



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

Ciclo XXX

**INTERAZIONE TRA SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
E COCAINA: STUDI PRECLINICI
COMPORTAMENTALI E MOLECOLARI IN RATTI
ADOLESCENTI E ADULTI**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/14-Farmacologia

Presentata da:	Dott. Matteo Deidda
Coordinatore Dottorato	Prof. Antonio Argiolas
Tutor	Prof.ssa Paola Fadda

Esame finale anno accademico 2016 – 2017

Tesi discussa nella sessione d'esame Febbraio-Marzo 2018

Sommario

1 Prefazione	1
2 Adolescenza e sviluppo cerebrale	4
2.1 Alterazioni del normale sviluppo cerebrale	6
3 La gateway hypothesis	8
4 Cannabis e sistema endocannabinoide	11
4.1 Il sistema endocannabinoide	13
4.2 I recettori cannabinoidi	13
4.3 Gli endocannabinoidi	17
4.3.1 Metabolismo degli endocannabinoidi	19
4.3.2 Biosintesi AEA	19
4.3.3 Biosintesi 2AG.....	20
4.3.4 Biosintesi altri endocannabinoidi	21
4.3.5 Degradazione degli endocannabinoidi	21
4.3.6 Meccanismo d'azione degli endocannabinoidi	22
4.4 Agonisti e antagonisti di sintesi	24
4.5 Effetti degli endocannabinoidi sul Sistema Nervoso Centrale	25
4.5.1 Plasticità sinaptica	26
4.5.2 Addiction	27
4.5.3 Apprendimento e memoria.....	29
4.5.4 Attività motoria	30
4.5.5 Comportamento alimentare	31
4.5.6 Sviluppo del sistema nervoso	32
5 La cannabis in adolescenza	33
6 La cannabis come sostanza gateway	36
6.1 Evidenze epidemiologiche	36
6.2 Evidenze precliniche.....	39

7 Effetti dei cannabinoidi sul Sistema Nervoso Centrale	41
7.1 Epigenetica	41
7.2 Modificazioni epigenetiche e molecolari legate all'esposizione ai cannabinoidi	42
8 Premesse e obiettivi del presente studio	47
9 Materiali e metodi.....	54
9.1 Animali	54
9.2 Farmaci	54
9.3 Disegno sperimentale e trattamenti	55
9.4 Prelievo del tessuto e raccolta delle aree cerebrali	57
Tecniche biochimiche	
9.5 Estrazione proteica e western blot	57
9.6 Analisi statistiche	58
Tecniche comportamentali	
9.7 PPI del riflesso da spavento acustico	59
9.8 Attività motoria	60
9.9 Analisi statistiche	61
10 Risultati.....	62
10.1 peso corporeo e quantità di cibo assunto nei ratti trattati cronicamente con WIN	62
10.2 Valutazione delle modificazioni istoniche e proteiche.....	64
10.2.1 Valutazione dei livelli delle acetilazioni istoniche nel D1.....	64
<i>Adolescenti</i>	64
<i>Adulti</i>	65
10.2.2 Valutazione dei livelli proteici nel D1	66
<i>Adolescenti</i>	66
<i>Adulti</i>	68
10.2.3 Valutazione dei livelli delle acetilazioni istoniche nel D9.....	69

<i>Adolescenti</i>	69
<i>Adulti</i>	70
10.2.4 Valutazione dei proteici nel D9	71
<i>Adolescenti</i>	71
<i>Adulti</i>	72
10.3 Test comportamentali	73
10.3.1 PPI	73
<i>Adolescenti</i>	73
<i>Adulti</i>	74
10.3.2 Sensibilizzazione alla cocaina	75
10.3.2.1 Valutazione dell'attività motoria nel D1	75
<i>Adolescenti</i>	76
<i>Adulti</i>	78
10.3.2.2 Valutazione dell'attività motoria nel D8	79
<i>Adolescenti</i>	79
<i>Adulti</i>	81
11 Risultati.....	83
Bibliografia	96

1 Prefazione

Il consumo di sostanze psicotrope rappresenta una pratica assai diffusa in tutti gli strati sociali della società moderna, spesso sfocia in fenomeni come quello dell'*addiction* che a tutt'oggi rappresenta una delle principali cause dell'insorgenza di disordini multifattoriali, specialmente nei paesi occidentali (UNODC, 2017), e per questo risulta bersaglio di numerose azioni di contrasto attuate a più livelli da parte delle autorità. Le politiche di prevenzione e di disincentivazione all'uso di sostanze d'abuso implementate costantemente da paesi come l'Unione Europea e gli Stati Uniti d'America, hanno portato negli ultimi 20 anni a un continuo trend di diminuzione del consumo di sostanze come alcol e tabacco fra i giovani, tuttavia il consumo della cannabis si è mantenuto a livelli più stabili e attualmente risulta essere la sostanza d'abuso illegale maggiormente utilizzata a livello mondiale. In Europa si stima che circa 87,7 milioni di persone comprese fra i 15 e i 64 anni (il 26,3 % della popolazione europea in questa fascia d'età) abbiano assunto cannabis almeno una volta nella vita, e all'interno di questo campione circa 10 milioni di ragazzi compresi tra i 15 e i 24 anni (ovvero il 17,7 % della popolazione in questa fascia d'età) hanno fatto uso di cannabis nell'ultimo anno (EMCDDA, 2017). È noto infatti che molto spesso il primo approccio all'uso della cannabis avviene in età adolescenziale, infatti da un'indagine condotta in 23 paesi europei, il 10% di un campione di ragazzi compresi tra i 15 e i 16 anni aveva dichiarato di aver assunto cannabis nell'ultimo mese dall'intervista (ESPAD, 2015). Sebbene in quantità notevolmente inferiori rispetto alla cannabis, anche la cocaina risulta ampiamente diffusa e rappresenta la seconda sostanza d'abuso illegale maggiormente utilizzata. In Europa i dati indicano che nella fascia d'età compresa tra i 15 e i 64 anni, sono circa 17,5 milioni le persone che hanno utilizzato la cocaina almeno una volta nella vita (pari al 5,2 % della popolazione totale compresa in questa fascia d'età) e circa 2,3 milioni di ragazzi compresi fra i 15 e i 34 anni (l'1,9 % in questa fascia d'età) hanno usato cocaina nell'ultimo anno (EMCDDA, 2017).

I comportamenti di assunzione delle sostanze stupefacenti seguono diversi modelli, che possono susseguirsi cronologicamente e che vanno dall'assunzione sporadica e occasionale all'assunzione abituale, sfociando poi nella tossicomania e

nella dipendenza. I contesti in cui si attuano tali comportamenti si connotano come rituali sociali, infatti specialmente per gli adolescenti, l'uso di sostanze viene frequentemente associato a momenti di divertimento e di socializzazione, si ricercano quelle sensazioni di sicurezza e disinibizione e molto spesso la sostanza costituisce il mezzo più sicuro per ottenere accettazione all'interno del gruppo.

Spesso l'abuso non si limita a una sola sostanza, infatti è molto diffusa la pratica della combinazione, anche contemporanea, di più sostanze e tale fenomeno di poliassunzione è molto frequente tra gli adolescenti. Da un'indagine condotta nel 2010 in Italia dal Dipartimento Politiche Antidroga (DPA, 2010) è emerso che fra i ragazzi della fascia di età compresa tra i 15 e i 19 anni, il 22,3 % aveva già sperimentato l'uso di cannabis, di questi la quasi totalità aveva associato alla sostanza l'alcol e/o il tabacco e il 16,6 % aveva associato l'uso di cocaina. Inoltre nei soggetti che avevano riferito di aver fatto uso di cocaina nell'ultimo anno (il 2,9 %) la percentuale di coloro che avevano associato l'uso della cannabis era del 96 % (DPA, 2010). La pratica del policonsumo viene considerata come un incremento del rischio per la salute dell'utilizzatore per via degli effetti che scaturiscono dall'interazione di più sostanze e inoltre si inserisce in un quadro più ampio che è quello della teoria del passaggio da una droga all'altra nella quale può ricoprire un ruolo importante il potenziale intrinseco di una sostanza di funzionare da ponte per l'uso di altre sostanze. Questi concetti rappresentano il perno sulla quale si profila la *gateway hypothesis*, che sulla base di numerose evidenze epidemiologiche, descrive uno schema regolare di progressività nel consumo di sostanze d'abuso negli adolescenti, che segna il passaggio da quelle lecite a quelle illecite (Kandel, 2002; Kandel e Faust, 1975). La cannabis ricopre una posizione centrale nei presupposti dell'ipotesi poiché considerata sostanza di passaggio dall'uso di alcol e tabacco al consumo di ulteriori droghe illecite come gli psicostimolanti, e l'adolescenza costituisce il substrato principale sul quale si dipana l'intera concettualità della *gateway hypothesis*. Infatti in un contesto come quello dell'abuso di sostanze, l'adolescenza ricopre una notevole importanza perché rappresenta un delicato periodo di riprogrammazione biologica che sfocia in processi evolutivi di maturazione somatica e cerebrale. Durante tale fase di sviluppo il sistema nervoso centrale subisce un generale rimodellamento

funzionale che implementa una ridefinizione dei circuiti cerebrali (Bossong e Niesink, 2010; Cohen-Cory, 2002; Katz e Shatz, 1996; Luna, 2009; McDowell, 2010). Il sistema endocannabinoide risulta profondamente coinvolto in questi processi di sviluppo e come tale subisce importanti cambiamenti, infatti si verificano significative fluttuazioni transitorie nei livelli degli endocannabinoidi così come nell'espressione dei recettori cannabinoidi in numerose aree cerebrali, alcune delle quali rappresentano punti cardine per i processi di ricompensa e cognitivi come il nucleo accumbens (NAc) e la corteccia prefrontale (PFC) (Ellgren et al., 2008; Rodriguez de Fonseca et al., 1993). Alla luce di queste evidenze è comprensibile come l'ambiente esterno e l'esposizione a determinate sostanze, come la cannabis e la cocaina, possano interferire nel sistema nervoso centrale adolescenziale perturbandone gli equilibri della delicata fase transitoria e creando delle alterazioni a breve e a lungo termine, che possono ripercuotersi su sistemi come quello del piacere e della ricompensa e potrebbero dunque essere alla base di un aumento della vulnerabilità all'abuso di altre sostanze.

L'approccio all'uso di sostanze psicotrope come la cannabis e la cocaina costituisce un comportamento che può essere influenzato da numerose variabili tutte equamente influenti e correlate fra loro: la personalità di un soggetto è fondamentale per esempio nel momento in cui l'interesse personale spinge verso la sperimentazione del nuovo; la predisposizione genetica e neurobiologica risultano cruciali nella generazione delle sensazioni e nella risposta agli effetti delle sostanze; il contesto socio-ambientale come la famiglia, la scuola, le abitudini e le frequentazioni in generale, sono importanti perché possono portare a situazioni di familiarità con le sostanze d'abuso così come di facilità nella reperibilità e di propensione all'utilizzo. Per cui cercare di capire i meccanismi che sottendono la vulnerabilità all'uso di queste sostanze è un compito assai complesso e rappresenta una sfida importante per contrastare il fenomeno della dipendenza, e in tale quadro, lo studio degli effetti e dei cambiamenti associati all'uso di cannabis in adolescenza possono portare alla comprensione dell'eventuale causalità alla base del passaggio all'abuso di altre sostanze.

2 Adolescenza e sviluppo cerebrale

Il periodo dell'adolescenza può essere considerato da un punto di vista sociale come la fase di transizione che segna il passaggio dallo status di bambino a quella di adulto, durante la quale si susseguono processi evolutivi di natura biologica e psicologica. L'OMS definisce l'adolescenza come il periodo della vita di un individuo che comincia con i primi segni di maturazione puberale e termina con l'arresto dell'accrescimento somatico, collocabile nella finestra temporale che va dai 12-14 ai 18-20 anni di età. In questa delicata fase i processi di maturazione cerebrale subiscono un forte impulso e dirigono la crescita e i cambiamenti dell'individuo. È noto come gli adolescenti siano meno capaci rispetto agli adulti di definire i propri obiettivi e di valutare le proprie decisioni (Byrnes, 2002), sperimentano forti sensazioni ed elevati stati emozionali che associati a un'immatura capacità di giudizio e consapevolezza possono portare all'attuazione di comportamenti impulsivi, potenzialmente pericolosi o borderline, per i quali l'adolescente non coglie appieno le reali conseguenze (Benthin et al., 1993), aumentando dunque la vulnerabilità alle situazioni a rischio come per esempio l'abuso di sostanze stupefacenti (Fried e Reppucci, 2001; Martin et al., 2002; Patton et al., 2004). Alla base di questi fenomeni vi è una differenza nelle tempistiche di maturazione e di sviluppo di diverse aree cerebrali, infatti le regioni che controllano le funzioni primarie come i sistemi motori e sensoriali sono le prime a maturare, mentre le aree deputate alle funzioni più avanzate, come il controllo dell'orientamento spaziale, il linguaggio e il ragionamento, maturano successivamente, in tarda adolescenza (Gogtay et al., 2004; Sowell et al., 2004). Aree quali la corteccia frontale e prefrontale, che sono associate alle funzioni sociali, alla razionalità e alla cognitivtà, e che controllano le risposte sensoriali ed emozionali, si sviluppano appieno intorno al venticinquesimo anno di età (Casey et al., 1997; Lenrott et al., 2009), mentre le regioni appartenenti al sistema limbico, implicate nell'emotività e nell'impulsività, si sviluppano più precocemente (Giedd et al., 1999). La differenza temporale nello sviluppo di queste specifiche aree

appare significativa per la condizione adolescenziale poiché la maturazione della corteccia prefrontale consente un graduale aumento del controllo del sistema limbico che comporta un miglioramento dei processi inibitori, di elaborazione affettiva e in generale di maturazione dell'adolescente (Casey et al., 2005; Casey et al., 2008).

La maturazione del cervello è strettamente correlata alla densità della materia grigia che lo compone, infatti durante tutto l'arco della vita i neuroni subiscono un rimodellamento funzionale, di natura strutturale e quantitativa, che si traduce nella riduzione della materia grigia stessa. Fin dai primi anni di vita si ha un aumento graduale della densità di sostanza grigia che raggiunge un plateau intorno ai 12-13 anni, periodo in cui ha inizio l'adolescenza e con essa la graduale riduzione di tale densità, a partire dalle aree sottocorticali come il talamo, lo striato e il NAc (Huttenlocher, 1990; Sowell et al., 1999), fino alle aree proprie della corteccia. Tali cambiamenti avvengono poiché all'inizio dell'adolescenza si ha un incremento della sinaptogenesi che aumenta e consolida le connessioni sinaptiche neuronali, e successivamente subentra un processo di rimodellamento sinaptico noto come *pruning* sinaptico, che porta alla riduzione e all'eliminazione di quelle sinapsi scarsamente utilizzate generando uno sfoltimento funzionale noto col concetto di "*use it or lose it*" (Edelman, 1987). Questo meccanismo, ribattezzato da Edelman con l'efficace appellativo di "Darwinismo neurale", permette di conservare quelle connessioni sinaptiche che hanno una maggiore importanza fisiologica poiché contraddistinte da una elevata attività, e, in tale maniera, di ridefinire e migliorare diversi circuiti cerebrali importanti per l'adulto (Bossong e Niesink, 2010; Cohen-Cory, 2002; Katz e Shatz, 1996; Luna, 2009; McDowell, 2010; Whitford et al., 2007). Tuttavia, sebbene in questa fase l'eliminazione delle connessioni sia direttamente e positivamente correlata alla maturazione del cervello, i meccanismi di neurogenesi e di sinaptogenesi non si arrestano totalmente, bensì proseguono in determinate aree per l'intero arco della vita di un individuo. La fase di rimodellamento della sostanza grigia durante l'adolescenza avviene in concomitanza con un aumento della sostanza bianca del cervello dovuta a un aumento della mielinizzazione delle fibre neurali, le quali acquisiscono una

maggiore integrità e funzionalità nella conduzione dei segnali (Jernigan e Gamst, 2005; Hüppi e Dubois, 2006).

2.1 Alterazioni del normale sviluppo cerebrale

Alla luce dei fenomeni appena descritti si evince come l'ambiente esterno e gli stimoli a esso associati, per esempio l'educazione, le esperienze vissute, ma anche l'esposizione a determinate sostanze, possano interferire con i processi di rimodellamento cerebrale influenzando così la direzione e il grado di attivazione dei circuiti cerebrali e in generale alterando la maturazione cerebrale. Per esempio l'interazione sociale e affettiva risulta estremamente importante in adolescenza, infatti è emerso da alcuni studi come una deprivazione socio-emozionale riscontrabile in bambini rimasti orfani e istituzionalizzati in orfanotrofi sia connessa a una maggiore prevalenza di disturbi psichiatrici rispetto a bambini cresciuti in famiglia (Pluye et al., 2001; Zeanah et al., 2009), disturbi che risultano correlati per altro ad alterazioni morfologiche cerebrali (Eluvathingal et al., 2006). L'influenza dell'ambiente esterno associato alla tendenza all'attuazione di comportamenti impulsivi e a una scarsa consapevolezza del pericolo pongono l'adolescente in una condizione di vulnerabilità nei confronti delle dipendenze (Chambers et al., 2003) come dimostrato da studi epidemiologici che hanno evidenziato un aumentato rischio all'abuso di sostanze durante il periodo dell'adolescenza (Fried e Reppucci, 2001; Martin et al., 2002; Patton et al., 2004; Trad, 1994). Queste evidenze trovano una spiegazione in quello che rappresenta il quadro neurobiologico tipico dell'adolescente: l'azione del sistema limbico che media l'emotività e spinge gli impulsi, e in particolare l'aumento dell'attività del NAc (Kuhnen e Knutson, 2005; Matthews et al., 2004; Montague e Berns, 2002), la quale risulta assai marcata negli adolescenti rispetto ai bambini e agli adulti (Ernst et al., 2005; Galvan et al., 2006), coerentemente con quanto osservato anche in modelli di roditori (Laviola et al., 2003), suggeriscono una spiccata attivazione dei meccanismi di ricompensa che aumenterebbero il comportamento di assunzione di sostanze d'abuso.

L'esposizione a tali sostanze, come la cannabis, genera delle sovrastimolazioni dei sistemi endogeni come quello endocannabinoide, che ne alterano il delicato ruolo regolatorio, specialmente durante l'adolescenza, e che possono sfociare in modificazioni funzionali che impattano negativamente sullo sviluppo psicofisico.

3 La gateway hypothesis

Negli anni 70 Denise Kandel, partendo da uno studio epidemiologico sull'utilizzo delle droghe in età adolescenziale (Kandel, 1975), descrisse per la prima volta uno specifico schema di consumo di sostanze d'abuso che prevedeva una progressione dell'uso di varie sostanze, da quelle lecite a quelle illecite, e che chiamò *gateway hypothesis*. La studiosa osservò che il primo approccio al consumo riguardava sempre le sostanze legali (alcol e tabacco), e questo primo stadio era fondamentale nella successione dalla condizione di non uso a quella dell'uso di sostanze illegali, infatti una progressione diretta in tal senso risultava altamente improbabile. Inoltre la *cannabis* figurava come un intermedio cruciale nel passaggio dalle sostanze legali a quelle illegali. Per cui la regolare sequenza di fasi descritta dall'ipotesi prevedeva che l'uso di alcol e sigarette molto spesso precedesse l'uso della cannabis il quale a sua volta insorgeva prima dell'approccio ad altre droghe illegali come psichedelici, cocaina ed eroina. I molti studi che da allora hanno affrontato la tematica dell'abuso di sostanze nell'ottica dell'evoluitività prevista dall'ipotesi, hanno contribuito al consolidamento di due principali concetti: il concetto di sequenza che fissa il rapporto fra due sostanze, dove il consumo di una sostanza A precede sempre il consumo di un'altra sostanza B, e il concetto di associazione, per il quale il consumo di una sostanza A molto spesso aumenta la probabilità di iniziare il consumo di una seconda sostanza B (Collins, 2002).

Il comportamento di consumo di sostanze psicoattive può seguire diversi modelli che possono susseguirsi temporalmente creando un continuo evolutivo dell'abuso: si parte dalla prima esperienza dell'uso di una sostanza che può rimanere isolata oppure può ripetersi più volte creando una condizione di sperimentazione iniziale. Lo sperimentatore iniziale può proseguire con il comportamento di abuso in maniera saltuaria diventando consumatore occasionale, e questa sembra essere la fase più importante per l'inizio della poliassunzione di sostanze. Da questa fase si può passare a una fase di consumatore abituale, permanente, e tale condizione può

sfociare in fenomeni di dipendenza e tossicomania gravi. Questa sequenza generalistica è influenzata da numerose variabili e fattori, infatti la soggettività genetica e neuropsicologica di un individuo, la predisposizione a comportamenti rischiosi e alla sperimentazione, l'età, il contesto ambientale sia sociale che familiare possono tutti concorrere all'evoluzione del comportamento di abuso così come alla determinazione del potenziale intrinseco di una sostanza di diventare *gateway*.

Dunque per definire una sostanza *gateway* bisogna considerare dei criteri e delle condizioni che correlano con la sostanza stessa (Zermiani e Serpelloni, 2011):

- la sostanza deve possedere proprietà psicoattive;
- deve avere un alto grado di attrattività intrinseca, ovvero già prima del suo utilizzo deve essere percepita come fonte di piacere e gratificazione per lo sperimentatore;
- la sua assunzione deve far scaturire sensazioni di piacere e di gratificazione, deve dunque produrre un rinforzo positivo in grado di creare una traccia mnemonica;
- le diverse sostanze possono essere considerate potenzialmente *gateway* esclusivamente in relazione alle caratteristiche soggettive dello sperimentatore e al contesto ambientale in cui esso vive;
- la sostanza deve avere il potenziale di spingere l'utilizzatore alla ricerca di altre sostanze, innescando dunque un comportamento tendente al consolidamento o all'abitudine del consumo;
- la sostanza deve essere stata classificata come sostanza di primo uso negli studi di prevalenza, nelle persone in trattamento per tossicodipendenza;
- si deve attestare la presenza di studi longitudinali di coorte che dimostrino l'evolutivezza di alcuni soggetti vulnerabili, dall'inizio dell'uso della sostanza in età precoce all'uso di altre sostanze come eroina e cocaina;
- lo sperimentatore deve possedere un'elevata attitudine al rischio correlata all'attrazione per l'uso delle sostanze d'abuso, alcol e tabacco compresi.

Fin dalla sua formulazione, la *gateway hypothesis* e il relativo concetto di sequenza di fasi sono stati ampiamente documentati in un grande numero di studi epidemiologici provenienti da diverse parti del mondo, nondimeno, diversi studiosi hanno mostrato un minor consenso con la regolarità degli schemi

comportamentali proposti nell'ipotesi (Golub e Johnson, 1994; Hall e Lynskey, 2005). Per esempio il nesso riscontrato nell'associazione dell'utilizzo di due o più sostanze potrebbe essere spiegato con il fatto che le stesse possono essere disponibili contemporaneamente nello stesso mercato nero, per cui il consumatore di cannabis avrebbe più facilità di trovare anche altre droghe rispetto a un non consumatore. Più in generale il consumo di una determinata sostanza aumenterebbe per questioni ambientali le opportunità di esposizione ad altre sostanze, come dimostrato in uno studio di Wagner e Antony (2002).

Tuttavia tali aspetti, insieme alle variabili che influenzano il comportamento evolutivo dell'abuso, hanno l'effetto di elevare la complessità degli studi epidemiologici che porta a un aumento dell'accuratezza nelle loro analisi, infatti sono sempre di più i gruppi di ricerca che proseguono il loro lavoro di indagine sulla *gateway hypothesis*, a dimostrazione della considerevole rilevanza scientifica nonché sociale e politica che essa riveste, specialmente nelle società occidentali.

Come riportato in precedenza, la cannabis è considerata una delle principali sostanze gateway e ricopre una posizione centrale nella successione delle sostanze d'abuso: viene utilizzata prima delle altre droghe definite pesanti, e il suo uso aumenta la probabilità di utilizzare le altre droghe illecite. Il suo consumo è largamente diffuso e il primo approccio alla sostanza generalmente avviene in età precoce. Gli effetti mediati dalla cannabis sono collegati all'attivazione dei recettori cannabinoidegici e in generale alla stimolazione del sistema endocannabinoide, il quale risulta importante per la modulazione di numerosi processi fisiologici sia a livello periferico che centrale e influisce in processi di omeostasi e di sviluppo, specialmente in periodi critici come quello dell'adolescenza.

4 Cannabis e sistema endocannabinoide

La *Cannabis sativa*, facente parte della famiglia delle *Cannabaceae* (Cronquist et al., 1981), è una pianta dioica, di natura erbacea annuale, originaria di alcune regioni dell'Asia meridionale e occidentale. La sua diffusione, che ha dapprima interessato l'intero continente asiatico e successivamente quello europeo e americano, è ascrivibile all'uomo che a partire da diversi millenni a.C. ha scoperto e sfruttato le numerose peculiarità della pianta per usi medici, religiosi, artigianali e sociali (Abel et al., 1980), incluso l'uso ricreativo correlato all'effetto psicotropo che la rende tutt'oggi lo stupefacente maggiormente assunto nei paesi occidentali.

Sebbene la *Cannabis sativa* rappresenti l'unica specie riconosciuta del genere *Cannabis*, in base ad alcune caratteristiche qualitative i botanici descrivono diverse tipologie di cannabis oltre alla *Sativa*: la *Cannabis indica* e la *Cannabis ruderalis*. Tale diversità è al centro del dibattito riguardante la classificazione di queste varianti che talvolta vengono proposte come specie, oppure come sottospecie o semplici varietà appartenenti alla stessa specie (Hilling e Mahlberg, 2004).

Dalle analisi chimiche finora effettuate è emerso come la cannabis contenga oltre 500 differenti composti appartenenti a diverse classi chimiche ampiamente diffuse nel regno vegetale come terpenoidi, idrocarburi, composti azotati, acidi grassi e carboidrati (ElSohly, 2007). È inoltre presente un gruppo di molecole cannabinoidi esclusive del genere *Cannabis* note come fitocannabinoidi, che racchiude al suo interno alcune delle sostanze responsabili degli effetti psicoattivi della pianta e dei suoi preparati. Il gruppo dei fitocannabinoidi comprende 120 differenti composti contenenti ciascuna 21 atomi di carbonio e appartenenti alla classe chimica dei terpenofenoli (ElSholy e Slade, 2005; ElSholy et al., 2017), che in base a differenze di natura strutturale si suddividono a loro volta in 10 sottoclassi tra le quali ricoprono maggior risalto il tipo cannabigerolo (CBG), primo fitocannabinoide identificato (Mechoulam e Gaoni, 1965a), il tipo cannabicromene, il tipo cannabidiolo (CBD), presente in concentrazioni elevate, insieme al suo acido CBDA,

nella cannabis utilizzata per la produzione di fibre tessili, e importante per l'azione di neuroprotezione a livello centrale correlata all'assenza di attività psicoattiva (per una revisione vedere McPartland et al., 2014), e ancora il tipo delta-9 tetraidrocannabinolo (Δ^9 THC), il principale componente psicoattivo dei fitocannabinoidi isolato già negli anni 40 ma descritto nella sua composizione strutturale solo più tardi da Mechoulam e Gaoni (1965b).

La percentuale di Δ^9 THC (così come degli altri fitocannabinoidi) presente nella cannabis risulta estremamente variabile soprattutto in relazione ad aspetti quali varietà, sesso e habitat di coltivazione della pianta, e tali variabili quantitative si riscontrano anche nelle diverse tipologie dei preparati per il consumo umano. Marijuana è il termine più diffuso col quale si identifica l'infiorescenza femminile della cannabis in seguito a trattamento di essiccamento, mentre hashish è la definizione più comune per il preparato di resina della cannabis. Il contenuto medio di Δ^9 THC rilevato dai più recenti controlli effettuati dalla polizia italiana si aggira intorno al 10 % per entrambi i prodotti, con picchi massimi che arrivano fino al 26 % per la marijuana e al 35 % per l'hashish (Relazione Annuale al Parlamento, 2016). La cannabis liquida, il terzo dei preparati più diffusi anche noto come olio di hashish, è un estratto liquido di materiale erboso e resinoso della cannabis che raggiunge le concentrazioni di THC più elevate fra le droghe derivate, con picchi che arrivano fino al 60 % (UNODC, Drug Prices Report 2017). La più comune modalità di assunzione relativa a tutti i preparati che si ottengono dai derivati della cannabis è quella mediante inalazione del fumo generato dalla loro combustione, meno frequenti invece l'ingestione di cibi addizionati e l'inalazione dei gas ottenuti tramite vaporizzazione. Gli effetti psichici in acuto insorgono qualche minuto dopo l'assunzione, fatta eccezione nei casi di ingestione per i quali sopraggiungono più tardivamente, e tra i più comuni, anche in relazione alle caratteristiche psicofisiche soggettive del consumatore e alle quantità assunte, vi sono sensazioni di euforia, rilassamento, ilarità, alterate percezioni sensoriali e temporale, associati alla riduzione delle capacità attentive e di coordinazione motoria con rallentamento dei tempi di reazione. Sono frequenti anche i casi nei quali subentrano effetti deleteri che portano a stati d'ansia, disforia, attacchi di panico, sfiducia, ritiro sociale fino a sfociare nei casi più gravi a manifestazioni di

psicosi acute, allucinazioni, parestesie e tremori, convulsioni e perdita di coscienza (Tait et al, 2016; DSM V). Generalmente le sensazioni positive spingono l'utilizzatore a un uso ripetitivo e prolungato della cannabis che, contrariamente al pensiero diffuso, può provocare disturbi da abuso (Hasin et al., 2015) che possono degenerare in veri e propri stati di dipendenza e sindromi d'astinenza a essa connesse (Budney e Huges, 2006).

4.1 Il sistema endocannabinoide

Lo studio dei meccanismi che sono alla base degli effetti associati all'azione dei fitocannabinoidi ha portato alla scoperta di un complesso sistema biologico di comunicazione cellulare che oggi è conosciuto come il sistema endocannabinoide. Esso è costituito da specifici recettori detti recettori cannabinoidi (CB), da composti di natura lipidica i quali fungono da ligandi endogeni e da una serie di meccanismi proteici che regolano finemente la sintesi, il trasporto e la degradazione di questi ligandi. Il sistema endocannabinoide ricopre una rilevante importanza dal punto di vista biologico poiché regola numerosissimi processi fisiologici come il controllo motorio, la regolazione dell'omeostasi, l'alimentazione, le funzioni cognitive superiori, la percezione del dolore, le funzioni sessuali, la neuroprotezione, il sistema immunitario e le funzioni endocrine (Ameri, 1999; Correa et al., 2005; Di Marzo et al., 1998; Van der Stelt e Di Marzo, 2005; Wang et al., 2006).

4.2 I recettori cannabinoidi

I recettori cannabinoidi (CB) appartengono alla famiglia dei recettori metabotropici accoppiati a proteina G (GPCR), caratterizzati da una struttura aminoacidica che forma un'unica catena il cui terminale amminico si affaccia nella porzione extracellulare e il terminale carbossilico si protrude sulla faccia interna della membrana citoplasmatica, e ordinata in sette domini α -elica transmembranali connessi da 3 segmenti *loop* extracellulari, i quali insieme al terminale amminico compongono importanti siti di glicosilazione e di interazione

con i ligandi, e 3 intracellulari che ospitano siti regolatori che fungono da sede di interazione con le subunità delle proteine G. Sono noti due sottotipi di recettori CB: di tipo 1 (CB1) e di tipo 2 (CB2).

I recettori CB1 furono caratterizzati come sito di legame per i cannabinoidi la prima volta nel 1988 da Devane e colleghi (Devane et al., 1988) e pochi anni più tardi furono clonati e dunque descritti nella loro struttura sia nel ratto (Matsuda et al., 1990) che nell'uomo (Gérard et al., 1991). Tali recettori sono ampiamente distribuiti in gran parte del sistema nervoso centrale, infatti risultano i GPCR più abbondanti nel cervello dei mammiferi (Turu e Hunyady, 2010), e tramite studi autoradiografici, immunoistochimici e di ibridizzazione in situ sono state definite con precisione numerose aree cerebrali con elevata espressione come il bulbo olfattivo, il cervelletto, l'ippocampo, i gangli della base, corteccia, amigdala e ipotalamo (Biegon e Kerman, 2001; Herkenham et al., 1990; Pettit et al., 1998; Mailleux et al., 1992). Sebbene recentemente i CB1 siano stati localizzati anche su cellule non neuronali come gli astrociti e su cellule neuronali in sede postsinaptica (Oliveira et al., 2016; Hohmann et al., 1999), la loro dislocazione cellulare riguarda prevalentemente le aree presinaptiche dei neuroni, compatibilmente con l'attività neuromodulatoria della trasmissione tipica di questi recettori. Inoltre essi risultano espressi anche a livello del sistema nervoso periferico e in numerosi tessuti e organi nei mammiferi come il sistema immunitario, l'intestino, alcune ghiandole endocrine, il cuore, il sistema riproduttivo, il midollo osseo e le tonsille (Alger, 2001; Fonseca et al., 2009; Iannotti et al., 2013; Iannotti et al., 2014; Matias e Di Marzo, 2006; Talwar e Potluri, 2011). I recettori CB1 sono in grado di formare sia strutture omodimeriche che eterodimeriche con altri recettori GPCR (Turu e Hunyady, 2010), ed espletano la loro attività principalmente mediante interazione e attivazione delle proteine Gi/o a essi associate, le quali, per via della loro natura inibitoria, inducono una riduzione dell'attività dell'adenilato ciclasi che si traduce nella riduzione dei livelli di AMP ciclico (cAMP) così come nel blocco transitorio dell'attivazione della protein-chinasi A (PKA) (Felder et al., 1992). Inoltre promuovono ulteriori effetti quali l'attivazione della via delle MAP-chinasi e la modulazione di canali ionici come i canali al potassio di tipo A e i canali al calcio di tipo N e P/Q (Turu e Hunyady, 2010). Altresì i CB1 possono interagire con

tipologie diverse di proteine G, come la Gq/11 e la Gs, le quali potrebbero modulare con un meccanismo compensatorio lo stato di eccitabilità cellulare, caratterizzando un'attività bifasica dei recettori CB1 (Ligresti et al., 2016).

In linea con i molteplici meccanismi d'azione mediati e con una così diffusa localizzazione i recettori CB1 sono responsabili della modulazione di numerosi processi fisiologici, come la coordinazione motoria e il movimento, l'attenzione e le funzioni cognitive complesse tra le quali l'apprendimento, la memoria e le emozioni, la modulazione del dolore, il metabolismo energetico e il comportamento alimentare (Ameri, 1999; Pacher et al., 2006; Pagotto et al., 2006). Inoltre è cruciale il suo ruolo nel mantenimento dell'omeostasi sia centrale che periferica (Iannotti et al., 2016; Ravinet et al., 2004).

I recettori CB2, scoperti nel 1993 da Munro e colleghi, sebbene siano accomunati ai CB1 da omologie di natura strutturale e, per alcuni aspetti, di trasduzione del segnale, sono caratterizzati da una diversa distribuzione, infatti presentano un'elevata e diffusa localizzazione a livello periferico e una estesa seppur bassa espressione a livello di tutto il sistema nervoso centrale (Onaivi et al., 2006), prevalentemente in alcune tipologie specifiche di neuroni, nella microglia e negli astrociti (Demuth e Molleman, 2006; Stella, 2010). Perifericamente i CB2 risultano abbondantemente espressi nelle cellule del sistema immunitario come monociti, macrofagi, linfociti B e T, nelle quali partecipano all'induzione del rilascio di citochine proinfiammatorie (Klein et al., 2003) e modulano il rilascio di fattori angiogenici e linfoangiogenici (Staiano et al., 2015). Tali recettori espletano una modulazione della risposta immunitaria anche in altre sedi correlate al sistema immunitario nelle quali vengono espressi come la milza, le tonsille, il timo, il tessuto osseo ematopoietico e i cheratinociti (Galiègue et al., 1995; Petrosino et al., 2010). La loro presenza è inoltre stata osservata anche a livello del pancreas e dell'apparato gastrointestinale (Galli et al., 2011). Anche i CB2, come i CB1, espletano la loro azione mediante attivazione di proteine Gi e Go, e dunque controllano i livelli di cAMP e l'azione di canali al calcio a voltaggio dipendenti (Demuth e Molleman, 2006; Jin et al., 2004). Sebbene gli effetti associati all'attivazione dei CB2 a livello del SNC non siano ancora chiari, è stato ipotizzato

un loro coinvolgimento nei disturbi del comportamento e nel consumo di sostanze d'abuso (Atwood e Mackie, 2010; Xi et al, 2011).

Le scoperte legate alla consistente mole di studi svolti dal momento della loro scoperta fino ai nostri giorni identificano i recettori CB1 e CB2 come principali mediatori degli effetti fisiologici legati al sistema endocannabinoide, sebbene negli ultimi anni sia stata avanzata la proposta, corroborata da evidenze crescenti, che anche altri recettori diversi dai recettori CB contribuissero alla modulazione della fisiologia endocannabinoide. Infatti è stato candidato come recettore cannabinoide un recettore fino a poco tempo fa definito "orfano" (per via della mancanza di associazione a un ligando endogeno), il GPR55 (Lauckner et al., 2008; Ryberg et al., 2007). Appartenente anch'esso alla grande famiglia dei GPCRs, il GPR55 è espresso in varie aree del SNC (Wu et al., 2013) così come a livello periferico (Ryberg et al., 2007) ed è implicato in processi del metabolismo lipidico e delle funzioni vascolari (Backer et al., 2006). Il suo ligando endogeno è stato identificato nel lisofosfatidilinositolo (Oka et al., 2007), ma tale recettore sembra essere attivato anche dal Δ^9 THC così come da alcuni agonisti sintetici inversi del recettore CB1, e la trasduzione del segnale a esso legata genera numerosi di effetti fisiologici come il rilascio di ioni Ca^{2+} , la modulazione di alcune proteine chinasi e l'aumento dell'espressione di diversi fattori di trascrizione (Pertwee, 2007).

Il recettore canale TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type-1), conosciuto come il recettore per la capsaicina, è legato a numerosi meccanismi fisiologici a livello centrale e periferico e rappresenta un altro recettore potenzialmente interconnesso al sistema cannabinoide, poiché tra le molecole che presentano affinità di legame verso di esso vi sono anche alcuni fitocannabinoidi ed endocannabinoidi (Iannotti et al., 2014).

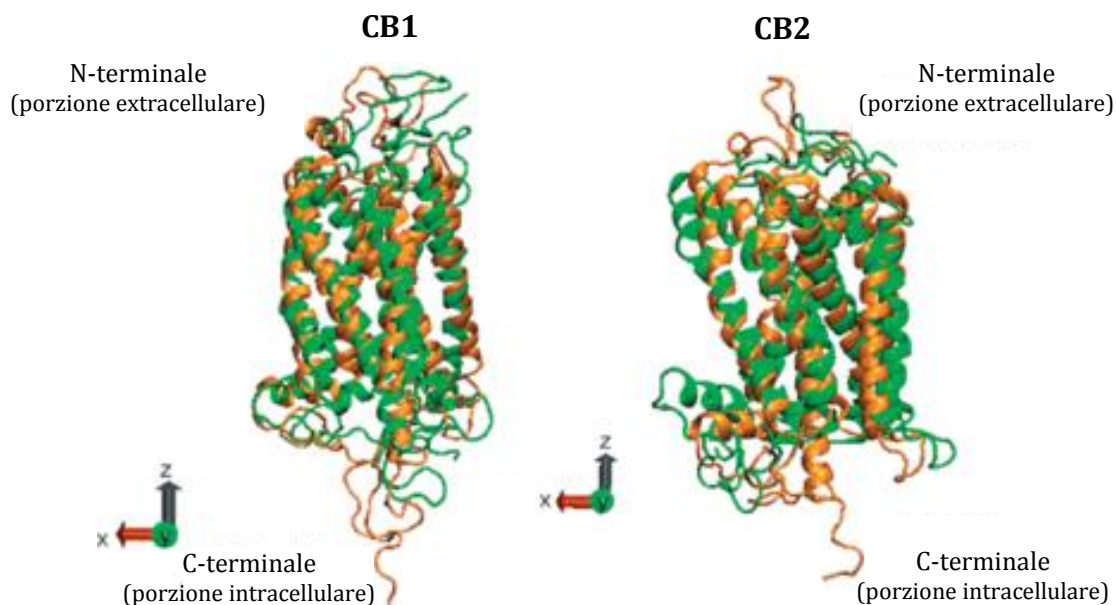


Figura 1. Rappresentazione della struttura molecolare dei recettori CB1 e CB2.

4.3 Endocannabinoidi

La scoperta dei recettori CB, sospinta dalle numerose ricerche volte alla comprensione del meccanismo d'azione della cannabis, ebbe da subito suscitato un forte interesse della comunità scientifica nei confronti di quelle molecole THC-simili che dovevano essere i ligandi endogeni dei nuovi recettori, e tale spinta portò Devane e colleghi già nel 1992, all'isolamento, a partire da estratti di cervello porcino, di una molecola di natura lipidica identificata come amide dell'acido arachidonico (N-arachidonoiletanamide), successivamente chiamata anandamide (AEA) dal sanscrito "*ananda*" (che significa stato di grazia o beatitudine), la quale mostrava un'elevata affinità per i recettori CB ed era in grado di mimare i principali effetti comportamentali indotti dal Δ^9 THC (Devane et al., 1992). Qualche anno più tardi Mechoulam dall'intestino di cane e Sugiura dal cervello di ratto isolarono quello che fu da subito considerato il secondo ligando endogeno, anch'esso di natura lipidica, che prese il nome di 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Con l'identificazione dei primi due ligandi endogeni nacque dunque la classe dei cannabinoidi endogeni o

endocannabinoidi. Oggi sappiamo che tale classe annovera al suo interno anche altri composti scoperti all'inizio del nuovo millennio, come il 2-arachidonoilgliceriletere (2-AGE o noladin-etero), l'O-arachidonoiletanolamina (virodamina) e la N-arachidonoildopamina (NADA), tutti in grado di interagire con i recettori CB (Hanus et al., 2001; Porter et al., 2002; Huang et al., 2002), sebbene AEA e 2-AG rimangono gli endocannabinoidi più importanti.

Vi sono inoltre delle altre molecole di natura endogena che non vengono considerate come endocannabinoidi ma che presentano delle analogie strutturali e funzionali con essi che le accostano ai meccanismi biologici del sistema endocannabinoide. Infatti tali molecole appartengono alla famiglia delle N-aciletanolamine (NAE) e risultano congeneri della AEA con la quale condividono delle particolarità strutturali e alcune vie metaboliche. Tra le NAE più rappresentative troviamo la palmitoiletanolamina (PEA) e l'oleiletanolamina (OEA) i cui effetti, compresi quelli di tipo endocannabinoide, non vengono mediati direttamente dai recettori CB ma risultano attribuibili all'interazione coi recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi (PPAR), e a un effetto "entourage" con il sistema endocannabinoide stesso (Fu et al., 2003; LoVerme et al., 2005).

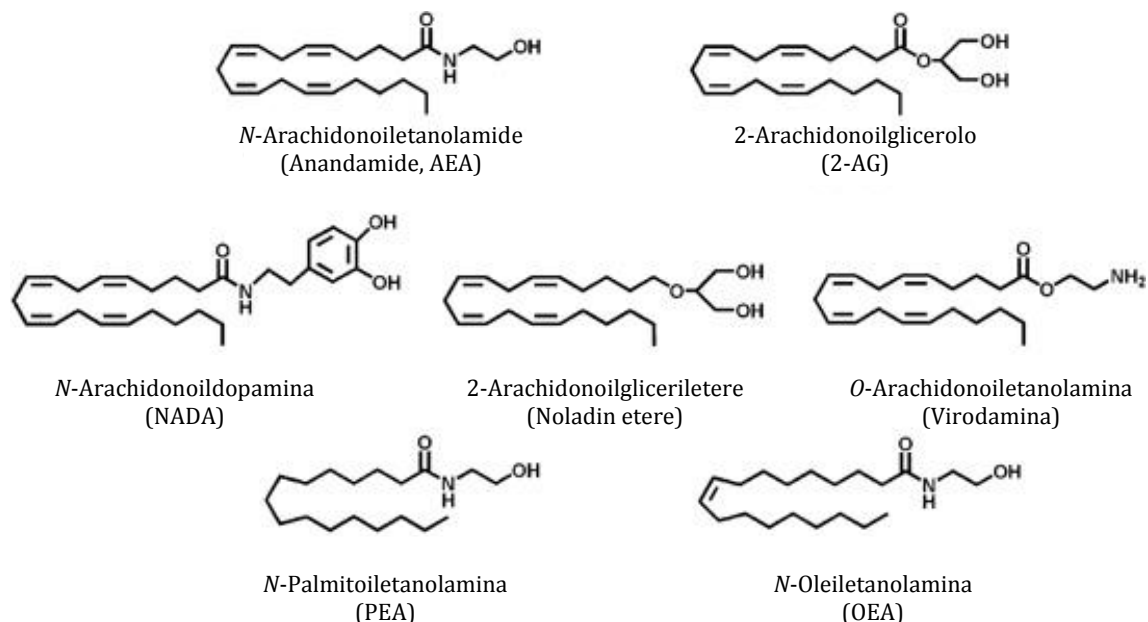


Figura 2. Formula di struttura degli endocannabinoidi

4.3.1 Metabolismo degli endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi sono considerati a tutti gli effetti neurotrasmettitori, tuttavia si differenziano per alcuni aspetti dai neurotrasmettitori classici infatti sebbene rispettino i principi peculiari per un neurotrasmettitore, tra i quali la sintesi intraneuronale, il rilascio in seguito a stimolazione adeguata, l'attività specifica sul bersaglio recettoriale, la ricaptazione e la degradazione, a causa della loro natura lipidica non vengono immagazzinati in vescicole e rilasciati tramite meccanismi di esocitosi bensì vengono prodotti "*on demand*", ovvero all'occorrenza a partire da precursori lipidici localizzati sulla membrana plasmatica e subito rilasciati (Piomelli, 2003). Inoltre gli endocannabinoidi vengono rilasciati dal terminale postsinaptico previa precisi stimoli fisiologici quali la depolarizzazione della membrana postsinaptica con conseguente aumento del Ca^{2+} intracellulare, e mediano un'azione retrograda di modulazione della sinapsi stessa attraverso l'azione sui recettori cannabinoidi posizionati sulla membrana presinaptica (Freund et al., 2003).

4.3.2 Biosintesi AEA

L'anandamide risulta essere un agonista parziale per entrambi i recettori CB, con una affinità maggiore per il recettore CB1, e interagisce inoltre con altri recettori come i PPAR e i TRPV1 (O'Sullivan, 2007). La sua biosintesi può seguire due diverse vie metaboliche indipendenti tra loro. La prima via si sviluppa a partire dall'azione delle fosfolipasi A₂ e D che a partire da fosfolipidi di membrana generano rispettivamente l'acido arachidonico (AA) e l'etanamina (Vinod e Hungund, 2005). Successivamente queste due molecole subiscono una condensazione diretta che porta alla formazione di AEA. Tale reazione di condensazione è catalizzata dall'idrolasi delle amidi degli acidi grassi (FAAH), enzima peraltro coinvolto anche nella degradazione della stessa AEA (Ueda et al., 1995). Questa via biosintetica sembrerebbe comunque non avere una rilevanza fisiologica a causa delle elevate concentrazioni dei substrati necessarie affinché essa possa innescarsi con successo (Okamoto et al., 2007). La seconda via

metabolica rappresenta dunque la via principale e si sviluppa in diverse fasi. Dapprima, l'attivazione dell'enzima N-acil-transferasi (NAT) ad opera del Ca^{2+} e del cAMP porta al trasferimento di una molecola di acido arachidonico dalla fosfatidilcolina alla fosfatidiletanolamina generando così la N-arachidonoil-fosfatidiletanolamina (NArPE). Successivamente, in relazione alla tipologia di precursori disponibili e al tipo di tessuto in cui avviene, tale via può seguire tre diverse direzioni: una prima via diretta che porta all'idrolisi di NArPE da parte della fosfolipasi NAPE-PLD e che genera una molecola di AEA e una di acido fosfatidico (Piomelli, 2003); una seconda via che procede con una doppia deacilazione di NArPE ad opera dell'idrolasi ABHD4 che genera prima la liso-NArPE e poi la glicerofosfoanandamide, la quale grazie all'azione dell'esterasi GDE1 si scinde in AEA e glicerol-P; e infine una terza via che vede in successione la formazione della fosfoanandamide a partire dall'idrolisi di NArPE mediata dalla fosfolipasi C (PLC), e la defosforilazione di quest'ultima con la generazione di AEA grazie a fosfatasi quali SHIP1 o PTPN22 (Piomelli, 2003; Di Marzo, 2011). Evidenze sperimentali indicano che ciascuna via sembrerebbe essere funzionale almeno a livello cerebrale (Muccioli, 2010; Simon e Cravatt, 2010).

4.3.3 Biosintesi 2AG

Il 2AG è diffuso a livello periferico ma soprattutto a livello centrale, dove si trova in concentrazioni marcatamente più elevate rispetto a AEA, circa 200 volte superiori (Piomelli, 2004). Esso si comporta come agonista puro dei recettori CB, per i quali mostra un'efficacia superiore a quella del conspecifico AEA (Howlett et al., 2002). Anche per 2AG esistono due vie di biosintesi: la principale ha origine a partire da precursori fosfolipidici di membrana appartenenti ai *sn*-arachidonoil-PIP₂, i quali grazie all'idrolisi catalizzata dall'enzima fosfolipasi C β generano l'intermedio diacilglicerolo (DAG). DAG a sua volta subisce l'idrolisi dovuta all'azione di due enzimi specifici noti come DAGL α e β , dislocati rispettivamente a livello centrale e periferico e sensibili alla concentrazione degli ioni Ca^{2+} , che porta alla formazione del 2AG (Di Marzo, 2011). L'altra via biosintetica riguarda la fosfolipasi A1 (PLA1),

capace di portare alla formazione di un liso fosfolipide che successivamente subisce una conversione a 2AG mediante l'azione di una liso-PLC (Piomelli, 2003).

4.3.4 Biosintesi altri endocannabinoidi

Se per i due endocannabinoidi principali sono note in dettaglio le molteplici vie di biosintesi, non si può dire altrettanto per i rimanenti cannabinoidi endogeni. Dai pochi dati che si conoscono in letteratura emerge come la sintesi della noladinetere sembra non essere legata al metabolismo dei fosfolipidi e risulta indipendente dalle concentrazioni citoplasmatiche di Ca^{2+} (De Petrocellis et al., 2004). Per quanto riguarda la NADA, dati preliminari indicano una reazione tra la dopamina e l'arachidonoil-coenzima A come principale meccanismo di sintesi (De Petrocellis et al., 2004). Infine per la virodamina, la cui distribuzione tissutale è sovente associata a quella di AEA (Porter et al., 2002), è stata avanzata l'ipotesi secondo la quale la sua sintesi possa avvenire mediante una trasformazione della N-acetiletanolamina nel suo corrispondente O-acil estere (Markey et al., 2000).

4.3.5 Degradazione degli endocannabinoidi

L'attività sinaptica modulatoria endocannabinoidergica viene a sua volta regolata con la ricaptazione degli endocannabinoidi verso il citoplasma cellulare e la loro degradazione mediante idrolisi enzimatica. Sebbene l'attività di ricaptazione sia stata ben documentata e misurata nei neuroni e negli astrociti, non altrettanto si può dire per i meccanismi che ne sono alla base, infatti a oggi è ancora dibattuta l'esistenza o meno di un trasportatore di membrana specifico per gli endocannabinoidi (EMT), per cui diverse ipotesi si sono fatte strada. Alla luce delle evidenze finora raccolte è stato proposto che la ricaptazione di AEA, così come del 2AG, possa avvenire con un processo di diffusione semplice, che almeno per AEA sembra in qualche modo legata anche all'attività dell'enzima FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase), o con processi di diffusione facilitata nel quale EMT svolgerebbe un ruolo chiave mediando un trasporto in relazione anche al gradiente di concentrazione degli endocannabinoidi (Nicolussi e Gertsch, 2015). Per il 2AG è

stato proposto altresì uno specifico meccanismo di trasporto facilitato nel quale intervengono dei trasportatori selettivi per questa molecola, che operano mediante processi di endocitosi a meccanismo caveolare (McFarland e Barker, 2004).

All'interno della cellula gli endocannabinoidi vanno incontro a rapida degradazione, infatti l'AEA subisce un idrossilazione che porta alla formazione di acido arachidonico ed etanolamina grazie all'azione della FAAH (Cravatt et al., 1996), una serina idrolasi che si presenta come proteina integrale di membrana preferenzialmente localizzata nelle zone somato-dendritiche dei neuroni (Vinod e Hungund, 2005). Sebbene AEA rappresenti il principale substrato per FAAH, tale enzima svolge la sua funzione anche su altre molecole come le NAE e sullo stesso 2AG (Saghatelian et al., 2004). Tuttavia l'idrolisi di quest'ultimo viene mediata principalmente da una monoacilglicerolipasi (MAGL), che porta alla formazione di acido arachidonico e glicerolo (Piomelli, 2003).

4.3.6 Meccanismo d'azione degli endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi agiscono come mediatori locali, legandosi ai recettori CB delle cellule circostanti il sito di rilascio. Mentre anandamide, noladin-etero e 2-arachidonil-dopamina sono funzionalmente più selettivi per il CB1, Virodammina sembra preferire il CB2 e il 2-AG ha una potenza simile su entrambi i tipi di recettori. I recettori CB sono accoppiati a proteine G, la cui attivazione stimola quei processi di segnalazione intracellulare comunemente associati a questo tipo di recettore (Pertwee, 1997). Gli effetti principali sono: inibizione dell'adenilatociclastasi, con riduzione degli effetti mediati da cAMP/proteinkinasi A; stimolazione delle mitogen-activated protein-kinasi; inibizione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti di tipo N e P/Q; stimolazione dei canali del potassio tipo TASK-1; stimolazione della fosfatidilinositol 3-kinasi e della mobilizzazione del calcio intracellulare.

A livello del SNC, la presenza di alte concentrazioni degli endocannabinoidi e dei loro recettori sulle sinapsi GABAergiche e glutammatergiche suggerisce il loro coinvolgimento nella modulazione, su richiesta dell'organismo, della trasmissione

sinaptica. In particolare, si è visto che il meccanismo d'azione degli endocannabinoidi a livello sinaptico è del tutto peculiare, in quanto essi, dopo il rilascio dalla terminazione postsinaptica, vanno ad agire in senso retrogrado su una terminazione presinaptica, attivando in questa sede il recettore CB1 e determinando, come ultimo risultato, il blocco transitorio del rilascio di GABA o glutammato. In particolare, l'eccitazione protratta del neurone presinaptico determina la depolarizzazione del neurone postsinaptico, ove attraverso un meccanismo mediato dall'apertura di canali del calcio voltaggio-dipendenti e la concomitante attivazione di recettori metabotropici, vengono attivati gli enzimi preposti alla sintesi dell'endocannabinoide a partire da un precursore lipidico. L'endocannabinoide, altamente lipofilo, esce dalla cellula postsinaptica e, attraverso una diffusione retrograda, lega il recettore CB1 del neurone presinaptico. Il recettore CB1 è dotato di 7 domini transmembrana ed è accoppiato a una proteina G, la cui attivazione determina il distacco delle subunità beta e gamma, che riducono direttamente l'ingresso di ioni calcio e il rilascio calcio-dipendente del neurotrasmettitore. Quando ciò si verifica a livello dei neuroni GABAergici, determina una riduzione dell'inibizione mediata dal GABA, un fenomeno descritto inizialmente da Llano (1991) e Pitler (1992), che prende il nome di "*depolarization induced suppression of inhibition*" (DSI), mentre quando avviene a livello dei neuroni glutammatergici determina una riduzione dell'eccitazione mediata dal glutammato, e si definisce "*depolarization induced suppression of excitation*" (DSE). (Bevan et al., 2002). A lungo andare, gli effetti degli endocannabinoidi sul rilascio presinaptico dei neurotrasmettitori possono influenzare il potenziamento a lungo termine (LTP-*long term potentiation*) a livello sinaptico, un processo importante per il rimodellamento e consolidamento delle sinapsi. Questo processo sarebbe inibito laddove è ridotta la trasmissione eccitatoria mediata dal glutammato, e facilitato ove è inibita la trasmissione inibitoria mediata dal GABA (Davis et al., 2002).

Oltre al meccanismo d'azione mediato dai recettori CB1 e CB2, sono recentemente emerse nuove evidenze che indicano degli effetti cannabinoidergici associati all'azione di altri recettori, infatti alcuni effetti neurocomportamentali legati all'azione dell'anandamide non sono aboliti da inibitori selettivi del CB1, e

permangono anche in topi knockout CB1^{-/-} (Di Marzo et al., 2002), e allo stesso tempo, l'endocannabinoide sembra in grado di attivare il recettore vanilloide tipo 1 (TRPV1), inducendo tipici effetti mediati da questo recettore (entrata di calcio e depolarizzazione). Essi spiegherebbero l'effetto vasodilatatore dell'anandamide (Zygmunt et al., 2000). Infine, gli endocannabinoidi sarebbero in grado di agire direttamente su alcuni canali ionici (di calcio e potassio).

4.4 Agonisti e antagonisti di sintesi

La crescita della ricerca volta alla comprensione del sistema cannabinoide sospinta fra l'altro dall'interesse sul suo potenziale come mediatore terapeutico per diversi stati patologici ha portato all'implementazione di diverse molecole di agonisti e antagonisti dei recettori CB. Allo stato attuale si contano numerosi agonisti cannabinoidi esogeni che sono suddivisi in 4 principali classi (EMCDDA, 2009): gli analoghi del THC, noti come cannabinoidi classici, caratterizzati da una struttura contenente un anello dibenzopiranic dei quali fanno parte HU-210 (Ottani e Giuliani, 2001), il nabilone e il Dronabinol; la serie dei cicloesilfenoli (CP) etichettati in letteratura come cannabinoidi "non classici", fra i quali troviamo molecole come CP 55,940, CP 47,497 e loro omologhi n-alchilici (Compton et al., 1992); la classe degli aminoalchilindoli o composti JWH (dal nome del loro inventore J.W. Huffman, 2009), che racchiude diverse sottoclassi quali naftilmetilindoli, naftoilpirroli, naftilmetilindani, fenilacetilindoli e naftoilindoli, ai quali appartiene il WIN 55,212-2 (WIN), agonista non selettivo per recettori CB (Pertwee et al., 1997; Selley et al., 2001); infine una classe di composti eterogenei, derivati sintetici dell'acido arachidonico strutturalmente correlati all'AEA. Al pari dei composti agonisti, sono state sintetizzate numerose molecole con effetti di antagonismo nei confronti dei recettori CB (Pertwee, 2005), fra le più importanti l'SR141716A, conosciuto col nome Rimonabant (Rinaldi-Carmona et al., 1994), che si comporta da agonista inverso selettivo per i recettori CB1, passato alle cronache per il suo ritiro dal mercato a breve tempo dalla sua immissione, per via di pericolosi effetti collaterali a esso associati.

4.5 Effetti degli endocannabinoidi sul Sistema Nervoso Centrale

L'ampia distribuzione dei recettori CB1 risulta indicativa della numerosità dei processi fisiologici nei quali il sistema endocannabinoide è direttamente coinvolto, sia a livello periferico che centrale. Fra i più importanti (sebbene in maniera relativa al contesto che si vuole considerare) ci sono i meccanismi di plasticità sinaptica, l'attività motoria, l'alimentazione, l'apprendimento, vi è la regolazione della nocicezione, della temperatura corporea e dei meccanismi di emesi, e ancora sono note azioni sul sistema immunitario, su quello cardiovascolare endocrino e sullo sviluppo cerebrale (Ligresti et al., 2016; Piomelli, 2003).



Figura 3. Ruoli fisiologici del sistema endocannabinoide

4.5.1 Plasticità sinaptica

Il sistema endocannabinoide rappresenta un importante regolatore della trasmissione sinaptica e come tale è coinvolto in molteplici meccanismi di plasticità sinaptica, principalmente per via dell'azione retrograda degli endocannabinoidi sui recettori CB1 situati presinapticamente. Infatti la diminuzione del rilascio di neurotrasmettitore mediato dall'azione del sistema endocannabinoide dà origine al fenomeno di plasticità a breve termine suddivisibile in due tipologie: nel caso di sinapsi glutamatergiche eccitatorie genera una soppressione dell'eccitazione indotta dalla depolarizzazione (DSE) e nel caso di sinapsi GABAergiche inibitorie genera una soppressione dell'inibizione indotta dalla depolarizzazione (DSI) (Kano et al., 2009). Tali meccanismi sono stati osservati in numerose aree cerebrali come l'ippocampo, il nucleo accumbens, i gangli della base, l'amigdala, il cervelletto e la corteccia cerebrale (Kano et al., 2009).

I recettori CB1 sono implicati anche nell'induzione della riduzione a lungo termine del rilascio del neurotrasmettitore dal terminale presinaptico, meccanismo noto come depressione a lungo termine (*Long Term Depression*, LTD) (Heifets e Castillo, 2009), che avviene in sede a sinapsi eccitatorie o inibitorie in numerose aree cerebrali tra le quali lo striato (Gerdeman et al., 2002), il nucleo accumbens (Robbe et al., 2002), l'area ventrale tegmentale (VTA) (Pan et al., 2008), l'amigdala (Marsicano et al., 2002) e la corteccia prefrontale (Lafourcade et al., 2007). È noto che per la generazione di LTD, è necessaria una stimolazione prolungata del recettore CB1 (Blednov e Harris, 2009), tali recettori non sembrano però coinvolti nelle fasi successive del mantenimento del fenomeno di plasticità (Kishimoto e Kano, 2006). Viceversa un altro importante meccanismo di plasticità sinaptica, il potenziamento a lungo termine (LTP), risulta essere modulato nel mantenimento ma non nell'instaurazione, dai fenomeni di LTD e DSI/E associati al sistema endocannabinoide (Carlson et al., 2002).

4.5.2 Addiction

Ciascuna sostanza d'abuso è caratterizzata da uno stimolo discriminativo che la contraddistingue rispetto alle altre in relazione agli effetti soggettivi, spesso gratificanti, che essa scatena nell'utilizzatore, portandolo a sperimentare una condizione di benessere che si traduce in un "rinforzo positivo", e la cannabis con i suoi effetti psicoattivi innesca tali processi di gratificazione e di rinforzo (Cooper e Haney, 2009). I meccanismi di gratificazione in natura si innescano in risposta a stimoli gratificanti primari come la ricerca del cibo, dell'acqua, il sesso e la cura della prole, le quali risultano attività essenziali per la sopravvivenza della specie, e le sostanze d'abuso agiscono sollecitando in maniera innaturale questi stessi meccanismi.

Il sistema meso-cortico-limbico è l'insieme di aree cerebrali nelle quali si integrano i meccanismi fisiologici alla base dei processi di gratificazione, di rinforzo positivo e motivazionali (Kelley e Berridge, 2002). Tale sistema è composto da aree corticali come la corteccia prefrontale, deputata al controllo di processi intellettivi e di coscienza; da aree più profonde come l'amigdala, nucleo di sostanza grigia situata alla base dell'encefalo, e l'ippocampo, struttura circonvoluta di corteccia dell'archipallio situata nel lobo temporale, i quali rivestono ruoli di regolazione dei meccanismi di apprendimento e memoria, e degli stati emozionali (Cattaneo, 1989; Koob e Volkow, 2010; Schoenbaum et al., 2006); e ancora da aree sottocorticali facenti parte dello striato tra le quali il nucleo accumbens, situato nell'area ventrale dello striato, importante nel controllo del movimento involontario e fulcro dell'integrazione dei meccanismi di ricompensa e motivazionali (Di Chiara, 2002). Le azioni della maggior parte delle sostanze d'abuso conducono, direttamente o indirettamente, a un aumento della trasmissione dopaminergica e glutamatergica a livello delle aree appena descritte (Spanagel e Weiss, 1999) e uno degli eventi salienti propri di queste sostanze riguarda l'aumento dei livelli extracellulari della dopamina nell'area del nucleo accumbens (Di Chiara e Imperato, 1988).

È noto che la cannabis genera un aumento del tono dopaminergico a livello del nucleo accumbens in maniera indiretta, infatti con l'attivazione dei suoi recettori CB1 a livello mesencefalico e proencefalico, il Δ^9 THC induce un effetto regolatorio che crea un cambio nello schema di *firing* dei neuroni dopaminergici di quest'area (French, 1997; Gifford et al., 1997; Diana et al., 1998; Gessa et al., 1998), il quale si traduce in un aumentato segnale dopaminergico nelle aree di proiezione tipiche di tali neuroni, fra tutte il nucleo accumbens (Cheer et al., 2004; Gessa et al., 1998; French et al., 1997).

Infatti diversi studi di microdialisi cerebrale effettuati in vivo hanno confermato come il cannabinoide inducesse un aumento significativo dei livelli di dopamina extracellulare nell'area del nucleo accumbens (NgCheong Ton et al., 1988; Tanda et al. 1997; Malone and Taylor, 1999), e lo stesso effetto è stato osservato anche con il cannabinoide sintetico WIN 55,212-2 sia dopo somministrazione acuta sia durante la sua autosomministrazione nel ratto (Tanda et al., 1997; Fadda et al., 2006). Tale aumento, sia nel caso del Δ^9 THC che del WIN 55,212-2, avveniva in maniera selettiva a livello della *shell* (Tanda et al., 1997), sottoregione del nucleo accumbens coinvolta con un ruolo di primo piano per la mediazione del *reward* indotto dalle sostanze d'abuso (Johnson et al., 1995; Pontieri et al., 1995; Carzelon and Wise, 1996; Gardner e Vorel, 1998). Il potenziale d'abuso dei cannabinoidi è ben documentato in letteratura, il WIN 55,212-2 induce un comportamento di auto somministrazione sia acuta nel topo *drug-naive* (Martellotta et al., 1998; Ledent et al., 1999) che cronica nel ratto (Fattore et al., 2001; Spano et al., 2004; Deiana et al., 2006), e il CP-55940 è capace di sostenere un comportamento di auto somministrazione intracranica nel ratto (Braidia et al., 2001).

Esistono evidenze che indicano un effetto diretto anche degli endocannabinoidi endogeni sui processi di gratificazione mediati da un azione specifica sul substrato neuroanatomico del *reward*: l'anandamide risulta in grado di suscitare un comportamento di auto somministrazione nelle scimmie Squirrel, e tale effetto viene bloccato dal pre-trattamento con l'SR141716A, antagonista del recettore CB1 (Justinova et al., 2005), e come nel caso degli esocannabinoidi citati prima, anche l'anandamide induce un aumento dei livelli extracellulari di dopamina selettivamente nell'area della *shell* del nucleo accumbens del ratto, effetto peraltro

potenziato dalla somministrazione dell'URB597, inibitore dell'enzima responsabile della sua degradazione (Solinas et al., 2006).

4.5.3 Apprendimento e memoria

Il sistema endocannabinoide è coinvolto a diversi livelli nella regolazione dell'apprendimento e della memoria, infatti i recettori CB1, ubiquitariamente distribuiti nel sistema nervoso centrale, presentano un'elevata densità nell'area dell'ippocampo, notoriamente coinvolta nei processi di apprendimento e memoria. Sono diversi i riferimenti bibliografici che dimostrano come gli agonisti esogeni dei recettori CB1 siano in grado di generare deficit nell'apprendimento e nella formazione della memoria spaziale (Ferrari et al., 1999), nella memoria di lavoro (Varvel et al., 2001) e nella memoria a lungo termine (Puighermanal et al., 2009). Allo stesso modo un aumento dei livelli di AEA mediante blocco farmacologico dell'enzima FAAH, così come un blocco dell'idrolisi di 2AG influiscono in maniera negativa sui processi di apprendimento e di memoria (Basavarajappa et al., 2014; Griebel et al., 2015). Tuttavia il sistema endocannabinoide sembra costituire una componente essenziale anche per una modulazione positiva di alcuni aspetti legati alla memoria, infatti in condizioni di stress elevato si è osservato un aumento dei livelli di 2AG nell'area dell'ippocampo in associazione a un miglioramento della memoria (Moreira e Wotjak, 2010).

Si pensa che l'effetto del sistema endocannabinoide sulla memoria sia legato all'inibizione del rilascio di diversi neurotrasmettitori come il GABA, il glutammato e l'acetilcolina a livello dell'ippocampo (Davis e Woodside, 2002), infatti la riduzione dei livelli di glutammato osservati nei casi di intossicazione da cannabis può indurre una conseguente riduzione dell'attivazione dei recettori N-metil-D-aspartato (NMDA) la quale comporterebbe un effetto negativo sul ruolo che tali recettori hanno nei processi di formazione della memoria. Ulteriori studi indicano il coinvolgimento dei cannabinoidi in altri aspetti legati alla memoria, infatti è stato osservato che il WIN è in grado di inibire la formazione della memoria aversiva nel paradigma dell'acquisizione del condizionamento alla paura (Pamplona e Takahashi, 2006), mentre un effetto bifasico dose dipendente dello stesso agonista

cannabinoide è stato osservato nell'estinzione del condizionamento alla paura: una dose alta induceva una interruzione dell'estinzione mentre la dose bassa sfociava in una facilitazione di tale processo (Pamplona et al., 2006). È stato proposto inoltre che gli endocannabinoidi siano in grado di promuovere la rimozione di ricordi spiacevoli mediante un'azione inibitoria sull'attività GABAergica amigdaloidea (Marsicano et al., 2002).

4.5.4 Attività motoria

Sia gli endocannabinoidi che gli esocannabinoidi sono in grado di influenzare l'attività motoria in maniera dose-dipendente (Romero et al., 1995), esercitando un effetto definito bifasico: basse dosi inducono un'attivazione motoria mentre dosi elevate sfociano in una soppressione dell'attività motoria fino all'insorgenza di catalessia (Drews et al. 2005; Polissidis et al. 2010; Rodvelt et al. 2007; Sulcova et al. 1998), e l'inibizione dell'attività dei recettori CB1 mediante azione antagonista dell'SR141716 reverte tali effetti (Polissidis et al., 2013).

I recettori CB1 risultano ampiamente distribuiti in aree deputate al controllo delle funzioni motorie come i gangli della base e il cervelletto, e la loro funzionalità in sede a tali aree risulta alterata sia in modelli animali che in pazienti affetti da diverse patologie neurologiche. A livello dei gangli della base si verifica l'integrazione dei segnali GABAergici e dopaminergici che regolano le vie "diretta" e "indiretta" notoriamente deputate al controllo dei movimenti. Tali segnali sono sottoposti a fine regolazione mediante meccanismi di plasticità sinaptica modulata dagli endocannabinoidi, specialmente a livello delle circuitazioni della via indiretta (El Manira e Kyriakatos, 2010), e ciò conferma un ruolo di primo piano svolto dal sistema endocannabinoide nel controllo delle funzioni motorie. Come per i gangli della base, anche a livello del cervelletto i meccanismi di plasticità sinaptica modulano e integrano i segnali per il controllo dei movimenti (Ito, 1972; 2001) ed è stato osservato come i processi di LTD nella corteccia cerebellare siano connessi al rilascio degli endocannabinoidi da parte delle cellule del Purkinje (Safó e Regehr, 2005). L'elevata diffusione dei recettori CB1 e il coinvolgimento degli

endocannabinoidi nei meccanismi di plasticità sinaptica in tutto il cervelletto fanno dunque pensare a un ruolo del controllo delle funzioni motorie da parte del sistema endocannabinoide anche in tale area, sebbene contestualmente non se ne conosce il reale grado di importanza (El Manira e Kyriakatos, 2010).

4.5.5 Comportamento alimentare

Le proprietà stimolanti l'appetito associate alla cannabis sono note da secoli, tuttavia l'effetto oreogigenico proprio del Δ^9 THC è stato dimostrato solo recentemente (Williams et al., 1998). Ultimamente la ricerca ha fornito una grossa mole di evidenze che supportano il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione del comportamento alimentare e del bilancio energetico attraverso meccanismi sia centrali che periferici (Coutts e Izzo, 2004; Di Marzo e Matias, 2005). Infatti è ben noto che la manipolazione farmacologica del sistema, attraverso l'azione di cannabinoidi esogeni come il Δ^9 THC, il CP55940 e il WIN, determina un aumento del consumo di cibo sia nell'uomo che negli animali da laboratorio (Cota et al., 2003; Dodd et al., 2009; Hart et al., 2002; Hollister, 1971; Koch e Matthews, 2001; Williams et al., 1998). Le principali aree centrali nelle quali il sistema endocannabinoide svolge la propria azione modulatoria per l'assunzione del cibo sono l'ipotalamo e il sistema mesolimbico (Matias e Di Marzo, 2007). Infatti è stato dimostrato che sia il Δ^9 THC che gli endocannabinoidi, quando somministrati localmente a livello dell'ipotalamo (Anderson-Baker et al., 1979; Hao et al., 2000; Jamshidi and Taylor, 2001; Verty et al., 2005) e del nucleo accumbens (Jamshidi and Taylor, 2001; Kirkham et al., 2002; Soria-Gòmez et al., 2007), sono in grado di aumentare il consumo di cibo in ratti sazi. Altresì si è appurato che la generazione di tali effetti di iperfagia sono mediati dall'attivazione dei recettori CB1, infatti una loro inattivazione farmacologica induce la scomparsa dei suddetti effetti (Kirkham et al., 2002; Soria-Gòmez et al., 2007), e un loro silenziamento genico (CB1-KO) porta a condizioni di magrezza e ipofagia nei topi (Wiley et al., 2005).

Tuttavia il sistema endocannabinoide sembra essere in grado di mediare anche degli effetti diametralmente opposti rispetto a quelli finora riportati, infatti sono diversi i riferimenti bibliografici preclinici che indicano un effetto bifasico dose dipendente degli agonisti cannabinoidi sul comportamento alimentare. La somministrazione di dosi elevate di esocannabinoidi, naturali o sintetici, può portare alla diminuzione della quantità di cibo assunto e a un conseguente rallentamento della crescita corporea (Biscaia et al., 2003; Rubino et al., 2008; Scherma et al., 2016; Radziszewska e Bojanowska, 2013).

4.5.6 Sviluppo del sistema nervoso

La programmazione delle cellule neuronali e in generale lo sviluppo del sistema nervoso centrale costituiscono processi delicati per i quali il sistema endocannabinoide svolge un ruolo di estrema importanza, soprattutto in fasi critiche come la vita intrauterina, il periodo postnatale e la fase adolescenziale. Gli endocannabinoidi e i recettori CB1 risultano ampiamente diffusi nel cervello fetale e la loro dislocazione così come i loro livelli sono soggetti a variazioni durante lo sviluppo embrionale (Berrendero et al., 1999). L'AEA presenta elevati livelli nelle prime fasi embrionali e svolge un ruolo importante nell'impianto dell'embrione e nel mantenimento della gravidanza (Paria et al., 2001), mentre i livelli del 2AG si accrescono durante la differenziazione delle cellule progenitrici neurali (Palazuelos et al., 2012).

L'esposizione agli esocannabinoidi nel periodo prenatale può incidere sullo sviluppo dei sistemi neurotrasmettitoriali come quello colinergico (Hernandez et al., 2000), serotoninergico (Molina-Holgado et al., 1996), GABAergico (Garcia-Gil et al., 1999), glutamatergico (Suarez et al., 2004) e oppioidergico (Fernandez-Ruiz et al., 2000; Vela et al. 1998). L'adolescenza rappresenta un altro periodo critico per l'azione modulatoria del sistema endocannabinoide.

5 La cannabis in adolescenza

Studi preclinici hanno dimostrato come durante l'adolescenza si verificano delle significative fluttuazioni transitorie nei livelli di AEA e 2AG così come nell'espressione dei recettori CB1 in aree cerebrali chiave per i processi di ricompensa e cognitivi come il NAc e la PFC (Ellgren et al., 2008; Rodriguez de Fonseca et al., 1993), e dunque sovrastimolazioni di natura esogena come l'abuso di cannabinoidi potrebbero creare delle perturbazioni nell'attività del sistema che si ripercuoterebbero sulle modulazioni fisiologiche a esso correlate. Inoltre numerosi studi suggeriscono che l'esposizione prolungata e/o ad alte dosi di *Cannabis* possa indurre cambiamenti strutturali a livello cerebrale (Matochik et al., 2005; Welch et al., 2011; Yücel et al., 2008), anche in base alla precoce età di utilizzo (Arnone et al., 2008; Wilson et al., 2000). In particolare uno studio sulla morfologia cerebrale condotto sull'uomo, ha dimostrato come l'uso di *Cannabis* in adolescenza determini una riduzione dei solchi cerebrali in entrambi gli emisferi, un assottigliamento dello spessore corticale nel lobo frontale destro, e in generale si verificherebbe dunque una rallentata girificazione cerebrale con conseguenti alterazioni morfologiche e asimmetrie emisferiche che si tradurrebbero in un'aberrazione del normale corso evolutivo cerebrale (Mata et al., 2010), ovvero in un rallentamento delle tappe evolutive.

L'esposizione alla cannabis in età adolescenziale può dunque impattare negativamente sullo sviluppo psicofisico e può aumentare il rischio dell'insorgenza di disordini cognitivi e stati patologici psichiatrici (Di Forti et al., 2007), infatti sono stati dimostrati effetti negativi sull'apprendimento, la memoria, l'attenzione (Fried et al., 2005; Harvey et al., 2007; Medina et al., 2007), e su processi di cognitivtà visiva (Tapert et al., 2002), così come un abbassamento del quoziente intellettivo verbale (Pope et al., 2002) e totale (Lyons et al., 2004; Meier et al., 2012), con una forte correlazione alla precoce età di esposizione alla Cannabis (Fontes et al., 2011; Pope et al., 2003). Tali deficit sembrano avere un decorso prolungato e permanere anche per più di un mese dalla sospensione dell'uso

(Medina et al., 2007), e sebbene sembrano risolversi dopo un'astinenza ancora più duratura (Pope et al., 2002), le alterazioni morfologiche cerebrali a essi associati sembrano perdurare anche dopo la loro scomparsa (Padula et al., 2007; Schweinsburg et al., 2008). L'uso di marijuana in adolescenza, soprattutto prima dei 15 anni, è stato associato alla comparsa di disturbi dell'umore (Fergusson et al., 2003) e all'aumento del rischio di insorgenza in età adulta di disordini depressivi o d'ansia (Hayatbakhsh et al., 2007; Henquet et al., 2006; Rey et al., 2004; Van Laar et al., 2007), e nei casi più gravi all'aumento di tendenze suicide (Moore et al., 2007; van Ours et al., 2013). Inoltre è noto come l'esposizione alla cannabis durante l'adolescenza possa generare l'insorgenza di disturbi psicotici sia acuti che a lungo termine (Ferdinand et al., 2005; Henquet et al., 2005; Le Bec et al., 2009) e possa indurre un peggioramento della sintomatologia in pazienti già affetti da tali disturbi (Levine et al., 2017).

Con l'utilizzo di modelli animali, diversi gruppi hanno condotto ricerche sperimentali sull'esposizione ai cannabinoidi durante l'adolescenza focalizzandosi principalmente su quegli aspetti cognitivi, emotivi e psicotici emersi con risalto dalle indagini epidemiologiche. Nella fattispecie si è visto che l'esposizione adolescenziale ai cannabinoidi, sia sintetici che naturali, induce dei deficit della memoria spaziale e di lavoro, che non si osservano invece con l'esposizione in età adulta (O'Shea et al., 2004 e 2006; Quinn et al., 2008; Realini et al., 2010; Schneider and Koch, 2003), e tali deficit correlano con alterazioni intraneuronali come la diminuzione di alcuni markers di plasticità sinaptica e dei livelli di espressione del recettore glutamatergico NMDA in aree come la corteccia prefrontale e l'ippocampo, e alterazioni nella ramificazione e nella densità delle spine dendritiche nel giro dentato dell'ippocampo (Rubino et al., 2009 a e b). Inoltre si è osservato come ratti trattati con cannabinoidi in adolescenza mostrano una ridotta interazione sociale, indicativa per gli stati ansiosi, (Leweke and Schneider, 2010; O'Shea et al., 2004 e 2006; Realini et al., 2010) così come alterazioni in paradigmi per la valutazione del comportamento da disperazione e dell'anedonia (Bambico et al., 2010; Rubino et al., 2008; Realini et al., 2010), i quali connotano un quadro comportamentale considerato simil-depressivo, e tali alterazioni comportamentali correlavano con modificazioni molecolari rapportabili a un profilo depressivo

come la disregolazione dei livelli del fattore di trascrizione CREB e della funzionalità del recettore CB1 in aree come la PFC, il NAc e l'amigdala (Rubino et al., 2008; Realini et al., 2010).

6 La cannabis come sostanza gateway

6.1 Evidenze epidemiologiche

I concetti chiave della *gateway hypothesis* costituiscono un valido approccio descrittivo per il quadro che emerge dai dati raccolti nei numerosi studi epidemiologici finora effettuati. La linearità del passaggio dalle sostanze lecite a quelle illecite, concetto centrale dell'ipotesi formulata da Denise Kandel, emergeva in maniera distinta nello studio dell'autrice, infatti quasi tutti gli adolescenti che avevano assunto cocaina o eroina avevano utilizzato dapprima alcol, tabacco e cannabis (Kandel, 2002; Kandel, 1975). In seconda istanza, in associazione a tale schema, nell'ipotesi affiorava l'importanza dell'uso regolare e continuato della cannabis in adolescenza poiché tale aspetto correlava con il successivo uso di cocaina e di eroina. Molte delle indagini condotte successivamente nell'ambito dell'abuso di sostanze tra i giovani hanno fornito dati che corroborano lo schema *gateway*. Da alcune analisi condotte negli Stati Uniti è emerso che solo il 7% dei giovani ha dichiarato di usare sostanze illecite senza prima aver usato cannabis, mentre la percentuale di coloro che hanno prima assunto la cannabis era molto più elevata (Kandel, 1984). La stessa correlazione è stata osservata anche in Australia, come riportato in diversi sondaggi sull'uso delle droghe (Donnelly e Hall, 1994): nell'indagine condotta nell'ambito della National Campaign Against Drug Abuse (NCADA) del 1993 per esempio è emerso come gli utilizzatori di eroina che avevano prima utilizzato regolarmente la cannabis erano 30 volte più numerosi rispetto a chi non aveva utilizzato cannabis, e in un'ulteriore indagine condotta nel 1998 emerse una relazione ancora più forte poiché coloro che dichiararono di aver regolarmente utilizzato cannabis mostravano una probabilità di consumo di eroina 78 volte maggiore rispetto a chi non l'aveva utilizzata (Donnelly e Hall, 1994). Tali aspetti, in linea con i presupposti delle *gateway hypothesis*, si configurano anche in uno studio di Degenhardt e colleghi (2010), i quali incrociando i dati di 17 paesi

diversi, fra i quali l'Italia, hanno trovato, ovunque ad eccezione del Giappone, un'elevata correlazione fra l'uso di tabacco e alcol e l'uso di cannabis, e in tutti i paesi esaminati, ancora una volta l'utilizzo della cannabis correla con il successivo uso di altre droghe illecite.

Il periodo dell'adolescenza, caratterizzato da una vera e propria riprogrammazione biologica, rappresenta dunque il substrato centrale e imprescindibile sul quale poggia l'intera concettualità della *gateway hypothesis*, e la precocità dell'età di inizio dell'uso di cannabis rappresenta un punto cardine della teoria, infatti risulta strettamente correlata con l'aumento delle probabilità che l'utilizzatore passi al consumo di altre sostanze illecite (Hall e Lynskey, 2005; Degenhardt et al., 2010; Golub e Johnson, 2002). Da un'indagine condotta sulla popolazione americana è emerso che per gli individui cui il primo utilizzo di cannabis avveniva a 14 anni o precedentemente, la percentuale di abuso e dipendenza da altre sostanze era maggiore rispetto a coloro il cui approccio al consumo della sostanza avveniva a un'età maggiore (SAMHSA, 2005).

In uno studio condotto da Lynskey e collaboratori (2003), col fine di verificare la relazione tra uso precoce di cannabis e uso successivo di altre sostanze illecite è stato analizzato un campione di 311 coppie di gemelli che riportavano il primo uso di cannabis in età inferiore a 17 anni da parte di uno solo dei gemelli di ciascuna coppia. Tale tipologia di campione consentiva di valutare un'eventuale nesso causale tra l'uso in adolescenza della cannabis e il successivo passaggio ad altre sostanze, al netto di eventuali influenze associate a variabili considerate simili (sebbene non identiche) fra fratelli gemelli come i fattori ambientali e genetici. Dall'analisi dei risultati emerse che l'uso precoce di cannabis era associato a un sensibile incremento del rischio sia di uso di altre droghe che di sviluppo di sindromi di abuso o dipendenza. Infatti sia i gemelli monozigoti che dizigoti che avevano utilizzato cannabis presentavano una più alta probabilità di utilizzare successivamente droghe pesanti rispetto ai loro fratelli gemelli: da 2 a 4 volte superiore era il rischio di cadere nell'uso di altre sostanze illegali e da 1.6 a 6 volte maggiore quello di sviluppare dipendenza da droga o alcol.

In generale, dalla sua formulazione a oggi, numerosi studi di natura epidemiologica, specialmente longitudinali, hanno contribuito al rafforzamento

dell'idea della *gateway hypothesis*. Partendo dai primi studi effettuati su adolescenti americani negli anni 70 (Kandel et al., 1986; Robins et al., 1970; Yamaguchi e Kandel, 1984), e proseguendo con studi provenienti da altri paesi come la Nuova Zelanda (Fergusson et al., 2006; McGee e Feehan, 1993), l'Australia (Coffey et al., 2000), la Germania (Hoefer et al., 1999), la Svezia (Stenbacka et al., 1992 e 1993), sono aumentate le evidenze che documentano come l'uso di cannabis in adolescenza spesso preceda l'uso di altre sostanze illecite. Recentemente Korhonen e colleghi (2010) hanno fornito ulteriori conferme attraverso uno studio longitudinale effettuato in paesi del nord Europa da cui si evince che una precoce esposizione alle sigarette può essere predittiva per un successivo uso di cannabis, inoltre Guxens e colleghi (2007), hanno riportato un'associazione fra il consumo di cannabis e il precedente uso di alcol e tabacco nei giovani di Barcellona e ancora Mayet e colleghi (2012) hanno confermato la tipica sequenza *gateway* per il consumo di sostanze in Francia, concludendo che l'uso di cannabis risulta correlato con la successiva sperimentazione di droghe illecite. Infine in un recentissimo lavoro, Keyes e colleghi (2016) tramite uno studio di coorte su un campione di giovani studenti americani riportano evidenze di una correlazione fra l'uso di sigarette, alcol e marijuana, e trovano un'associazione significativa fra il consumo di marijuana e il successivo consumo di cocaina.

L'ipotesi per la quale la cannabis sia una sostanza *gateway* e dunque di passaggio all'uso di altre sostanze illegali rappresenta il perno centrale della *gateway hypothesis*, tuttavia, sebbene sostenuta dalle evidenze raccolte in decine di anni di ricerche e di studi, tale ipotesi presenta delle criticità non trascurabili. L'uso di cannabis di per se non rappresenta un forte elemento predittivo dell'utilizzo di altre sostanze considerate più pesanti, bensì lo è la precoce età di inizio dell'utilizzo della stessa così come l'uso prolungato e regolare. Altresì tale schema non rappresenta la regola poiché la maggior parte dei giovani utilizzatori di cannabis non passano all'uso di altre droghe illecite (Hall e Lynskey, 2005), mentre dagli studi epidemiologici lo schema *gateway* è supportato da un'analisi che concettualmente si muove in direzione contraria, ovvero la maggior parte degli utilizzatori di droghe illecite hanno dapprima utilizzato la cannabis. Inoltre uno degli aspetti più importanti dell'ipotesi costituisce anche un elemento di criticità

della stessa, ed è rappresentato dal nesso di causalità che intercorre fra due sostanze, inteso come i meccanismi che sarebbero alla base del passaggio fra le due. Infatti per stabilire se l'uso di una sostanza causi direttamente l'inizio del consumo di un'altra appaiono insufficienti da un punto di vista tecnico i soli dati osservazionali epidemiologici per cui diverse obiezioni dal mondo scientifico sono state mosse a riguardo.

6.2 Evidenze precliniche

La ricerca preclinica rappresenta a tal proposito un valido campo di studio poiché offre gli strumenti e le condizioni utili per la riduzione delle variabili sopra riportate e consente una più accurata investigazione sulla validità dell'ipotesi di causalità all'interno della sequenza gateway, estendendo la ricerca anche ai meccanismi farmacologici e neurobiologici che potrebbero generarla. Diversi studi di laboratorio hanno dimostrato come alcune sostanze, quando somministrate in adolescenza, influenzano la risposta legata agli effetti relativi alla successiva somministrazione di altre sostanze diverse, come nel caso della nicotina (Collins e Izenwasser, 2004; McQuown et al., 2007), dell'MDMA (Aberg et al., 2007; Achat-Mendes et al., 2003; Daza-Losada et al., 2008) e dell'alcol (Ledesma et al., 2017), che risultano in grado di modificare la risposta agli effetti della cocaina.

Anche i cannabinoidi hanno la capacità di influenzare gli effetti associati ad altre sostanze d'abuso, infatti in letteratura sono diversi i casi di studio che, mediante l'utilizzo di modelli animali, hanno dimostrato come diversi agonisti cannabinoidi siano in grado di modulare gli effetti di rinforzo (Caillé e Parsons, 2003; DeVries e Pert, 2003; Navarro et al., 2001; Norwood et al., 2003; Solinas et al., 2003, 2005), e gli effetti motori (Cadoni et al., 2001; Gorriti et al., 1999; Lamarque et al., 2001; Muschamp e Sivy, 2002; Pontieri et al., 2001) di sostanze come agonisti oppioidi e anfetamina. Rodríguez-Arias e colleghi (2010) hanno osservato che un'esposizione al WIN in adolescenza aumenta gli effetti di rinforzo dell'MDMA nel test della *Conditioned Place Preference* (CPP), e Scherma e colleghi (2016) hanno riportato come l'esposizione in adolescenza al THC aumenta gli effetti di rinforzo del WIN nell'adulto, col modello dell'autosomministrazione.

Sono inoltre presenti in letteratura alcuni studi preclinici che riportano un'interazione del sistema endocannabinoide con gli effetti della cocaina, per esempio è stato osservato che topi knockout per i recettori CB1 mostrano una riduzione dell'autosomministrazione di cocaina (Soria et al., 2005), e lo stato d'ansia correlato agli effetti di tale sostanza viene modificato da una pre-esposizione al THC (Panlilio et al., 2007). In uno studio recente si è osservato come il trattamento di ratti adolescenti col cannabinoide sintetico WIN inducesse modificazioni del quadro sintomatico tipico dell'astinenza da cocaina, infatti in seguito alla sospensione del trattamento con lo psicostimolante gli animali mostravano differenze nei comportamenti d'ansia e depressivo simili (Aguilar et al., 2017). Inoltre è stato dimostrato che il pretrattamento in età adolescenziale (ma non in età adulta) con THC genera una sensibilizzazione crociata riscontrabile nell'aumento della risposta motoria alla cocaina (Dow-Edwards e Izenwasser, 2012), e un'esposizione al cannabinoide sintetico CP 55,940 in adolescenza sortisce un aumento del comportamento di autosomministrazione di cocaina in ratti femmine, le quali a un'analisi con la PET presentavano delle alterazioni metaboliche a livello cerebrale, nella fattispecie una iperattivazione della corteccia frontale e una ipofunzionalità della corteccia entorinale amigdaloidea, associate peraltro a un incremento dei livelli del trasportatore della dopamina (DAT) nel caudato putamen (Higuera-Matas et al., 2008, 2010).

In una visione di insieme, sebbene le evidenze e i risultati ottenuti con la ricerca preclinica non risultino esaustive né sufficienti per confermare la presenza di un nesso causale per il passaggio da una sostanza a un'altra, esse forniscono tuttavia delle conferme sulla capacità di alcune sostanze d'abuso, tra le quali i cannabinoidi, di indurre delle importanti alterazioni neurobiologiche, soprattutto in adolescenza, che talvolta sono in grado di modificare il meccanismo d'azione di altre sostanze, e di cambiarne gli effetti tipici e le risposte biologiche comportamentali a esse associate. Queste modificazioni potrebbero influire sulla propensione all'uso di determinate sostanze così come sul passaggio fra più tipologie, e potrebbero dunque essere alla base della condizione di vulnerabilità all'abuso.

7 Effetti dei cannabinoidi sul sistema nervoso centrale

7.1 Epigenetica

La disregolazione del naturale equilibrio neurochimico determinata dall'esposizione alle sostanze d'abuso sfocia molto spesso nell'attivazione di meccanismi responsabili di una modulazione dell'espressione genica e della conseguente trascrizione di diverse molecole, e più in generale nella formazione di numerose modificazioni biologiche che possono essere a breve e a lungo termine.

L'epigenetica è quella branca della scienza che studia i cambiamenti della regolazione dell'attività e dell'espressione genica che non dipendono dalla sequenza stessa del gene (NIH, Roadmap Epigenomics Program). I meccanismi epigenetici regolano la trascrizione genica modificando a diversi livelli la cromatina e la stessa struttura del DNA, senza mutarne la sequenza di basi.

Tra i meccanismi epigenetici principali ci sono le metilazioni a carico della catena del DNA, a livello dei residui di citosina intercalate in aree note come isole dinucleotidiche citosina-guanina (CpG) presenti all'interno di promotori genici. Le metilazioni a carico delle isole CpG, catalizzate da una famiglia di enzimi metiltransferasi (Okano et al., 1998), interagiscono con fattori di trascrizione e con l'RNA polimerasi influenzando la trascrizione genica (Abdul et al., 2017). Le modificazioni istoniche rappresentano un'altra tipologia importante di meccanismi epigenetici, e agiscono rimodellando la struttura cromatinica: ciascuna tipologia di istone (H2A, H2B, H3 e H4) che compone il nucleosoma, (unità fondamentale della cromatina), risulta modificabile nella sua porzione ammino-terminale attraverso processi di acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinizzazione e sumoilazione (Kouzarides, 2007), e queste trasformazioni contribuiscono a una regolazione del grado di compattezza della cromatina che si riflette sull'accessibilità dell'apparato trascrizionale e quindi sull'espressione genica. L'acetilazione rappresenta una delle principali modificazioni istoniche che

aumentano la trascrizione. Questo meccanismo avviene a opera di enzimi istone acetiltransferasi che acetilano dei residui di lisina a livello delle code istoniche e producono una decondensazione della cromatina che favorisce appunto la trascrizione. Il processo può essere contrastato dall'azione degli enzimi istone deacetilasi (Abdul et al., 2017). La metilazione costituisce un'altra modificazione istonica importante, è regolata da enzimi istone metiltransferasi e demetilasi e avviene a carico di residui di lisina e di arginina. Il grado di metilazione può variare, infatti possono formarsi a livello dello stesso sito, delle mono-, di- o trimetilazioni. In base al residuo amminoacidico, al sito e al grado la metilazione può sia aumentare che ridurre la trascrizione genica (Abdul et al., 2017).

7.2 Modificazioni epigenetiche e molecolari legate all'esposizione ai cannabinoidi

L'azione sulla trascrizione genica costituisce un aspetto cruciale dell'azione delle droghe e la modificazione della cromatina è il principale meccanismo epigenetico coinvolto in tale contesto. I componenti del sistema endocannabinoide appaiono tutti regolabili attraverso meccanismi epigenetici e per contro gli endocannabinoidi risultano implicati nella regolazione di numerosi processi naturali epigenetici sia a livello periferico che centrale (D'Addario et al., 2013). A considerazione di tali evidenze è comprensibile come una stimolazione esogena del sistema endocannabinoide possa ripercuotersi sui normali meccanismi epigenetici cellulari da esso controllati e possa inoltre comportare l'insorgenza di effetti neurobiologici sia a breve che a lungo termine. Infatti si è osservato come l'esposizione a un trattamento cronico con THC inducesse diverse metilazioni e acetilazioni in molteplici siti dell'istone H3, modulando la trascrizione genica in diverse aree cerebrali quali la corteccia prefrontale, l'ippocampo, il nucleo accumbens e l'amigdala, e tale modulazione figurava globalmente più complessa negli adolescenti rispetto agli adulti (Prini et al., 2017). L'azione del THC è stata associata anche a delle modificazioni significative nel nucleo accumbens, e precisamente a carico dell'istone H3 a livello dei geni per i recettori dopaminergici D2 e per il neuropeptide oppioide proencefalina (DiNieri et al., 2011; Tomasiwicz

et al., 2012; Spano et al., 2007) i quali risultano coinvolti in meccanismi di vulnerabilità all'abuso, e tali modificazioni sono state osservate sia nell'uomo che negli animali esposti al THC in periodi prenatale o adolescenziale, con effetti duraturi fino all'età adulta (DiNieri et al., 2011; Tomaszewicz et al., 2012). Inoltre l'esposizione prenatale ai cannabinoidi potrebbe portare ad alterazioni epigenetiche a livello di geni come *Dgl4* codificante per la proteina Psd-95 (post synaptic density protein 95), la quale risulta coinvolta nella regolazione dell'interazione fra dopamina e glutammato e, in associazione col recettore NMDA, in processi di plasticità sinaptica (Szutorisz e Hurd, 2016).

La modulazione della trascrizione associata all'azione delle sostanze d'abuso coinvolge diversi bersagli genici. Tra questi spiccano per importanza una serie di geni immediati precoci che codificano per fattori di trascrizione come c-Fos, Fos-B, Fra1 e Fra2, tutti appartenenti alla famiglia Fos e importanti nella formazione del fattore di trascrizione AP-1 (activator protein-1), che avviene mediante dimerizzazione con altri elementi della famiglia delle proteine Jun (Morgan e Curran, 1995). Infatti i membri della famiglia Fos risultano rapidamente indotti nello striato in risposta alla somministrazione di psicostimolanti in acuto, sebbene tale induzione risulti transiente e ritorni in breve tempo a livelli basali (Graybiel et al., 1990; Hope et al., 1992; Young et al., 1991). In tale contesto si differenzia per una più marcata stabilità Δ FosB, una variante tronca di FosB, la quale in seguito a somministrazione cronica di diverse sostanze d'abuso, si accumula a elevati livelli in aree come lo striato e l'aumento della sua espressione persiste per settimane anche dopo l'ultima somministrazione (Madsen et al., 2012; Nestler, 2008).

I cannabinoidi si annoverano tra le sostanze in grado di indurre la trascrizione dei geni immediati precoci appartenenti alla famiglia Fos, infatti la somministrazione di THC modula, anche in base al regime di trattamento adottato, i livelli di FosB e Δ FosB in aree come lo striato, l'ippocampo e la corteccia prefrontale (Lazenka et al., 2015; Rubino et al., 2004; Porcella et al., 1998), e l'induzione di Δ FosB sembrerebbe influenzare gli stessi effetti dei cannabinoidi attraverso una modulazione indiretta del sistema oppioide endogeno, così come mediante azione diretta di desensitizzazione e *downregulation* dei recettori CB1 (Lazenka et al., 2012).

Un altro fattore di trascrizione importante nei meccanismi d'azione delle sostanze d'abuso è CREB (cAMP response element-binding protein), il quale viene espresso in maniera ubiquitaria in tutto il cervello. Questo fattore viene attivato nella sua forma fosforilata (pCREB) da numerose vie di segnalazione intracellulari, e una volta attivato recluta CBP (CREB-binding protein), proteina che esercita un'attività acetil transferasica a livello istonico: l'attivazione di tale complesso porta alla promozione della trascrizione di numerosi geni (Arias et al., 1994; Chan e La Thangue, 2001; Lonze e Ginty, 2002). Sebbene le sostanze d'abuso inducano un rapido aumento dei livelli di pCREB nello striato (Choe et al., 2002; Kano et al., 1995; Walters and Blendy, 2001), il suo ruolo nei processi di *addiction* non appare del tutto chiaro. Infatti la sovraespressione di CREB nella *shell* del nucleo accumbens è stata associata a una diminuzione delle proprietà di ricompensa della cocaina osservata nel paradigma della CPP e viceversa la sua diretta inibizione, così come l'ablazione del gene per CREB, inducono l'aumento della ricompensa nella CPP (Carlezon et al., 1998; Pliakas et al., 2001) e un aumento della sensibilità alle proprietà attivanti degli psicostimolanti (Fasano et al., 2009; Madsen et al., 2012). Queste evidenze supportano l'ipotesi che CREB sia alla base di meccanismi omeostatici che riducono la risposta alle droghe (Dong et al., 2006; McClung e Nestler, 2003), tuttavia numerosi studi hanno fornito evidenze contrarie, ovvero la presenza di CREB, soprattutto a livello della *shell* del NAc (Green et al., 2010; Larson et al., 2011) e della PFC (McPherson et al., 2010), risulta un fattore importante nell'aumento della ricompensa nel paradigma dell'autosomministrazione di cocaina. Tali divergenze possono derivare da numerose variabili quali la tipologia della sostanza, la natura delle somministrazioni (volontaria o involontaria) e le aree cerebrali così come le tipologie neuronali nei quali CREB viene attivato.

Il sistema endocannabinoide risulta implicato nella modulazione di CREB in diverse aree cerebrali. Per esempio è noto che col blocco dei recettori CB1 si ha una riduzione dei livelli di pCREB nell'ippocampo e nel nucleo accumbens (Zhang et al., 2016), e l'inibizione dell'enzima di degradazione dei cannabinoidi FAAH sfocia in un aumento dei livelli di CREB attivo in sede all'ippocampo e alla corteccia frontale (Su et al., 2016). In linea con tali evidenze è stato dimostrato che una

modulazione da parte del sistema endocannabinoide, mediata da cannabinoidi esogeni, si riflette sul grado di attivazione di CREB, infatti l'esposizione acuta a diverse dosi di THC porta a un aumento dei livelli attivi della proteina a livello dello striato, del cervelletto, della corteccia prefrontale e dell'ippocampo, e a una diminuzione nell'area dell'amigdala (Rubino et al., 2004 e 2008; Casu et al., 2005), mentre esposizioni ripetute al cannabinoide generano una riduzione a livello del cervelletto e dell'ippocampo (Casu et al., 2005; Fan et al., 2010), sebbene un diverso protocollo di esposizione ripetuta al THC abbia mostrato anche un aumento a livello ippocampale (Rubino et al., 2008).

Un altro candidato molecolare, il fattore di iniziazione eucariotico 2 (eIF2), sta assumendo una posizione di rilievo nelle ricerche sugli effetti delle sostanze d'abuso. Il fattore eIF2 è un complesso eteromero costituito da tre differenti subunità (α, β, γ), che svolge un ruolo primario nei processi di traduzione dell'mRNA grazie al suo legame con un gruppo GTP, e come tale risulta importante nella regolazione della sintesi proteica (Wek et al., 2006). eIF2 è integrato nei meccanismi di risposta allo stress, infatti risulta bersaglio di diverse proteine chinasi come GCN2, PERK o HRI (Han et al., 2001; Teske et al., 2011; Wek et al., 2004) che attivandosi durante situazioni di stress specifiche, inducono la fosforilazione della subunità α (p-eIF2 α). Nello stato fosforilato p-eIF2 α inibisce eIF2B, che rappresenta il fattore di scambio nucleotidico responsabile della costituzione della forma attiva della stessa eIF2-GTP. Tale inibizione blocca dunque la riattivazione del fattore di iniziazione e sfocia in un blocco globale della sintesi proteica e alla contemporanea attivazione della traduzione di pochi prodotti genici specifici per la generazione della *integrated stress response* (ISR), che consiste in un insieme di vie metaboliche che hanno l'obiettivo di ripristinare l'omeostasi cellulare (Pakos-Zebrucka et al., 2016). Il ristretto numero di proteine che vengono tradotte da p-eIF2 α (tra le quali ATF3, ATF4 e CHOP) possono, a seconda dell'intensità della condizione di stress, indurre delle risposte infiammatorie, innescare il processo di apoptosi o possono sfociare in un meccanismo regolatorio a feedback nel quale l'inibizione generale della traduzione proteica indotta da p-eIF2 α porta all'induzione di GADD34, la quale promuove un

ripristino della traduzione attraverso il reclutamento della proteina fosfatasi 1 (PP1) (Ma e Hendershot, 2003).

La defosforilazione di eIF2 α risulta importante per il ripristino della sintesi proteica generale ed è importante nei processi di formazione della memoria a lungo termine: è stato osservato infatti che un'infusione a livello ippocampale di Sal003, un molecola inibente la defosforilazione di p-eIF2 α , blocca l'induzione dei meccanismi di LTP e della memoria a lungo termine (Costa-Mattioli et al., 2007), inoltre evidenze cliniche e precliniche hanno riportato la presenza di elevati livelli di p-eIF2 α nella patologia dell'Alzheimer (Chang et al., 2002; Ma et al., 2013). Il controllo della traduzione associato alla fosforilazione di eIF2 α risulta implicato anche in processi di *addiction*: Huang e colleghi (2016) hanno dimostrato che in topi adolescenti (ma non negli adulti), basse dosi di cocaina portavano a una riduzione di p-eIF2 α nell'area della VTA in correlazione a un aumentato rinforzo associato alla sostanza. Inoltre anche altre sostanze d'abuso come la metanfetamina, l'alcol e la nicotina sono in grado di indurre una riduzione dei livelli di p-eIF2 α nella VTA, la quale influisce sugli effetti comportamentali delle sostanze (Huang et al., 2016; Placzek et al., 2016).

8 Premesse e obiettivi del presente studio

Sebbene il quadro delle ricerche epidemiologiche fornisca in generale degli indizi che corroborano l'ipotesi della cannabis come sostanza *gateway*, a oggi ancora non si hanno evidenze biologiche e molecolari che provino in maniera esaustiva un nesso di causalità tra gli effetti della cannabis e il passaggio all'abuso di altre sostanze. Il presente studio si colloca nell'ambito di un progetto di ricerca più ampio nato da una collaborazione fra il nostro gruppo e quello del prof. Erik Kandel della Columbia University di New York, che ha come obiettivo generale lo studio degli effetti dell'esposizione ai cannabinoidi nel contesto della *gateway hypothesis*.

Partendo da studi preliminari *in vitro*, volti alla caratterizzazione degli effetti molecolari e biochimici indotti dall'esposizione ai cannabinoidi, il gruppo del prof. Kandel ha dimostrato come l'esposizione prolungata al WIN inducesse un abbassamento dei livelli della forma fosforilata di eIF2 α , in colture cellulari simil-neuronali. Tale evidenza risultava in linea con quanto già presente in letteratura relativamente ad altre sostanze d'abuso, per cui, col fine di indagare i meccanismi cellulari sottesi alla riduzione della fosforilazione di eIF2 α hanno eseguito un sequenziamento del RNA delle cellule. Dai risultati è emerso che tra i primi 20 geni la cui espressione era stata modificata (upregolati e downregolati), vi era il gene *Gadd34* (*Ppp1r15a*), la cui espressione era aumentata e il cui prodotto genico, GADD34, agisce come proteina scaffold e fra le varie funzioni recluta la proteina fosfatasi 1 (PP1) con la quale induce una defosforilazione di p-eIF2 α (Choy et al., 2015).

Questo quadro poneva GADD34 quale candidato ideale responsabile della defosforilazione di p-eIF2 α , dunque il passo successivo è stato valutare in che modo il WIN causasse l'incremento dei livelli di GADD34. Gli studi hanno portato alla prima osservazione che spiegasse tale meccanismo: il WIN aumenta i livelli di acetilazione dell'istone 3 a carico della lisina 27 (H3K27ac) lungo l'intero gene *Gadd34* (all'interno del quale risulta abbondantemente diffusa), indice di un

aumento della trascrizione, e inoltre si è osservato come il responsabile dell'aumento di questa acetilazione fosse CREB-binding protein (CBP), un enzima con attività istone acetil transferasica attivo sui residui lisinici di H3, che previa esposizione al WIN presenta un aumento della sua collocazione nucleare rispetto a quella citoplasmatica e mostra elevati livelli di occupazione a livello dei siti di inizio trascrizione (TSS) presenti nel gene *Gadd34*.

Essendo presente a livello del gene *Gadd34* una sequenza parziale della caratteristica successione nucleotidica dei siti *cAMP-responsive elements* (CRE; TGACG, 132 nucleotidi a monte della regione TSS), il gruppo della Columbia University ha ipotizzato un ruolo del fattore di trascrizione CREB nella riduzione dei livelli di p-eIF2 α . CREB infatti detiene come bersaglio d'azione proprio i siti CRE e interagisce in maniera funzionale con il fattore CBP. Infatti, da uno studio di immunoprecipitazione della cromatina è emerso che il WIN porta a un aumento del grado di occupazione di CREB nel sito TSS di *Gadd34*, e contemporaneamente a un aumento dei livelli della forma attiva fosforilata p-CREB. Infine, considerando che la fosforilazione di CREB viene indotta da diverse vie di traduzione del segnale, compresa la via della mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases (MAPK/ERK) (Kida and Serita, 2014), e che come noto i cannabinoidi come il THC sono coinvolti nell'attivazione della via di ERK1/2 (Bouaboula et al., 1995; Tortoriello et al., 2014) il gruppo di ricerca ha voluto valutare i livelli della forma attiva fosforilata di ERK1/2 (p-ERK1/2): dalle analisi è emerso un aumento dei livelli di p-ERK1/2 mediato dal WIN, effetto contrastato dall'inibizione dei recettori CB.

Nel loro insieme queste scoperte sono in grado di fornire delle prove dell'esistenza di una via metabolica (schematizzata in figura 4) che dimostra come l'esposizione al WIN culmini nella defosforilazione di p-eIF2 α .

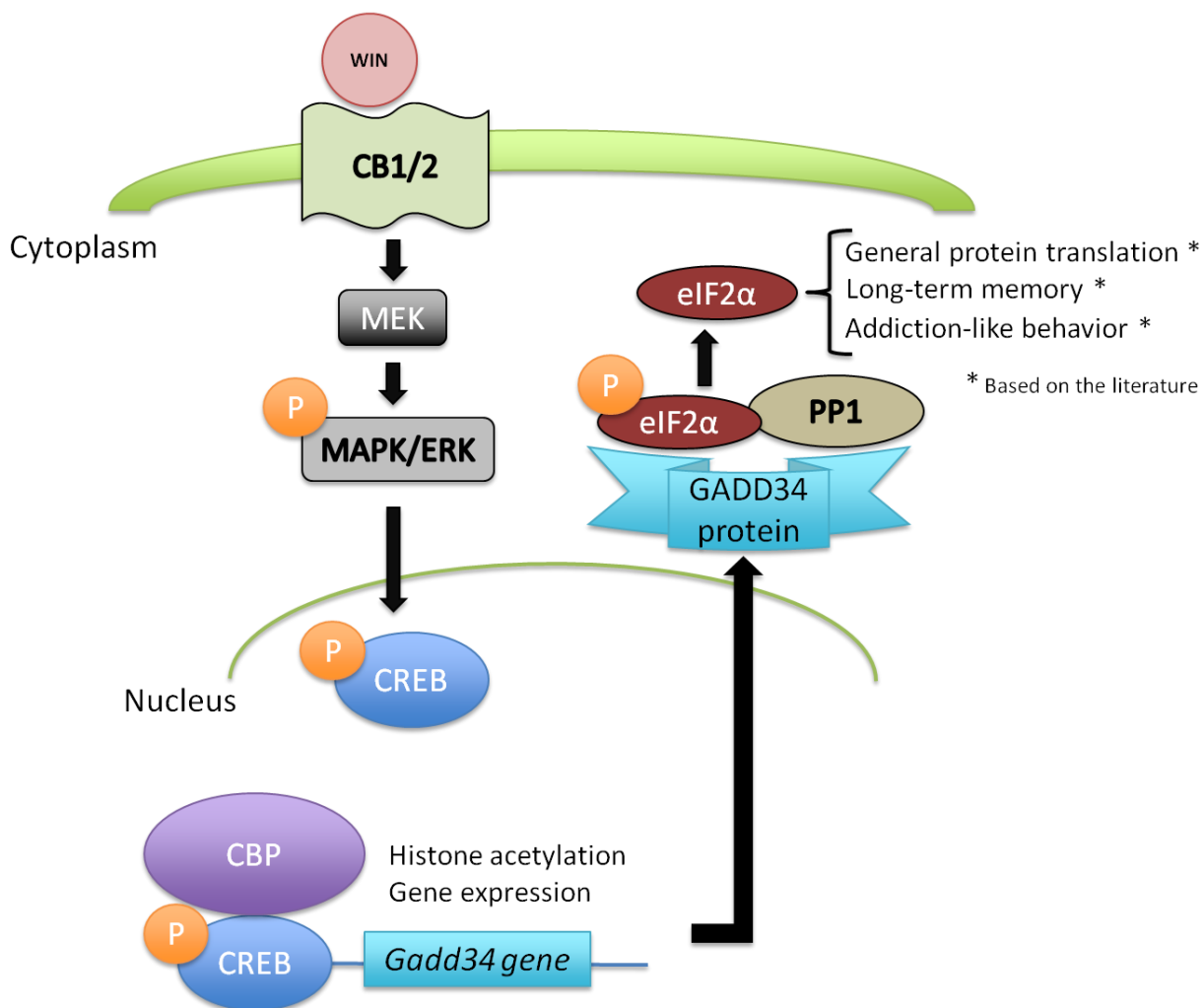


Figura 4. Via metabolica proposta per la diminuzione dei livelli di p-eIF2 α mediata dal WIN

Considerando che l'organismo animale rappresenta un sistema assai più complesso rispetto alla singola cellula, e che il periodo dell'adolescenza, che rappresenta una delicata fase di vulnerabilità agli effetti avversi della cannabis, non può essere riprodotto *in vitro*, il passaggio successivo, ambito nel quale si colloca lo studio della presente tesi, è stato quello di traslare queste ricerche su un modello *in vivo* che ci permettesse di testare gli effetti del WIN sia nella fase critica adolescenziale che nella fase adulta.

Per tale fine, servendoci di ratti maschi del ceppo Sprague Dawley, abbiamo utilizzato un disegno sperimentale (riportato nella sezione materiali e metodi) che, mediante un protocollo di esposizione cronica (11 giorni) a dosi crescenti di WIN,

ci consentisse di mimare il forte abuso della cannabis nell'uomo. In seguito, per poter valutare se il cannabinoide, specialmente nell'adolescenza, inducesse degli effetti capaci di incidere sulla sensibilizzazione e sulla vulnerabilità all'uso di altre sostanze d'abuso come gli psicostimolanti, si è proceduti con un periodo di sospensione dei trattamenti col WIN e una successiva esposizione a una diversa sostanza d'abuso (cocaina: 24 ore e 8 giorni dopo la fine del trattamento col cannabinoide).

Come precedentemente riportato, studi presenti in letteratura e gli stessi studi preliminari sopra citati, indicano che alcuni degli effetti indotti dai cannabinoidi sono correlati a modificazioni epigenetiche che sfociano in un'alterazione dell'espressione genica e della traduzione proteica, le quali possono condurre sia a dei cambiamenti di tipo transitorio che a modificazioni più stabili a lungo termine. Sulla base di queste evidenze, il primo obiettivo della presente tesi è stato dunque quello di valutare se il trattamento cronico con WIN, effettuato sia in adolescenza che in età adulta, fosse in grado di modificare in specifiche aree cerebrali coinvolte nei meccanismi dell'*addiction* [PFC, NAcc, caudato-putamen (CPu), amigdala (Amig) e ippocampo (Ipp)], i livelli di alcune acetilazioni istoniche notoriamente associate all'attivazione della trascrizione genica (H3K27ac, H2Bk20ac e H4K5-16ac). Altresì, considerando quanto già osservato *in vitro* e alla luce delle recenti evidenze bibliografiche che indicano come le azioni molecolari associate a diverse sostanze d'abuso, come l'alcol, la cocaina, la metanfetamina e la nicotina, convergano tutte nella riduzione dello stato fosforilato di eIF2 α , meccanismo che in adolescenza sembra influire sulla sensibilizzazione agli effetti di queste sostanze (Huang et al., 2016; Placzek et al., 2016), abbiamo voluto valutare l'azione del WIN, in adolescenti e adulti, sui livelli cerebrali di p-eIF2 α così come delle proteine che *in vitro* risultano coinvolte nel meccanismo di defosforilazione del fattore di traduzione, ovvero pERK1/2, pCREB, CBP e GADD34. Inoltre abbiamo valutato i livelli cerebrali di Δ FosB, molecola fortemente implicata nei meccanismi d'azione delle sostanze d'abuso. A tal fine, i sacrifici degli animali, adolescenti e adulti, e l'immediata dissezione delle aree cerebrali oggetto dei saggi di western blot sono stati effettuati a 24 ore e a 9 giorni dall'ultima somministrazione di WIN.

Il secondo obiettivo della presente tesi è stato quello di esaminare, sia nei ratti adolescenti che negli adulti, la risposta comportamentale legata agli effetti dell'esposizione cronica al WIN a breve e a lungo termine. A tale scopo abbiamo valutato dapprima la possibile presenza di alterazioni cognitive legate al trattamento cronico col WIN mediante test di *pre-pulse inhibition* (PPI), effettuato 24 ore dopo l'ultima somministrazione del WIN. Il test della PPI costituisce un valido paradigma per valutare il grado di integrità del *gating* motorio sensoriale, il quale rappresenta un processo neurale che permette la filtrazione e l'elaborazione delle informazioni sensoriali che portano all'immediata implementazione di una adeguata risposta di tipo motorio, e un'alterazione della PPI nella risposta allo spavento è considerata un indice della presenza di deficit cognitivi e viene associata a diversi disordini neuropsichiatrici, come disturbi psicotici, disturbi d'ansia e dell'attenzione (Swerdlow and Geyer, 2000; Fendt e Koch, 2013).

Successivamente abbiamo valutato la possibile presenza di una sensibilizzazione crociata locomotoria agli effetti della cocaina, il quale rappresenta un modello ampiamente validato in letteratura e costituisce uno degli approcci più utilizzati nel campo della ricerca sull'*addiction* (Robinson e Berridge, 2003; Vanderschuren e Kalivas, 2000).

Da un punto di vista farmacologico per sensibilizzazione si intende un aumento progressivo degli effetti basali di un farmaco, quando somministrato in maniera ripetuta, e rappresenta un meccanismo opposto a quello della tolleranza, che pure si instaura con le medesime esposizioni ripetute. I meccanismi di sensibilizzazione neuronale si ripercuotono sulle funzioni fisiologiche a essi correlate, e molto spesso generano una sensibilizzazione di tipo comportamentale che si divide in due classi principali di effetti: gli effetti incentivo-motivazionali e gli effetti eccitomotori (Robinson e Berridge, 2003). Diverse sostanze d'abuso, compresi i cannabinoidi, sono in grado di generare nell'uomo e negli animali da laboratorio una sensibilizzazione eccitomotora riscontrabile con un aumento della locomozione, così come un incremento dell'esplorazione, della vigilanza e dell'attenzione (Robinson e Berridge, 2003; Vanderschuren e Kalivas, 2000), e tale tipologia di sensibilizzazione è considerata un parametro coinvolto nel più ampio fenomeno della farmacodipendenza (Robinson and Berridge, 1993; Stewart and

Badiani, 1993; Vanderschuren and Kalivas, 2000), infatti i meccanismi d'azione sottesi in entrambi i fenomeni modificano l'attività dopaminergica e glutamatergica a livello del circuito cortico-meso-limbico. Alla luce di tale analogia lo studio sperimentale dell'eventuale sensibilizzazione crociata fra due sostanze diverse costituisce uno degli approcci più validi nel campo della ricerca sull'abuso, per la comprensione dei meccanismi di interazione presenti fra due o più composti che si riflettono nei processi di ricompensa e di rinforzo.

I cannabinoidi rappresentano una classe di sostanze d'abuso in grado di generare una sensibilizzazione comportamentale e in molteplici casi si sono osservati effetti di sensibilizzazione crociata con altre sostanze. Infatti si è osservato come un pre-trattamento con dosi crescenti di THC suscitò nei ratti una sensibilizzazione comportamentale di tipo motorio osservata dopo un periodo di sospensione e una successiva riesposizione alla stessa sostanza così come una sensibilizzazione crociata indotta dall'esposizione alla morfina, e in maniera speculare un pre-trattamento con la morfina induce i medesimi effetti di sensibilizzazione crociata in seguito a successiva esposizione al THC (Cadoni et al., 2001; 2008). Analogamente, è stato documentato come una pre-esposizione al cannabinoide sintetico WIN inducesse una sensibilizzazione crociata di tipo motoria in seguito alla successiva esposizione all'eroina (Pontieri et al., 2001). L'anfetamina risulta essere un altro composto coinvolto in processi di sensibilizzazione crociata di tipo comportamentale in ratti pre-esposti a trattamenti cronici di THC (Lamarque et al., 2001) e di WIN (Muschamp e Siviy, 2002). Inoltre, Dow-Edwards e Izenwasser hanno riportato delle evidenze di una cross-sensibilizzazione tra il THC e la cocaina esclusivamente in ratti adolescenti, infatti nel loro lavoro dimostrano come nei ratti adulti un trattamento cronico con il THC diminuisce l'attività motoria rispetto ai controlli e la successiva somministrazione di cocaina induce un'eccitazione motoria che non presenta differenze fra i trattati e i controlli; lo stesso trattamento con THC effettuato sugli adolescenti non sortisce alcuna riduzione nella motilità e la successiva somministrazione di cocaina genera una risposta motoria più elevata rispetto al gruppo non trattato in precedenza col THC, indicando la presenza di sensibilizzazione crociata fra le due sostanze (Dow-Edwards e Izenwasser, 2012).

Attualmente la cocaina è lo stimolante illecito maggiormente utilizzato in Europa, circa l'1,9% dei giovani adulti nella fascia di età compresa tra 15 e 34 anni hanno assunto cocaina almeno una volta nell'ultimo anno (EMCDDA, 2017), e in alcuni paesi si registra una tendenza all'aumento del consumo e spesso il suo uso si succede o si sovrappone a quello della cannabis. Il motivo principale che spinge al consumo di questa droga è la sua capacità di generare in acuto uno stato di "high" determinato dal blocco dei trasportatori delle monoamine a livello centrale, specialmente della DA, e tale condizione è contraddistinta da sensazioni di benessere, euforia, aumentata energia e vigilanza associate alla concomitante riduzione del senso di fatica e della fame.

Per tali ragioni la cocaina si presentava come lo psicostimolante ideale per valutare la presenza di una sovrapposizione fra i suoi effetti e quelli associati al WIN. A tale scopo abbiamo sottoposto sia i ratti adolescenti che i ratti adulti, a una somministrazione acuta di cocaina durante il monitoraggio dell'attività motoria, a 24 ore e a 8 giorni di distanza dall'ultima somministrazione del canabinoide, per la valutazione della presenza di un'eventuale sensibilizzazione crociata di tipo motorio.

9 Materiali e metodi

9.1 Animali

Per gli esperimenti sono stati utilizzati ratti maschi della specie Sprague Dawley (SD) (Harlan Italy, S. Pietro al Natisone, Italia), rispettivamente di 35 *post natal day* (PND, ovvero giorni post nascita) gli adolescenti e 70 PND gli adulti al momento dell'arrivo. Gli animali sono stati stabulati in numero di 4 per ciascuna gabbia, in condizioni di temperatura (21 ± 2 °C) e umidità (60%) costanti, con un regime di ciclo luce/buio artificiale della durata di 12 ore (ciclo di luce dalle 7.00 alle 19.00). Gli animali sono stati manipolati delicatamente durante la settimana precedente l'inizio dei test e hanno avuto libero accesso ad acqua e cibo durante l'intero periodo di stabulazione. I trattamenti farmacologici e i test comportamentali sono stati condotti durante il periodo di luce e prima di ciascun test gli animali sono stati sottoposti a un periodo di abitamento alle condizioni ambientali delle stanze di sperimentazione. Tutte le procedure e gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato Etico per la Sperimentazione sugli Animali dell'Università di Cagliari e dal Ministero della Salute, e sono stati condotti nel rispetto delle normative vigenti in Italia, previste dal D.L. 26/2014 che attua la direttiva europea 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

9.2 Farmaci

WIN 55,212-2 mesylate ([R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl) methyl] pyrrol [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-yl]-(1-naphthalenyl) methanonemesylate]); TocrisBioscience, UK) è stato disciolto in 2% Tween 80 (Sigma-Aldrich, UK), 2% etanolo (Sigma-Aldrich, UK) e 96% sodio cloruro 0,9%. Una soluzione composta dalle medesime percentuali di etanolo, Tween 80 e sodio cloruro è stata utilizzata come soluzione veicolo per i gruppi di controllo.

La cocaina cloridrato (MacFarlan Smith Ltd., Edinburgh, UK) è stata disciolta in soluzione di sodio cloruro 0,9%. La stessa soluzione salina è stata utilizzata come sostanza veicolo per i gruppi di controllo.

Ciascun farmaco utilizzato è stato preparato il giorno dell'esperimento ed è stato somministrato intraperitonealmente (i.p.) in un volume di 1 ml·kg⁻¹.

9.3 Disegno sperimentale e trattamenti

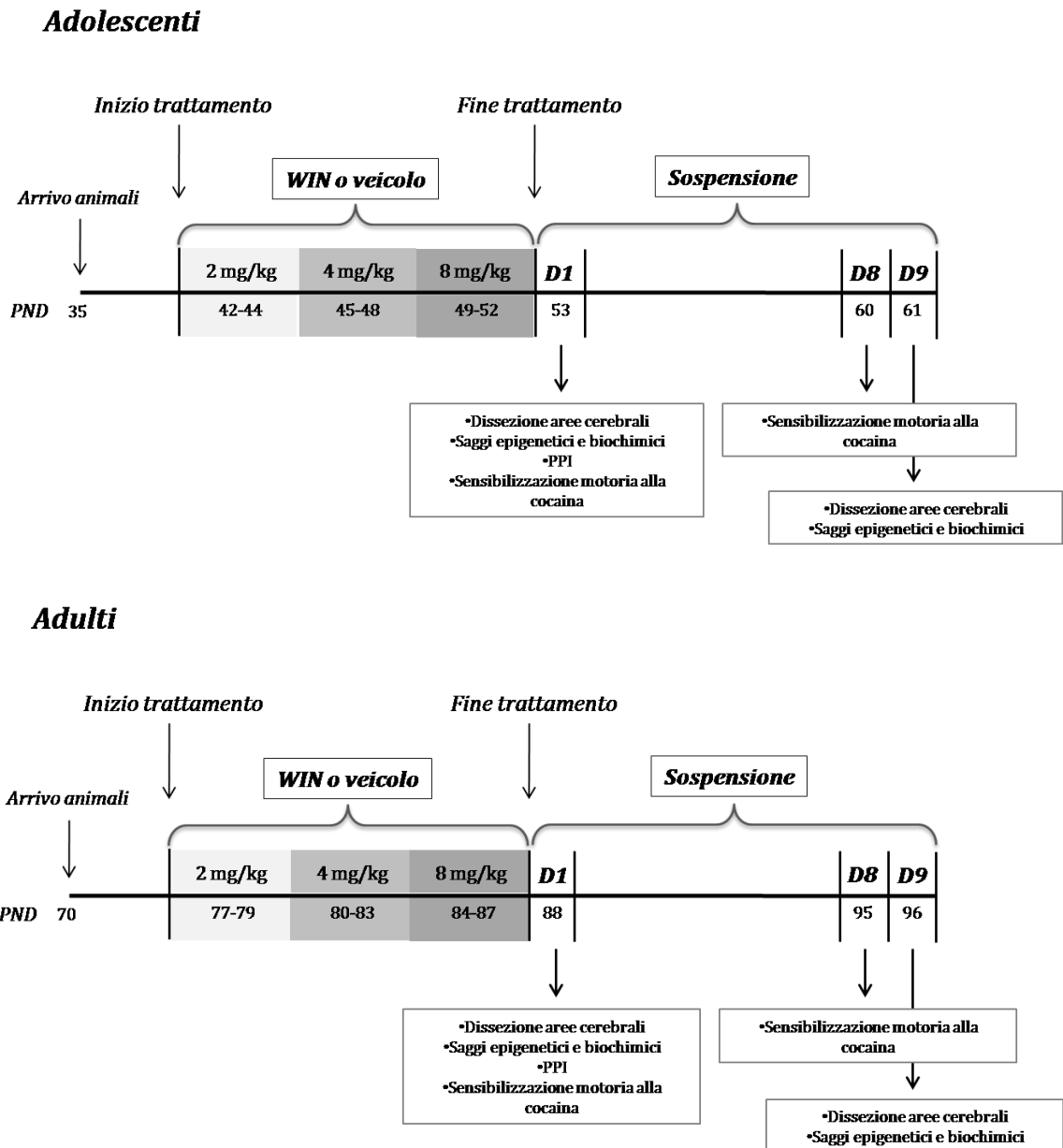


Figura 5. Schema del disegno sperimentale dei ratti adolescenti e adulti.

Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato un gruppo di ratti adolescenti (42 PND al momento di inizio del trattamento) e un gruppo di ratti adulti (77 PND al momento di inizio del trattamento). Il disegno sperimentale (fig. 5) ha previsto una prima fase di esposizione prolungata al WIN che mimasse il consumo di cannabis osservato nell'uomo (Realini et al., 2011; Scherma et al, 2016). A tale scopo, sia i ratti adolescenti che i ratti adulti sono stati sottoposti a un trattamento cronico della durata di 11 giorni, articolato in due iniezioni giornaliere (9:00 e 17:00) di dosi crescenti di WIN (o del relativo veicolo): 2 mg·kg⁻¹ (da 42 PND a 44 PND per gli adolescenti; da 77 PND a 79 PND per gli adulti); 4 mg·kg⁻¹ (da 45 PND a 48 PND per gli adolescenti; da 80 PND a 83 PND per gli adulti); 8 mg·kg⁻¹ (da 49 PND a 52 PND per gli adolescenti; da 84 PND a 87 PND per gli adulti). La scelta di tali dosaggi è stata valutata sulla base di evidenze presenti in letteratura che indicano lo sviluppo di una sensibilizzazione crociata tra il cannabinoide e l'eroina (Pontieri et al., 2001).

La seconda fase sperimentale ha consistito nella sospensione dei trattamenti col WIN e nello studio degli effetti comportamentali e neuromolecolari associati al trattamento cronico col cannabinoide, così come alla sua interazione con gli effetti suscitati dall'esposizione alla cocaina.

Per lo studio delle modificazioni epigenetiche e molecolari si è proceduto con i sacrifici e la dissezione delle aree di interesse in due diversi intertempi: nel D1 (53 PND per gli adolescenti e 88 PND per gli adulti) coincidente con un tempo di 24 ore dopo l'ultima somministrazione di WIN, e nel D9 (61 PND per gli adolescenti e 96 PND per gli adulti: 9 giorni dopo la sospensione del trattamento con WIN), coincidente con un tempo di 24 ore dopo lo svolgimento dei test comportamentali. Gli studi comportamentali si sono svolti nei giorni D1 e D8 (quest'ultimo coincidente col 60 PND per gli adolescenti e 95 PND e per gli adulti: 8 giorni dopo la sospensione del trattamento con WIN). Gli esperimenti di PPI sono stati eseguiti nel D1. Gli esperimenti di attività motoria sono stati effettuati in concomitanza con una esposizione alla cocaina (10 mg·kg⁻¹) nel D1 e nel D8.

9.4 Prelievo del tessuto e raccolta delle aree cerebrali

Per la raccolta delle aree cerebrali si è proceduto con il sacrificio degli animali eseguito mediante decapitazione, col prelievo del cervello e la immediata dissezione delle aree di interesse, le quali sono state rapidamente congelate mediante contatto con ghiaccio secco e successivamente conservate a -80°C . Le aree cerebrali raccolte sono la corteccia prefrontale (PFC), il nucleo accumbens (NAcc), lo striato dorsale (caudato e putamen, CPu), l'amigdala (Amig) e l'ippocampo (Ipp).

Tecniche biochimiche

9.5 Estrazione proteica e western blot

La lisi cellulare e l'estrazione proteica è stata eseguita utilizzando N-PER™ Neuronal Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) per l'estrazione proteica totale, NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) per i frazionamenti citoplasmatici e nucleari, e EpiQuik Total Histone Extraction Kit (EpiGentek; Epigentek Group Inc., Farmingdale, NY, USA) per le estrazioni istoniche. Ai reagenti di estrazione è stato aggiunto il mix Pierce™ Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets (Thermo Scientific). La concentrazione proteica è stata misurata utilizzando il Pierce™ Detergent Compatible Bradford Assay Kit (Thermo Scientific) e la corsa elettroforetica di uguali quantità per ciascun campione è stata eseguita su 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Biorad; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) secondo procedure standard per il western blot. In seguito all'incubazione con gli anticorpi primari e secondari, e appropriati lavaggi, le bande proteiche di interesse sono state visualizzate sia con sistema di rilevamento a fluorescenza (Odyssey Classic; LI-COR, LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA) che a chemiluminescenza (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent; GE Healthcare, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA). Se nella stessa membrana erano visualizzate più di una proteina di interesse, la membrana stessa veniva strappata e riprocessata con l'utilizzo di

WesternSure® ECL Stripping Buffer (LI-COR) o di Restore™ Fluorescent Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific). I seguenti anticorpi primari sono stati utilizzati per le relative proteine o modificazioni proteiche: fosfo-eIF2 α (Ser51) (#9721, Cell Signaling; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), eIF2 α (#2103, Cell Signaling), GADD34 (sc-8327, Santa Cruz; SantaCruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) o GADD34 (10449-1-AP, Proteintech; Proteintech Group, Inc., Rosemont, IL, USA), beta Actina (ab6276, Abcam; Abcam PLC, Cambridge, UK), CBP (sc-583, Santa Cruz), Nucleolina/C23 (sc-8031; Santa Cruz), FosB/ Δ FosB (#2251, Cell Signaling), istone H3 acetil K27 (39133, Active Motif; Active Motif, Inc., Carlsbad, CA, USA), istone H3 (ab10799, Abcam), istone H2B acetil K20 (ab177430, Abcam), istone H2B (ab52484, Abcam), istone H4 acetil-(K5, K8, K12, K16) (06-866, EMD Millipore), istone H4 (ab17036, Abcam), CREB fosfo S133 (ab32096, Abcam), CREB (ab178322, Abcam), fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101, Cell Signaling), ERK 1/2 (sc-514302, Santa Cruz). L'analisi delle immagini e la quantificazione delle proteine di interesse sono state effettuate con l'utilizzo di Image Studio™ Software (LI-COR) o ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; [Schneider et al., 2012]). I dati ottenuti sono stati normalizzati con un appropriato target di riferimento (i.e. la beta-Actina per gli estratti cellulari totali o per gli estratti citoplasmatici, la Nucleolina per gli estratti nucleari, e il totale degli istoni H2B/H3/H4 per gli estratti istonici) e successivamente trasformati in differenze *fold-change* in relazione al gruppo controllo.

9.6 Analisi statistiche

Il numero dei campioni utilizzato per le analisi statistiche è riportato nella discussione dei risultati di ciascun esperimento. I valori sono rappresentati come medie \pm errore standard (SEM). La normalità dei valori è stata esaminata mediante test di Shapiro-Wilk. La comparazione fra due gruppi è stata eseguita mediante test di Mann-Whitney e *unpaired* t-test di Student per le analisi parametriche. Si è utilizzato il test di Grubbs per la ricerca e l'esclusione dei probabili outliers. La significatività statistica è stata impostata al valore di $P \leq 0.05$. Tutte le analisi

statistiche sono state eseguite col programma GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Test comportamentali

9.7 PPI del riflesso da spavento acustico

L'apparato utilizzato per la misurazione della *Pre Pulse Inhibition* (PPI) del riflesso da spavento acustico è composto da 4 camere insonorizzate e ventilate (Med Associated, St Albans, VT, USA). All'interno di ciascuna camera è contenuta la *startle cage*, un cilindro di Plexiglas non restrittivo (9 cm di diametro) allocato su un accelerometro piezoelettrico connesso a un convertitore analogico-digitale. Due altoparlanti, in grado di generare dei suoni quali il rumore di fondo e i *burst* acustici, sono posizionati in prossimità della *startle cage*, in modo da permettere una propagazione ottimale del suono attraverso la stessa, con una minima variazione di 1 dB. Il protocollo sperimentale utilizzato per il test è stato precedentemente descritto da Frau *et al.* (2016). Ciascun ratto è stato posizionato nella gabbia sperimentale per un periodo di 5 minuti di acclimatazione in presenza di un rumore bianco di fondo di 70 dB (emesso per tutta la durata del test) seguito da tre blocchi prova consecutivi: il primo e il terzo blocco contraddistinti entrambi da una successione di 5 impulsi sonori singoli di 40 ms ciascuno dell'intensità di 115 dB, mentre il secondo blocco (il blocco del test vero e proprio) consistente in una sequenza pseudo randomizzata di 50 impulsi sonori di tre diverse tipologie: 12 impulsi singoli di 115 dB, 30 impulsi di 115 dB preceduti da pre-impulsi delle intensità di 74, 78 o 82 dB (10 per ciascuna intensità), e 8 impulsi muti dove è diffuso il solo rumore di fondo. La percentuale di PPI è stata calcolata valutando esclusivamente i dati del secondo blocco, usando la seguente formula: $100 - [(media\ ampiezza\ dello\ spavento\ per\ le\ prove\ di\ pre-impulso+impulso / media\ ampiezza\ dello\ spavento\ per\ le\ prove\ di\ impulso\ singolo) \times 100]$. Gli animali sono stati testati al termine del pre-trattamento, 24 ore dopo l'ultima somministrazione di WIN.

9.8 Attività motoria

Nei giorni D1 e D8, gli animali sono stati sottoposti individualmente al test dell'attività motoria mediante l'utilizzo del Digiscan Animal Activity Analyser (Omnitech Electronics, USA), composto da 4 gabbie operative della grandezza di 42 x 30 x 60 cm, ciascuna delle quali equipaggiata con due set di 16 fotocellule a raggi infrarossi distanziate 2,5 cm l'una dall'altra, posizionati parallelamente al pavimento a un'altezza di 4 cm per rilevare l'attività motoria orizzontale, e un ulteriore set di 16 fotocellule con le medesime caratteristiche delle precedenti, regolabili in altezza in base alla taglia degli animali per valutarne i movimenti verticali. Il test è stato condotto in regime di luce attenuata. Gli animali sono stati dapprima collocati nella stanza dell'esperimento per circa 30 minuti al fine di consentire una giusta acclimatazione al nuovo ambiente. All'inizio della sessione sperimentale ciascun animale è stato posizionato individualmente all'interno della gabbia sperimentale per 30 minuti, tale periodo di abituamento consentiva un raggiungimento basale ottimale dei parametri di attività motoria.

Successivamente gli animali sono stati trattati con cocaina ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e l'attività locomotoria è stata monitorata per ulteriori 60 minuti (test vero e proprio), con rilevazioni dei valori a intertempi di 10 minuti. In tale contesto abbiamo suddiviso gli animali in 4 gruppi sperimentali: veicolo/salina (pre-trattamento cronico con veicolo e prova motoria con soluzione salina); WIN/salina (pre-trattamento cronico con WIN e prova motoria con soluzione salina); veicolo/cocaina (pre-trattamento cronico con veicolo e prova motoria con cocaina); WIN/cocaina (pre-trattamento cronico con WIN e prova motoria con cocaina). I parametri da noi valutati sono stati la distanza percorsa, ovvero il totale del percorso orizzontale misurato in cm e l'attività verticale, intesa come numero totale di interruzioni dei raggi infrarossi. Per ciascun parametro abbiamo valutato la curva temporale dei valori rilevati a ogni intertempo, e le conte cumulative totali, ovvero le medie delle somme dei valori di tutti gli intertempi relativi ai 60 minuti di test. Tra una sessione e la successiva le pareti dell'apparato sono state pulite con H_2O_2 in modo da limitare ogni possibile traccia olfattiva.

9.9 Analisi statistiche

Tutti i dati sono espressi come MEDIA \pm SEM. Le valutazioni statistiche dei dati relativi alla crescita corporea e all'assunzione di cibo durante i pre-trattamenti cronici sono state determinate mediante ANOVA a due vie (studio dell'interazione Trattamento x Tempo) seguita dal test *post hoc* di Bonferroni per le comparazioni multiple. Le analisi statistiche dei dati relativi ai test di attività motoria sono state effettuate tramite ANOVA a due vie (studio dell'interazione Trattamento x Tempo) per le curve temporali e ANOVA a una via (studio del fattore Trattamento tra i gruppi) per le conte cumulative. Qualora tali analisi abbiano riportato significatività statistiche, si è proceduto con l'analisi *post hoc* di Bonferroni per valutare le comparazioni multiple. La valutazione statistica dei dati riguardanti gli esperimenti di PPI è stata eseguita utilizzando L'ANOVA a due vie per le 3 intensità di pre-impulso (studio dell'interazione Trattamento x intensità di impulso) e l'*Unpaired t* test di Student per la risposta allo spavento acustico. La significatività statistica è stata impostata al valore di $P \leq 0.05$. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite col programma GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

10 Risultati

10.1 Peso corporeo e quantità di cibo assunto nei ratti trattati cronicamente con WIN

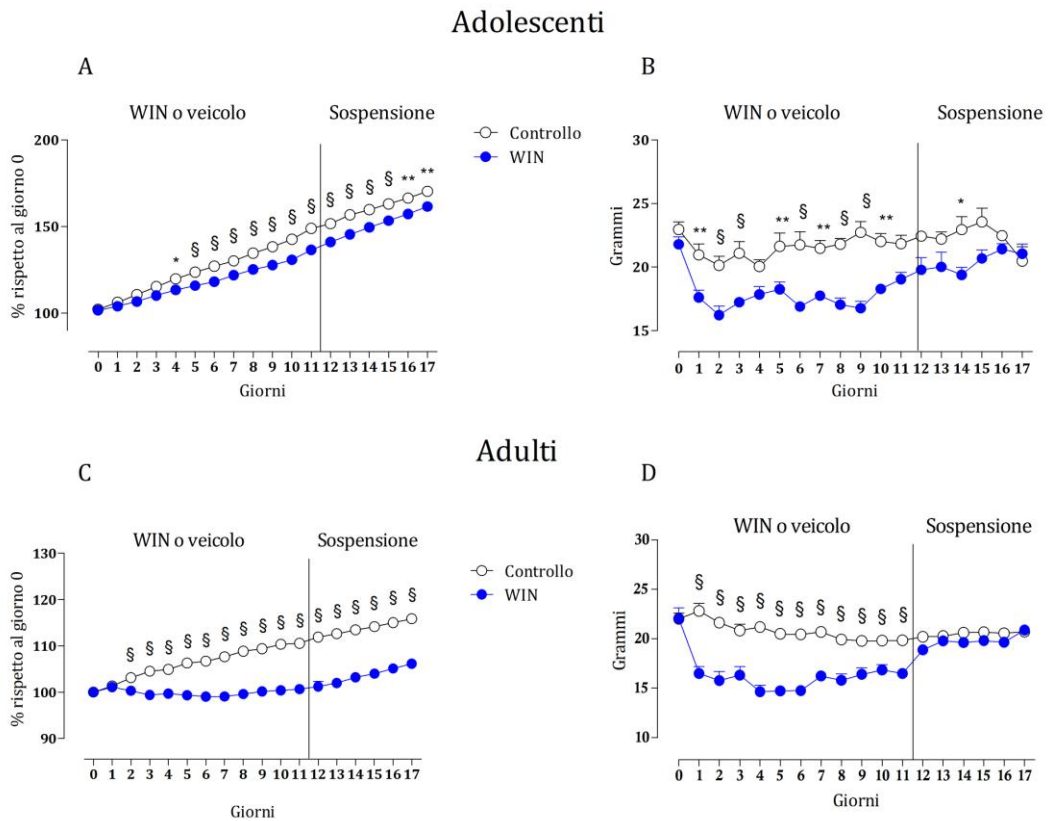


Figura 6. Crescita corporea e assunzione di cibo nei ratti adolescenti e adulti durante le fasi di pre-trattamento cronico con l'agonista cannabinoide (o veicolo) e successivo periodo di sospensione. (A) curva temporale dei pesi dei ratti adolescenti, espressi come percentuale in riferimento al giorno 0: § $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.5$ WIN vs Controllo. (B) curva della quantità media (espressa in grammi) di cibo assunto da ciascun ratto adolescente: § $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.5$ WIN vs Controllo. (C) curva temporale dei pesi dei ratti adulti, espressi come percentuale in riferimento al giorno 0: § $P < 0.001$ WIN vs Controllo. (D) curva della quantità media (espressa in

grammi) di cibo assunto da ciascun ratto adulto: § $P < 0.001$ WIN vs Controllo. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Dalla curva di crescita corporea degli animali (fig. 6A) si evince un rallentamento significativo dell'incremento di peso nei ratti adolescenti trattati cronicamente con WIN rispetto ai veicoli, come riportato dall'analisi ANOVA a due vie (interazione trattamento farmacologico x tempo: $F_{(17, 1084)} = 2,794$, $P < 0.0001$) e dall'analisi *post-hoc* di Bonferroni ($P < 0.05$ per il giorno 4, $P < 0.001$ dal giorno 5 al giorno 15, $P < 0.01$ per i giorni 16 e 17). Una significativa diminuzione della crescita corporea emerge anche nei ratti adulti trattati con WIN rispetto ai relativi controlli (fig. 6C), come mostrato dall'analisi ANOVA a due vie (interazione trattamento farmacologico x tempo: $F_{(17, 1644)} = 32,61$, $P < 0.0001$) e dall'analisi *post-hoc* di Bonferroni ($P < 0.001$ dal giorno 2 al giorno 17). Tale riduzione della curva di crescita del peso corporeo risulta in linea con i dati della quantità di cibo assunto. Infatti sia gli adolescenti che gli adulti trattati con WIN mostrano una riduzione significativa del consumo di cibo rispetto ai relativi controlli durante gli 11 giorni di trattamento, e un successivo incremento a partire dal giorno di sospensione del trattamento. Nella fattispecie, dalle analisi ANOVA a due vie emergono differenze significative sia negli adolescenti (fig. 6B; interazione trattamento farmacologico x tempo: $F_{(16, 236)} = 2,073$, $P = 0.0102$) che negli adulti (fig. 6D; interazione trattamento farmacologico x tempo: $F_{(16, 282)} = 9,094$, $P < 0.0001$), differenze che si appianano a partire dal giorno 11, come mostrato dall'analisi *post-hoc* di Bonferroni (negli adolescenti $P < 0.01$ dal giorno 1 al giorno 10, con eccezione del giorno 4 dove non è presente significatività, e negli adulti $P < 0.001$ dal giorno 1 al giorno 11).

10.2 Valutazione delle modificazioni istoniche e proteiche

I risultati ottenuti dagli esperimenti preliminari *in vitro*, mostrano la capacità del WIN di aumentare il grado dell'acetilazione istonica H3K27ac lungo l'intero locus del gene *Gadd34*, e in generale di generare un aumento globale delle acetilazioni a carico dei residui di lisina degli istoni H2B, H3, H4. Inoltre l'esposizione al WIN determina, *in vitro*, un aumento dei livelli di alcune delle proteine dimostrate responsabili della riduzione dei livelli di p-eIF2 α . Il nostro obiettivo è stato quindi quello di verificare se il WIN somministrato cronicamente inducesse, *in vivo*, delle modificazioni nei livelli delle acetilazioni istoniche attivatrici della trascrizione genica studiate *in vitro* (H3K27ac, H2BK20ac, H4K5-16ac), e nei livelli della proteina p-eIF2 α così come dei fattori proteici in grado di modularne lo stato acetilato. Queste analisi sono state condotte in 5 diverse aree cerebrali (PFC, NAcc, Ipp, CPu, Amig), sia nel D1 (24 ore dopo la sospensione del trattamento con WIN) che nel D9 (9 giorni dopo la sospensione del trattamento con WIN).

10.2.1 Valutazione dei livelli delle acetilazioni istoniche nel D1

Nel D1, sia per gli adolescenti che per gli adulti erano presenti due gruppi sperimentali: gruppo di controllo (Controllo) e gruppo trattato con WIN (WIN).

Adolescenti

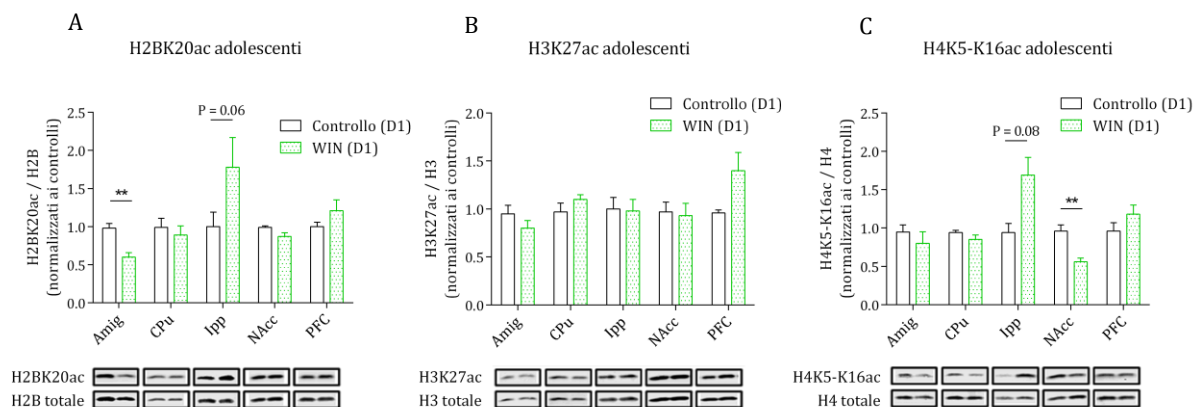


Figura 7. Modificazioni delle acetilazioni istoniche indotte dal WIN nel cervello dei ratti adolescenti nel D1. I valori sono espressi in differenze *fold-change* rispetto al gruppo controllo. (A) Variazione dei livelli di H2BK20ac (Amig: ** P < 0.01 Controllo vs WIN). (B) Livelli di H3K27ac. (C) Variazione dei livelli di H4K5-16ac (Nacc: ** P < 0.01 Controllo vs WIN). Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Dalle analisi di western blot (N = 4-5 per gruppo) è emerso come il gruppo di adolescenti trattati cronicamente col WIN mostri delle riduzioni significative nei livelli di H2BK20ac (fig. 7A; t-test, P = 0.0017) nell'amigdala e di H4K5-K16ac nel nucleo accumbens (fig. 7C; t-test, P = 0.0033). Nel medesimo gruppo sperimentale si è osservata una tendenza all'incremento, seppur non statisticamente significativa, nell'ippocampo per entrambe le acetilazioni: H2BK20ac e H4K5-K16ac (fig. 7A e C). Mentre H3K27ac non ha subito variazioni nelle aree cerebrali esaminate (fig. 7C).

Adulti

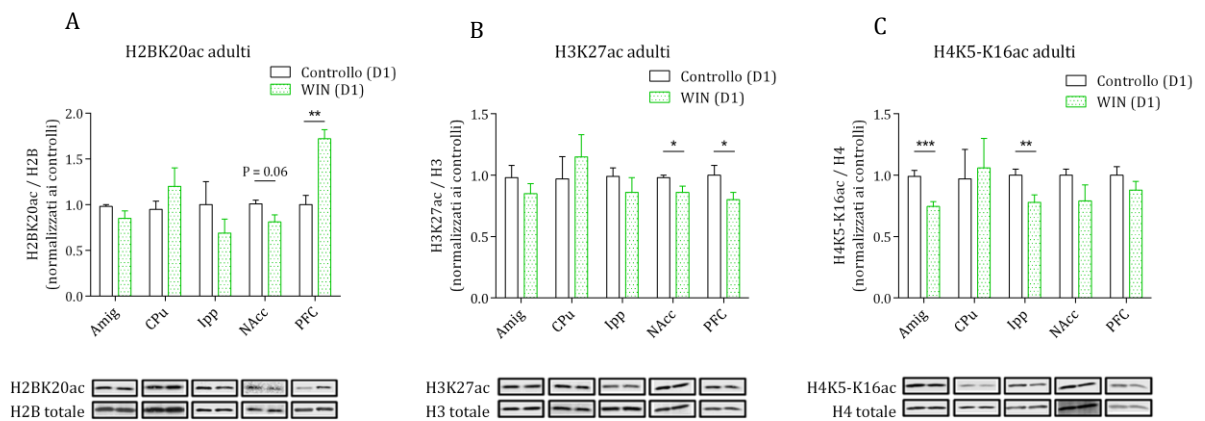


Figura 8. Modificazioni delle acetilazioni istoniche indotte dal WIN nel cervello dei ratti adulti nel D1. I valori sono espressi in differenze *fold-change* rispetto al gruppo controllo. (A) Variazione dei livelli di H2BK20ac (PFC: ** P < 0.01 Controllo vs WIN). (B) Variazione dei livelli di H3K27ac (Nacc: * P < 0.05 Controllo vs WIN; PFC: * P < 0.05 Controllo vs WIN). (C) Variazione dei livelli di H4K5-16ac (Amig: *** P < 0.001 Controllo vs WIN; Ipp: ** P < 0.01 Controllo vs WIN). Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Per quanto riguarda gli adulti (N = 4-5 per gruppo), nel D1 si osservano delle modificazioni significative nella PFC, dove il trattamento col WIN determina un aumento dei livelli di H2BK20ac (fig. 8A; t-test P = 0.002) e una diminuzione di quelli di H3K27ac (fig. 8B; t-test P = 0.03). Inoltre viene riscontrata una significativa riduzione dei livelli di H3K27ac nel nucleo accumbens dei ratti pretrattati col WIN (fig. 8B; t-test P = 0.03). Lo stesso gruppo mostra una significativa riduzione dei livelli di H4K5-K16ac in sede ippocampale e amigdaloidica (fig. 8C; Amig: t-test P = 0.0006; Ipp: t-test P = 0.0049).

10.2.2 Valutazione dei livelli proteici nel D1

Adolescenti

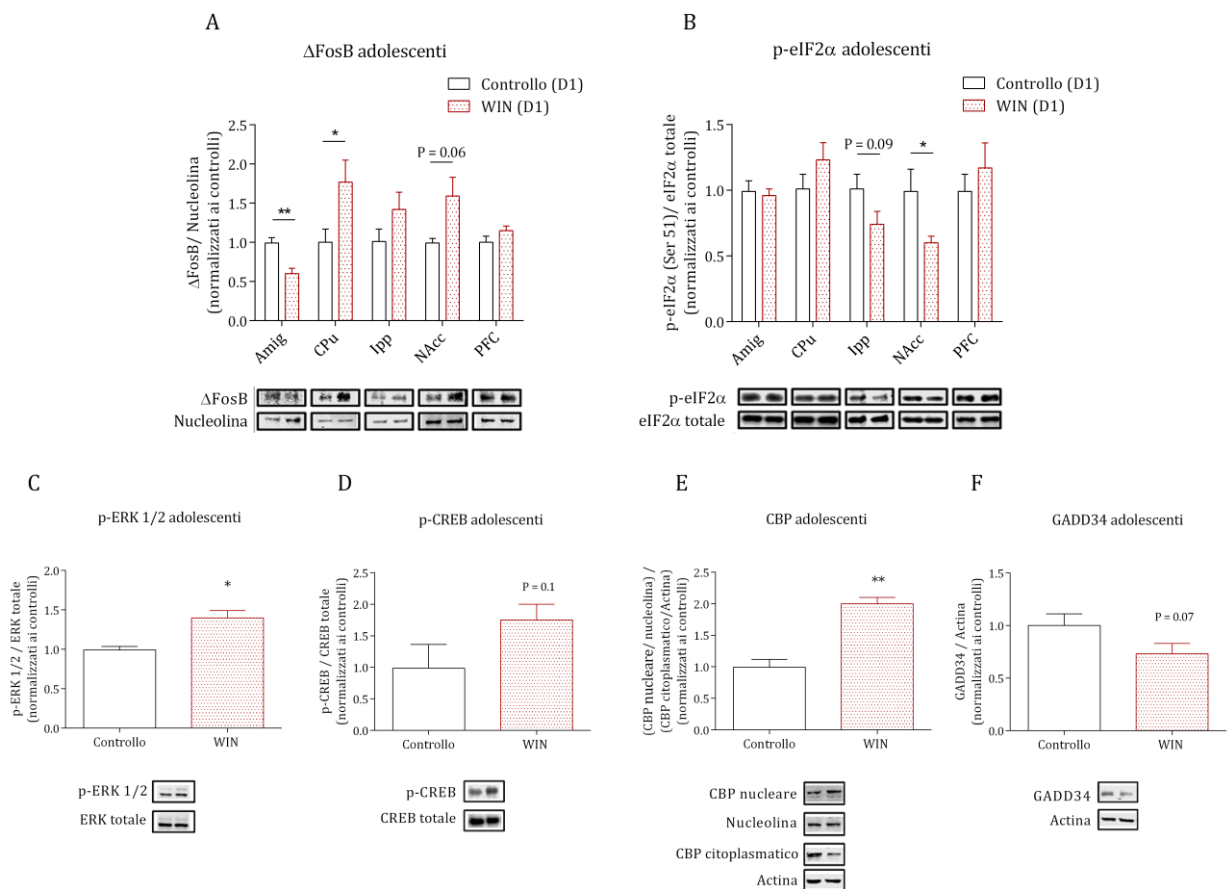


Figura 9. Modificazioni dei livelli proteici indotti dal WIN nel cervello dei ratti adolescenti nel D1. I valori sono espressi in differenze *fold-change* rispetto al gruppo controllo. (A) Variazione dei livelli di Δ FosB (Amig: ** P < 0.01 Controllo vs WIN; NAcc: * P < 0.05 Controllo vs WIN). (B) Variazione dei livelli di p-eIF2 α (NAcc: * P < 0.05 Controllo vs WIN). (C) Variazione dei livelli di p-ERK nel NAcc (* P < 0.05 Controllo vs WIN). (D) Variazione dei livelli di p-CREB nel NAcc. (E) Variazione dei livelli nucleari di CBP nel NAcc (** P < 0.01 Controllo vs WIN). (F) Variazione dei livelli di GADD34 nel NAcc. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Come precedentemente riportato l'esposizione cronica a sostanze d'abuso, inclusi i cannabinoidi, induce un aumento dei livelli di Δ FosB nel SNC, per cui abbiamo dapprima valutato l'effetto del WIN sui livelli di tale proteina nelle 5 aree cerebrali prese in considerazione. Nel gruppo degli adolescenti trattati cronicamente con l'agonista cannabinoide, a 24 ore dall'ultima somministrazione (D1), abbiamo trovato un aumento significativo dei livelli di Δ FosB nello striato e nel nucleo accumbens (fig. 9A; CPu: t-test, P = 0.04; N = 4 per gruppo; NAcc: t-test, P = 0.06; N = 5 per gruppo), e una riduzione significativa nell'amigdala (fig. 9A; t-test, P = 0.006; N = 5 per gruppo). Successivamente, abbiamo analizzato l'effetto dell'esposizione al WIN sui livelli di p-eIF2 α e, in linea con quanto osservato *in vitro*, nelle aree cerebrali degli adolescenti esposti al cannabinoide abbiamo trovato una diminuzione significativa della proteina nel nucleo accumbens (fig. 9B; t-test, P = 0.04; N = 4-5 per gruppo) e un trend di diminuzione nell'ippocampo (fig. 9B; t-test, P = 0.09; N = 5 per gruppo). Alla luce di tali evidenze, focalizzandoci sul nucleo accumbens, abbiamo analizzato i livelli delle proteine note essere coinvolte nella regolazione della fosforilazione di eIF2 α . Anche in questo caso i dati rilevati sono risultati in linea con quanto già osservato *in vitro*, infatti abbiamo riscontrato che il trattamento cronico col WIN determina nel NAcc degli adolescenti una significativa sovraregolazione di p-ERK1/2 (fig. 9C; t-test, P = 0.02; N = 5 per gruppo), un trend di aumento, sebbene non significativo, dei livelli di p-CREB (fig. 9D; t-test, P = 0.1; N = 5 per gruppo) e un significativo aumento della localizzazione nucleare di CBP (fig. 9E; t-test, P = 0.001; N = 4-5 per gruppo). Tuttavia quando abbiamo esaminato i livelli della proteina GADD34 abbiamo osservato un trend di

diminuzione della proteina (fig. 9F; t-test, $P = 0.07$; $N = 4$ per gruppo) che invece *in vitro* risultava upregolata. Tale discrepanza può essere dovuta al tempo intercorso fra l'esposizione al WIN e l'esecuzione delle analisi (immediata *in vitro*, 24 ore dopo *in vivo*), infatti GADD34 va incontro a una rapida degradazione mediata dal proteasoma 26S (Brush e Shenolikar, 2008).

Adulti

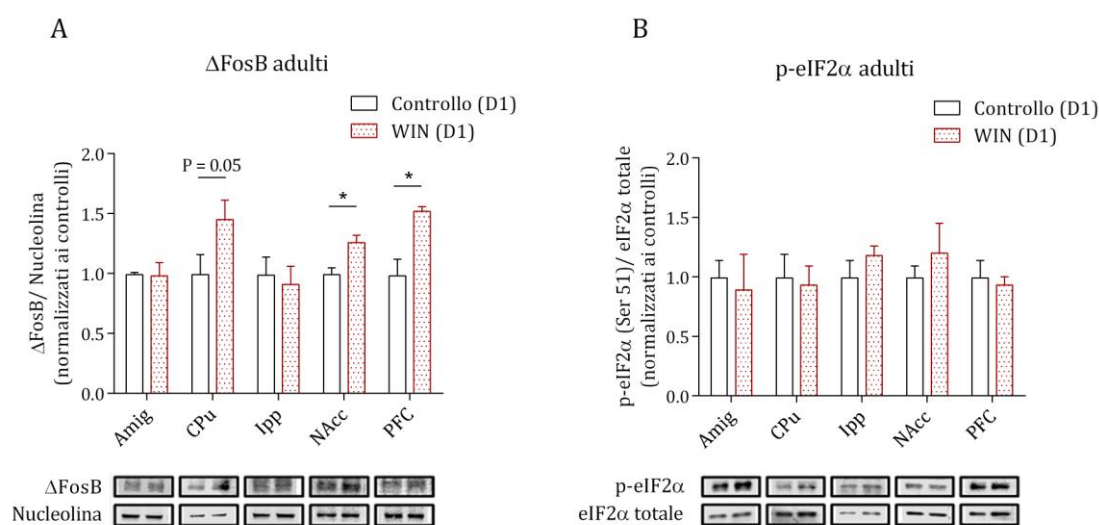


Figura 10. Modificazioni dei livelli proteici indotti dal WIN nel cervello dei ratti adulti nel D1. I valori sono espressi in differenze *fold-change* rispetto al gruppo controllo. (A) Variazione dei livelli di Δ FosB (PFC: * $P < 0.05$ Controllo vs WIN; NAcc: * $P < 0.05$ Controllo vs WIN). (B) Livelli di p-eIF2 α . Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Nel D1, l'esposizione cronica al WIN ha generato, nei ratti adulti, un aumento significativo dei livelli di Δ FosB in striato, nucleo accumbens e corteccia prefrontale (fig. 10A; CPU: t-test, $P = 0.05$; $N = 4-5$ per gruppo; NAcc: t-test, $P = 0.02$; $N = 4-5$ per gruppo; PFC: Mann-Whitney, $P = 0.01$; $N = 4-5$ per gruppo). Mentre contrariamente a quanto osservato negli adolescenti, i risultati riguardanti i livelli di p-eIF2 α non hanno mostrato, per nessuna delle aree analizzate, alcuna variazione fra i due gruppi sperimentali (fig. 10B).

10.2.3 Valutazione dei livelli delle acetilazioni istoniche nel D9

Nel D9 (9 giorni di sospensione del WIN), sia per gli adolescenti che per gli adulti abbiamo effettuato i saggi sperimentali sul gruppo di controllo e sul gruppo pretrattato con WIN.

Adolescenti

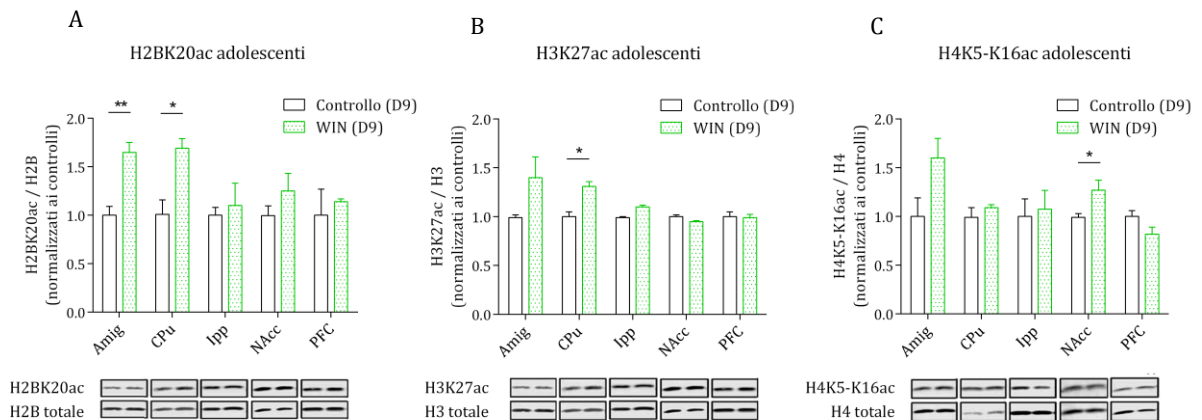


Figura 11. Modificazioni delle acetilazioni istoniche indotte dal WIN nel cervello dei ratti adolescenti nel D9. I valori sono espressi in differenze *fold-change* rispetto al gruppo controllo. (A) Variazione dei livelli di H2BK20ac (PFC: ** $P < 0.01$ Controllo vs WIN; Nacc: * $P < 0.05$ Controllo vs WIN). (B) Variazione dei livelli di H3K27ac (Nacc: * $P < 0.05$ Controllo vs WIN). (C) Variazione dei livelli di H4K5-16ac (Amig: * $P < 0.05$ Controllo vs WIN). Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Nel D9 abbiamo osservato un effetto a lungo termine del WIN sul livello di acetilazioni istoniche nelle aree cerebrali degli adolescenti. Il gruppo trattato con WIN presentava un aumento significativo dei livelli di acetilazione degli istoni H2B e H3 nel NAcc (fig. 11A e B; t test: H2BK20ac $P < 0.05$; H3K27ac $P < 0.05$; N = 4-6 per gruppo). Inoltre lo stesso gruppo sperimentale ha mostrato un aumento significativo dei livelli di H2BK20ac nella PFC (fig. 11A; t test: $P < 0.01$; N = 4-6 per gruppo) e dei livelli di H4K5-16ac nell'Amig (fig. 11C; t test: $p < 0.05$; N = 4-6 per

gruppo). Infine, nella PFC del gruppo trattato con WIN abbiamo osservato un trend di aumento dei livelli di H4K5-16ac (fig. 11C; t test: $P = 0.06$; $N = 4-5$ per gruppo).

Adulti

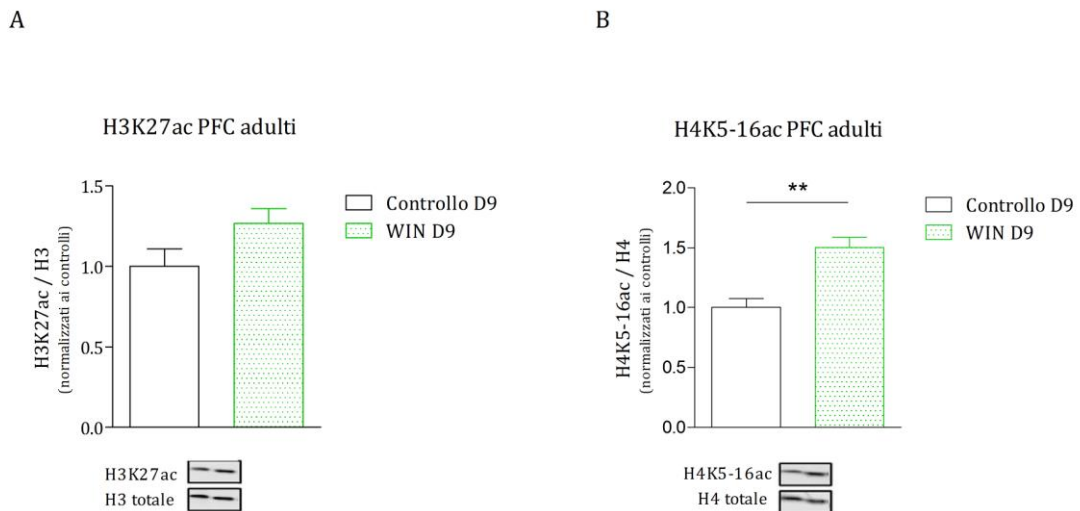


Figura 12. Modificazioni delle acetilazioni istoniche indotte dal WIN nella PFC dei ratti adulti nel D9. I valori sono espressi in differenze *fold-change* rispetto al gruppo controllo. (A) Livelli di H3K27ac. (B) Variazione dei livelli di H4K5-16ac (** $P < 0.01$ Controllo vs WIN). Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Per ragioni tecniche sperimentali, al momento della stesura della presente tesi la PFC è stata l'unica area cerebrale analizzata negli adulti, e in maniera simile a quanto osservato negli adolescenti abbiamo trovato un effetto a lungo termine del WIN: nello specifico il cannabinoide ha portato, in sede alla PFC, un significativo aumento dei livelli di acetilazione a carico dell'istone H4 (fig. 12B; t test: H4K5-16ac $P < 0.01$; $N = 5$ per gruppo).

10.2.4 Valutazione dei livelli proteici nel D9

Adolescenti

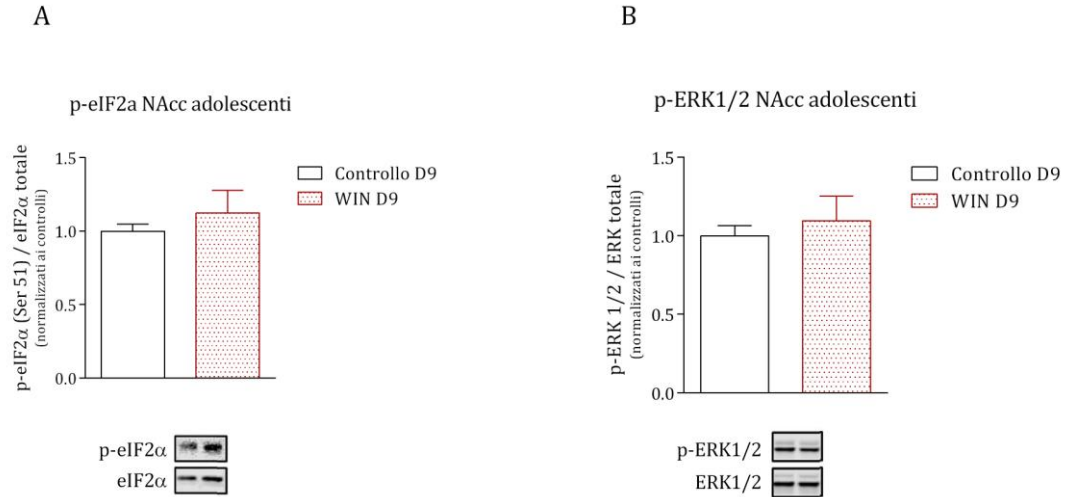


Figura 13. Modificazioni dei livelli proteici indotti dal WIN nel NAcc dei ratti adolescenti nel D9. I valori sono espressi in differenze *fold-change* rispetto al gruppo controllo. (A) Livelli di p-eIF2α. (B) Livelli di p-ERK1/2. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Alla luce dei risultati ottenuti nel gruppo degli adolescenti nel D1, dove il NAcc rappresentava l'area cerebrale con le maggiori differenze a carico delle proteine esaminate, nel D9 abbiamo deciso di focalizzare gli studi nella medesima area cerebrale. La prima proteina valutata, p-eIF2α, non ha presentato differenze statisticamente significative nei livelli di espressione dei due gruppi sperimentali, e così anche la seconda proteina esaminata, p-ERK1/2, uno dei fattori implicati nella defosforilazione di p-eIF2α (fig. 13 A e B). Tali evidenze indicano che gli effetti regolatori che il WIN esercita sui livelli di p-eIF2α non perdurano a lungo termine, bensì risultano di tipo transitorio a breve termine, come dimostrato sia in acuto sulle colture simil-neuronali, che a 24 ore dall'ultimo trattamento nei nostri esperimenti *in vivo*.

Adulti

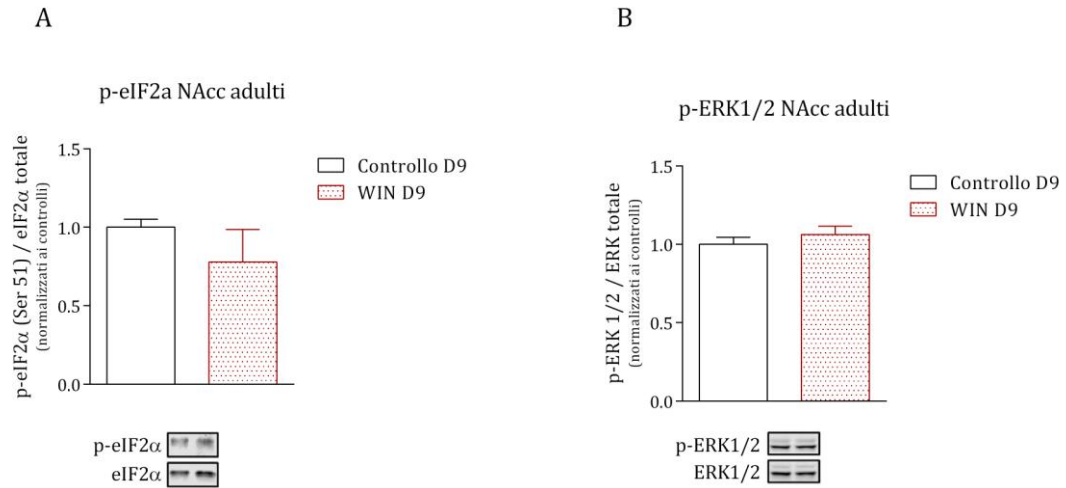


Figura 14. Modificazioni dei livelli proteici indotti dal WIN nel NAcc dei ratti adolescenti nel D9. I valori sono espressi in differenze *fold-change* rispetto al gruppo controllo. (A) Livelli di p-eIF2α. (B) Livelli di p-ERK1/2. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

A scopo comparativo, anche negli adulti abbiamo circoscritto le analisi dei livelli proteici esclusivamente nel NAcc. In maniera simile a quanto osservato nel D1, anche nel D9 il WIN non sortisce alcuna modificazione dello stato acetilato di eIF2α così come di ERK1/2 (fig. 14 A e B).

10.3 Test comportamentali

10.3.1 PPI

Con lo scopo di valutare l'eventuale presenza di effetti psicotici e cognitivi associati all'esposizione cronica al WIN, i test di PPI sono stati condotti nel D1, 24 ore dopo l'ultima somministrazione del cannabinoide.

Adolescenti

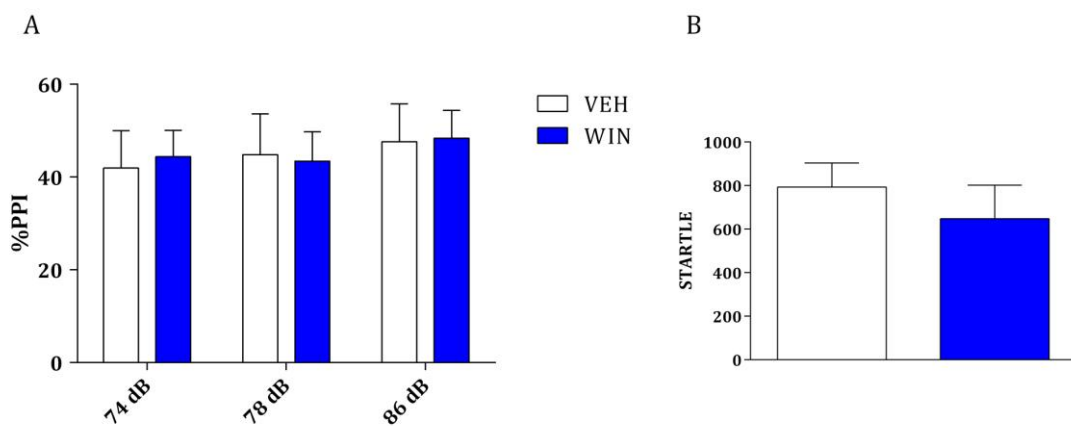


Figura 15. Test della PPI dei ratti adolescenti pre-trattati cronicamente con WIN e dei relativi controlli. (A) percentuale di PPI per i 3 livelli di intensità di pre-impulso. (B) ampiezza della risposta allo spavento (*startle*) generato dagli impulsi sonori singoli. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Dall'analisi delle risposte di trasalimento, negli adolescenti nessuna differenza è emersa fra il gruppo che ha ricevuto il pre-trattamento cronico col WIN e il relativo gruppo controllo, per ciascuna delle 3 diverse intensità di pre-impulso della PPI (fig. 15A). La risposta allo spavento acustico (*startle*) per gli impulsi singoli dell'intensità più elevata, misurati nel primo e nel terzo blocco del test, è risultata statisticamente non differente in ampiezza fra i due gruppi sperimentali (fig. 15B).

Adulti

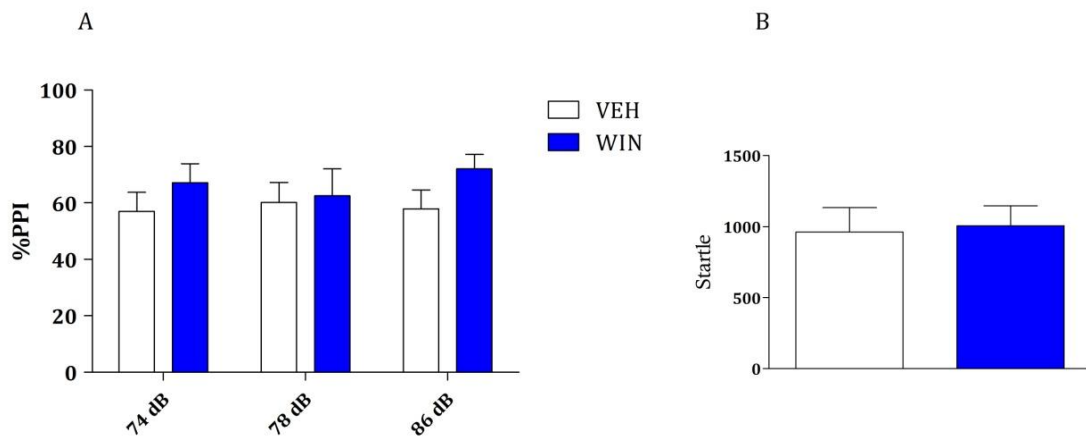


Figura 16. Test della PPI dei ratti adulti pre-trattati cronicamente con WIN e dei relativi controlli. (A) percentuale di PPI per i 3 livelli di intensità di pre-impulso. (B) ampiezza della risposta allo spavento (*startle*) generato dagli impulsi sonori singoli. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Anche nel caso degli adulti, il WIN non ha indotto alcuna modificazione del *gating* sensoriale motorio, come indicato dall'assenza di differenze tra i due gruppi sperimentali nelle percentuali di PPI alle 3 intensità di preimpulso e nell'intensità dello *startle* (fig. 16 A e B).

10.3.2 Sensibilizzazione alla cocaina

Con lo scopo di valutare se l'esposizione prolungata al WIN fosse in grado di creare una sensibilizzazione agli effetti di attivazione motoria intrinseci della cocaina, abbiamo sottoposto gli animali, adolescenti e adulti, al test dell'attività motoria durante la quale è stato somministrato lo psicostimolante dopaminergico in acuto, alla dose di $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. I test sono stati condotti nel D1 (24 ore dopo l'ultima somministrazione di WIN) e nel D8 (8 giorni dopo l'ultima somministrazione di WIN). Per questa fase sperimentale, come specificato nei materiali e metodi, abbiamo suddiviso gli animali in 4 gruppi sperimentali: 2 gruppi che durante il test di attività motoria hanno ricevuto soluzione salina (veicolo/salina e WIN/salina), e 2 gruppi che durante il test di attività motoria hanno ricevuto la cocaina (veicolo/cocaina e WIN/cocaina). In entrambi i giorni sperimentali, per tutti i parametri motori misurati, il gruppo WIN/salina ha mostrato valori del tutto omogenei con il gruppo dei controlli assoluti veicolo/salina (dati non mostrati). Per tale ragione abbiamo rappresentato esclusivamente i valori dei 2 gruppi che hanno ricevuto la cocaina, i quali, per ragioni di semplicità, in base al pre-trattamento ricevuto da ora verranno chiamati gruppo "Controllo" e gruppo "WIN".

10.3.2.1 Valutazione dell'attività motoria nel D1

Il test per l'attività motoria è stato eseguito a 24 ore dall'ultima somministrazione di WIN, una tempistica che consente di valutare gli effetti a breve termine del cannabinoide, escludendone tuttavia gli effetti legati alla sua azione fisiologica acuta.

Adolescenti

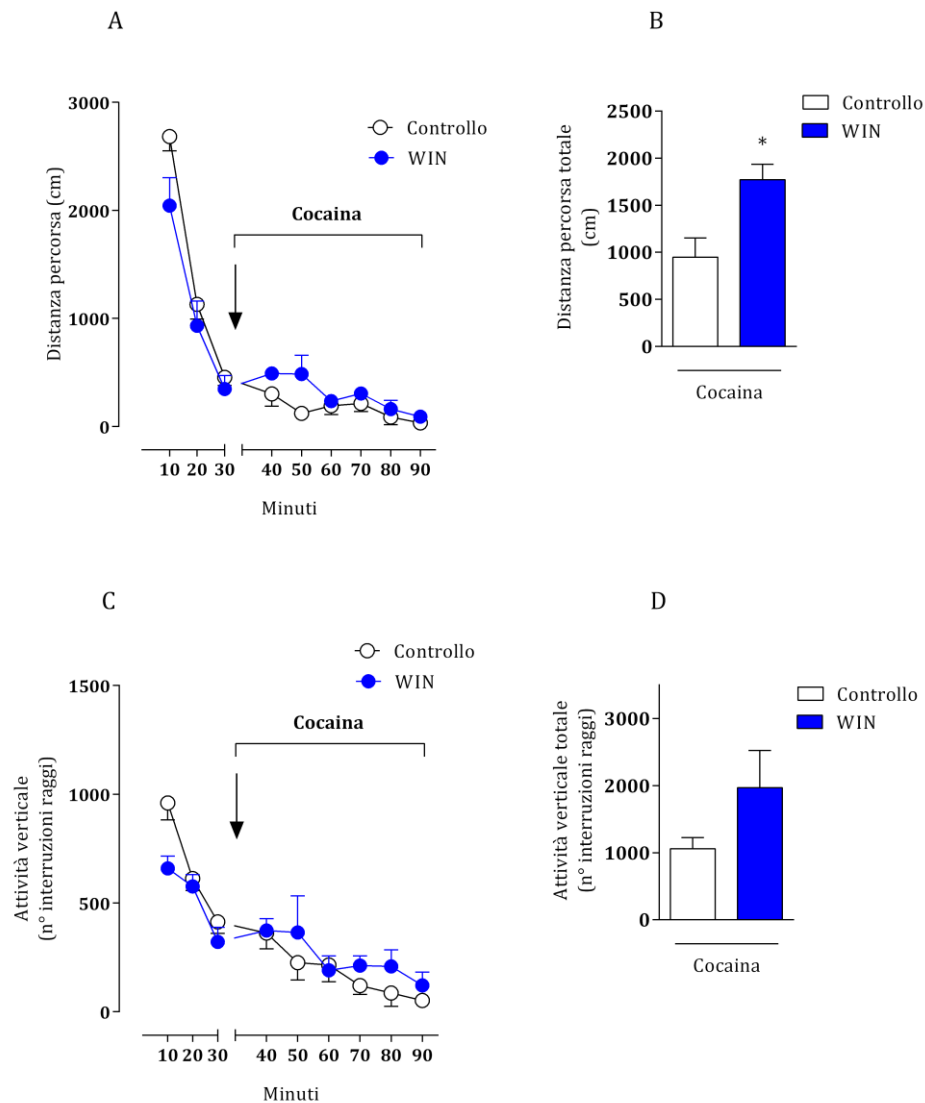


Figura 17. Test dell'attività motoria dei ratti adolescenti, svolto nel D1. (A) Curva temporale della distanza percorsa. (B) Conte cumulative della distanza percorsa (* $P < 0.05$ Controllo vs WIN). (C) Curva temporale dell'attività verticale. (D) Conte cumulative dell'attività verticale. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Nel giorno 1, in seguito alla somministrazione di cocaina, l'attività motoria degli adolescenti è stata influenzata in maniera significativa dal pre-trattamento col WIN, indicando la presenza di una sensibilizzazione crociata tra il cannabinoide e

lo psicostimolante dopaminergico. Considerando il parametro della distanza percorsa, l'analisi ANOVA a due vie della curva temporale ha riportato un'interazione significativa fra il trattamento col WIN e il tempo (fig. 17A; $F_{(8, 48)} = 2,975$, $P < 0.01$), e l'analisi statistica delle conte cumulative indica che, in risposta alla cocaina, vi è un aumento della distanza percorsa del gruppo trattato col WIN rispetto al gruppo controllo (fig. 17B; t test: $P < 0.05$). L'attività verticale valutata in risposta alla cocaina non presenta delle differenze significative fra i due gruppi sperimentali, tuttavia risulta apprezzabile una tendenza all'aumento di tale parametro nel gruppo pre-esposto al cannabinoide, in particolare nelle conte cumulative (fig. 17 C e D).

Adulti

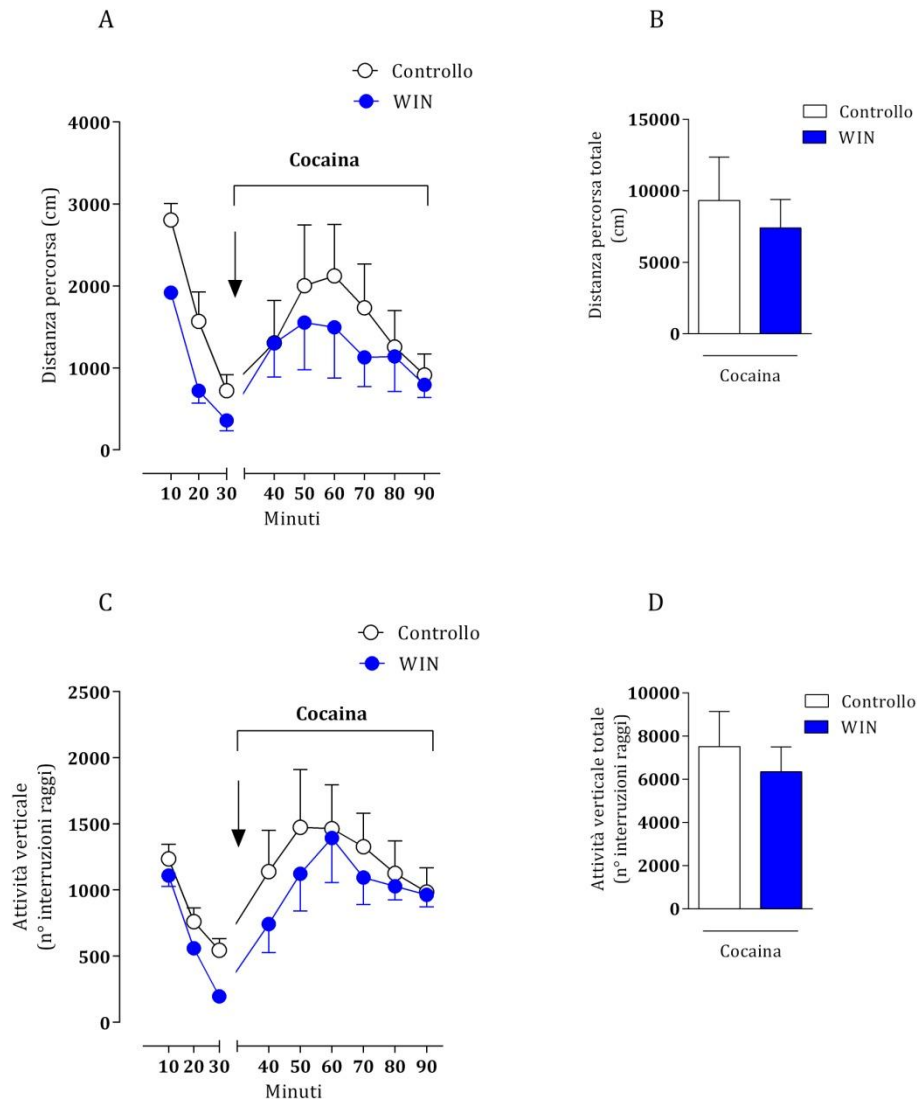


Figura 18. Test dell'attività motoria dei ratti adulti, svolto nel D1. (A) Curva temporale della distanza percorsa. (B) Conte cumulative della distanza percorsa. (C) Curva temporale dell'attività verticale. (D) Conte cumulative dell'attività verticale. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Negli adulti testati nel giorno 1, la risposta motoria alla cocaina non ha riportato differenze significative fra i due gruppi sperimentali, in entrambi i parametri motori misurati (fig. 18). Questi risultati indicano che negli adulti il WIN non genera la sensibilizzazione agli effetti attivatori della cocaina osservati negli adolescenti.

10.3.2.2 Valutazione dell'attività motoria nel D8

Il secondo test dell'attività motoria è stato condotto a 8 giorni di distanza dall'ultima somministrazione di WIN (D8). Utilizzando il medesimo protocollo sperimentale dei precedenti test di attività motoria, l'obiettivo è stato quello di valutare un eventuale persistenza a lungo termine della sensibilizzazione associata al cannabinoide osservata negli adolescenti nel D1.

Adolescenti

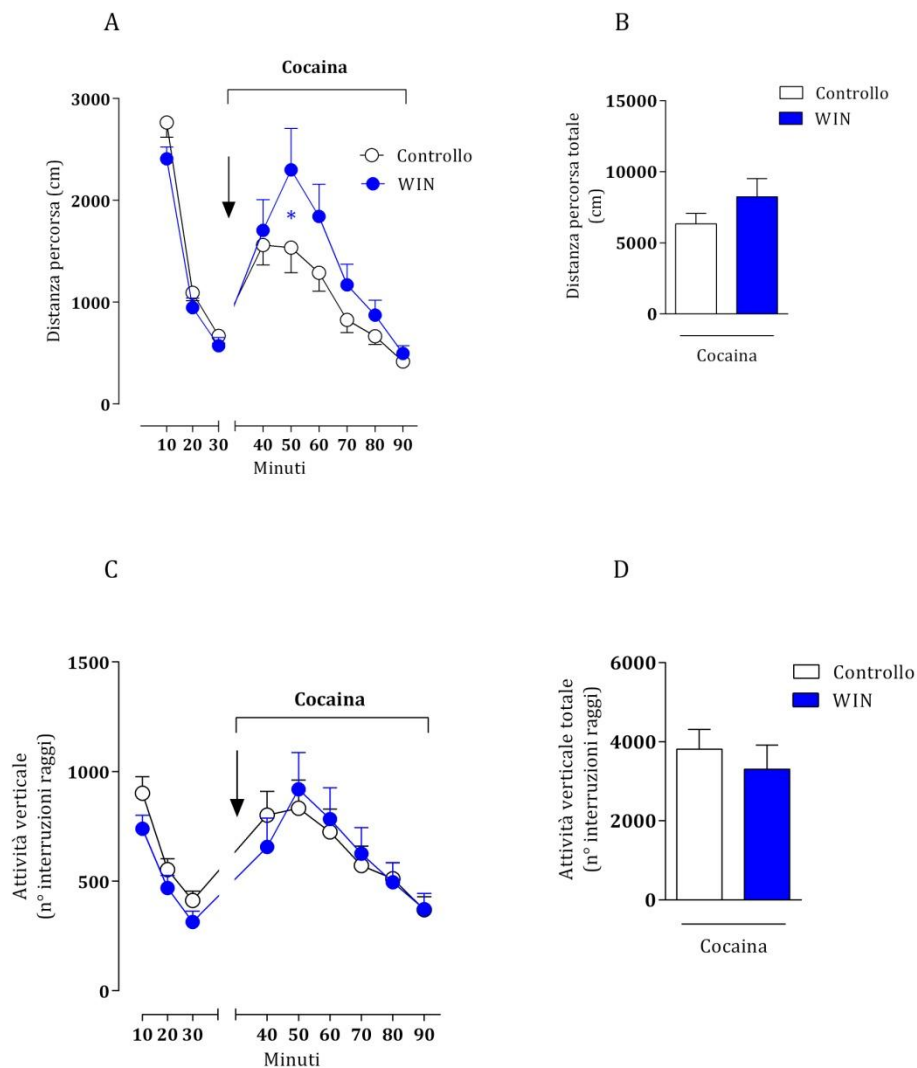


Figura 19. Test dell'attività motoria dei ratti adolescenti, svolto nel D8. (A) Curva temporale della distanza percorsa (* $P < 0.05$ Controllo vs WIN). (B) Conte cumulative della distanza percorsa. (C)

Curva temporale dell'attività verticale. (D) Conte cumulative dell'attività verticale. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM.

Nel D8, nei ratti adolescenti risultano ancora presenti gli effetti di sensibilizzazione del WIN già osservati nel giorno 1. Esaminando il parametro della distanza percorsa, l'analisi ANOVA a due vie ha mostrato valori significativi per quanto riguarda l'interazione fra il trattamento col WIN e il tempo (fig. 19A; $F_{(8, 328)} = 2,870$, $P < 0.01$), e l'analisi *post-hoc* di Bonferroni ha confermato la presenza di una differenza significativa tra il gruppo controllo e il gruppo pre-trattato con WIN al minuto 50 (fig. 19A; $P < 0.05$, controllo vs WIN). Questo risultato conferma la capacità del WIN di generare una sensibilizzazione crociata agli effetti motori della cocaina e indica la presenza di effetti a lungo termine, poiché tale effetto perdura fino a 8 giorni dall'ultima esposizione al cannabinoide. Le conte cumulative della distanza percorsa non riportano differenze fra i due gruppi sperimentali, sebbene il gruppo pre-trattato col WIN si attesti a livelli maggiori rispetto al gruppo controllo (fig. 19B). La misurazione dell'attività verticale non riporta differenze significative tra il gruppo controllo e il gruppo WIN (fig. 19C e D).

Adulti

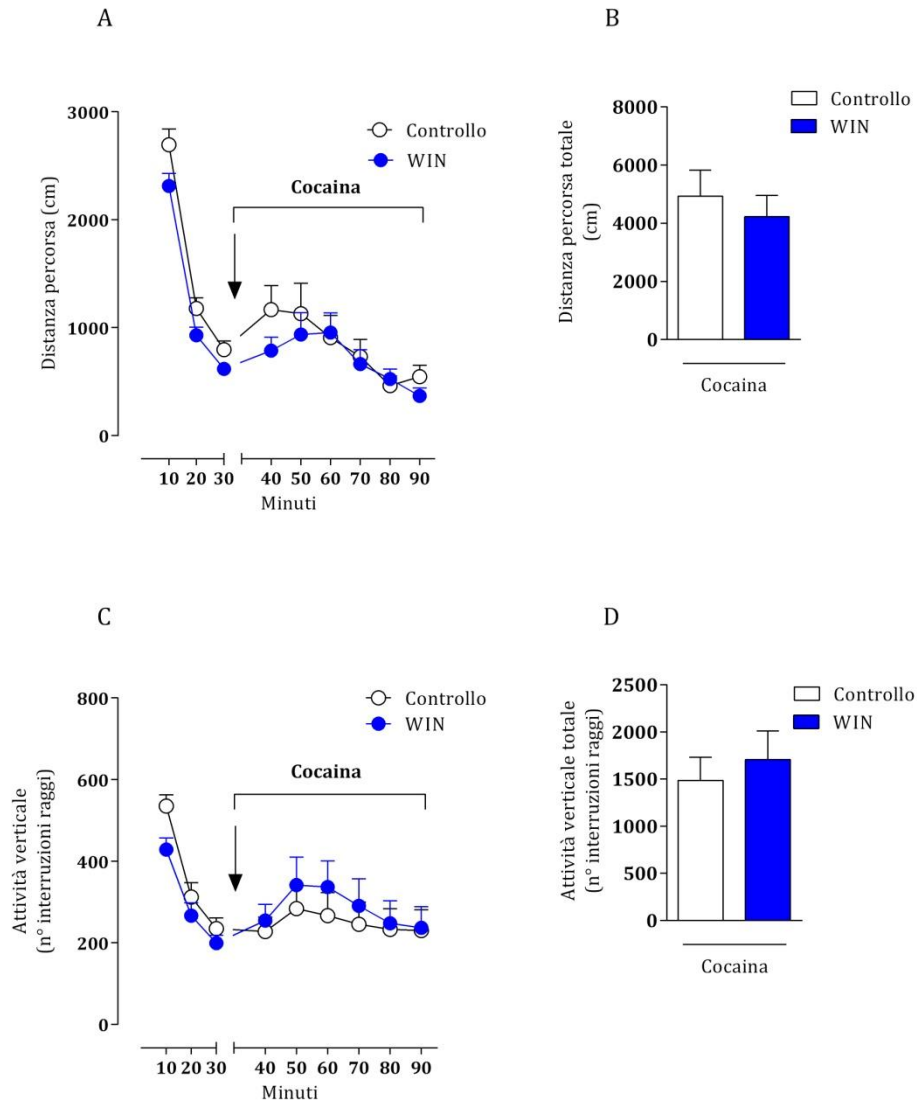


Figura 20. Test dell'attività motoria dei ratti adulti, svolto nel D8. (A) Curva temporale della distanza percorsa. (B) Conte cumulative della distanza percorsa. (C) Curva temporale dell'attività verticale. (D) Conte cumulative dell'attività verticale. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM

In linea con quanto già osservato nell'attività motoria svolta 24 ore dopo la fine del trattamento cronico, anche nel giorno 8 gli adulti non hanno mostrato la sensibilizzazione legata all'azione del WIN. Infatti, come mostrato in figura 20, la risposta motoria agli effetti della cocaina è risultata omogenea e le analisi

statistiche non hanno riportato differenze significative fra il gruppo controllo e il gruppo pre-esposto al cannabinoide, per entrambi i parametri misurati.

11 Discussione

L'ambiente esterno e l'esposizione a determinate sostanze possono interferire nel sistema nervoso centrale adolescenziale perturbandone gli equilibri della delicata fase transitoria e creando delle alterazioni a lungo termine che possono ripercuotersi su sistemi come quello del piacere e della ricompensa, e potrebbero dunque essere alla base di un aumento della vulnerabilità all'abuso di altre sostanze.

Nel presente lavoro di tesi, sono stati valutati su ratti maschi Sprague Dawley adolescenti e adulti, gli effetti epigenetici, biochimici e comportamentali associati a un'esposizione cronica al WIN seguita da un'esposizione acuta alla cocaina.

Durante l'intero periodo di esposizione al WIN, sia i ratti adolescenti che quelli adulti hanno mostrato un significativo rallentamento della crescita corporea associato a una significativa riduzione del cibo assunto nell'arco delle 24 ore, in comparazione ai relativi gruppi di controllo. Il sistema endocannabinoide è notoriamente coinvolto, a diversi livelli, nel controllo del comportamento alimentare (Cota et al., 2006; Matias e Di Marzo, 2006), infatti un importante effetto oreogigenico viene comunemente associato all'attivazione dei recettori CB1, sia da parte dei cannabinoidi endogeni (Di Marzo et al., 2001; Kirkham et al., 2002; Williams e Kirkham, 1999) così come da parte degli esocannabinoidi (Haney et al., 2007; Kirkham, 2009; Pacher et al., 2006). Nell'uomo, non solo i cannabinoidi inducono iperfagia ma incrementano la predilezione per cibi molto appetibili (Abel, 1975) promuovendo quindi un meccanismo di selezione della tipologia del cibo da assumere (Cota et al., 2003). Tuttavia le nostre osservazioni vanno in direzione opposta al quadro appena riportato, e risultano per altro in linea con evidenze riportate da diversi gruppi di ricerca, infatti sono note riduzioni della crescita corporea e del cibo assunto in seguito al trattamento con diversi cannabinoidi come il CP-55,940 (Biscaia et al., 2003), il THC (Rubino et al., 2008; Scherma et al., 2016; Stopponi et al., 2013), l'HU210 (Giuliani et al., 2000) e lo stesso WIN (Abalo et al., 2009; Merroun et al., 2009; Radziszewska et al., 2012). In

maniera simile anche l'anandamide, in seguito a un blocco del suo *reuptake*, esercita un effetto inibitorio sull'assunzione di cibo (Reyes-Cabello et al., 2012).

Queste evidenze indicano un'attività bifasica associata ai cannabinoidi che sembra essere correlata col dosaggio e il tipo di trattamento: bassi dosaggi solitamente generano iperfagia, mentre l'effetto anoressigenico subentra con dosaggi più elevati. Nel presente lavoro di tesi, il protocollo di trattamento cronico ha previsto un regime di dosi crescenti e elevate di WIN (2, 4 e 8 mg·kg⁻¹, somministrate due volte al giorno). Una possibile spiegazione di tale effetto dose dipendente potrebbe essere legata all'azione inibitoria che alti dosaggi di WIN inducono sull'attività motoria del ratto, infatti è stato dimostrato che la dose di 5 mg·kg⁻¹ induce una significativa diminuzione della locomozione (Merroun et al., 2009), e in generale subentra un grado di atassia per il quale gli animali perdono la proprietà di attuare anche semplici movimenti (Dewey, 1986). Questa condizione, osservata anche nei nostri esperimenti, è giustificabile con l'ampia distribuzione dei recettori CB1 a livello del cervelletto e dei gangli della base i quali conferiscono al sistema endocannabinoide un ruolo di regolatore diretto dell'attività motoria (Rodríguez de Fonseca et al., 1998), che allo stesso tempo può incidere sul comportamento di assunzione del cibo.

Entrambi i gruppi sperimentali, adolescenti e adulti, hanno mostrato una riduzione significativa della quantità di cibo assunto, iniziata dal primo giorno di esposizione al WIN e mantenutasi costante per tutti gli 11 giorni di trattamento. A partire dal primo giorno di sospensione del cannabinoide l'effetto anoressigenico è svanito e la differenza del quantitativo di cibo assunto, presente fra controlli e trattati, si è ridotta notevolmente perdendo significatività statistica. Queste osservazioni sono in linea con evidenze presenti in letteratura che indicano come l'effetto anoressigenico del WIN somministrato in acuto, ha un decorso di 24 ore (Radziszewska et al., 2012): si mantiene elevato per circa 6 ore dalla somministrazione, per poi diminuire nell'arco di tempo che va dalle 6 alle 24 ore (Merroun et al., 2009). Il protocollo da noi utilizzato prevedeva 2 iniezioni giornaliere del cannabinoide, intervallate da un tempo di 6 ore l'una dall'altra: tali condizioni prolungavano potenzialmente l'effetto anoressizzante acuto fino a 12

ore consecutive per giorno, e accorciavano le finestre temporali di diminuzione dell'effetto.

Successivamente abbiamo valutato le alterazioni epigenetiche associate al trattamento col WIN. Nel D1, a 24 ore dall'ultima somministrazione, il cannabinoide ha indotto una diminuzione dei livelli di acetilazioni istoniche sia nei ratti adolescenti che nei ratti adulti. Tali modificazioni epigenetiche generalmente trasformano la cromatina nel suo stato meno condensato, noto come eucromatina, che favorisce l'attivazione della trascrizione genica, per cui un abbassamento dell'acetilazione, come quello osservato a 24 ore dall'esposizione al WIN, potrebbe sfociare in una riduzione della trascrizione. Un effetto simile, è stato osservato in associazione all'azione del THC (Prini et al., 2017), il quale nell'arco di 24 ore ha portato, nel cervello di ratti femmine adolescenti, a una riduzione di H3K14ac e a un aumento delle metilazioni (di- e tri-metilazioni) a carico di H3K9: tali modificazioni istoniche correlano con una repressione della trascrizione. Tuttavia è altresì noto che sia il THC che altre sostanze d'abuso generano nel NAcc un innalzamento dei livelli di acetilazione a carico dell'istone H3 (Levine et al., 2011; Prini 2017; Wang et al., 2010).

Nel presente lavoro di tesi, abbiamo focalizzato l'attenzione sull'acetilazione H3K27ac, la quale *in vitro* si presentava a livelli elevati lungo il locus *Gadd34*, in seguito a esposizione al WIN. Nel nostro caso il cannabinoide non ha indotto variazioni nei livelli di H3K27ac presenti nel cervello degli adolescenti, mentre ha portato a una riduzione dei livelli della modificazione istonica nel NAcc e nella PFC dei ratti adulti. Tale quadro non risulta in linea con gli effetti osservati *in vitro*, tuttavia, senza addentrarci nella ragguardevole differenza della complessità biologica intrinseca dei due modelli sperimentali, è rilevante notare che questi risultati derivano da protocolli sperimentali differenti. Le colture simil-neuronali erano sottoposte a un'esposizione continua al WIN per un periodo di 6 ore al quale seguivano nell'immediato i saggi biochimici per la valutazione delle modificazioni istoniche che, in tali condizioni, riflettevano gli effetti acuti del cannabinoide. I nostri risultati invece derivano da condizioni sperimentali che prevedevano una finestra temporale di 24 ore fra l'ultima esposizione al WIN e la dissezione delle

aree cerebrali: tale periodo ha fatto sì che l'azione fisiologica acuta del cannabinoide non fosse più presente. È noto in letteratura che le acetilazioni istoniche rappresentano delle modificazioni epigenetiche di natura instabile, che difficilmente perdurano a lungo (Jenuwein e Allis, 2001), e inoltre il THC risulta in grado di aumentare i livelli dell'enzima istone deacetilasi 3 (HDAC3) (Khare et al., 2006) il quale media la deacetilazione dei residui di lisina di tutti gli istoni della cromatina. Seppur non conoscendo la condizione dei livelli di H3K27ac nella fase acuta dell'azione del WIN *in vivo*, alla luce delle considerazioni sopra riportate è possibile ipotizzare che tali fattori abbiano potuto influenzare lo stato di acetilazione dell'istone H3 nei cervelli dei ratti adolescenti e adulti, mascherando un ipotetico aumento mediato dal WIN e generando le differenze prima descritte con i risultati *in vitro*.

I nostri studi hanno riguardato inoltre l'effetto del WIN sulla modulazione dei livelli di altre acetilazioni istoniche, H4K5-16ac e H2BK20ac, generalmente coinvolte insieme a H3K27ac nella regolazione della trascrizione genica (Kumar 2016; Kurdistani et al., 2004; Richards e Elgin, 2002; Turner, 2000). Nel D1 gli adolescenti trattati col WIN hanno mostrato riduzioni significative nei livelli di H2BK20ac nell'area dell'amigdala, e di H4K5-16ac nell'area del NAcc. A livello ippocampale abbiamo invece osservato una tendenza all'aumento sebbene non statisticamente significativo, delle acetilazioni H2BK20ac e H4K5-16ac. Negli adulti il trattamento cronico col WIN ha portato alla riduzione dei livelli di H4K5-16ac nell'ippocampo e nell'amigdala. Mentre un aumento di H2BK20ac si è osservato a livello della PFC.

Alla luce delle evidenze riportate, fatta eccezione per H2BK20ac nella PFC degli adulti e per le tendenze osservate per H2BK20ac e H4K5-16ac nell'ippocampo degli adolescenti, il quadro generale indica che un regime di esposizione cronica al WIN a breve termine determina in prevalenza una riduzione importante dei livelli di acetilazioni istoniche nel sistema cortico-meso-limbico il quale risulta cruciale nei meccanismi di *addiction* e la cui integrità è fondamentale nel funzionamento dei processi cognitivi. Scostamenti dall'omeostasi fisiologica, come l'alterazione delle modificazioni istoniche osservate in questo lavoro di tesi, possono dunque creare ripercussioni sui comportamenti di assunzione di sostanze d'abuso e sul

funzionamento dei processi cognitivi, specialmente nell'instabile e vulnerabile contesto biologico che caratterizza l'adolescenza. In letteratura sono riportate evidenze che indicano come l'aumento delle acetilazioni istoniche sia associato a un miglioramento delle funzioni cognitive e viceversa una riduzione influenzi negativamente tali processi (Gräff e Tsai, 2013; Peleg et al., 2010). In accordo con tali considerazioni, vi sono ulteriori evidenze che attestano come i cannabinoidi possano generare una diminuzione delle acetilazioni istoniche, e come l'uso di cannabis, specialmente in adolescenza, impatta negativamente sulle capacità cognitive (Di Forti et al., 2007; Fried et al., 2005; Harvey et al., 2007; Medina et al., 2007).

Un crescente numero di studi sulla neurobiologia delle dipendenze e sui meccanismi d'azione delle sostanze d'abuso riportano un coinvolgimento in tali ambiti, dei meccanismi molecolari che sottendono i normali processi di apprendimento e memoria. Infatti tra gli effetti delle sostanze d'abuso vi è quello di indurre una disregolazione neurofisiologica in differenti aree cerebrali che le rende parti attive nella formulazione delle memorie inconsce correlate all'uso delle sostanze stesse. Tuttavia sono note poche molecole che risultano implicate in entrambi i processi (formazione della memoria e dipendenza da sostanze). Una di queste è Δ FosB, un fattore di trascrizione i cui livelli cerebrali aumentano in seguito a esposizione a sostanze d'abuso, e che risulta coinvolto sia nella formazione della memoria (Eagle et al., 2015) che nei processi di *addiction* (Nestler, 2008).

Un altro candidato molecolare coinvolto in entrambi i processi è il fattore di iniziazione della traduzione eIF2 α , principalmente nella sua forma fosforilata (p-eIF2 α). Tale fattore svolge un ruolo nella formazione della memoria (Costa-Mattioli et al., 2005; Costa-Mattioli et al., 2007; Di Prisco et al., 2014), e inoltre è stata recentemente osservata una sua disregolazione associata all'azione di diverse sostanze d'abuso (come l'alcol, la cocaina, la metanfetamina e la nicotina) e un suo coinvolgimento nei processi di ipersensibilizzazione alle sostanze (Huang et al., 2016; Placzek et al., 2016).

In questo lavoro di tesi abbiamo valutato l'effetto dell'esposizione al WIN sui livelli cerebrali di tali molecole, in ratti adolescenti e adulti. Dalle analisi effettuate nel D1, 24 ore dopo l'ultima somministrazione del WIN, è emerso un aumento cannabinoide-dipendente dei livelli cerebrali di Δ FosB, sia negli adolescenti che negli adulti. Infatti i ratti adolescenti hanno mostrato un aumento significativo nel CPu e un trend di aumento nel NAcc, mentre gli adulti hanno mostrato un aumento significativo nella PFC e nel NAcc. Il cannabinoide si dimostra dunque in grado di influenzare i livelli del fattore di trascrizione e tale quadro risulta in linea con dati presenti in letteratura, infatti il THC è in grado di modulare i livelli di Δ FosB in aree come lo striato, la corteccia prefrontale e il nucleo accumbens (Lazenka et al., 2015; Perrotti et al., 2008; Porcella et al., 1998; Rubino et al., 2004).

Nel D1, le nostre analisi hanno evidenziato una diminuzione dei livelli dello stato fosforilato di eIF2 α nel NAcc dei ratti adolescenti pre-trattati col WIN, mentre nei cervelli dei ratti adulti non vi era alcuna variazione fra il gruppo controllo e il gruppo esposto al cannabinoide. I risultati ottenuti negli adolescenti sono in linea con la riduzione dei livelli di p-eIF2 α mediata dal WIN negli studi *in vitro*, e collocano il cannabinoide fra quelle sostanze d'abuso dimostrate in grado di influenzarne la regolazione (Huang et al., 2016; Placzek et al., 2016). Huang e colleghi (2016) hanno osservato che la cocaina induce una diminuzione dei livelli di p-eIF2 α nell'area tegmentale ventrale (VTA) di topi adolescenti, ma non negli adulti (se non a dosi molto più elevate), e questa disregolazione sfocia nell'aumento dei fenomeni di LTP legati alla cocaina, così come della suscettibilità comportamentale osservata nel test della *conditioned place preference*. In maniera interessante, i nostri risultati indicano un effetto età dipendente e identificano il NAcc degli adolescenti come area principale nella quale il WIN influenza lo stato fosforilato di eIF2 α . Tale nucleo, intercalato nel sistema limbico, risulta caratterizzato da numerose efferenze e afferenze che lo pongono in connessione con molteplici aree tra le quali spicca, per rilevanza nei meccanismi di *addiction*, la connessione con la VTA. Il NAcc assume un ruolo chiave nei processi di gratificazione e ricompensa legati a stimoli esterni come le sostanze d'abuso (Di Chiara, 2002), e la sua disregolazione porta al consolidamento delle forti proprietà

motivazionali delle sostanze stesse, ponendo le basi per le condizioni di vulnerabilità e dipendenza (Volkow e Li, 2004).

I risultati da noi ottenuti, che indicano la capacità del WIN di modificare lo stato di fosforilazione di eIF2 α nel cervello di ratti adolescenti, si uniscono alle altre evidenze presenti in letteratura che attestano un effetto mediato da diverse sostanze d'abuso sui livelli del fattore di traduzione fosforilato. Tuttavia a oggi non risultano noti i meccanismi che sottendono questo processo e per tale scopo nel presente lavoro di tesi abbiamo valutato e confermato lo schema, precedentemente descritto in questa tesi, proposto a seguito di quanto emerso dagli esperimenti preliminari eseguiti *in vitro*. Infatti nel NAcc degli adolescenti, oltre alla riduzione di p-eIF2 α , il cannabinoide ha portato all'aumento degli altri fattori proteici ritenuti responsabili di tale riduzione.

In maniera non dissimile dalle colture cellulari neuronali, abbiamo trovato un effetto del WIN che porta all'aumento di p-ERK1/2, il quale indica l'attivazione della via MAPK/ERK che porta alla fosforilazione del fattore di trascrizione CREB, molecola questa, che presenta un ruolo centrale sia nella formazione della memoria che nei processi di dipendenza da sostanze (Kandel, 2012; McPherson e Lawrence, 2007). Negli esperimenti *in vitro* il WIN porta a un aumento significativo dei livelli di p-CREB mentre nel NAcc degli adolescenti esposti al WIN abbiamo rilevato una tendenza di aumento che non ha riportato una significatività statistica. CREB costituisce un bersaglio molecolare della proteina fosfatasi 1 (PP1), la quale, nell'arco delle 24 ore intercorse fra l'ultima esposizione al cannabinoide e la dissezione delle aree cerebrali, potrebbe aver influito sullo stato fosforilato del fattore di trascrizione (Bito et al., 1996). Inoltre, in linea con le evidenze riportate *in vitro*, nei nostri esperimenti abbiamo osservato un aumento del rapporto fra la frazione nucleare e quella citoplasmatica del fattore CREB-binding protein (CBP), che detiene attività intrinseca di istone acetiltransferasi e che agisce in concerto con p-CREB aumentando la trascrizione genica. Sebbene sia noto che altri enzimi epigenetici, come la classe delle istone deacetilasi (e.g. IIA HDAC) e EP300 (Sebti et al., 2014), siano in grado di traslocare tra il citoplasma e il nucleo in risposta a uno stimolo cellulare, non ci risulta la presenza in letteratura di informazioni che

indichino la capacità di CBP di fare altrettanto, per cui a tal proposito sono necessari ulteriori e più approfonditi studi.

Infine *in vitro*, l'attivazione della via MAPK/ERK e la conseguente azione del complesso p-CREB/CBP portava all'aumento dei livelli della proteina GADD34, la quale si presentava come il diretto responsabile della defosforilazione di p-eIF2 α , azione che generalmente attua mediante cooperazione con la fosfatasi PP1 (Choy et al., 2015). Negli esperimenti del presente lavoro di tesi, nel D1 il NAcc degli adolescenti non ha mostrato l'aumento atteso dei livelli di GADD34. Tuttavia in tale frangente è d'uopo considerare le già citate differenti condizioni sperimentali presenti fra gli esperimenti preliminari *in vitro* e quelli del presente studio *in vivo*. Non possiamo sapere, infatti, quale influenza abbia avuto il WIN con i suoi effetti in acuto, sui livelli di GADD34 nel NAcc dei ratti adolescenti; possiamo tuttavia ipotizzare che un eventuale innalzamento dei livelli di GADD34 *in vivo* possa essere stato revertito, nell'arco delle 24 ore trascorse dall'ultima esposizione al cannabinoide, dalla rapida degradazione mediata dal proteasoma 26S (Brush e Shenolikar, 2008).

Le modificazioni epigenetiche osservate 9 giorni dopo la sospensione del trattamento col WIN (D9), descrivono un quadro completamente opposto da quello presentatosi nel D1. Infatti sia negli adolescenti che negli adulti esposti al cannabinoide, nel D9 abbiamo riscontrato un ripristino ai livelli di controllo di tutte le acetilazioni istoniche diminuite nel D1, e inoltre abbiamo osservato un aumento diffuso di tali acetilazioni in sede a diverse aree cerebrali. Nella fattispecie gli adolescenti pre-trattati col WIN hanno mostrato un aumento nel NAcc dei livelli di H2BK20ac e di H3K27ac, nella PFC dei livelli di H2BK20ac e nell'amigdala dei livelli di H4K5-16ac. Per quanto riguarda gli adulti, la sola area della PFC è stata analizzata e abbiamo riscontrato un aumento dei livelli di H4K5-16ac.

Se, come considerato in precedenza, gli effetti a breve termine del WIN portano a una riduzione dei livelli di acetilazioni istoniche che comporta una probabile diminuzione generale della trascrizione genica, è plausibile supporre che la reversione di tutte le modificazioni e il generale aumento delle acetilazioni

istroniche osservate 9 giorni dopo l'esposizione al WIN, possa riflettere un processo di riequilibrio omeostatico cellulare implementato in risposta agli effetti scaturiti dalla pregressa esposizione cronica al cannabinoide, un meccanismo peraltro già ipotizzato da altri gruppi di ricerca (Prini et al., 2017).

Infine, dalle analisi dei livelli proteici del NAcc (l'area cerebrale nella quale il WIN ha generato le modificazioni proteiche osservate nel D1), nel giorno 9 non si osservano modificazioni nei ratti adolescenti e adulti pre-esposti al WIN. Infatti nel NAcc degli adolescenti e degli adulti, il fattore p-eIF2 α e la chinasi p-ERK1/2 non mostrano differenze legate alla pregressa esposizione al cannabinoide.

In accordo con gli obiettivi del presente lavoro di tesi abbiamo valutato gli effetti comportamentali associati al WIN.

L'esposizione prolungata al cannabinoide non ha generato modificazioni del *gating* sensoriale motorio sia sui ratti adolescenti che sui ratti adulti. Infatti dagli esperimenti di PPI condotti nel D1, a 24 ore di distanza dall'ultima somministrazione del WIN, tra il gruppo controllo e il gruppo pre-trattato col cannabinoide, sia dei ratti adolescenti che dei ratti adulti, non sono emerse differenze nella risposta allo spavento per le tre intensità di pre-impulso, e nell'ampiezza dello *startle*.

I dati presenti in letteratura risultano discordanti in merito, infatti alcuni lavori riportano un effetto negativo del WIN sulla PPI sia in ratti adolescenti che in ratti adulti (Wegener et al., 2008; Wegener e Koch, 2009; Schneider et al., 2005), altri contrariamente riportano un effetto migliorativo del cannabinoide su condizioni di alterato *gating* sensoriale (Brzoka et al., 2010; Spano et al., 2009), e infine alcuni lavori indicano l'assenza di effetti legati al cannabinoide (Bortolato et al., 2009; Levin et al., 2014). Tale eterogeneità può essere legata a numerose variabili che differiscono fra i vari studi, come il ceppo dei ratti utilizzati, l'età, il trattamento e il protocollo sperimentale. I nostri risultati ci forniscono l'importante indicazione dell'assenza di disturbi psicotici e cognitivi che avrebbero potuto influenzare gli esperimenti comportamentali.

Le evidenze emerse dagli esperimenti di attività locomotoria per la sensibilizzazione alla cocaina indicano che la pregressa esposizione al WIN aumenta la risposta di attivazione motoria suscitata dallo psicostimolante solo nei ratti adolescenti e non negli adulti. Infatti sia nel D1, sia nel D8, in seguito a somministrazione acuta di cocaina gli adolescenti pre esposti al WIN presentano un aumento della distanza percorsa rispetto al gruppo di controllo, mentre gli adulti, in entrambi i giorni sperimentali, non hanno mostrato differenze. Tale quadro evidenzia in maniera netta l'importanza della fase evolutiva dell'adolescenza contestualmente all'esposizione al cannabinoide, infatti solo negli adolescenti vi era la presenza di una sensibilizzazione crociata tra il WIN e gli effetti attivatori della cocaina.

I risultati ottenuti nei nostri esperimenti si trovano in accordo con diversi lavori di ricerca preclinica sulle sostanze d'abuso, i quali evidenziano importanti differenze legate all'età. È noto infatti che nei ratti adulti, l'esposizione prolungata al THC (Panlilio et al., 2007) e al cannabinoide sintetico CP 55,940 (Arnold et al., 1998) non induce modificazioni nella risposta motoria legata agli effetti della cocaina. Viceversa, diversi gruppi di ricerca hanno riscontrato che la somministrazione di agonisti cannabinoidi durante il periodo critico dell'adolescenza sfocia in un aumento della risposta comportamentale agli effetti della cocaina. Da un lavoro di Dow-Edwards e Izenwasser (2012) emerge l'evidenza che l'esposizione cronica al THC induce una sensibilizzazione di tipo motorio agli effetti della cocaina solo in ratti adolescenti, mentre non si osservano effetti negli adulti. Higuera-Matas e colleghi (2008), riportano inoltre un'influenza dell'esposizione ai cannabinoidi in età precoce, nella suscettibilità all'acquisizione del comportamento di auto-somministrazione di cocaina. È altresì noto che una precoce e prolungata esposizione ai cannabinoidi può generare una sensibilizzazione crociata nella risposta motoria associata anche ad altri psicostimolanti dopaminergici come l'anfetamina (Lamarque et al., 2001; Muschamp e Siviy, 2002). Più in generale, vi sono evidenze ben documentate che attestano come fra l'adolescenza e l'età adulta vi siano notevoli differenze negli effetti comportamentali e fisiologici che scaturiscono in risposta all'assunzione di sostanze d'abuso, e ciò risulta riprova del

fatto che il periodo adolescenziale è contraddistinto da una maggiore vulnerabilità agli effetti delle droghe (Izenwasser, 2005).

L'espressione della sensibilizzazione comportamentale avviene nel contesto di una riesposizione a una sostanza dopo un periodo di sospensione. Si innesca infatti un aumento della risposta basale al farmaco stesso che deriva dalla modificazione del substrato neurofisiologico determinata dalla precedente esposizione alla sostanza (fase di induzione) (Vanderschuren e Kalivas, 2000). È stata osservata una correlazione tra il fenomeno della sensibilizzazione e un aumento dell'attività dei neuroni dopaminergici della VTA e della *substantia nigra* compatta (centro della via extrapiramidale) che porta a una maggiore stimolazione dopaminergica dei gangli della base e in particolare del NAcc (Nestler e Aghajanian, 1997; Vanderschuren e Kalivas, 2000; White e Kalivas, 1998). Il circuito meso- limbico risulta dunque la principale sede di implementazione dei meccanismi di sensibilizzazione, e al suo interno i recettori CB1 risultano ampiamente diffusi e co-localizzati con i recettori dopaminergici (Herkenham, 1991). Il THC è in grado di modulare l'attività dopaminergica, infatti mediante attivazione dei recettori CB1, genera un aumento del *firing* dei neuroni dopaminergici nella VTA e nella *substantia nigra*, attraverso la riduzione dell'inibizione GABAergica nei neuroni del mesencefalo (Szabo et al., 2002; Wu e French, 2000). È noto che l'esposizione cronica ai cannabinoidi sfocia in una desensitizzazione e in una riduzione nel numero dei recettori CB1 nello striato (Rodriguez de Fonseca et al., 1994; Zhuang et al., 1998). Il circuito meso- limbico risulta inoltre mediatore degli effetti di attivazione psicomotoria degli psicostimolanti come la cocaina, e ne promuove le proprietà incentivo motivazionali (Wise e Bozarth, 1987), per cui un aumento della sensibilizzazione psicomotoria può essere direttamente correlato a un aumento della sensibilizzazione incentiva agli stimoli della sostanza stessa (De Vries et al., 2002).

Alla luce di tali evidenze è ipotizzabile che gli effetti di una esposizione prolungata al WIN possano indurre una modificazione a lungo termine della fisiologia di base del sistema endocannabinoide, che specialmente nell'area meso- limbica può risultare più marcata e duratura nel periodo di riorganizzazione e maturazione biologica adolescenziale e che potrebbe comportare ripercussioni nell'espressione

degli effetti intrinseci della cocaina, generando l'aumento della sensibilizzazione psicomotoria legata alla sostanza.

L'alterazione a breve termine dei livelli di p-eIF2 α , osservata negli adolescenti dopo le 24 ore dall'esposizione al WIN, potrebbe in qualche modo contribuire all'instaurazione della sensibilizzazione psicomotoria alla cocaina riscontrata proprio negli adolescenti, per esempio mediante la promozione di meccanismi con effetti a breve e a lungo termine (come l'LTP) potenzialmente responsabili della presenza di tale sensibilizzazione sia nel D1 che nel D8. Il fenomeno dell'LTP assume una posizione centrale nei meccanismi di *addiction*, infatti sostanze come gli psicostimolanti, la nicotina e l'etanolo sono in grado di indurre LTP nella VTA (Bowers et al., 2010; Lüscher and Malenka, 2011), e sempre nella medesima area, generano un abbassamento dei livelli di p-eIF2 α (Huang et al., 2016).

L'attività di traduzione proteica che scaturisce dalla disregolazione dello stato fosforilato di eIF2 α risulta implicata nella vulnerabilità agli effetti della cocaina da un punto di vista sia sinaptico che comportamentale (Huang et al., 2016). Infatti un basso livello di p-eIF2 α genera un aumento di LTP cocaina-dipendente nella VTA, e porta una maggiore suscettibilità agli effetti di rinforzo della cocaina nel test della CPP. Inoltre è stato osservato che un'esposizione prolungata alla nicotina genera una sensibilizzazione comportamentale agli effetti della cocaina (Levine et al., 2011) e contemporaneamente influenza la plasticità sinaptica di aree cerebrali importanti nei processi di *addiction*, infatti rafforza i fenomeni di LTP indotti dalla cocaina nell'ippocampo (Huang et al., 2014) e allo stesso tempo incrementa la riduzione della LTP che la cocaina genera a livello dello striato e del NAcc (Levine et al., 2001), un effetto risaputo essere mediato dall'esposizione cronica allo psicostimolante che porterebbe a una disinibizione delle cellule dopaminergiche della VTA aumentando il fenomeno del *reward* (Levine et al., 2011; Moussawi et al., 2009). Il WIN, come le sostanze sopracitate, si è dimostrato capace di influenzare a breve termine i livelli di p-eIF2 α nel NAcc dei ratti adolescenti, e allo stesso tempo di influenzare la risposta motoria agli effetti della cocaina sia a breve che a lungo termine. Essendo sia gli endocannabinoidi che gli esocannabinoidi coinvolti nella regolazione della plasticità sinaptica neuronale (Carlson et al., 2002; Navakkode e Korte, 2014; Segev et al., 2014) una delle speculazioni possibili potrebbe essere un

effetto età-specifico del WIN di alterazione della plasticità sinaptica nel sistema meso-limbico, supportato nel breve periodo dagli effetti derivanti dalla riduzione di p-eIF2 α e capace di consolidarsi per diversi giorni, risultando in un' aumentata suscettibilità alla cocaina.

In conclusione i risultati della presente tesi rivelano che l'esposizione ai cannabinoidi genera un'alterazione delle modificazioni epigenetiche in aree cerebrali cruciali per i meccanismi sottesi all'abuso di sostanze. Inoltre tale esposizione causa, nel periodo adolescenziale ma non nell'età adulta, una disregolazione di importanti fattori proteici coinvolti nei meccanismi di *addiction*, e una sensibilizzazione comportamentale agli effetti della cocaina. Tali evidenze forniscono un quadro che potrebbe riflettere un'alterazione età-specifica della suscettibilità all'abuso di sostanze, e pone in risalto la vulnerabilità neurobiologica del periodo adolescenziale in un contesto di esposizione a sostanze d'abuso come i cannabinoidi.

Bibliografía

- Abalo, R., Cabezos, P.A., López-Miranda, V., Vera, G., González, C., Castillo, M., Fernández-Pujol, R., Martín, M.I. (2009). Selective lack of tolerance to delayed gastric emptying after daily administration of WIN 55,212-2 in the rat. *Neurogastroenterol. Motil.* *21*, 1002-e80.
- Abdul, Q.A., Yu, B.P., Chung, H.Y., Jung, H.A., Choi, J.S. (2017). Epigenetic modifications of gene expression by lifestyle and environment. *Arch. Pharm. Res.*
- Abel, E.L. (1975). Cannabis: effects on hunger and thirst. *Behav Biol* *15*, 255–281.
- Abel, E.L. *Marihuana - The First Twelve Thousand Years*. Springer.
- Aberg, M., Wade, D., Wall, E., Izenwasser, S. (2007). Effect of MDMA (ecstasy) on activity and cocaine conditioned place preference in adult and adolescent rats. *Neurotoxicol Teratol* *29*, 37–46.
- Achat-Mendes, C., Anderson, K.L., Itzhak, Y. (2003). Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. *Neuropharmacology* *45*, 106–115.
- Aguilar, M.A., Ledesma, J.C., Rodríguez-Arias, M., Penalva, C., Manzanedo, C., Miñarro, J., Arenas, M.C. (2017). Adolescent Exposure to the Synthetic Cannabinoid WIN 55212-2 Modifies Cocaine Withdrawal Symptoms in Adult Mice. *Int J Mol Sci* *18*.
- Alger, B.E. (2012). Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *J. Physiol. (Lond.)* *590*, 2203–2212.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* *58*, 315–348.
- Anderson-Baker, W.C., McLaughlin, C.L., Baile, C.A. (1979). Oral and hypothalamic injections of barbiturates, benzodiazepines and cannabinoids and food intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *11*, 487–491.
- Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J., Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* *370*, 226–229.
- Arnold, J.C., Topple, A.N., Hunt, G.E., McGregor, I.S. (1998). Effects of pre-exposure and co-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 on behavioral sensitization to cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* *354*, 9–16.

- Arnone, D., Barrick, T.R., Chengappa, S., Mackay, C.E., Clark, C.A., Abou-Saleh, M.T. (2008). Corpus callosum damage in heavy marijuana use: preliminary evidence from diffusion tensor tractography and tract-based spatial statistics. *Neuroimage* *41*, 1067–1074.
- Atwood, B.K., Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.* *160*, 467–479.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W.L., Hiley, C.R. (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* *27*, 1–4.
- Bambico, F.R., Nguyen, N.-T., Katz, N., Gobbi, G. (2010). Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission. *Neurobiol. Dis.* *37*, 641–655.
- Basavarajappa, B.S., Nagre, N.N., Xie, S., Subbanna, S. (2014). Elevation of endogenous anandamide impairs LTP, learning, and memory through CB1 receptor signaling in mice. *Hippocampus* *24*, 808–818.
- Benthin, A., Slovic, P., Severson, H. (1993). A psychometric study of adolescent risk perception. *J Adolesc* *16*, 153–168.
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J.A., Di Marzo, V., Fernández-Ruiz, J.J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* *33*, 181–191.
- Bevan, M.D., Magill, P.J., Hallworth, N.E., Bolam, J.P., Wilson, C.J. (2002). Regulation of the timing and pattern of action potential generation in rat subthalamic neurons in vitro by GABA-A IPSPs. *J. Neurophysiol.* *87*, 1348–1362.
- Biegon, A., Kerman, I.A. (2001). Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. *Neuroimage* *14*, 1463–1468.
- Biscaia, M., Marín, S., Fernández, B., Marco, E.M., Rubio, M., Guaza, C., Ambrosio, E., Viveros, M.P. (2003). Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl.)* *170*, 301–308.
- Bito, H., Deisseroth, K., Tsien, R.W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* *87*, 1203–1214.
- Blednov, Y.A., Harris, R.A. (2009). Deletion of vanilloid receptor (TRPV1) in mice alters behavioral effects of ethanol. *Neuropharmacology* *56*, 814–820.
- Bortolato, M., Aru, G.N., Frau, R., Orrù, M., Luckey, G.C., Boi, G., Gessa, G.L. (2005). The CB receptor agonist WIN 55,212-2 fails to elicit disruption of prepulse inhibition of the startle in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl.)* *177*, 264–271.

- Bossong, M.G., Niesink, R.J.M. (2010). Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia. *Prog. Neurobiol.* *92*, 370–385.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J.* *312* (Pt 2), 637–641.
- Bowers, M.S., Chen, B.T., Bonci, A. (2010). AMPA receptor synaptic plasticity induced by psychostimulants: the past, present, and therapeutic future. *Neuron* *67*, 11–24.
- Braida, D., Pozzi, M., Parolaro, D., Sala, M. (2001). Intracerebral self-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the rat: interaction with the opioid system. *Eur. J. Pharmacol.* *413*, 227–234.
- Brush, M.H., Shenolikar, S. (2008). Control of cellular GADD34 levels by the 26S proteasome. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 6989–7000.
- Brzózka, M.M., Fischer, A., Falkai, P., Havemann-Reinecke, U. (2011). Acute treatment with cannabinoid receptor agonist WIN55212.2 improves prepulse inhibition in psychosocially stressed mice. *Behav. Brain Res.* *218*, 280–287.
- Budney, A.J., Hughes, J.R. (2006). The cannabis withdrawal syndrome. *Curr Opin Psychiatry* *19*, 233–238.
- Byrnes, J.P. (2002). The development of decision-making. *J Adolesc Health* *31*, 208–215.
- Cadoni, C., Pisanu, A., Solinas, M., Acquas, E., Di Chiara, G. (2001). Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl.)* *158*, 259–266.
- Cadoni, C., Valentini, V., Di Chiara, G. (2008). Behavioral sensitization to delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine: differential changes in accumbal shell and core dopamine transmission. *J. Neurochem.* *106*, 1586–1593.
- Caillé, S., Parsons, L.H. (2003). SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in nucleus accumbens dopamine in rats. *Eur. J. Neurosci.* *18*, 3145–3149.
- Carlezon, W.A., Wise, R.A. (1996). Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex. *J. Neurosci.* *16*, 3112–3122.
- Carlezon, W.A., Thome, J., Olson, V.G., Lane-Ladd, S.B., Brodtkin, E.S., Hiroi, N., Duman, R.S., Neve, R.L., Nestler, E.J. (1998). Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* *282*, 2272–2275.
- Carlson, G., Wang, Y., Alger, B.E. (2002). Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* *5*, 723–724.

- Casey, B.J., Trainor, R.J., Orendi, J.L., Schubert, A.B., Nystrom, L.E., Giedd, J.N., Castellanos, F.X., Haxby, J.V., Noll, D.C., Cohen, J.D., et al. (1997). A Developmental Functional MRI Study of Prefrontal Activation during Performance of a Go-No-Go Task. *J Cogn Neurosci* 9, 835–847.
- Casey, B.J., Galvan, A., Hare, T.A. (2005). Changes in cerebral functional organization during cognitive development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 239–244.
- Casey, B.J., Getz, S., and Galvan, A. (2008). The adolescent brain. *Dev Rev* 28, 62–77.
- Casu, M.A., Pisu, C., Sanna, A., Tambaro, S., Spada, G.P., Mongeau, R., Pani, L. (2005). Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on phosphorylated CREB in rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 1048, 41–47.
- Cattaneo, L. Anatomia del sistema nervoso centrale e periferico dell'uomo.
- Chambers, R.A., Taylor, J.R., Potenza, M.N. (2003). Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am J Psychiatry* 160, 1041–1052.
- Chan, H.M., La Thangue, N.B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell. Sci.* 114, 2363–2373.
- Chang, R.C.C., Wong, A.K.Y., Ng, H.-K., Hugon, J. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 13, 2429–2432.
- Cheer, J.F., Wassum, K.M., Heien, M.L.A.V., Phillips, P.E.M., Wightman, R.M. (2004). Cannabinoids enhance subsecond dopamine release in the nucleus accumbens of awake rats. *J. Neurosci.* 24, 4393–4400.
- Choe, E.S., Chung, K.T., Mao, L., Wang, J.Q. (2002). Amphetamine increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and transcription factors in the rat striatum via group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology* 27, 565–575.
- Choy, M.S., Yusoff, P., Lee, I.C., Newton, J.C., Goh, C.W., Page, R., Shenolikar, S., Peti, W. (2015). Structural and Functional Analysis of the GADD34:PP1 eIF2 α Phosphatase. *Cell Rep* 11, 1885–1891.
- Coffey, C., Lynskey, M., Wolfe, R., Patton, G.C. (2000). Initiation and progression of cannabis use in a population-based Australian adolescent longitudinal study. *Addiction* 95, 1679–1690.
- Cohen-Cory, S. (2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* 298, 770–776.
- Collins, S.L., Izenwasser, S. (2004). Chronic nicotine differentially alters cocaine-induced locomotor activity in adolescent vs. adult male and female rats. *Neuropharmacology* 46, 349–362.

- Collins, L., Kandel, D., Chase, M. (2002). Examining the gateway hypothesis: Stages and pathways of drug involvement (Cambridge, MA: Cambridge University Press).
- Compton, D.R., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Martin, B.R. (1992). Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *260*, 201–209.
- Cooper, Z.D., Haney, M. (2009). Actions of delta-9-tetrahydrocannabinol in cannabis: relation to use, abuse, dependence. *Int Rev Psychiatry* *21*, 104–112.
- Correa, F., Mestre, L., Molina-Holgado, E., Arévalo-Martín, A., Docagne, F., Romero, E., Molina-Holgado, F., Borrell, J., Guaza, C. (2005). The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini Rev Med Chem* *5*, 671–675.
- Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Stern, E., Gamache, K., Colina, R., Cuello, C., Sossin, W., Kaufman, R., Pelletier, J., Rosenblum, K., et al. (2007). eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* *129*, 195–206.
- Cota, D., Marsicano, G., Lutz, B., Vicennati, V., Stalla, G.K., Pasquali, R., Pagotto, U. (2003a). Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *27*, 289–301.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortman, S., et al. (2003b). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest.* *112*, 423–431.
- Cota, D., Tschöp, M.H., Horvath, T.L., Levine, A.S. (2006). Cannabinoids, opioids and eating behavior: the molecular face of hedonism? *Brain Res Rev* *51*, 85–107.
- Coutts, A.A., Izzo, A.A. (2004). The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol* *4*, 572–579.
- Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants* (Columbia University Press).
- D'Addario, C., Di Francesco, A., Pucci, M., Finazzi Agrò, A., Maccarrone, M. (2013). Epigenetic mechanisms and endocannabinoid signalling. *FEBS J.* *280*, 1905–1917.
- Davis, C., Woodside, D.B. (2002). Sensitivity to the rewarding effects of food and exercise in the eating disorders. *Compr Psychiatry* *43*, 189–194.
- Daza-Losada, M., Rodríguez-Arias, M., Aguilar, M.A., Miñarro, J. (2008). Effect of adolescent exposure to MDMA and cocaine on acquisition and reinstatement of morphine-induced CPP. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *32*, 701–709.
- De Petrocellis, L., Chu, C.J., Moriello, A.S., Kellner, J.C., Walker, J.M., Di Marzo, V. (2004). Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. *Br. J. Pharmacol.* *143*, 251–256.

- De Vries, T.J., Schoffelmeer, A.N.M., Binnekade, R., Raasø, H., Vanderschuren, L.J.M.J. (2002). Relapse to cocaine- and heroin-seeking behavior mediated by dopamine D2 receptors is time-dependent and associated with behavioral sensitization. *Neuropsychopharmacology* 26, 18–26.
- Degenhardt, L., Dierker, L., Chiu, W.T., Medina-Mora, M.E., Neumark, Y., Sampson, N., Alonso, J., Angermeyer, M., Anthony, J.C., Bruffaerts, R., et al. (2010). Evaluating the drug use “gateway” theory using cross-national data: consistency and associations of the order of initiation of drug use among participants in the WHO World Mental Health Surveys. *Drug Alcohol Depend* 108, 84–97.
- Deiana, S., Fattore, L., Spano, M.S., Cossu, G., Porcu, E., Fadda, P., Fratta, W. (2007). Strain and schedule-dependent differences in the acquisition, maintenance and extinction of intravenous cannabinoid self-administration in rats. *Neuropharmacology* 52, 646–654.
- Demuth, D.G., Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sci.* 78, 549–563.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34, 605–613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949.
- DeVries, A.C., Pert, A. (1998). Conditioned increases in anxiogenic-like behavior following exposure to contextual stimuli associated with cocaine are mediated by corticotropin-releasing factor. *Psychopharmacology (Berl.)* 137, 333–340.
- Dewey, W.L. (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 38, 151–178.
- Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav. Brain Res.* 137, 75–114.
- Di Chiara, G., Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5274–5278.
- Di Forti, M., Morrison, P.D., Butt, A., Murray, R.M. (2007). Cannabis use and psychiatric and cognitive disorders: the chicken or the egg? *Curr Opin Psychiatry* 20, 228–234.
- Di Marzo, V. (2011). Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat. Neurosci.* 14, 9–15.
- Di Marzo, V., Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* 8, 585–589.

- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* *21*, 521–528.
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járαι, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T., et al. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* *410*, 822–825.
- Di Marzo, V., Griffin, G., De Petrocellis, L., Brandi, I., Bisogno, T., Williams, W., Grier, M.C., Kulasegram, S., Mahadevan, A., Razdan, R.K., et al. (2002). A structure/activity relationship study on arvanil, an endocannabinoid and vanilloid hybrid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *300*, 984–991.
- Di Prisco, G.V., Huang, W., Buffington, S.A., Hsu, C.-C., Bonnen, P.E., Placzek, A.N., Sidrauski, C., Krnjević, K., Kaufman, R.J., Walter, P., et al. (2014). Translational control of mGluR-dependent long-term depression and object-place learning by eIF2 α . *Nat. Neurosci.* *17*, 1073–1082.
- Diana, M., Melis, M., Gessa, G.L. (1998). Increase in meso-prefrontal dopaminergic activity after stimulation of CB1 receptors by cannabinoids. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 2825–2830.
- Dinieri, J.A., Hurd, Y.L. (2012). Rat models of prenatal and adolescent cannabis exposure. *Methods Mol. Biol.* *829*, 231–242.
- DiNieri, J.A., Wang, X., Szutorisz, H., Spano, S.M., Kaur, J., Casaccia, P., Dow-Edwards, D., Hurd, Y.L. (2011). Maternal Cannabis Use Alters Ventral Striatal Dopamine D2 Gene Regulation in the Offspring. *Biological Psychiatry* *70*, 763–769.
- Dodd, G.T., Stark, J.A., McKie, S., Williams, S.R., Luckman, S.M. (2009). Central cannabinoid signaling mediating food intake: a pharmacological-challenge magnetic resonance imaging and functional histology study in rat. *Neuroscience* *163*, 1192–1200.
- Dong, Y., Green, T., Saal, D., Marie, H., Neve, R., Nestler, E.J., Malenka, R.C. (2006). CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nat. Neurosci.* *9*, 475–477.
- Donnelly, N., Hall, W. (1994). Patterns of cannabis use in Australia (Canberra : Australian Govt. Pub. Service).
- Dow-Edwards, D., Izenwasser, S. (2012). Pretreatment with Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) increases cocaine-stimulated activity in adolescent but not adult male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *100*, 587–591.
- DPA (2010). Dipartimento Politiche Antidroga, Relazione annuale al Parlamento 2010 sullo Stato delle Tossicodipendenze in Italia.
- DPA (2016). Dipartimento Politiche Antidroga, Relazione Annuale al Parlamento 2016 sullo stato delle tossicodipendenze in Italia.

Drews, E., Schneider, M., Koch, M. (2005). Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *80*, 145–150.

DSM V Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders | DSM Library (American Psychiatric Association).

Eagle, A.L., Gajewski, P.A., Yang, M., Kechner, M.E., Al Masraf, B.S., Kennedy, P.J., Wang, H., Mazei-Robison, M.S., Robison, A.J. (2015). Experience-Dependent Induction of Hippocampal Δ FosB Controls Learning. *J. Neurosci.* *35*, 13773–13783.

Edelman, G.M. (New York: Basic Books, c1987). *Neural Darwinism: the theory of neuronal group selection* / Gerald M. Edelman (New York: Basic Books).

El Manira, A., Kyriakatos, A. (2010). The role of endocannabinoid signaling in motor control. *Physiology (Bethesda)* *25*, 230–238.

Ellgren, M., Artmann, A., Tkalych, O., Gupta, A., Hansen, H.S., Hansen, S.H., Devi, L.A., Hurd, Y.L. (2008). Dynamic changes of the endogenous cannabinoid and opioid mesocorticolimbic systems during adolescence: THC effects. *Eur Neuropsychopharmacol* *18*, 826–834.

ElSohly, M.A. *Marijuana and the Cannabinoids* | Mahmoud A. ElSohly | (2007) Springer.

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

ElSohly, M.A., Radwan, M.M., Gul, W., Chandra, S., and Galal, A. (2017). Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. *Prog Chem Org Nat Prod* *103*, 1–36.

Eluvathingal, T.J., Chugani, H.T., Behen, M.E., Juhász, C., Muzik, O., Maqbool, M., Chugani, D.C., Makki, M. (2006). Abnormal brain connectivity in children after early severe socioemotional deprivation: a diffusion tensor imaging study. *Pediatrics* *117*, 2093–2100.

EMCDDA (2009). Understanding the ‘Spice’ phenomenon, Thematic papers, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.

Ernst, M., Nelson, E.E., Jazbec, S., McClure, E.B., Monk, C.S., Leibenluft, E., Blair, J., Pine, D.S. (2005). Amygdala and nucleus accumbens in responses to receipt and omission of gains in adults and adolescents. *Neuroimage* *25*, 1279–1291.

ESPAD (2015). Report 2015: Results from the European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs.

Fadda, P., Scherma, M., Spano, M.S., Salis, P., Melis, V., Fattore, L., Fratta, W. (2006). Cannabinoid self-administration increases dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroreport* *17*, 1629–1632.

- Fan, N., Yang, H., Zhang, J., Chen, C. (2010). Reduced expression of glutamate receptors and phosphorylation of CREB are responsible for in vivo Delta9-THC exposure-impaired hippocampal synaptic plasticity. *J. Neurochem.* *112*, 691–702.
- Fasano, S., Pittenger, C., Brambilla, R. (2009). Inhibition of CREB activity in the dorsal portion of the striatum potentiates behavioral responses to drugs of abuse. *Front Behav Neurosci* *3*, 29.
- Fattore, L., Cossu, G., Martellotta, C.M., Fratta, W. (2001). Intravenous self-administration of the cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* *156*, 410–416.
- Felder, C.C., Veluz, J.S., Williams, H.L., Briley, E.M., Matsuda, L.A. (1992). Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol. Pharmacol.* *42*, 838–845.
- Fendt, M., Koch, M. (2013). Translational value of startle modulations. *Cell Tissue Res.* *354*, 287–295.
- Ferdinand, R.F., Sondeijker, F., van der Ende, J., Selten, J.-P., Huizink, A., Verhulst, F.C. (2005). Cannabis use predicts future psychotic symptoms, and vice versa. *Addiction* *100*, 612–618.
- Fergusson, D.M., Horwood, L.J., Lynskey, M.T., Madden, P.A.F. (2003). Early reactions to cannabis predict later dependence. *Arch. Gen. Psychiatry* *60*, 1033–1039.
- Fergusson, D.M., Boden, J.M., Horwood, L.J. (2006). Cannabis use and other illicit drug use: testing the cannabis gateway hypothesis. *Addiction* *101*, 556–569.
- Fernández-Ruiz, J., Berrendero, F., Hernández, M.L., Ramos, J.A. (2000). The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci.* *23*, 14–20.
- Ferrari, F., Ottani, A., Vivoli, R., Giuliani, D. (1999). Learning impairment produced in rats by the cannabinoid agonist HU 210 in a water-maze task. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *64*, 555–561.
- Fonseca, B.M., Correia-da-Silva, G., Taylor, A.H., Konje, J.C., Bell, S.C., Teixeira, N.A. (2009). Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *7*, 121.
- Fontes, M.A., Bolla, K.I., Cunha, P.J., Almeida, P.P., Jungerman, F., Laranjeira, R.R., Bressan, R.A., Lacerda, A.L.T. (2011). Cannabis use before age 15 and subsequent executive functioning. *Br J Psychiatry* *198*, 442–447.
- Frau, R., Mosher, L.J., Bini, V., Pillolla, G., Pes, R., Saba, P., Fanni, S., Devoto, P., Bortolato, M. (2016). The neurosteroidogenic enzyme 5 α -reductase modulates the

role of D1 dopamine receptors in rat sensorimotor gating. *Psychoneuroendocrinology* 63, 59–67.

French, E.D. (1997). delta9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. *Neurosci. Lett.* 226, 159–162.

French, E.D., Dillon, K., Wu, X. (1997). Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* 8, 649–652.

Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83, 1017–1066.

Fried, C.S., Reppucci, N.D. (2001). Criminal decision making: the development of adolescent judgment, criminal responsibility, and culpability. *Law Hum Behav* 25, 45–61.

Fried, P.A., Watkinson, B., Gray, R. (2005). Neurocognitive consequences of marijuana--a comparison with pre-drug performance. *Neurotoxicol Teratol* 27, 231–239.

Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodríguez De Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., et al. (2003). Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* 425, 90–93.

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232, 54–61.

Galli, J.A., Sawaya, R.A., Friedenber, F.K. (2011). Cannabinoid hyperemesis syndrome. *Curr Drug Abuse Rev* 4, 241–249.

Galvan, A., Hare, T.A., Parra, C.E., Penn, J., Voss, H., Glover, G., Casey, B.J. (2006). Earlier development of the accumbens relative to orbitofrontal cortex might underlie risk-taking behavior in adolescents. *J. Neurosci.* 26, 6885–6892.

Garcia-Gil, L., de Miguel, R., Romero, J., Perez, A., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. (1999). Perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure augmented the magnitude of motor inhibition caused by GABA(B), but not GABA(A), receptor agonists in adult rats. *Neurotoxicol Teratol* 21, 277–283.

Gardner, E.L., Vorel, S.R. (1998). Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol. Dis.* 5, 502–533.

Gérard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G., and Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.* 279 (Pt 1), 129–134.

- Gerdeman, G.L., Ronesi, J., Lovinger, D.M. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat. Neurosci.* 5, 446–451.
- Gessa, G.L., Melis, M., Muntoni, A.L., Diana, M. (1998). Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 341, 39–44.
- Giedd, J.N., Blumenthal, J., Jeffries, N.O., Castellanos, F.X., Liu, H., Zijdenbos, A., Paus, T., Evans, A.C., Rapoport, J.L. (1999). Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat. Neurosci.* 2, 861–863.
- Gifford, A.N., Gardner, E.L., Ashby, C.R. (1997). The effect of intravenous administration of delta-9-tetrahydrocannabinol on the activity of A10 dopamine neurons recorded in vivo in anesthetized rats. *Neuropsychobiology* 36, 96–99.
- Giuliani, D., Ottani, A., Ferrari, F. (2000). Effects of the cannabinoid receptor agonist, HU 210, on ingestive behaviour and body weight of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 391, 275–279.
- Gogtay, N., Giedd, J.N., Lusk, L., Hayashi, K.M., Greenstein, D., Vaituzis, A.C., Nugent, T.F., Herman, D.H., Clasen, L.S., Toga, A.W., et al. (2004). Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8174–8179.
- Golub, A., and Johnson, B. Substance Use Progression and Hard Drug Use in Inner-City New York (Chapter 5) - Stages and Pathways of Drug Involvement.
- Gorriti, M.A., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Palomo, T. (1999). Chronic (-)-delta9-tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 365, 133–142.
- Gräff, J., Tsai, L.-H. (2013). Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 97–111.
- Graybiel, A.M., Moratalla, R., Robertson, H.A. (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6912–6916.
- Green, T.A., Alibhai, I.N., Roybal, C.N., Winstanley, C.A., Theobald, D.E.H., Birnbaum, S.G., Graham, A.R., Unterberg, S., Graham, D.L., Vialou, V., et al. (2010). Environmental enrichment produces a behavioral phenotype mediated by low cyclic adenosine monophosphate response element binding (CREB) activity in the nucleus accumbens. *Biol. Psychiatry* 67, 28–35.
- Griebel, G., Pichat, P., Beeské, S., Leroy, T., Redon, N., Jacquet, A., Françon, D., Bert, L., Even, L., Lopez-Grancha, M., et al. (2015). Selective blockade of the hydrolysis of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol impairs learning and memory performance while producing antinociceptive activity in rodents. *Sci Rep* 5, 7642.

- Guxens, M., Nebot, M., Ariza, C. (2007). Age and sex differences in factors associated with the onset of cannabis use: a cohort study. *Drug Alcohol Depend* 88, 234–243.
- Hall, W.D., Lynskey, M. (2005). Is cannabis a gateway drug? Testing hypotheses about the relationship between cannabis use and the use of other illicit drugs. *Drug Alcohol Rev* 24, 39–48.
- Han, A.P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S.H., Chen, J.J. (2001). Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J.* 20, 6909–6918.
- Haney, M., Gunderson, E.W., Rabkin, J., Hart, C.L., Vosburg, S.K., Comer, S.D., Foltin, R.W. (2007). Dronabinol and marijuana in HIV-positive marijuana smokers. Caloric intake, mood, and sleep. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 45, 545–554.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I., Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3662–3665.
- Hao, S., Avraham, Y., Mechoulam, R., Berry, E.M. (2000). Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur. J. Pharmacol.* 392, 147–156.
- Hart, C.L., Ward, A.S., Haney, M., Comer, S.D., Foltin, R.W., Fischman, M.W. (2002). Comparison of smoked marijuana and oral Δ^9 -tetrahydrocannabinol in humans. *Psychopharmacology* 164, 407–415.
- Harvey, M.A., Sellman, J.D., Porter, R.J., Frampton, C.M. (2007). The relationship between non-acute adolescent cannabis use and cognition. *Drug Alcohol Rev* 26, 309–319.
- Hasin, D.S., Saha, T.D., Kerridge, B.T., Goldstein, R.B., Chou, S.P., Zhang, H., Jung, J., Pickering, R.P., Ruan, W.J., Smith, S.M., et al. (2015). Prevalence of Marijuana Use Disorders in the United States Between 2001-2002 and 2012-2013. *JAMA Psychiatry* 72, 1235–1242.
- Hayatbakhsh, M.R., Najman, J.M., Jamrozik, K., Mamun, A.A., Alati, R., Bor, W. (2007). Cannabis and anxiety and depression in young adults: a large prospective study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46, 408–417.
- Heifets, B.D., Castillo, P.E. (2009). Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 283–306.
- Henquet, C., Krabbendam, L., Spauwen, J., Kaplan, C., Lieb, R., Wittchen, H.-U., van Os, J. (2005). Prospective cohort study of cannabis use, predisposition for psychosis, and psychotic symptoms in young people. *BMJ* 330, 11.
- Henquet, C., Krabbendam, L., de Graaf, R., ten Have, M., van Os, J. (2006). Cannabis use and expression of mania in the general population. *J Affect Disord* 95, 103–110.

- Herkenham, M. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections. *NIDA Res. Monogr.* 112, 129–145.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1932–1936.
- Hernández, M., Berrendero, F., Suárez, I., García-Gil, L., Cebeira, M., Mackie, K., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J. (2000). Cannabinoid CB(1) receptors colocalize with tyrosine hydroxylase in cultured fetal mesencephalic neurons and their activation increases the levels of this enzyme. *Brain Res.* 857, 56–65.
- Higuera-Matas, A., Soto-Montenegro, M.L., del Olmo, N., Miguéns, M., Torres, I., Vaquero, J.J., Sánchez, J., García-Lecumberri, C., Desco, M., Ambrosio, E. (2008). Augmented acquisition of cocaine self-administration and altered brain glucose metabolism in adult female but not male rats exposed to a cannabinoid agonist during adolescence. *Neuropsychopharmacology* 33, 806–813.
- Higuera-Matas, A., Botreau, F., Del Olmo, N., Miguéns, M., Olías, O., Montoya, G.L., García-Lecumberri, C., Ambrosio, E. (2010). Periadolescent exposure to cannabinoids alters the striatal and hippocampal dopaminergic system in the adult rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 895–906.
- Hillig, K.W., Mahlberg, P.G. (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Am. J. Bot.* 91, 966–975.
- Höfler, M., Lieb, R., Perkonigg, A., Schuster, P., Sonntag, H., Wittchen, H.U. (1999). Covariates of cannabis use progression in a representative population sample of adolescents: a prospective examination of vulnerability and risk factors. *Addiction* 94, 1679–1694.
- Hohmann, A.G., Briley, E.M., Herkenham, M. (1999). Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res.* 822, 17–25.
- Hollister, L.E. (1971). Hunger and appetite after single doses of marijuana, alcohol, and dextroamphetamine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 12, 44–49.
- Hope, B., Kosofsky, B., Hyman, S.E., Nestler, E.J. (1992). Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5764–5768.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161–202.
- Huang, S.M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T.J., Krey, J.F., Chu, C.J., et al. (2002). An endogenous capsaicin-

like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 8400–8405.

Huang, W., Placzek, A.N., Viana Di Prisco, G., Khatiwada, S., Sidrauski, C., Krnjević, K., Walter, P., Dani, J.A., Costa-Mattioli, M. (2016). Translational control by eIF2 α phosphorylation regulates vulnerability to the synaptic and behavioral effects of cocaine. *Elife* *5*.

Huang, Y.-Y., Levine, A., Kandel, D.B., Yin, D., Colnaghi, L., Drisaldi, B., Kandel, E.R. (2014). D1/D5 receptors and histone deacetylation mediate the Gateway Effect of LTP in hippocampal dentate gyrus. *Learn. Mem.* *21*, 153–160.

Huffman, J.W. (2009). Cannabimimetic Indoles, Pyrroles, and Indenes: Structure–Activity Relationships and Receptor Interactions. In *The Cannabinoid Receptors*, (Humana Press), pp. 49–94.

Hüppi, P.S., Dubois, J. (2006). Diffusion tensor imaging of brain development. *Semin Fetal Neonatal Med* *11*, 489–497.

Huttenlocher, P.R. (1990). Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia* *28*, 517–527.

Iannotti, F.A., Piscitelli, F., Martella, A., Mazzarella, E., Allarà, M., Palmieri, V., Parrella, C., Capasso, R., Di Marzo, V. (2013). Analysis of the “endocannabinoidome” in peripheral tissues of obese Zucker rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *89*, 127–135.

Iannotti, F.A., Silvestri, C., Mazzarella, E., Martella, A., Calvigioni, D., Piscitelli, F., Ambrosino, P., Petrosino, S., Czifra, G., Bíró, T., et al. (2014a). The endocannabinoid 2-AG controls skeletal muscle cell differentiation via CB1 receptor-dependent inhibition of Kv7 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, E2472-2481.

Iannotti, F.A., Hill, C.L., Leo, A., Alhusaini, A., Soubrane, C., Mazzarella, E., Russo, E., Whalley, B.J., Di Marzo, V., Stephens, G.J. (2014b). Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem Neurosci* *5*, 1131–1141.

Iannotti, F.A., Di Marzo, V., Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog. Lipid Res.* *62*, 107–128.

Ito, M. (1972). Neural design of the cerebellar motor control system. *Brain Res.* *40*, 81–84.

Ito, M. (2001). Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol. Rev.* *81*, 1143–1195.

Izenwasser, S. (2005). Differential effects of psychoactive drugs in adolescents and adults. *Crit Rev Neurobiol* *17*, 51–67.

- Jamshidi, N., Taylor, D.A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br. J. Pharmacol.* *134*, 1151–1154.
- Jenuwein, T., Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074–1080.
- Jernigan, T.L., Gamst, A.C. (2005). Changes in volume with age--consistency and interpretation of observed effects. *Neurobiol. Aging* *26*, 1271-1274; discussion 1275-1278.
- Jin, K., Xie, L., Kim, S.H., Parmentier-Batteur, S., Sun, Y., Mao, X.O., Childs, J., Greenberg, D.A. (2004). Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol. Pharmacol.* *66*, 204–208.
- Johnson, P.I., Goodman, J.B., Condon, R., Stellar, J.R. (1995). Reward shifts and motor responses following microinjections of opiate-specific agonists into either the core or shell of the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl.)* *120*, 195–202.
- Justinova, Z., Solinas, M., Tanda, G., Redhi, G.H., Goldberg, S.R. (2005). The endogenous cannabinoid anandamide and its synthetic analog R(+)-methanandamide are intravenously self-administered by squirrel monkeys. *J. Neurosci.* *25*, 5645–5650.
- Justinova, Z., Munzar, P., Panlilio, L.V., Yasar, S., Redhi, G.H., Tanda, G., Goldberg, S.R. (2008). Blockade of THC-seeking behavior and relapse in monkeys by the cannabinoid CB(1)-receptor antagonist rimonabant. *Neuropsychopharmacology* *33*, 2870–2877.
- Kalivas, P.W., Duffy, P. (1995). D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* *15*, 5379–5388.
- Kalivas, P.W., Stewart, J. (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *16*, 223–244.
- Kandel, D. (1975). Stages in adolescent involvement in drug use. *Science* *190*, 912–914.
- Kandel, D.B. (1984). Marijuana users in young adulthood. *Arch. Gen. Psychiatry* *41*, 200–209.
- Kandel, D.B. (2002). *Stages and Pathways of Drug Involvement: Examining the Gateway Hypothesis* (Cambridge University Press).
- Kandel, E.R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain* *5*, 14.

- Kandel, D.B., Davies, M., Karus, D., Yamaguchi, K. (1986). The consequences in young adulthood of adolescent drug involvement. An overview. *Arch. Gen. Psychiatry* 43, 746–754.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89, 309–380.
- Kano, T., Suzuki, Y., Shibuya, M., Kiuchi, K., Hagiwara, M. (1995). Cocaine-induced CREB phosphorylation and c-Fos expression are suppressed in Parkinsonism model mice. *Neuroreport* 6, 2197–2200.
- Katz, L.C., Shatz, C.J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274, 1133–1138.
- Kelley, A.E., Berridge, K.C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J. Neurosci.* 22, 3306–3311.
- Keyes, K.M., Hamilton, A., Kandel, D.B. (2016). Birth Cohorts Analysis of Adolescent Cigarette Smoking and Subsequent Marijuana and Cocaine Use. *Am J Public Health* 106, 1143–1149.
- Khare, M., Taylor, A.H., Konje, J.C., Bell, S.C. (2006). Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cytotrophoblast cell proliferation and modulates gene transcription. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 321–333.
- Kim, K.C., Choi, S.-W. Nutritional epigenetics and aging. In: *Nutrition, Exercise and Epigenetics: Ageing Interventions* | Byung Pal Yu | Springer.
- Kirkham, T.C. (2009). Cannabinoids and appetite: food craving and food pleasure. *Int Rev Psychiatry* 21, 163–171.
- Kirkham, T.C., Williams, C.M., Fezza, F., Di Marzo, V. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* 136, 550–557.
- Kishimoto, Y., Kano, M. (2006). Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. *J. Neurosci.* 26, 8829–8837.
- Klein, T.W., Newton, C., Larsen, K., Lu, L., Perkins, I., Nong, L., Friedman, H. (2003). The cannabinoid system and immune modulation. *J. Leukoc. Biol.* 74, 486–496.
- Koch, J.E., Matthews, S.M. (2001). Delta9-tetrahydrocannabinol stimulates palatable food intake in Lewis rats: effects of peripheral and central administration. *Nutr Neurosci* 4, 179–187.
- Koob, G.F., Volkow, N.D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35, 217–238.

- Korhonen, T., van Leeuwen, A.P., Reijneveld, S.A., Ormel, J., Verhulst, F.C., Huizink, A.C. (2010). Externalizing behavior problems and cigarette smoking as predictors of cannabis use: the TRAILS Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49, 61–69.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Kuhnen, C.M., Knutson, B. (2005). The neural basis of financial risk taking. *Neuron* 47, 763–770.
- Kumar, V., Rayan, N.A., Muratani, M., Lim, S., Elanggovan, B., Xin, L., Lu, T., Makhija, H., Poschmann, J., Lufkin, T., et al. (2016). Comprehensive benchmarking reveals H2BK20 acetylation as a distinctive signature of cell-state-specific enhancers and promoters. *Genome Res.* 26, 612–623.
- Kurdistani, S.K., Tavazoie, S., Grunstein, M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* 117, 721–733.
- van Laar, M., van Dorsselaer, S., Monshouwer, K., de Graaf, R. (2007). Does cannabis use predict the first incidence of mood and anxiety disorders in the adult population? *Addiction* 102, 1251–1260.
- Lafourcade, M., Elezgarai, I., Mato, S., Bakiri, Y., Grandes, P., Manzoni, O.J. (2007). Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS ONE* 2, e709.
- Lamarque, S., Taghzouti, K., Simon, H. (2001). Chronic treatment with Delta(9)-tetrahydrocannabinol enhances the locomotor response to amphetamine and heroin. Implications for vulnerability to drug addiction. *Neuropharmacology* 41, 118–129.
- Larson, E.B., Graham, D.L., Arzaga, R.R., Buzin, N., Webb, J., Green, T.A., Bass, C.E., Neve, R.L., Terwilliger, E.F., Nestler, E.J., et al. (2011). Overexpression of CREB in the nucleus accumbens shell increases cocaine reinforcement in self-administering rats. *J. Neurosci.* 31, 16447–16457.
- Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.-Y., Lu, H.-C., Hille, B., Mackie, K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2699–2704.
- Laviola, G., Macrì, S., Morley-Fletcher, S., Adriani, W. (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 19–31.
- Lazenka, M.F., Selley, D.E., Sim-Selley, L.J. (2013). Brain regional differences in CB1 receptor adaptation and regulation of transcription. *Life Sciences* 92, 446–452.
- Lazenka, M.F., Tomarchio, A.J., Lichtman, A.H., Greengard, P., Flajolet, M., Selley, D.E., Sim-Selley, L.J. (2015). Role of Dopamine Type 1 Receptors and Dopamine- and cAMP-Regulated Phosphoprotein Mr 32 kDa in Δ 9-Tetrahydrocannabinol-

- Mediated Induction of Δ FosB in the Mouse Forebrain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *354*, 316–327.
- Le Bec, P.-Y., Fatséas, M., Denis, C., Lavie, E., Auriacombe, M. (2009). [Cannabis and psychosis: search of a causal link through a critical and systematic review]. *Encephale* *35*, 377–385.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Böhme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., et al. (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* *283*, 401–404.
- Ledesma, J.C., Aguilar, M.A., Giménez-Gómez, P., Miñarro, J., Rodríguez-Arias, M. (2017). Adolescent but not adult ethanol binge drinking modulates cocaine withdrawal symptoms in mice. *PLoS ONE* *12*, e0172956.
- Lenroot, R.K., Schmitt, J.E., Ordaz, S.J., Wallace, G.L., Neale, M.C., Lerch, J.P., Kendler, K.S., Evans, A.C., Giedd, J.N. (2009). Differences in genetic and environmental influences on the human cerebral cortex associated with development during childhood and adolescence. *Hum Brain Mapp* *30*, 163–174.
- Lett, B.T. (1989). Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine, and cocaine. *Psychopharmacology (Berl.)* *98*, 357–362.
- Levin, R., Peres, F.F., Almeida, V., Calzavara, M.B., Zuardi, A.W., Hallak, J.E.C., Crippa, J.A.S., Abílio, V.C. (2014). Effects of cannabinoid drugs on the deficit of prepulse inhibition of startle in an animal model of schizophrenia: the SHR strain. *Front Pharmacol* *5*, 10.
- Levine, A., Huang, Y., Drisaldi, B., Griffin, E.A., Pollak, D.D., Xu, S., Yin, D., Schaffran, C., Kandel, D.B., Kandel, E.R. (2011). Molecular mechanism for a gateway drug: epigenetic changes initiated by nicotine prime gene expression by cocaine. *Sci Transl Med* *3*, 107ra109.
- Levine, A., Clemenza, K., Rynn, M., Lieberman, J. (2017). Evidence for the Risks and Consequences of Adolescent Cannabis Exposure. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* *56*, 214–225.
- Leweke, F.M., Schneider, M. (2011). Chronic pubertal cannabinoid treatment as a behavioural model for aspects of schizophrenia: effects of the atypical antipsychotic quetiapine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *14*, 43–51.
- Ligresti, A., De Petrocellis, L., Di Marzo, V. (2016). From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol. Rev.* *96*, 1593–1659.
- Llano, I., Leresche, N., Marty, A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* *6*, 565–574.

- Lonze, B.E., Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605–623.
- LoVerme, J., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., Piomelli, D. (2005). The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci.* 77, 1685–1698.
- Luna, B. (2009). Developmental changes in cognitive control through adolescence. *Adv Child Dev Behav* 37, 233–278.
- Lüscher, C., Malenka, R.C. (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69, 650–663.
- Lynskey, M.T., Heath, A.C., Bucholz, K.K., Slutske, W.S., Madden, P.A.F., Nelson, E.C., Statham, D.J., Martin, N.G. (2003). Escalation of drug use in early-onset cannabis users vs co-twin controls. *JAMA* 289, 427–433.
- Lyons, M.J., Bar, J.L., Panizzon, M.S., Toomey, R., Eisen, S., Xian, H., Tsuang, M.T. (2004). Neuropsychological consequences of regular marijuana use: a twin study. *Psychol Med* 34, 1239–1250.
- Ma, Y., Hendershot, L.M. (2003). Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 278, 34864–34873.
- Ma, T., Trinh, M.A., Wexler, A.J., Bourbon, C., Gatti, E., Pierre, P., Cavener, D.R., Klann, E. (2013). Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat. Neurosci.* 16, 1299–1305.
- Mackesy-Amiti, M.E., Fendrich, M., Goldstein, P.J. (1997). Sequence of drug use among serious drug users: typical vs atypical progression. *Drug Alcohol Depend* 45, 185–196.
- Madsen, H.B., Brown, R.M., Lawrence, A.J. (2012a). Neuroplasticity in addiction: cellular and transcriptional perspectives. *Front Mol Neurosci* 5, 99.
- Madsen, H.B., Navaratnarajah, S., Farrugia, J., Djouma, E., Ehrlich, M., Mantamadiotis, T., Van Deursen, J., Lawrence, A.J. (2012b). CREB1 and CREB-binding protein in striatal medium spiny neurons regulate behavioural responses to psychostimulants. *Psychopharmacology (Berl.)* 219, 699–713.
- Mailleux, P., Verslijpe, M., Vanderhaeghen, J.J. (1992). Initial observations on the distribution of cannabinoid receptor binding sites in the human adult basal ganglia using autoradiography. *Neurosci. Lett.* 139, 7–9.
- Malone, D.T., Taylor, D.A. (1999). Modulation by fluoxetine of striatal dopamine release following Delta9-tetrahydrocannabinol: a microdialysis study in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* 128, 21–26.
- Markey, S.P., Dudding, T., Wang, T.C. (2000). Base- and acid-catalyzed interconversions of O-acyl- and N-acyl-ethanolamines: a cautionary note for lipid analyses. *J. Lipid Res.* 41, 657–662.

- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., et al. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* *418*, 530–534.
- Martellotta, M.C., Cossu, G., Fattore, L., Gessa, G.L., Fratta, W. (1998). Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in drug-naive mice. *Neuroscience* *85*, 327–330.
- Martin, C.A., Kelly, T.H., Rayens, M.K., Brogli, B.R., Brenzel, A., Smith, W.J., Omar, H.A. (2002). Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* *41*, 1495–1502.
- Mata, I., Perez-Iglesias, R., Roiz-Santiañez, R., Tordesillas-Gutierrez, D., Pazos, A., Gutierrez, A., Vazquez-Barquero, J.L., Crespo-Facorro, B. (2010). Gyrfication brain abnormalities associated with adolescence and early-adulthood cannabis use. *Brain Res.* *1317*, 297–304.
- Matias, I., Di Marzo, V. (2006). Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance. *J. Endocrinol. Invest.* *29*, 15–26.
- Matias, I., Di Marzo, V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol. Metab.* *18*, 27–37.
- Matochik, J.A., Eldreth, D.A., Cadet, J.-L., Bolla, K.I. (2005). Altered brain tissue composition in heavy marijuana users. *Drug Alcohol Depend* *77*, 23–30.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* *346*, 561–564.
- Matthews, S.C., Simmons, A.N., Lane, S.D., Paulus, M.P. (2004). Selective activation of the nucleus accumbens during risk-taking decision making. *Neuroreport* *15*, 2123–2127.
- Mayet, A., Legleye, S., Falissard, B., Chau, N. (2012). Cannabis use stages as predictors of subsequent initiation with other illicit drugs among French adolescents: use of a multi-state model. *Addict Behav* *37*, 160–166.
- McClung, C.A., Nestler, E.J. (2003). Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat. Neurosci.* *6*, 1208–1215.
- McDowell, J.J. (2010). Behavioral and neural Darwinism: selectionist function and mechanism in adaptive behavior dynamics. *Behav. Processes* *84*, 358–365.
- McFarland, M.J., Barker, E.L. (2004). Anandamide transport. *Pharmacol. Ther.* *104*, 117–135.
- McGee, R., Feehan, M. (1993). Cannabis use among New Zealand adolescents. *N. Z. Med. J.* *106*, 345.

- McPartland, J.M., Duncan, M., Di Marzo, V., Pertwee, R.G. (2015). Are cannabidiol and $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 737–753.
- McPherson, C.S., Lawrence, A.J. (2007). The nuclear transcription factor CREB: involvement in addiction, deletion models and looking forward. *Curr Neuropharmacol* *5*, 202–212.
- McPherson, C.S., Mantamadiotis, T., Tan, S.-S., Lawrence, A.J. (2010). Deletion of CREB1 from the dorsal telencephalon reduces motivational properties of cocaine. *Cereb. Cortex* *20*, 941–952.
- McQuown, S.C., Belluzzi, J.D., Leslie, F.M. (2007). Low dose nicotine treatment during early adolescence increases subsequent cocaine reward. *Neurotoxicol Teratol* *29*, 66–73.
- Mechoulam, R., Gaoni, Y. (1965a). Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* *21*, 1223–1229.
- Mechoulam, R., Gaoni, Y. (1965b). A total synthesis of dl-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* *87*, 3273–3275.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* *50*, 83–90.
- Medina, K.L., Hanson, K.L., Schweinsburg, A.D., Cohen-Zion, M., Nagel, B.J., Tapert, S.F. (2007). Neuropsychological functioning in adolescent marijuana users: subtle deficits detectable after a month of abstinence. *J Int Neuropsychol Soc* *13*, 807–820.
- Meier, M.H., Caspi, A., Ambler, A., Harrington, H., Houts, R., Keefe, R.S.E., McDonald, K., Ward, A., Poulton, R., Moffitt, T.E. (2012). Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, E2657-2664.
- Merroun, I., Errami, M., Hoddah, H., Urbano, G., Porres, J.M., Aranda, P., Llopis, J., López-Jurado, M. (2009). Influence of intracerebroventricular or intraperitoneal administration of cannabinoid receptor agonist (WIN 55,212-2) and inverse agonist (AM 251) on the regulation of food intake and hypothalamic serotonin levels. *Br. J. Nutr.* *101*, 1569–1578.
- Molina-Holgado, F., Amaro, A., González, M.I., Alvarez, F.J., Leret, M.L. (1996). Effect of maternal delta 9-tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. *Eur. J. Pharmacol.* *316*, 39–42.
- Montague, P.R., Berns, G.S. (2002). Neural economics and the biological substrates of valuation. *Neuron* *36*, 265–284.

- Moore, T.H.M., Zammit, S., Lingford-Hughes, A., Barnes, T.R.E., Jones, P.B., Burke, M., Lewis, G. (2007). Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet* 370, 319–328.
- Moreira, F.A., Wotjak, C.T. (2010). Cannabinoids and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* 2, 429–450.
- Morgan, J.I., Curran, T. (1995). Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci.* 18, 66–67.
- Moussawi, K., Pacchioni, A., Moran, M., Olive, M.F., Gass, J.T., Lavin, A., Kalivas, P.W. (2009). N-Acetylcysteine reverses cocaine-induced metaplasticity. *Nat. Neurosci.* 12, 182–189.
- Muccioli, G.G. (2010). Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov. Today* 15, 474–483.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.
- Muschamp, J.W., Siviy, S.M. (2002). Behavioral sensitization to amphetamine follows chronic administration of the CB1 agonist WIN 55,212-2 in Lewis rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 835–842.
- Navakkode, S., Korte, M. (2014). Pharmacological activation of CB1 receptor modulates long term potentiation by interfering with protein synthesis. *Neuropharmacology* 79, 525–533.
- Navarro, M., Carrera, M.R., Fratta, W., Valverde, O., Cossu, G., Fattore, L., Chowen, J.A., Gomez, R., del Arco, I., Villanua, M.A., et al. (2001). Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J. Neurosci.* 21, 5344–5350.
- NCADA Australian Data Archive - National Campaign Against Drug Abuse Social Issues Survey, 1993.
- Nencini, P. (1992). Il controllo farmacologico del comportamento.
- Nestler, E.J. (2008). Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 363, 3245–3255.
- Nestler, E.J., Aghajanian, G.K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278, 58–63.
- Ng Cheong Ton, J.M., Gerhardt, G.A., Friedemann, M., Etgen, A.M., Rose, G.M., Sharpless, N.S., Gardner, E.L. (1988). The effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on potassium-evoked release of dopamine in the rat caudate nucleus: an in vivo electrochemical and in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 451, 59–68.
- Nicolussi, S., Gertsch, J. (2015). Endocannabinoid transport revisited. *Vitam. Horm.* 98, 441–485.

NIH Roadmap Epigenomics Project - Overview.
<http://www.roadmapepigenomics.org/overview>

Norwood, C.S., Cornish, J.L., Mallet, P.E., McGregor, I.S. (2003). Pre-exposure to the cannabinoid receptor agonist CP 55940 enhances morphine behavioral sensitization and alters morphine self-administration in Lewis rats. *Eur. J. Pharmacol.* *465*, 105–114.

Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., Sugiura, T. (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *362*, 928–934.

Okamoto, Y., Wang, J., Morishita, J., Ueda, N. (2007). Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem. Biodivers.* *4*, 1842–1857.

Okano, M., Xie, S., Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* *19*, 219–220.

Oliveira da Cruz, J.F., Robin, L.M., Drago, F., Marsicano, G., Metna-Laurent, M. (2016). Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB1): A new player in the tripartite synapse. *Neuroscience* *323*, 35–42.

Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.-P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., et al. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1074*, 514–536.

O'Shea, M., Singh, M.E., McGregor, I.S., Mallet, P.E. (2004). Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* *18*, 502–508.

O'Shea, M., McGregor, I.S., Mallet, P.E. (2006). Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* *20*, 611–621.

O'Sullivan, S.E. (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 576–582.

Ottani, A., Giuliani, D. (2001). Hu 210: a potent tool for investigations of the cannabinoid system. *CNS Drug Rev* *7*, 131–145.

Pacher, P., Bátkai, S., Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* *58*, 389–462.

Padula, C.B., Schweinsburg, A.D., Tapert, S.F. (2007). Spatial working memory performance and fMRI activation interaction in abstinent adolescent marijuana users. *Psychol Addict Behav* *21*, 478–487.

- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., Pasquali, R. (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* 27, 73–100.
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., Gorman, A.M. (2016). The integrated stress response. *EMBO Rep.* 17, 1374–1395.
- Palazuelos, J., Ortega, Z., Díaz-Alonso, J., Guzmán, M., Galve-Roperh, I. (2012). CB2 cannabinoid receptors promote neural progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling. *J. Biol. Chem.* 287, 1198–1209.
- Pamplona, F.A., Takahashi, R.N. (2006). WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci. Lett.* 397, 88–92.
- Pamplona, F.A., Prediger, R.D.S., Pandolfo, P., Takahashi, R.N. (2006). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 188, 641–649.
- Pan, B., Hillard, C.J., Liu, Q. (2008). Endocannabinoid signaling mediates cocaine-induced inhibitory synaptic plasticity in midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* 28, 1385–1397.
- Panlilio, L.V., Solinas, M., Matthews, S.A., Goldberg, S.R. (2007). Previous exposure to THC alters the reinforcing efficacy and anxiety-related effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology* 32, 646–657.
- Paria, B.C., Song, H., Wang, X., Schmid, P.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H., Bonner, T.I., Zimmer, A., Dey, S.K. (2001). Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation. *J. Biol. Chem.* 276, 20523–20528.
- Patton, G.C., McMorris, B.J., Toumbourou, J.W., Hemphill, S.A., Donath, S., Catalano, R.F. (2004). Puberty and the onset of substance use and abuse. *Pediatrics* 114, e300-306.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., Cota, P., Wittnam, J.L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., et al. (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328, 753–756.
- Perrotti, L.I., Weaver, R.R., Robison, B., Renthal, W., Maze, I., Yazdani, S., Elmore, R.G., Knapp, D.J., Selley, D.E., Martin, B.R., et al. (2008). Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse* 62, 358–369.
- Pertwee, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* 74, 129–180.
- Pertwee, R.G. (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* 76, 1307–1324.

- Pertwee, R.G. (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.* *152*, 984–986.
- Petrosino, S., Cristino, L., Karsak, M., Gaffal, E., Ueda, N., Tüting, T., Bisogno, T., De Filippis, D., D’Amico, A., Saturnino, C., et al. (2010). Protective role of palmitoylethanolamide in contact allergic dermatitis. *Allergy* *65*, 698–711.
- Pettit, D.A., Harrison, M.P., Olson, J.M., Spencer, R.F., Cabral, G.A. (1998). Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J. Neurosci. Res.* *51*, 391–402.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 873–884.
- Piomelli, D. (2004). The endogenous cannabinoid system and the treatment of marijuana dependence. *Neuropharmacology* *47 Suppl 1*, 359–367.
- Pitler, T.A., Alger, B.E. (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurosci.* *12*, 4122–4132.
- Placzek, A.N., Prisco, G.V.D., Khatiwada, S., Sgritta, M., Huang, W., Krnjević, K., Kaufman, R.J., Dani, J.A., Walter, P., Costa-Mattioli, M. (2016). eIF2 α -mediated translational control regulates the persistence of cocaine-induced LTP in midbrain dopamine neurons. *ELife Sciences* *5*, e17517.
- Pliakas, A.M., Carlson, R.R., Neve, R.L., Konradi, C., Nestler, E.J., Carlezon, W.A. (2001). Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J. Neurosci.* *21*, 7397–7403.
- Pluye, P., Lehingue, Y., Aussilloux, C., Popa, I., Aiguesvives, C. (2001). [Mental and behavior disorders in children placed in long term care institutions in Hunedoara, Cluj and Timis, Romania]. *Sante* *11*, 5–12.
- Polissidis, A., Chouliara, O., Galanopoulos, A., Rentesi, G., Dosi, M., Hyphantis, T., Marselos, M., Papadopoulou-Daifoti, Z., Nomikos, G.G., Spyraiki, C., et al. (2010). Individual differences in the effects of cannabinoids on motor activity, dopaminergic activity and DARPP-32 phosphorylation in distinct regions of the brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *13*, 1175–1191.
- Polissidis, A., Galanopoulos, A., Naxakis, G., Papahatjis, D., Papadopoulou-Daifoti, Z., Antoniou, K. (2013). The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *16*, 393–403.
- Pontieri, F.E., Tanda, G., Di Chiara, G. (1995). Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 12304–12308.

- Pontieri, F.E., Monnazzi, P., Scontrini, A., Buttarelli, F.R., Patacchioli, F.R. (2001). Behavioral sensitization to heroin by cannabinoid pretreatment in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* *421*, R1-3.
- Pope, H.G., Gruber, A.J., Hudson, J.I., Huestis, M.A., Yurgelun-Todd, D. (2002). Cognitive measures in long-term cannabis users. *J Clin Pharmacol* *42*, 41S-47S.
- Pope, H.G., Gruber, A.J., Hudson, J.I., Cohane, G., Huestis, M.A., Yurgelun-Todd, D. (2003). Early-onset cannabis use and cognitive deficits: what is the nature of the association? *Drug Alcohol Depend* *69*, 303-310.
- Porcella, A., Gessa, G.L., Pani, L. (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol increases sequence-specific AP-1 DNA-binding activity and Fos-related antigens in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 1743-1751.
- Porter, A.C., Sauer, J.-M., Knierman, M.D., Becker, G.W., Berna, M.J., Bao, J., Nomikos, G.G., Carter, P., Bymaster, F.P., Leese, A.B., et al. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *301*, 1020-1024.
- Prini, P., Penna, F., Sciuccati, E., Alberio, T., Rubino, T. (2017). Chronic Δ^8 -THC Exposure Differently Affects Histone Modifications in the Adolescent and Adult Rat Brain. *Int J Mol Sci* *18*.
- Puighermanal, E., Marsicano, G., Busquets-Garcia, A., Lutz, B., Maldonado, R., Ozaita, A. (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat. Neurosci.* *12*, 1152-1158.
- Quinn, H.R., Matsumoto, I., Callaghan, P.D., Long, L.E., Arnold, J.C., Gunasekaran, N., Thompson, M.R., Dawson, B., Mallet, P.E., Kashem, M.A., et al. (2008). Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* *33*, 1113-1126.
- Radziszewska, E., Bojanowska, E. (2013). Effects of glucagon-like peptide-1 receptor stimulation and blockade on food consumption and body weight in rats treated with a cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55,212-2. *Med Sci Monit Basic Res* *19*, 6-11.
- Ravinet Trillou, C., Delgorge, C., Menet, C., Arnone, M., Soubrié, P. (2004). CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *28*, 640-648.
- Realini, N., Vigano', D., Guidali, C., Zamberletti, E., Rubino, T., Parolaro, D. (2011). Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology* *60*, 235-243.

- Reid, M.S., Berger, S.P. (1996). Evidence for sensitization of cocaine-induced nucleus accumbens glutamate release. *Neuroreport* 7, 1325–1329.
- Rey, J.M., Martin, A., Krabman, P. (2004). Is the party over? Cannabis and juvenile psychiatric disorder: the past 10 years. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43, 1194–1205.
- Reyes-Cabello, C., Alen, F., Gómez, R., Serrano, A., Rivera, P., Orío, L., Rodríguez de Fonseca, F., Pavón, F.J. (2012). Effects of the anandamide uptake blocker AM404 on food intake depend on feeding status and route of administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101, 1–7.
- Richards, E.J., Elgin, S.C.R. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489–500.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., Caput, D. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350, 240–244.
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., Manzoni, O.J. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8384–8388.
- Robins, L.N., Darvish, H.S., Murphy, G.E. (1970). The long-term outcome for adolescent drug users: a follow-up study of 76 users and 146 nonusers. *Proc Annu Meet Am Psychopathol Assoc* 59, 159–180.
- Robinson, T.E., Berridge, K.C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 18, 247–291.
- Robinson, T.E., Berridge, K.C. (2003). Addiction. *Annu Rev Psychol* 54, 25–53.
- Rodríguez de Fonseca, F., Ramos, J.A., Bonnín, A., Fernández-Ruiz, J.J. (1993). Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4, 135–138.
- Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Ramos, J.A., Martín, M., Fernández-Ruiz, J.J. (1994). Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Sci.* 54, 159–170.
- Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Martín-Calderón, J.L., Gorriti, M.A., Navarro, M. (1998). Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol. Dis.* 5, 483–501.
- Rodríguez-Arias, M., Manzanedo, C., Roger-Sánchez, C., Do Couto, B.R., Aguilar, M.A., Miñarro, J. (2010). Effect of adolescent exposure to WIN 55212-2 on the acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 166–171.

- Rodvelt, K.R., Bumgarner, D.M., Putnam, W.C., Miller, D.K. (2007). WIN-55,212-2 and SR-141716A alter nicotine-induced changes in locomotor activity, but do not alter nicotine-evoked [3H]dopamine release. *Life Sci.* *80*, 337–344.
- Romero, J., García, L., Cebeira, M., Zadrozny, D., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A. (1995). The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci.* *56*, 2033–2040.
- Rubino, T., Forlani, G., Viganò, D., Zippel, R., Parolaro, D. (2004). Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol. Cell. Neurosci.* *25*, 355–362.
- Rubino, T., Guidali, C., Viganò, D., Realini, N., Valenti, M., Massi, P., Parolaro, D. (2008a). CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology* *54*, 151–160.
- Rubino, T., Viganò, D., Realini, N., Guidali, C., Braidà, D., Capurro, V., Castiglioni, C., Cherubino, F., Romualdi, P., Candeletti, S., et al. (2008b). Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* *33*, 2760–2771.
- Rubino, T., Realini, N., Braidà, D., Alberio, T., Capurro, V., Viganò, D., Guidali, C., Sala, M., Fasano, M., Parolaro, D. (2009a). The depressive phenotype induced in adult female rats by adolescent exposure to THC is associated with cognitive impairment and altered neuroplasticity in the prefrontal cortex. *Neurotox Res* *15*, 291–302.
- Rubino, T., Realini, N., Braidà, D., Guidi, S., Capurro, V., Viganò, D., Guidali, C., Pinter, M., Sala, M., Bartsaghi, R., et al. (2009b). Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* *19*, 763–772.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 1092–1101.
- Safo, P.K., Regehr, W.G. (2005). Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron* *48*, 647–659.
- Saghatelian, A., Trauger, S.A., Want, E.J., Hawkins, E.G., Siuzdak, G., Cravatt, B.F. (2004). Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. *Biochemistry* *43*, 14332–14339.
- SAMHSA, 2005 (2005). Substance Abuse and Mental Health Services Administration. 2004 National Survey on Drug Use & Health.
- Scherma, M., Dessì, C., Muntoni, A.L., Lecca, S., Satta, V., Luchicchi, A., Pistis, M., Panlilio, L.V., Fattore, L., Goldberg, S.R., et al. (2016). Adolescent $\Delta(9)$ -

Tetrahydrocannabinol Exposure Alters WIN55,212-2 Self-Administration in Adult Rats. *Neuropsychopharmacology* 41, 1416–1426.

Schneider, M., Koch, M. (2007). The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *Eur Neuropsychopharmacol* 17, 180–186.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.

Schneider, M., Drews, E., Koch, M. (2005). Behavioral effects in adult rats of chronic prepubertal treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Behav Pharmacol* 16, 447–454.

Schoenbaum, G., Roesch, M.R., Stalnaker, T.A. (2006). Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends Neurosci.* 29, 116–124.

Schweinsburg, A.D., Brown, S.A., Tapert, S.F. (2008). The influence of marijuana use on neurocognitive functioning in adolescents. *Curr Drug Abuse Rev* 1, 99–111.

Sebti, S., Prébois, C., Pérez-Gracia, E., Bauvy, C., Desmots, F., Pirot, N., Gongora, C., Bach, A.-S., Hubberstey, A.V., Palissot, V., et al. (2014). BAG6/BAT3 modulates autophagy by affecting EP300/p300 intracellular localization. *Autophagy* 10, 1341–1342.

Segev, A., Rubin, A.S., Abush, H., Richter-Levin, G., Akirav, I. (2014). Cannabinoid receptor activation prevents the effects of chronic mild stress on emotional learning and LTP in a rat model of depression. *Neuropsychopharmacology* 39, 919–933.

Selley, D.E., Rorrer, W.K., Breivogel, C.S., Zimmer, A.M., Zimmer, A., Martin, B.R., Sim-Selley, L.J. (2001). Agonist efficacy and receptor efficiency in heterozygous CB1 knockout mice: relationship of reduced CB1 receptor density to G-protein activation. *J. Neurochem.* 77, 1048–1057.

Simon, G.M., Cravatt, B.F. (2010). Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol Biosyst* 6, 1411–1418.

Solinas, M., Panlilio, L.V., Antoniou, K., Pappas, L.A., Goldberg, S.R. (2003). The cannabinoid CB1 antagonist N-piperidinyl-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl) -4-methylpyrazole-3-carboxamide (SR-141716A) differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous reinforcement, fixed ratio, and progressive ratio schedules of drug self-administration in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 93–102.

Solinas, M., Panlilio, L.V., Tanda, G., Makriyannis, A., Matthews, S.A., Goldberg, S.R. (2005). Cannabinoid agonists but not inhibitors of endogenous cannabinoid transport or metabolism enhance the reinforcing efficacy of heroin in rats. *Neuropsychopharmacology* 30, 2046–2057.

- Solinas, M., Justinova, Z., Goldberg, S.R., Tanda, G. (2006). Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. *J. Neurochem.* *98*, 408–419.
- Soria, G., Mendizábal, V., Touriño, C., Robledo, P., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* *30*, 1670–1680.
- Soria-Gómez, E., Matias, I., Rueda-Orozco, P.E., Cisneros, M., Petrosino, S., Navarro, L., Di Marzo, V., Prospéro-García, O. (2007). Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *Br. J. Pharmacol.* *151*, 1109–1116.
- Sowell, E.R., Thompson, P.M., Holmes, C.J., Jernigan, T.L., Toga, A.W. (1999). In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nat. Neurosci.* *2*, 859–861.
- Sowell, E.R., Thompson, P.M., Toga, A.W. (2004). Mapping changes in the human cortex throughout the span of life. *Neuroscientist* *10*, 372–392.
- Spanagel, R., Weiss, F. (1999). The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci.* *22*, 521–527.
- Spano, M.S., Fattore, L., Cossu, G., Deiana, S., Fadda, P., Fratta, W. (2004). CB1 receptor agonist and heroin, but not cocaine, reinstate cannabinoid-seeking behaviour in the rat. *Br. J. Pharmacol.* *143*, 343–350.
- Spano, M.S., Ellgren, M., Wang, X., Hurd, Y.L. (2007). Prenatal Cannabis Exposure Increases Heroin Seeking with Allostatic Changes in Limbic Enkephalin Systems in Adulthood. *Biological Psychiatry* *61*, 554–563.
- Spano, M.S., Fadda, P., Frau, R., Fattore, L., Fratta, W. (2010). Cannabinoid self-administration attenuates PCP-induced schizophrenia-like symptoms in adult rats. *Eur Neuropsychopharmacol* *20*, 25–36.
- Staiano, R.I., Loffredo, S., Borriello, F., Iannotti, F.A., Piscitelli, F., Orlando, P., Secondo, A., Granata, F., Lepore, M.T., Fiorelli, A., et al. (2016). Human lung-resident macrophages express CB1 and CB2 receptors whose activation inhibits the release of angiogenic and lymphangiogenic factors. *J. Leukoc. Biol.* *99*, 531–540.
- Stella, N. (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* *58*, 1017–1030.
- van der Stelt, M., Di Marzo, V. (2005). Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med.* *7*, 37–50.
- Stenbacka, M., Allebeck, P., Brandt, L., Romelsjö, A. (1992). Intravenous drug abuse in young men: risk factors assessed in a longitudinal perspective. *Scand J Soc Med* *20*, 94–101.

- Stenbacka, M., Allebeck, P., Romelsjö, A. (1993). Initiation into drug abuse: the pathway from being offered drugs to trying cannabis and progression to intravenous drug abuse. *Scand J Soc Med* 21, 31–39.
- Stewart, J., Badiani, A. (1993). Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* 4, 289–312.
- Stopponi, S., Soverchia, L., Ubaldi, M., Cippitelli, A., Serpelloni, G., Ciccocioppo, R. (2014). Chronic THC during adolescence increases the vulnerability to stress-induced relapse to heroin seeking in adult rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 1037–1045.
- Su, S.-H., Wang, Y.-Q., Wu, Y.-F., Wang, D.-P., Lin, Q., Hai, J. (2016). Cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 may protect against cognitive impairment in rats of chronic cerebral hypoperfusion via PI3K/AKT signaling. *Behavioural Brain Research* 313, 334–344.
- Suárez, I., Bodega, G., Fernández-Ruiz, J., Ramos, J.A., Rubio, M., Fernández, B. (2004). Down-regulation of the AMPA glutamate receptor subunits GluR1 and GluR2/3 in the rat cerebellum following pre- and perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure. *Cerebellum* 3, 66–74.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 89–97.
- Sulcova, E., Mechoulam, R., Frider, E. (1998). Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59, 347–352.
- Swerdlow, N.R., Braff, D.L., Geyer, M.A. (2000). Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav Pharmacol* 11, 185–204.
- Szabo, B., Siemes, S., Wallmichrath, I. (2002). Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur. J. Neurosci.* 15, 2057–2061.
- Szutorisz, H., Hurd, Y.L. (2016). Epigenetic Effects of Cannabis Exposure. *Biological Psychiatry* 79, 586–594.
- Tait, R.J., Caldicott, D., Mountain, D., Hill, S.L., Lenton, S. (2016). A systematic review of adverse events arising from the use of synthetic cannabinoids and their associated treatment. *Clin Toxicol (Phila)* 54, 1–13.
- Talwar, R., Potluri, V.K. (2011). Cannabinoid 1 (CB1) receptor--pharmacology, role in pain and recent developments in emerging CB1 agonists. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10, 536–544.
- Tanda, G., Pontieri, F.E., Di Chiara, G. (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 276, 2048–2050.

- Tapert, S.F., Granholm, E., Leedy, N.G., Brown, S.A. (2002). Substance use and withdrawal: neuropsychological functioning over 8 years in youth. *J Int Neuropsychol Soc* 8, 873–883.
- Teske, B.F., Fusakio, M.E., Zhou, D., Shan, J., McClintick, J.N., Kilberg, M.S., Wek, R.C. (2013). CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Mol. Biol. Cell* 24, 2477–2490.
- Tomasiewicz, H.C., Jacobs, M.M., Wilkinson, M.B., Wilson, S.P., Nestler, E.J., Hurd, Y.L. (2012). Proenkephalin Mediates the Enduring Effects of Adolescent Cannabis Exposure Associated with Adult Opiate Vulnerability. *Biological Psychiatry* 72, 803–810.
- Tortoriello, G., Morris, C.V., Alpar, A., Fuzik, J., Shirran, S.L., Calvigioni, D., Keimpema, E., Botting, C.H., Reinecke, K., Herdegen, T., et al. (2014). Miswiring the brain: Δ 9-tetrahydrocannabinol disrupts cortical development by inducing an SCG10/stathmin-2 degradation pathway. *EMBO J.* 33, 668–685.
- Trad, P.V. (1994). Developmental vicissitudes that promote drug abuse in adolescents. *Am J Drug Alcohol Abuse* 20, 459–481.
- Turner, B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22, 836–845.
- Turu, G., Hunyady, L. (2010). Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 75–85.
- Tzschentke, T.M., Schmidt, W.J. (2003). Glutamatergic mechanisms in addiction. *Mol. Psychiatry* 8, 373–382.
- Ueda, N., Kurahashi, Y., Yamamoto, S., Tokunaga, T. (1995). Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J. Biol. Chem.* 270, 23823–23827.
- UNODC (2017). United Nations Office on Drugs and Crime; Drugs Price Report.
- Vanderschuren, L.J., Kalivas, P.W. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl.)* 151, 99–120.
- Varvel, S.A., Hamm, R.J., Martin, B.R., Lichtman, A.H. (2001). Differential effects of delta 9-THC on spatial reference and working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 157, 142–150.
- Vela, G., Martín, S., García-Gil, L., Crespo, J.A., Ruiz-Gayo, M., Fernández-Ruiz, J.J., García-Lecumberri, C., Pélaprat, D., Fuentes, J.A., Ramos, J.A., et al. (1998). Maternal exposure to delta9-tetrahydrocannabinol facilitates morphine self-administration behavior and changes regional binding to central mu opioid receptors in adult offspring female rats. *Brain Res.* 807, 101–109.

- Verty, A.N.A., McGregor, I.S., Mallet, P.E. (2005). Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology* 49, 1101–1109.
- Vinod, K.Y., Hungund, B.L. (2005). Endocannabinoid lipids and mediated system: implications for alcoholism and neuropsychiatric disorders. *Life Sci.* 77, 1569–1583.
- Volkow, N.D., Li, T.-K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 963–970.
- Wagner, F.A., Anthony, J.C. (2002). Into the world of illegal drug use: exposure opportunity and other mechanisms linking the use of alcohol, tobacco, marijuana, and cocaine. *Am. J. Epidemiol.* 155, 918–925.
- Walters, C.L., Blendy, J.A. (2001). Different requirements for cAMP response element binding protein in positive and negative reinforcing properties of drugs of abuse. *J. Neurosci.* 21, 9438–9444.
- Wang, H., Dey, S.K., Maccarrone, M. (2006). Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr. Rev.* 27, 427–448.
- Wang, L., Lv, Z., Hu, Z., Sheng, J., Hui, B., Sun, J., Ma, L. (2010). Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKIIalpha in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement. *Neuropsychopharmacology* 35, 913–928.
- Wegener, N., Koch, M. (2009). Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res.* 1253, 81–91.
- Wegener, N., Kuhnert, S., Thüns, A., Roese, R., Koch, M. (2008). Effects of acute systemic and intra-cerebral stimulation of cannabinoid receptors on sensorimotor gating, locomotion and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 198, 375–385.
- Wek, R.C., Jiang, H.-Y., Anthony, T.G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 7–11.
- Welch, K.A., McIntosh, A.M., Job, D.E., Whalley, H.C., Moorhead, T.W., Hall, J., Owens, D.G.C., Lawrie, S.M., Johnstone, E.C. (2011). The impact of substance use on brain structure in people at high risk of developing schizophrenia. *Schizophr Bull* 37, 1066–1076.
- White, F.J., Kalivas, P.W. (1998). Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* 51, 141–153.
- Wiley, J.L., Burston, J.J., Leggett, D.C., Alekseeva, O.O., Razdan, R.K., Mahadevan, A., Martin, B.R. (2005). CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br. J. Pharmacol.* 145, 293–300.

- Williams, C.M., Kirkham, T.C. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 143, 315–317.
- Williams, C.M., Rogers, P.J., Kirkham, T.C. (1998). Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiol. Behav.* 65, 343–346.
- Wilson, W., Mathew, R., Turkington, T., Hawk, T., Coleman, R.E., Provenzale, J. (2000). Brain morphological changes and early marijuana use: a magnetic resonance and positron emission tomography study. *J Addict Dis* 19, 1–22.
- Wise, R.A., Bozarth, M.A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94, 469–492.
- Wu, X., French, E.D. (2000). Effects of chronic delta9-tetrahydrocannabinol on rat midbrain dopamine neurons: an electrophysiological assessment. *Neuropharmacology* 39, 391–398.
- Wu, C.-S., Chen, H., Sun, H., Zhu, J., Jew, C.P., Wager-Miller, J., Straiker, A., Spencer, C., Bradshaw, H., Mackie, K., et al. (2013). GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS ONE* 8, e60314.
- Xi, Z.-X., Peng, X.-Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.-Y., Liu, Q.-R., Yang, H.-J., Bi, G.-H., Li, J., Gardner, E.L. (2011). Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat. Neurosci.* 14, 1160–1166.
- Yamaguchi, K., Kandel, D.B. (1984). Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: II. Sequences of progression. *Am J Public Health* 74, 668–672.
- Young, S.T., Porrino, L.J., Iadarola, M.J. (1991). Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1291–1295.
- Yücel, M., Solowij, N., Respondek, C., Whittle, S., Fornito, A., Pantelis, C., Lubman, D.I. (2008). Regional brain abnormalities associated with long-term heavy cannabis use. *Arch. Gen. Psychiatry* 65, 694–701.
- Zeanah, C.H., Egger, H.L., Smyke, A.T., Nelson, C.A., Fox, N.A., Marshall, P.J., Guthrie, D. (2009). Institutional rearing and psychiatric disorders in Romanian preschool children. *Am J Psychiatry* 166, 777–785.
- Zermiani, M., Serpelloni, G. Cannabis e danni alla salute. Capitolo 6.
- Zhang, J., Wang, N., Chen, B., Wang, Y., He, J., Cai, X., Zhang, H., Wei, S., Li, S. (2016). Blockade of Cannabinoid CB1 receptor attenuates the acquisition of morphine-induced conditioned place preference along with a downregulation of ERK, CREB phosphorylation, and BDNF expression in the nucleus accumbens and hippocampus. *Neuroscience Letters* 630, 70–76.
- Zhuang, S., Kittler, J., Grigorenko, E.V., Kirby, M.T., Sim, L.J., Hampson, R.E., Childers, S.R., Deadwyler, S.A. (1998). Effects of long-term exposure to delta9-THC on

expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 62, 141–149.

Zygmunt, P.M., Sørsgård, M., Petersson, J., Johansson, R., Högestätt, E.D. (2000). Differential actions of anandamide, potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig basilar artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 361, 535–542.