaviors related to an excess of serotonin are similar to symptoms of anxiety and depressive disorders (151). Moreover, CBD and STR bind to plasma proteins (152, 153). Thus, it would be interesting to explore a potential interaction that may cause STR or CBD concentrations to change and explains, at least in part, why the combination of both drugs has less efficacy than the administration of CBD alone.

On the other hand, time course and differences in the molecular neuroadaptations induced by the combination in comparison to CBD alone suggest some interaction between CBD and STR at the pharmacodynamic level. At the beginning of the treatment (1-14 days), CBD plus STR showed the same efficacy as CBD alone and less with STR. Notably, the time point (14 days) at which the effectiveness of the combination starts to be less effective than CBD is the same as when STR presents efficacy by itself. As treatment becomes chronic, the combination results in significantly less effectiveness than CBD, as shown by the results at 18 and 26 days for NOR and SC tests. Similarly, molecular neuroadaptation analyses showed that 5-HT_{1A}, BDNF and PPAR δ are the main critical targets in which CBD differs from the combination and STR. CBD restored changes in 5-HT_{1A} receptor gene expression in the Hipp, whereas neither the combination nor STR modified this target. CBD and STR separately changed the effects of UCMS on 5-HT_{1A} receptor gene expression in the Amy, but not the combination. Notably, BDNF and PPAR δ gene expressions increased with CBD but not with STR or the combination. Altogether, these results suggest that the lack of effect modulating 5-HT_{1A}, BDNF and PPAR δ in the Hipp is similar between STR and the combination. Despite further studies being necessary to determine the mechanisms underlying these observations, it is tempting to hypothesize that CBD and STR interact negatively in the modulation of the serotonergic system and neuroplasticity, reducing the efficacy of CBD when both drugs are administered together.

Taken together, the results of this study revealed that CBD induced an antidepressant-like effect in the UCMS accompanied by molecular neuroadaptations in crucial targets of the serotonin system and neuroplasticity, expanding the knowledge about its mechanism of action. CBD presents advantages over the antidepressant STR, notably significant speed and efficiency, to modulate behavioral despair, cognitive impairment and anhedonia, and all the molecular disturbances analyzed. More importantly, special attention should be given to the

combination of CBD with current antidepressants since it appears to produce a negative impact on treatment.

In summary, this study lays the groundwork for future clinical studies to determine CBD's efficacy and therapeutic positioning in treating depressive and anxiety disorders in humans.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

Conceptualization, M.S.G.G. and J.M.; methodology, M.S.G.G. and J.M.; validation, M.S.G.G.; formal analysis, M.S.G.G.; investigation, M.S.G.G., D.N. and A.A.O.; data curation, M.S.G.G.; writing—original draft preparation, M.S.G.G. and D.N.; writing—review and editing, J.M.; visualization, M.S.G.G.; supervision, M.S.G.G.; project administration, M.S.G.G. and J.M.; funding acquisition, M.S.G.G. and J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, SPANISH MINISTRY OF SCIENCE AND INNOVATION, grant number PI18/00576 to M.S.G.G. and J.M. and RED DE INVESTIGACIÓN EN ATENCIÓN PRIMARIA DE ADICCIONES, INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, SPANISH MINISTRY OF SCIENCE AND INNOVATION, grant number RD21/0009/0008 to J.M.

Acknowledgments

The authors would like to thank the PFIS fellowship “Contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud” (PFIS) (ISCIII, Spanish Ministry of Science and Innovation) granted to AAO (FI19/00170).

Data Availability Statement

Datasets are available on request

References

1. WHO. Depression Fact Sheet 2021 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>].
2. Friedrich MJ. Depression Is the Leading Cause of Disability Around the World. *JAMA*. 2017;317(15):1517.
3. Jia H, Zack MM, Thompson WW, Crosby AE, Gottesman, II. Impact of depression on quality-adjusted life expectancy (QALE) directly as well as indirectly through suicide. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 2015;50(6):939-49.
4. Chen C. Recent advances in the study of the comorbidity of depressive and anxiety disorders. *Adv Clin Exp Med*. 2022;31(4):355-8.
5. Bassett D, Boyce P, Lyndon B, Mulder R, Parker G, Porter R, et al. Guidelines for the management of psychosis in the context of mood disorders. *Schizophr Res*. 2022;241:187-96.
6. Serra-Blasco M, Radua J, Soriano-Mas C, Gomez-Benlloch A, Porta-Casteras D, Carulla-Roig M, et al. Structural brain correlates in major depression, anxiety disorders and post-traumatic stress disorder: A voxel-based morphometry meta-analysis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2021;129:269-81.
7. Ploski JE, Vaidya VA. The Neurocircuitry of Posttraumatic Stress Disorder and Major Depression: Insights Into Overlapping and Distinct Circuit Dysfunction-A Tribute to Ron Duman. *Biol Psychiatry*. 2021;90(2):109-17.
8. Hawton K, Casanas ICC, Haw C, Saunders K. Risk factors for suicide in individuals with depression: a systematic review. *J Affect Disord*. 2013;147(1-3):17-28.
9. Fava M, Rush AJ, Trivedi MH, Nierenberg AA, Thase ME, Sackeim HA, et al. Background and rationale for the sequenced treatment alternatives to relieve depression (STAR*D) study. *The Psychiatric clinics of North America*. 2003;26(2):457-94, x.
10. Rush AJ, Fava M, Wisniewski SR, Lavori PW, Trivedi MH, Sackeim HA, et al. Sequenced treatment alternatives to relieve depression (STAR*D): rationale and design. *Control Clin Trials*. 2004;25(1):119-42.
11. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *The American journal of psychiatry*. 2006;163(11):1905-17.
12. Garcia-Gutierrez MS, Navarrete F, Gasparyan A, Austrich-Olivares A, Sala F, Manzanares J. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules*. 2020;10(11).
13. Kwee CM, van Gerven JM, Bongaerts FL, Cath DC, Jacobs G, Baas JM, et al. Cannabidiol in clinical and preclinical anxiety research. A systematic review into concentration-effect relations using the IB-de-risk tool. *J Psychopharmacol*. 2022;2698811221124792.
14. Atalay Ekiner S, Gegotek A, Skrzydlewska E. The molecular activity of cannabidiol in the regulation of Nrf2 system interacting with NF-kappaB pathway under oxidative stress. *Redox biology*. 2022;57:102489.

15. Yousaf M, Chang D, Liu Y, Liu T, Zhou X. Neuroprotection of Cannabidiol, Its Synthetic Derivatives and Combination Preparations against Microglia-Mediated Neuroinflammation in Neurological Disorders. *Molecules*. 2022;27(15).

16. V Micale KT, J Kucerová, F Drago. Role of the endocannabinoid system in depression: From preclinical to clinical evidence. In: Fattore PCaL, editor. *Cannabinoid modulation of emotion, memory and motivation*. New York Springer New York; 2015. p. 97-129.

17. Stark T, Di Martino S, Drago F, Wotjak CT, Micale V. Phytocannabinoids and schizophrenia: Focus on adolescence as a critical window of enhanced vulnerability and opportunity for treatment. *Pharmacol Res*. 2021;174:105938.

18. Di Bartolomeo M, Stark T, Maurel OM, Iannotti FA, Kuchar M, Ruda-Kucerova J, et al. Crosstalk between the transcriptional regulation of dopamine D2 and cannabinoid CB1 receptors in schizophrenia: Analyses in patients and in perinatal Delta9-tetrahydrocannabinol-exposed rats. *Pharmacol Res*. 2021;164:105357.

19. Stark T, Ruda-Kucerova J, Iannotti FA, D'Addario C, Di Marco R, Pekarik V, et al. Peripubertal cannabidiol treatment rescues behavioral and neurochemical abnormalities in the MAM model of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2019;146:212-21.

20. Viudez-Martinez A, Garcia-Gutierrez MS, Medrano-Relinque J, Navarron CM, Navarrete F, Manzanares J. Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior. *Acta pharmacologica Sinica*. 2019;40(3):358-64.

21. Parker LA, Burton P, Sorge RE, Yakiwchuk C, Mechoulam R. Effect of low doses of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;175(3):360-6.

22. Vann RE, Gamage TF, Warner JA, Marshall EM, Taylor NL, Martin BR, et al. Divergent effects of cannabidiol on the discriminative stimulus and place conditioning effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Drug Alcohol Depend*. 2008;94(1-3):191-8.

23. Fusar-Poli P, Crippa JA, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Allen P, Martin-Santos R, et al. Distinct effects of {delta}9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. *Archives of general psychiatry*. 2009;66(1):95-105.

24. Winton-Brown TT, Allen P, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Fusar-Poli P, Crippa JA, et al. Modulation of auditory and visual processing by delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(7):1340-8.

25. Martin-Santos R, Crippa JA, Batalla A, Bhattacharyya S, Atakan Z, Borgwardt S, et al. Acute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(32):4966-79.

26. Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*. 1990;100(4):558-9.

27. Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimaraes FS. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res*. 2006;172(2):294-8.

28. Viudez-Martinez A, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J. Cannabidiol regulates the expression of hypothalamus-pituitary-adrenal axis-related genes in response to acute restraint stress. *J Psychopharmacol*. 2018;32(12):1379-84.

29. Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2006;30(8):1466-71.

30. Casarotto PC, Gomes FV, Resstel LB, Guimaraes FS. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. *Behav Pharmacol*. 2010;21(4):353-8.

31. Reus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Luft T, Abelaira HM, Fries GR, et al. Administration of cannabidiol and imipramine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test

and increases brain-derived neurotrophic factor levels in the rat amygdala. *Acta Neuropsychiatr.* 2011;23(5):241-8.

32. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 2008;455(7215):894-902.

33. Nollet M. Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice. *Curr Protoc.* 2021;1(8):e208.

34. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of stress.* 2017;6:78-93.

35. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* 1997;134(4):319-29.

36. Gall Z, Farkas S, Albert A, Ferencz E, Vancea S, Urkon M, et al. Effects of Chronic Cannabidiol Treatment in the Rat Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression. *Biomolecules.* 2020;10(5).

37. Xu C, Chang T, Du Y, Yu C, Tan X, Li X. Pharmacokinetics of oral and intravenous cannabidiol and its antidepressant-like effects in chronic mild stress mouse model. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019;70:103202.

38. Ma H, Li C, Wang J, Zhang X, Li M, Zhang R, et al. Amygdala-hippocampal innervation modulates stress-induced depressive-like behaviors through AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(6).

39. Zhang F, Zhu X, Yu P, Sheng T, Wang Y, Ye Y. Crocin ameliorates depressive-like behaviors induced by chronic restraint stress via the NAMPT-NAD(+)-SIRT1 pathway in mice. *Neurochem Int.* 2022;157:105343.

40. Lu Y, Xu X, Jiang T, Jin L, Zhao XD, Cheng JH, et al. Sertraline ameliorates inflammation in CUMS mice and inhibits TNF-alpha-induced inflammation in microglia cells. *International immunopharmacology.* 2019;67:119-28.

41. Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 1992;16(4):525-34.

42. Garcia-Gutierrez MS, Perez-Ortiz JM, Gutierrez-Adan A, Manzanares J. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *British journal of pharmacology.* 2010;160(7):1773-84.

43. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980;13(2):167-70.

44. Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J Psychopharmacol.* 2011;25(1):111-20.

45. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl).* 1987;92(2):180-5.

46. Vaugeois JM, Passera G, Zuccaro F, Costentin J. Individual differences in response to imipramine in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl).* 1997;134(4):387-91.

47. Brambilla-Pisoni C, Munoz-Moreno E, Gallego-Amaro I, Maldonado R, Ivorra A, Soria G, et al. Auricular Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation Acutely Modulates Brain Connectivity in Mice. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2022;16:856855.

48. Busquets-Garcia A, Gomis-Gonzalez M, Salgado-Mendialdua V, Galera-Lopez L, Puighermanal E, Martin-Garcia E, et al. Hippocampal Protein Kinase C Signaling Mediates the Short-Term Memory Impairment Induced by Delta9-Tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology.* 2018;43(5):1021-31.

49. Li S, Wang C, Wang M, Li W, Matsumoto K, Tang Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. *Life Sci.* 2007;80(15):1373-81.

50. Paxinos G, Franklin, K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press. Harcourt Science and Technology Company; 2001.

51. Palkovits M. Punch sampling biopsy technique. *Methods Enzymol.* 1983;103:368-76.
52. Amaral DG, Witter, M.P. . Hippocampal formation. In: Press A, editor. *The Rat Nervous System*. 2nd ed. London 1995. p. 443-93.
53. Papp M, Moryl E, Willner P. Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol.* 1996;296(2):129-36.
54. Cipriani A, La Ferla T, Furukawa TA, Signoretti A, Nakagawa A, Churchill R, et al. Sertraline versus other antidepressive agents for depression. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2010(4):CD006117.
55. Fenske JN, Schwenk TL. Obsessive compulsive disorder: diagnosis and management. *Am Fam Physician.* 2009;80(3):239-45.
56. Hobgood CD, Clayton AH. Sertraline in the treatment of panic disorder. *Drugs Today (Barc).* 2009;45(5):351-61.
57. Buhmann CB, Andersen HS. [Diagnosing and treating post-traumatic stress disorder]. *Ugeskr Laeger.* 2017;179(24).
58. Machado-Vieira R, Baumann J, Wheeler-Castillo C, Latov D, Henter ID, Salvatore G, et al. The Timing of Antidepressant Effects: A Comparison of Diverse Pharmacological and Somatic Treatments. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010;3(1):19-41.
59. Ramanathan M, Kumar SN, Suresh B. Evaluation of cognitive function of fluoxetine, sertraline and tianeptine in isolation and chronic unpredictable mild stress-induced depressive Wistar rats. *Indian J Exp Biol.* 2003;41(11):1269-72.
60. Luo Y, Kuang S, Xue L, Yang J. The mechanism of 5-lipoxygenase in the impairment of learning and memory in rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Physiol Behav.* 2016;167:145-53.
61. Cowen PJ, Browning M. What has serotonin to do with depression? *World Psychiatry.* 2015;14(2):158-60.
62. Seeman P. Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Translational psychiatry.* 2016;6(10):e920.
63. Stark T, Di Bartolomeo M, Di Marco R, Drazanova E, Platania CBM, Iannotti FA, et al. Altered dopamine D3 receptor gene expression in MAM model of schizophrenia is reversed by peripubertal cannabidiol treatment. *Biochemical pharmacology.* 2020;177:114004.
64. Newberg AB, Amsterdam JD, Wintering N, Ploessl K, Swanson RL, Shults J, et al. 123I-ADAM binding to serotonin transporters in patients with major depression and healthy controls: a preliminary study. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 2005;46(6):973-7.
65. Savitz JB, Drevets WC. Neuroreceptor imaging in depression. *Neurobiology of disease.* 2013;52:49-65.
66. Bekris S, Antoniou K, Daskas S, Papadopoulou-Daifoti Z. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behav Brain Res.* 2005;161(1):45-59.
67. Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int.* 2003;42(2):107-14.
68. Chengfeng S, Wei L, Xinxing W, Lei W, Rui Z, Lingjia Q. Hyperhomocysteinemia is a result, rather than a cause, of depression under chronic stress. *PLoS One.* 2014;9(10):e106625.
69. Grecksch G, Zhou D, Franke C, Schroder U, Sabel B, Becker A, et al. Influence of olfactory bulbectomy and subsequent imipramine treatment on 5-hydroxytryptaminergic presynapses in the rat frontal cortex: behavioural correlates. *British journal of pharmacology.* 1997;122(8):1725-31.
70. Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, et al. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res.* 2007;58(1):32-9.

71. Jahng JW, Kim JG, Kim HJ, Kim BT, Kang DW, Lee JH. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain research*. 2007;1150:100-7.
72. Liang BF, Huang F, Wang HT, Wang GH, Yuan X, Zhang MZ, et al. Involvement of norepinephrine and serotonin system in antidepressant-like effects of hederagenin in the rat model of unpredictable chronic mild stress-induced depression. *Pharm Biol*. 2015;53(3):368-77.
73. Tang M, Lei J, Sun X, Liu G, Zhao S. Stress-induced anhedonia correlates with lower hippocampal serotonin transporter protein expression. *Brain research*. 2013;1513:127-34.
74. Qiu HM, Yang JX, Jiang XH, Fei HZ, Liu D, Hu XY, et al. Upregulating serotonin transporter expression and downregulating monoamine oxidase-A and indoleamine 2, 3-dioxygenase expression involved in the antidepressant effect of sodium valproate in a rat model. *Neuroreport*. 2014;25(17):1338-43.
75. Hjorth S, Bengtsson HJ, Kullberg A, Carlzon D, Peilot H, Auerbach SB. Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. *J Psychopharmacol*. 2000;14(2):177-85.
76. Albert PR, Le Francois B, Vahid-Ansari F. Genetic, epigenetic and posttranscriptional mechanisms for treatment of major depression: the 5-HT1A receptor gene as a paradigm. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*. 2019;44(3):164-76.
77. Garcia-Garcia AL, Newman-Tancredi A, Leonardo ED. 5-HT(1A) [corrected] receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231(4):623-36.
78. Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, et al. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*. 2002;416(6879):396-400.
79. Savitz J, Lucki I, Drevets WC. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Progress in neurobiology*. 2009;88(1):17-31.
80. Zhang J, Huang XY, Ye ML, Luo CX, Wu HY, Hu Y, et al. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci*. 2010;30(7):2433-41.
81. Hale LH, Tickerhoof MC, Smith AS. Chronic intranasal oxytocin reverses stress-induced social avoidance in female prairie voles. *Neuropharmacology*. 2021;198:108770.
82. Carneiro-Nascimento S, Powell W, Uebel M, Buerge M, Sigrist H, Patterson M, et al. Region- and receptor-specific effects of chronic social stress on the central serotonergic system in mice. *IBRO Neurosci Rep*. 2021;10:8-16.
83. Puglisi-Allegra S, Andolina D. Serotonin and stress coping. *Behav Brain Res*. 2015;277:58-67.
84. Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014;8:199.
85. Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF. Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2014;7:24.
86. Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, Kupfer DJ, et al. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nuclear medicine and biology*. 2007;34(7):865-77.
87. Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Butters MA, Ziolkowski SK, Moses-Kolko E, et al. Serotonin 1A receptor binding and treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(12):2258-65.
88. Gomes FV, Alves FH, Guimaraes FS, Correa FM, Resstel LB, Crestani CC. Cannabidiol administration into the bed nucleus of the stria terminalis alters cardiovascular responses induced by acute restraint stress through 5-HT(1)A receptor. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2013;23(9):1096-104.

89. Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1A} receptors. *Neurochemical research*. 2005;30(8):1037-43.
90. Sartim AG, Guimaraes FS, Joca SR. Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex-Possible involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. *Behav Brain Res*. 2016;303:218-27.
91. Linge R, Jimenez-Sanchez L, Campa L, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Pazos A, et al. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology*. 2016;103:16-26.
92. Marinho AL, Vila-Verde C, Fogaca MV, Guimaraes FS. Effects of intra-infralimbic prefrontal cortex injections of cannabidiol in the modulation of emotional behaviors in rats: contribution of 5HT(1)A receptors and stressful experiences. *Behav Brain Res*. 2015;286:49-56.
93. Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *British journal of pharmacology*. 2010;159(1):122-8.
94. Nugent AC, Carlson PJ, Bain EE, Eckelman W, Herscovitch P, Manji H, et al. Mood stabilizer treatment increases serotonin type 1A receptor binding in bipolar depression. *J Psychopharmacol*. 2013;27(10):894-902.
95. Dong J, De Montigny C, Blier P. Assessment of the serotonin reuptake blocking property of YM992: electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe. *Synapse (New York, NY)*. 1999;34(4):277-89.
96. El Mansari M, Sanchez C, Chouvet G, Renaud B, Haddjeri N. Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: an in vivo electrophysiological study in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(7):1269-77.
97. Hughes ZA, Starr KR, Langmead CJ, Hill M, Bartoszyk GD, Hagan JJ, et al. Neurochemical evaluation of the novel 5-HT_{1A} receptor partial agonist/serotonin reuptake inhibitor, vilazodone. *Eur J Pharmacol*. 2005;510(1-2):49-57.
98. Albert U, Lamba P, Stahl SM. Early response to trazodone once-a-day in major depressive disorder: review of the clinical data and putative mechanism for faster onset of action. *CNS Spectr*. 2021;26(3):232-42.
99. Montalbano A, Mlinar B, Bonfiglio F, Polenzani L, Magnani M, Corradetti R. Dual inhibitory action of trazodone on dorsal raphe serotonergic neurons through 5-HT_{1A} receptor partial agonism and alpha₁-adrenoceptor antagonism. *PLoS One*. 2019;14(9):e0222855.
100. De Gregorio D, McLaughlin RJ, Posa L, Ochoa-Sanchez R, Enns J, Lopez-Canul M, et al. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*. 2019;160(1):136-50.
101. Blier P, De Montigny C. Electrophysiological investigations on the effect of repeated zimelidine administration on serotonergic neurotransmission in the rat. *J Neurosci*. 1983;3(6):1270-8.
102. Baeken C, Xu Y, Wu GR, Dockx R, Peremans K, De Raedt R. Hostility in medication-resistant major depression and comorbid generalized anxiety disorder is related to increased hippocampal-amygdala 5-HT_{2A} receptor density. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 2021;271(7):1369-78.
103. Nikolaus S, Antke C, Beu M, Muller HW. Cortical GABA, striatal dopamine and midbrain serotonin as the key players in compulsive and anxiety disorders--results from in vivo imaging studies. *Rev Neurosci*. 2010;21(2):119-39.
104. Soloff PH, Price JC, Meltzer CC, Fabio A, Frank GK, Kaye WH. 5HT_{2A} receptor binding is increased in borderline personality disorder. *Biol Psychiatry*. 2007;62(6):580-7.
105. Murnane KS. Serotonin 2A receptors are a stress response system: implications for post-traumatic stress disorder. *Behav Pharmacol*. 2019;30(2 and 3-Spec Issue):151-62.

106. Odagaki Y, Kinoshita M, Meana JJ, Callado LF, Garcia-Sevilla JA. 5-HT(2A) receptor-mediated Galpha(q/11) activation in psychiatric disorders: A postmortem study. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*. 2021;22(7):505-15.
107. Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Galfalvy H, Dwork AJ, Mann JJ, et al. Serotonin receptors and suicide, major depression, alcohol use disorder and reported early life adversity. *Translational psychiatry*. 2018;8(1):279.
108. McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol Psychiatry*. 1995;37(6):383-93.
109. Ossowska G, Nowa G, Kata R, Klenk-Majewska B, Danilczuk Z, Zebrowska-Lupina I. Brain monoamine receptors in a chronic unpredictable stress model in rats. *J Neural Transm (Vienna)*. 2001;108(3):311-9.
110. Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Pandey SC, Pesold C, et al. Higher expression of serotonin 5-HT(2A) receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims. *The American journal of psychiatry*. 2002;159(3):419-29.
111. Carhart-Harris R, Giribaldi B, Watts R, Baker-Jones M, Murphy-Beiner A, Murphy R, et al. Trial of Psilocybin versus Escitalopram for Depression. *N Engl J Med*. 2021;384(15):1402-11.
112. Tariq R. Using Psychedelics in clinical practice: Comparing therapeutic use and potential harms. *Curr Rev Clin Exp Pharmacol*. 2022.
113. Corne R, Mongeau R. [Neurotrophic mechanisms of psychedelic therapy]. *Biol Aujourdhui*. 2019;213(3-4):121-9.
114. Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature reviews*. 2013;14(1):7-23.
115. McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*. 1999;22:295-318.
116. Mamounas LA, Altar CA, Blue ME, Kaplan DR, Tessarollo L, Lyons WE. BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. *J Neurosci*. 2000;20(2):771-82.
117. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 1995;15(11):7539-47.
118. Bjorkholm C, Monteggia LM. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*. 2016;102:72-9.
119. Castren E, Antila H. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Molecular psychiatry*. 2017;22(8):1085-95.
120. 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(7):2365-72.
121. Zhu JX, Shan JL, Hu WQ, Zeng JX, Shu JC. Gallic acid activates hippocampal BDNF-Akt-mTOR signaling in chronic mild stress. *Metab Brain Dis*. 2019;34(1):93-101.
122. Gong Y, Yang Y, Chen X, Yang M, Huang D, Yang R, et al. Hyperoside protects against chronic mild stress-induced learning and memory deficits. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;91:831-40.
123. First M, Gil-Ad I, Taler M, Tarasenko I, Novak N, Weizman A. The effects of reboxetine treatment on depression-like behavior, brain neurotrophins, and ERK expression in rats exposed to chronic mild stress. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2013;50(1):88-97.
124. Adachi M, Barrot M, Autry AE, Theobald D, Monteggia LM. Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy. *Biol Psychiatry*. 2008;63(7):642-9.

125. Castren E, Rantamaki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Developmental neurobiology*. 2010;70(5):289-97.
126. Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*. 2002;22(8):3251-61.
127. Sales AJ, Fogaca MV, Sartim AG, Pereira VS, Wegener G, Guimaraes FS, et al. Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Molecular neurobiology*. 2019;56(2):1070-81.
128. Mori MA, Meyer E, Soares LM, Milani H, Guimaraes FS, de Oliveira RMW. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2017;75:94-105.
129. Valvassori SS, Elias G, de Souza B, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, et al. Effects of cannabidiol on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychopharmacol*. 2011;25(2):274-80.
130. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2(4):236-40.
131. Girroir EE, Hollingshead HE, He P, Zhu B, Perdew GH, Peters JM. Quantitative expression patterns of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) protein in mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;371(3):456-61.
132. Liu KF, Li Y, Cheng KC, Hsu CC, Cheng JT, Peng WH. Changes in PPARdelta expression in a rat model of stress-induced depression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017;44(6):664-70.
133. Ji MJ, Yu XB, Mei ZL, An YQ, Tang SS, Hu M, et al. Hippocampal PPARdelta Overexpression or Activation Represses Stress-Induced Depressive Behaviors and Enhances Neurogenesis. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*. 2015;19(1).
134. Tong M, Dominguez C, Didsbury J, de la Monte SM. Targeting Alzheimer's Disease Neuro-Metabolic Dysfunction with a Small Molecule Nuclear Receptor Agonist (T3D-959) Reverses Disease Pathologies. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2016;6(3).
135. Martin HL, Mounsey RB, Sathe K, Mustafa S, Nelson MC, Evans RM, et al. A peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist provides neuroprotection in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2013;240:191-203.
136. Dickey AS, Pineda VV, Tsunemi T, Liu PP, Miranda HC, Gilmore-Hall SK, et al. PPAR-delta is repressed in Huntington's disease, is required for normal neuronal function and can be targeted therapeutically. *Nature medicine*. 2016;22(1):37-45.
137. Trudeau LE, El Mestikawy S. Glutamate Cotransmission in Cholinergic, GABAergic and Monoamine Systems: Contrasts and Commonalities. *Front Neural Circuits*. 2018;12:113.
138. Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004;45(3):250-65.
139. Duman RS, Sanacora G, Krystal JH. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron*. 2019;102(1):75-90.
140. Selten M, van Bokhoven H, Nadif Kasri N. Inhibitory control of the excitatory/inhibitory balance in psychiatric disorders. *F1000Res*. 2018;7:23.

141. Aleksandrova LR, Phillips AG, Wang YT. Antidepressant effects of ketamine and the roles of AMPA glutamate receptors and other mechanisms beyond NMDA receptor antagonism. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*. 2017;42(4):222-9.
142. Silberbauer LR, Spurny B, Handschuh P, Klobl M, Bednarik P, Reiter B, et al. Effect of Ketamine on Limbic GABA and Glutamate: A Human In Vivo Multivoxel Magnetic Resonance Spectroscopy Study. *Frontiers in psychiatry*. 2020;11:549903.
143. Watanabe K, Yamaori S, Funahashi T, Kimura T, Yamamoto I. Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabidiol by human hepatic microsomes. *Life Sci*. 2007;80(15):1415-9.
144. Jiang R, Yamaori S, Takeda S, Yamamoto I, Watanabe K. Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. *Life Sci*. 2011;89(5-6):165-70.
145. Wang JH, Liu ZQ, Wang W, Chen XP, Shu Y, He N, et al. Pharmacokinetics of sertraline in relation to genetic polymorphism of CYP2C19. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;70(1):42-7.
146. Anderson LL, Doohan PT, Oldfield L, Kevin RC, Arnold JC, Berger M, et al. Citalopram and Cannabidiol: In Vitro and In Vivo Evidence of Pharmacokinetic Interactions Relevant to the Treatment of Anxiety Disorders in Young People. *J Clin Psychopharmacol*. 2021;41(5):525-33.
147. Jiang R, Yamaori S, Okamoto Y, Yamamoto I, Watanabe K. Cannabidiol is a potent inhibitor of the catalytic activity of cytochrome P450 2C19. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013;28(4):332-8.
148. Vaughn SE, Strawn JR, Poweleit EA, Sarangdhar M, Ramsey LB. The Impact of Marijuana on Antidepressant Treatment in Adolescents: Clinical and Pharmacologic Considerations. *J Pers Med*. 2021;11(7).
149. Jakubovski E, Varigonda AL, Freemantle N, Taylor MJ, Bloch MH. Systematic Review and Meta-Analysis: Dose-Response Relationship of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Major Depressive Disorder. *The American journal of psychiatry*. 2016;173(2):174-83.
150. Nanan JC, Crosby S, Schuh MJ. Hyponatremic Cognitive Dysfunction Resulting from Drug-Drug-Gene Interaction between Sertraline and Cannabidiol in an Intermediate CYP2C19 Metabolizer Patient. *Innov Pharm*. 2022;13(3).
151. Jukic MM, Haslemo T, Molden E, Ingelman-Sundberg M. Impact of CYP2C19 Genotype on Escitalopram Exposure and Therapeutic Failure: A Retrospective Study Based on 2,087 Patients. *The American journal of psychiatry*. 2018;175(5):463-70.
152. Liu C, Cai A, Li H, Deng N, Cho BP, Seeram NP, et al. Characterization of molecular interactions between cannabidiol and human plasma proteins (serum albumin and gamma-globulin) by surface plasmon resonance, microcalorimetry, and molecular docking. *J Pharm Biomed Anal*. 2022;214:114750.
153. Shahlaei M, Rahimi B, Nowroozi A, Ashrafi-Kooshk MR, Sadrjavadi K, Khodarahmi R. Exploring binding properties of sertraline with human serum albumin: Combination of spectroscopic and molecular modeling studies. *Chem Biol Interact*. 2015;242:235-46.

Table 1. The chronic unpredictable mild stress procedure

	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday	Sunday
Week 1	10-11h Restraint Stress 12-15h Stroboscopic illumination 17-18h Loud noise	9-12h Stroboscopic illumination 13-14h Restraint Stress 19-8h (+1 day) Titled cage	10-10.30h Fox urine exposure 15-17h Loud noise 18-19h Restraint Stress	10-13h Stroboscopic illumination 14-15h Restraint Stress 16-18h Loud noise	9.00-9.30h Fox urine exposure 13-14h Restraint Stress 16-19h Stroboscopic illumination	8.30-19h Inversion light/dark cycle	10-11h Retraint Stress 19-8.30h (+1 day) Wet cage
Week 2	11-13h Stroboscopic illumination 16-18h Loud noise	10-11h Restraint Stress 13-13.30h Fox urine exposure 16-18h Loud noise	8-14h Behavioral test= LDB 18-19h Restraint stress	9-11h Loud noise 12-15h Stroboscopic illumination 17-17.30h Fox urine exposure	10-13h Stroboscopic illumination 19-8.30h (+1 day) Tilted cage	10.30-12.30h Loud noise 15-15.30h Fox urine exposure	8.30h-14h Inversion light/dark cycle 16-17h Restraint stress
Week 3	10-11h Restraint Stress 12-14h Loud noise 16-18h Stroboscopic illumination	8-14h Behavioral test= EPM 18-18.30h Fox urine exposure	9-11h Loud noise 12-15h Stroboscopic illumination 18-19h Restraint Stress	10-13h Stroboscopic illumination 19-8.30h (+1 day) Tilted cage	10-10.30h Fox urine exposure 13-14h Restraint Stress 16-19h Stroboscopic illumination	9-18h Wet cage	8.30-19h Inversion light/dark cycle
Week 4	8-14h Behavioral test= TS 17-19h Loud noise	10-11h Restraint Stress 13-13.30h Fox urine exposure 16-19h Stroboscopic illumination	9-11h Loud noise 12-15h Stroboscopic illumination 18-19h Restraint stress	9-12h Stroboscopic illumination 13-14h Restraint Stress 19-8.00 (+1 day) Wet cage	11-11.30h Fox urine exposure 13-14h Restraint Stress 19-14h (+1 day) Titled cage	19-13h (+1 day) Food and water deprivation	13-14h Behavioral test= SI
Week 5	Start of treatment 10-11h Restraint Stress 13-13.30h Fox urine exposure	9-11h Loud noise 13-14h Restraint Stress 19-8h (+1 day) Titled cage	10-13h Stroboscopic illumination 15-17h Loud noise 18-19h Retraint stress	8-14h Behavioral test= LDB 18-18.30h Fox urine exposure	9-11h Loud noise 12-15h Stroboscopic illumination 18-19h Restraint stress	8.30-19h Inversion light/dark cycle	8.00-14h Behavioral test= TS
Week 6	11-13h Stroboscopic illumination 16-18h Loud noise	10-11h Restraint Stress 13-15h Loud noise 16-19h Stroboscopic illumination	10-12h Loud noise 13-13.30h Fox urine exposure 16-17h Restraint Stress	10-13h Stroboscopic illumination 14-15h Restraint Stress 19-8h (+1 day) Wet cage	11-13h Loud noise 16-19h Stroboscopic illumination	9-10h Restraint Stress 12-19h Tilted cage	8.00-14h Behavioral test= EPM
Week 7	9-12h Stroboscopic illumination 13-14h Restraint Stress 19-8h (+1 day) Titled cage	10-11h Restraint Stress 12-14h Loud noise 16-18h Stroboscopic illumination	8-14h Behavioral test= NOR 16-18h Loud noise	8-14h Behavioral test= NOR 17-18h Restraint Stress	10-10.30h Fox urine exposure 12-15h Stroboscopic illumination 18-19h Restraint stress	9.30-11.30h Loud noise 14-19h Wet cage	8.30-19h Inversion light/dark cycle
Week 8	9-11h Loud noise 13-14h Restraint Stress 19-8h (+1 day) Titled cage	10-13h Stroboscopic illumination 15-17h Loud noise 18-19h Restraint stress	10-11h Restraint Stress 12-15h Stroboscopic illumination 17-19h Loud noise	11-11.30h Fox urine exposure 13-14h Restraint stress 19-13h (+1 day) Food and water deprivation	13-14h Behavioral test= SI		

LBD: light-dark box; EPM: elevated plus maze; TS: tail suspension; NOR: novel object recognition; SI: sucrose intake.

Figure and legends

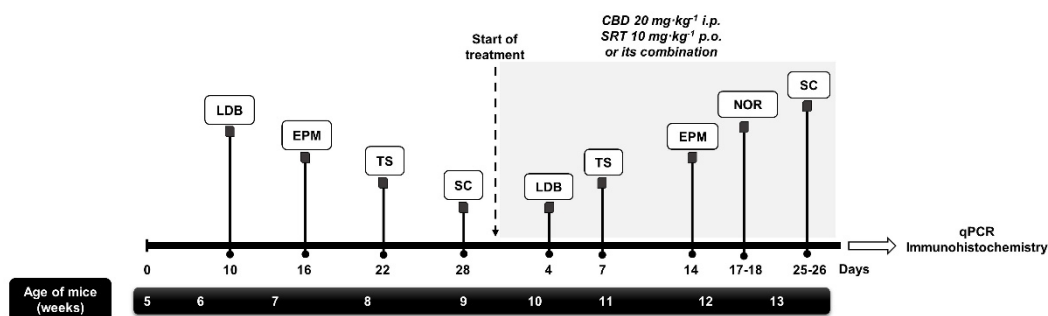


Figure 1. Schematic representation of the experimental design. Mice were exposed to the Unpredictable Chronic Mild Stress Model (UCMS) for 8 weeks. During the first 4 weeks, the model was established, being behavioral alterations evaluated at 10, 16, 22 and 28 days by the light-dark box (LDB), elevated plus maze (EPM), tail suspension (TS) and sucrose consumption (SC) tests, respectively. Once the model was established, mice were distributed randomly to receive CBD (20 mg·kg⁻¹, i.p., twice daily, at 9.00h and 19.00h), STR (10 mg·kg⁻¹, p.o., once daily, at 9.00h), their combination or VEH, during 28 days. The efficacy of each treatment in modulating the effects of UCMS were evaluated at different time points by the LDB, TS, EPM, Novel Object Recognition (NOR) and SC tests. Finally, mice were decapitated or perfused to perform real-time PCR (qPCR) and immunohistological studies.

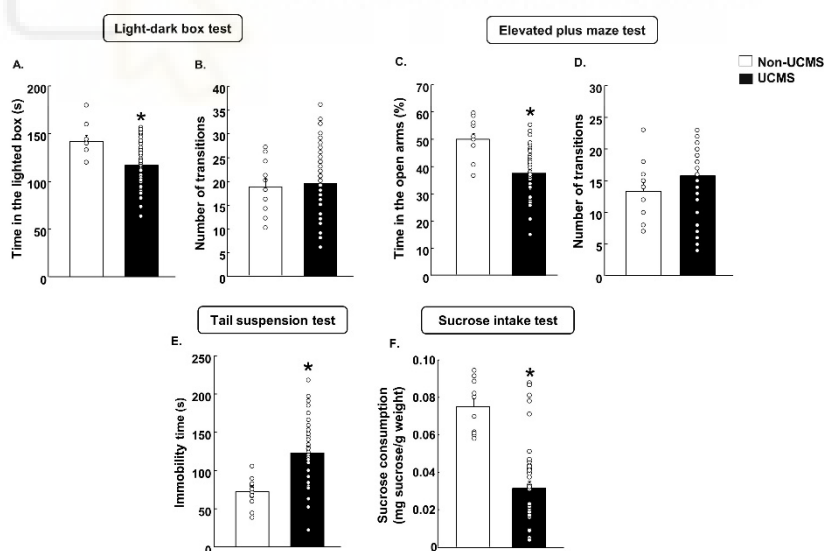


Figure 2. Behavioral evaluation of mice exposed to the unpredictable chronic mild stress model (UCMS) before starting pharmacological treatment. Panels (A, B) Light-dark box, Panels (C, D) Elevated plus maze, Panel (E) Tail suspension and Panel (F) Sucrose intake. Columns represent the means and vertical lines the \pm SEM of each parameter evaluated. *Values from the UCMS-exposed group that differ significantly from the non-UCMS group (Student's t-test, $P < 0.05$).

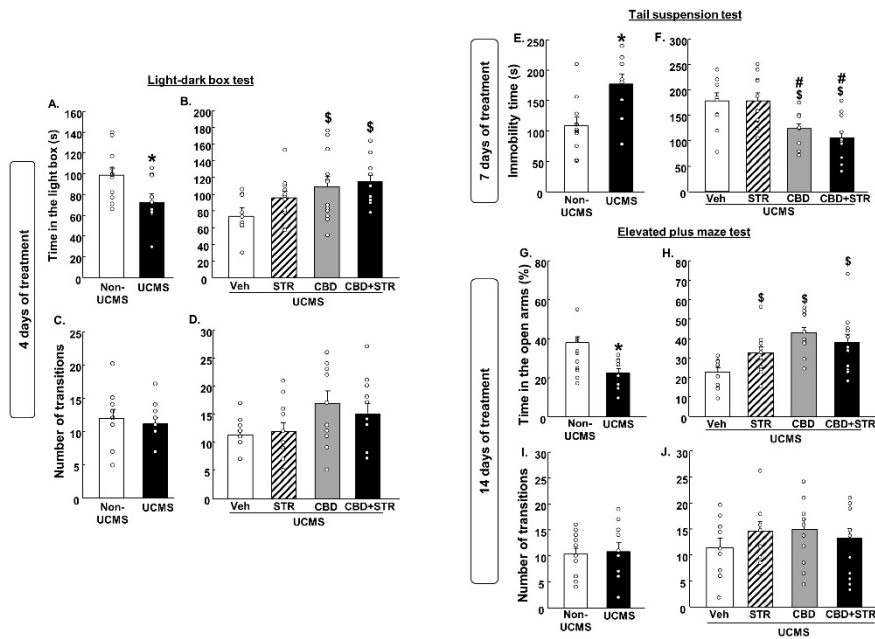


Figure 3. Chronic effects of treatment with CBD, STR or their combination in modulating anxiety and behavioral despair in mice exposed to the unpredictable chronic mild stress model (UCMS). Anxiolytic and antidepressant-like effects were evaluated at different time points (4, 7 and 14 days) using the light-dark box (panels A-D), tail suspension (panels E and F) and elevated plus maze (panels G-J) tests. Columns represent the means and vertical lines the \pm SEM of each parameter evaluated. *Values from the VEH-treated UCMS group that differ significantly from VEH-treated non-UCMS group (Student's t-test, $P < 0.05$). \$ Values from STR-, CBD-, and/or CBD+STR-treated UCMS mice that were different from VEH-treated UCMS mice. # Values from CBD- and/or CBD+STR-treated UCMS mice that were different from STR-treated UCMS mice (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

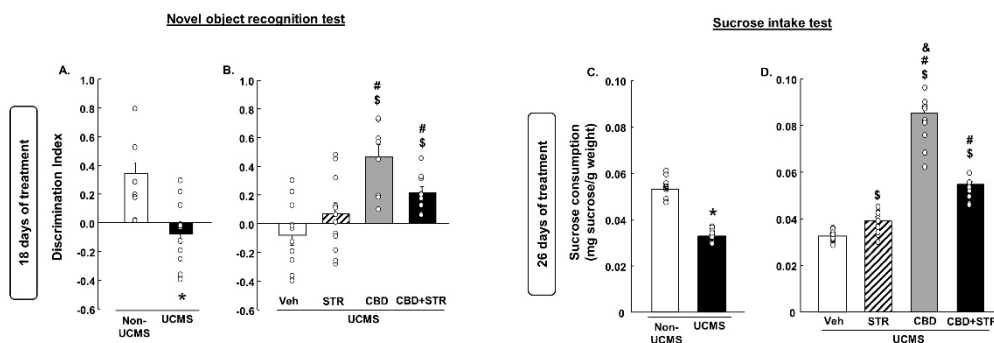


Figure 4. Chronic effects of treatment with CBD, STR or their combination in modulating cognitive impairment and anhedonia in mice exposed to the unpredictable chronic mild stress model (UCMS). Panels (A-B) Novel Object Recognition Test (NOR) and panels (C-D) sucrose intake. Columns represent the means and vertical lines the \pm SEM of each parameter evaluated. * Values from the

VEH-treated UCMS group that differ significantly from VEH-treated non-UCMS group (Student's t-test, $P < 0.05$). \$ Values from STR-, CBD- and/or CBD+STR-treated UCMS mice that were different from the VEH-treated UCMS group. # Values from CBD- and/or CBD+STR-treated UCMS mice that were different from STR-treated UCMS mice. & Values from CBD-treated UCMS mice that were different from CBD+STR treated UCMS mice (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

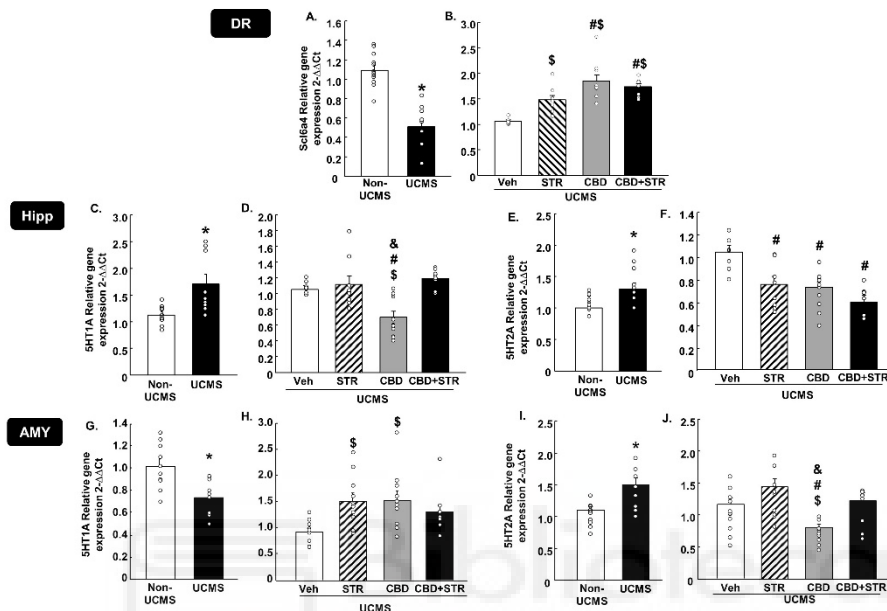


Figure 5. Relative gene expression of the serotonin transporter (*Slc6a4*) and receptors (5-HT1A and 5-HT2A) in the dorsal raphe (DR), DG of the hippocampus (DG) and AMY (amygdala) of mice exposed to the UCMS and treated with CBD, STR or their combination by real-time PCR. Columns represent the means and vertical lines the \pm SEM of the *Slc6a4* in the DR (panels A-B), 5-HT1A and 5-HT2A in the Hipp (panels C-D and E-F, respectively) and the AMY (panels G-H and I-J, respectively). *Values from the VEH-treated UCMS group that differ significantly from VEH-treated non-UCMS group (Student's t-test, $p < 0.05$). \$ Values from STR-, CBD- and/or CBD+STR-treated UCMS mice that were different from VEH-treated UCMS mice. # Values from CBD- and/or CBD+STR-treated UCMS mice that were different from STR-treated UCMS group, & Values from CBD-treated UCMS mice that were different from CBD+STR treated UCMS mice (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

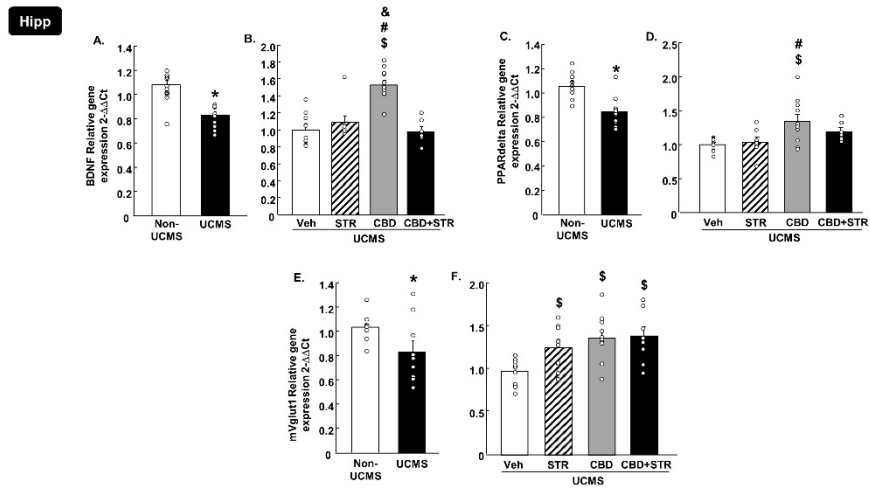


Figure 6. Relative gene expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) and vesicular glutamate transporter 1 (mVglut1) in the hippocampus (Hipp) of mice exposed to the UCMS and treated with CBD, STR or their combination by real-time PCR. Columns represent the means and vertical lines the \pm SEM of the BDNF (panels A-B), PPARdelta (panels C-D) and mVglut1 (panels E-F). *Values from the VEH-treated UCMS group that differ significantly from VEH-treated non-UCMS group (Student's t-test, $p < 0.05$). \$ Values from STR-, CBD- and/or CBD + STR-treated UCMS mice that were different from VEH-treated UCMS mice. # Values from CBD- and/or CBD + STR-treated UCMS mice that were different from the STR-treated UCMS group. & Values from CBD-treated UCMS mice that were different from CBD + STR treated UCMS mice (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

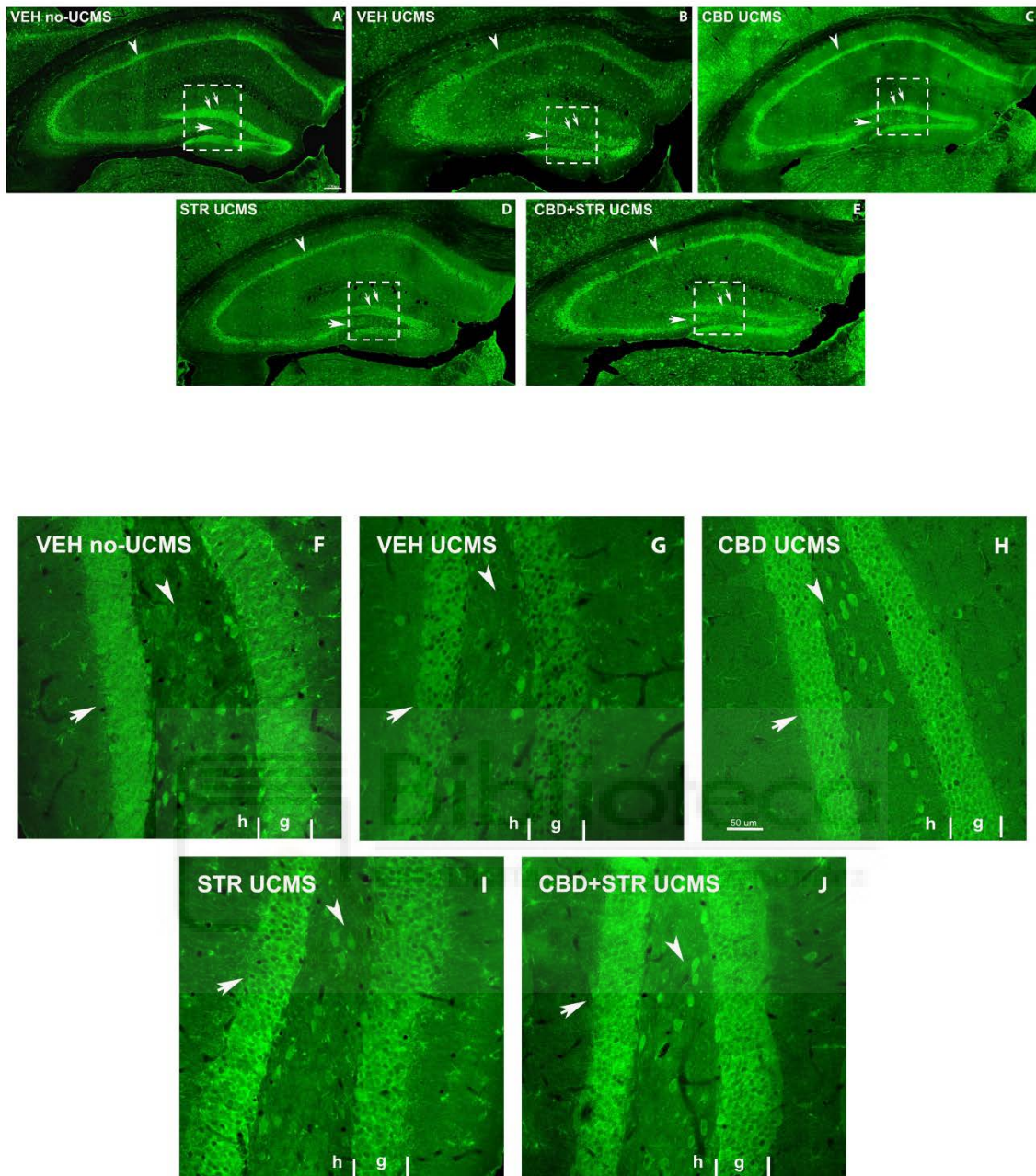


Figure 7. Low magnification confocal images of BDNF-immunolabeling in mice exposed to the UCMS and treated with CBD, STR or their combination. Collages of confocal photomicrographs showing BDNF-ir (green labeling; A-E) in the hippocampus of VEH-treated non-UCMS (A), VEH-treated UCMS (B), CBD-treated UCMS (C), STR-treated UCMS (D) and CBD + STR treated UCMS (E) in adults' mice. Note the decrease in the number and labeling of BDNF-in cells in the pyramidal layer of CA1 and CA3 (arrowhead), the granular layer (double arrow), and hilus (arrow) of DG in VEH-treated UCMS (B) compared with VEH-treated non UCMS (A). These data show that BDNF-ir is recovered after treatment with CBD (C), STR (D), and CBD + STR (E). The density and intensity of labeling are higher with CBD (C) and CBD + STR (E) treatment than with STR (D) alone in the pyramidal layer of CA1 and CA3 (arrowhead), the granular layer (double arrow), and hilus (arrow) of DG. High magnification of DG to the UCMS and treated with CBD, STR or their combination UCMS and treated with CBD, STR, or their combination in mice it was shows the intensity of labeling is higher with CBD (H) and CBD + STR (J) treatment than with STR (I) (Arrows in F, G, H, I,J) g: granular; h: hilus.

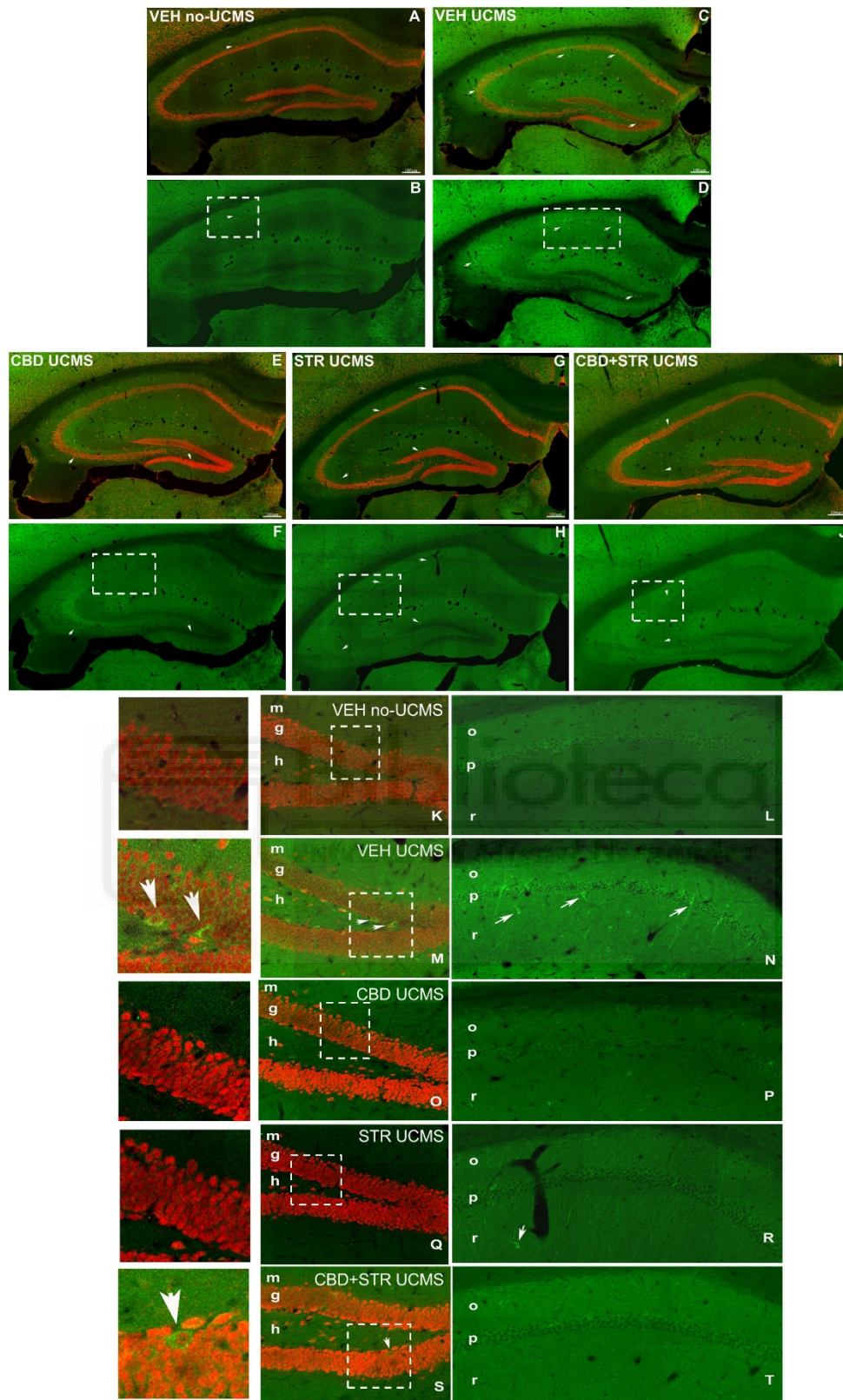


Figure 8. Low magnification confocal image showing NeuN/Caspase-3 double immunostaining coronal section of the hippocampus of mice exposed to the UCMS and treated with CBD, STR or their combination. Low magnification photomicrographs of coronal sections of the hippocampus showing NeuN-ir neurons in red and Caspase-3-ir in green in VEH-treated non-UCMS (A, B), VEH-

treated UCMS (C, D), CBD-treated UCMS (E, F), STR-treated UCMS (G, H), and CBD + STR treated UCMS (I, J). Details of NeuN in DG (K, M, O, Q, S) and Caspase-3 (L, N, P, R, T) in CA1 of VEH-treated non-UCMS, VEH-treated UCMS, CBD-treated UCMS, STR-treated UCMS, and CBD + STR treated UCMS mice. Note the decrease of Caspase-3-ir in the granular layer of DG and pyramidal and stratum radiatum of CA1 in CBD-, STR-, and CBD + STR treated UCMS groups compared with VEH-treated UCMS group. The VEH-treated UCMS (C, D) group showed an increase in Caspase-3-ir in CA1, CA3, and DG compared with the treated groups (D, E, F, G, H, I) and VEH-treated non-UCMS group (A, B). The UCMS mice treated with CBD (E, F, O, P) or CBD plus STR (I, J, S, T) showed lower Caspase-3-ir than mice treated with STR (G, H, K, R). Same scale for (A-J) and for (S, L, M, N, O, P, Q, R, S). High magnification of the CA1 showing the Caspase-3 positive cells in green in non-UCMS, UCMS, and treated with CBD, STR, or their combination (L, N, P, R, T) and NeuN/Caspase-3 double immunostaining (Caspase-3-ir in green and NeuN-ir in red, in the DG of the hippocampus (K, M, O, and S). Note that CBD-UCM, STR-UCMS, and CBD-STR UCMS have less Caspase-3-ir than the VEH UCMS (see details on the right). m: molecular; g: granular; h: hilus; o: oriens; p: pyramidal; r: radiatum.



Supplementary Information

Unveiling behavioral and molecular neuroadaptations related to the antidepressant action of cannabidiol in the unpredictable chronic mild stress model

María Salud García-Gutiérrez, Daniela Navarro, Amaya Austrich-Olivares and Jorge Manzanares*

* Correspondence:

Jorge Manzanares: jmanzanares@umh.es

Dose-response effects of cannabidiol in mice exposed to the unpredictable chronic mild stress model

Briefly, CD-1 male mice were exposed to the UCMS protocol for 4-weeks. Once the UCMS model was established, mice will be divided into the following groups: VEH-treated UCMS (n=9), CBD 5 mg/kg-treated UCMS (n= 10), CBD 10mg/kg treated UCMS (n=10) and CBD 20mg/kg treated UCMS (n=9). CBD was dissolved as previously described and administered at the corresponding doses twice daily ip. Non-UCMS group was treated with the corresponding vehicle of CBD twice daily ip (VEH-treated non-UCMS, n=10).

CBD efficacy modulating behavioral alterations induced by UCMS were evaluated at different time points in the light-dark box (7 days), elevated plus maze (12 days), and tail suspension test (21 days).

In the LBD, the results revealed that VEH-treated UCMS mice spent less time in the light compartment compared with the VEH-treated non-UCMS group (figure S1A) (Student t-test: $t=5.400$, 17df, $P<0,001$). No differences were observed in the number of transitions (figure S1B) (Student t-test $t=1.676$, $P=0.012$). CBD, at the three doses tested, significantly increased the time spent in the light compartment in comparison with the VEH-treated UCMS group (figure S1C) (One way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls $F(3,37)=6.679$, $P=0.001$). No differences were observed in the number of transitions between groups (figure S1D) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls $F(3,37)=0.822$, $P=0.49$).

In the EPM, VEH-treated UCMS spent less time in the open arms compared with VEH-treated non-UCMS mice (Figure 1SE) (Student t-test $t=4.426$, $P<0,001$). No differences were observed in the number of transitions (figure S1F) (Student t-test $t=-2.362$, $P=0.207$). CBD significantly increased the time spent in the open arms at all the doses tested (Figure 1SG) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls $F(3,37)=11.643$, $P<0.001$). No differences were observed in the number of transitions between groups (figure S1H) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls $F(3,37)=1.398$, $P=0.260$).

As expected, in the TS test VEH-treated UCMS group showed an increased time of immobility compared with the VEH-treated non-UCMS (figure 1SI) (Student t-test: $t= -9.199$, 17 df, $P<0,001$). Curiously, only the high dose of CBD was able to reduce the immobility time in the TS test (figure 1SJ) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls: $F(3,37)=15,212$, $P<0,001$).

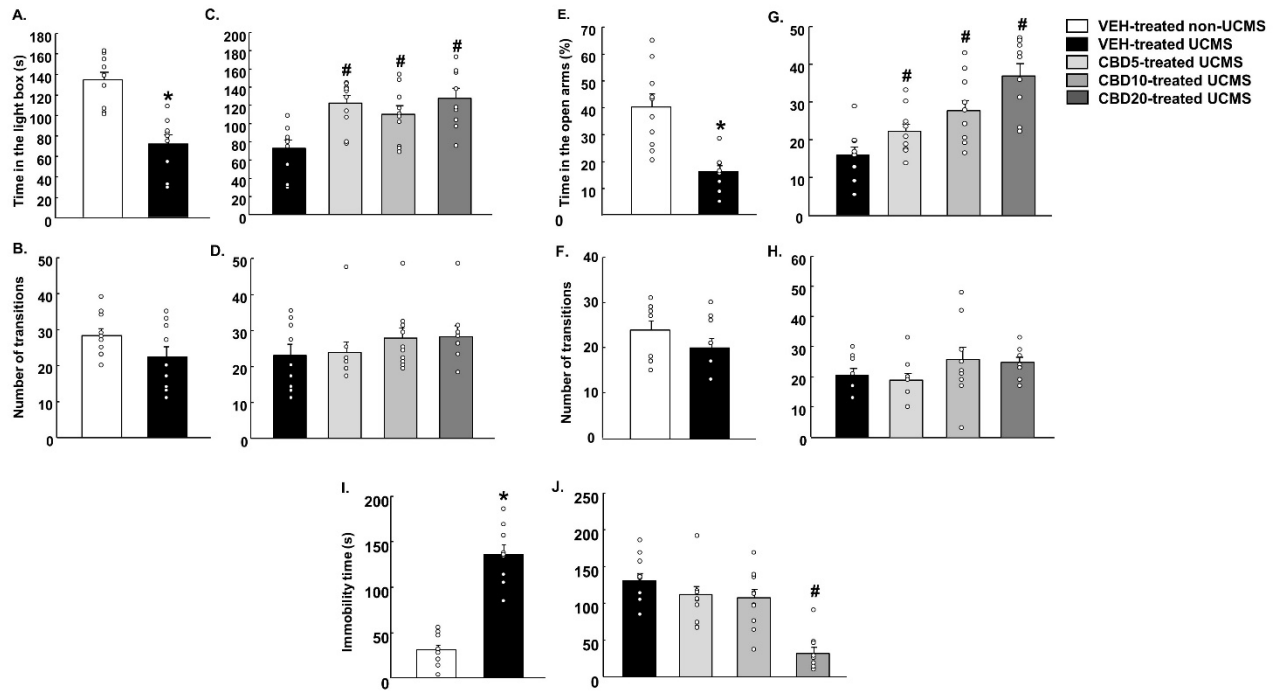


Figure S1. Dose-response effects of cannabidiol in mice exposed to the unpredictable chronic mild stress model. CD-1 male mice were exposed to the UCMS protocol for 4-weeks. Once the UCMS model was established, mice will be divided into the following groups: VEH-treated UCMS (n=9), CBD 5 mg/kg-treated UCMS (CBD5) (n=10), CBD 10mg/kg treated UCMS (CBD10) (n=10) and CBD 20mg/kg treated UCMS (CBD20) (n=9). CBD's effects on modulating behavioral alterations induced by the UCMS were evaluated at different time points in the light-dark box (panels A-D) (7 days), elevated plus maze (panels E-H) (12 days) and tail suspension test (panel I-J) (21 days). * VEH-treated UCMS group that differs significantly from the VEH-treated non-UCMS group. # treated-UCMS groups that differ from VEH-treated UCMS group.