



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Corso di dottorato in NEUROSCIENZE

Ciclo XXX

Dipendenza da eroina e lunghezza dei telomeri nei leucociti

SSD BIO/14

Presentata da:	Dott.ssa Carla Melis
Coordinatore Dottorato	Prof. Antonio Argiolas
Tutor	Prof.ssa Maria Del Zompo

Esame finale anno accademico 2016 – 2017
Tesi discussa nella sessione d'esame Febbraio-Marzo 2018



“La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze dell’Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2016/2017 - XXX ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

Abstract

Telomeres are repetitive sequences at the end of chromosomes that play a key role in the maintenance of genomic stability. In general, during each cellular division, the telomeres shorten but also other external factor, like various mental states, depressed mood, drug and alcohol addiction can lead to an accelerated erosion of the chromosome terminal portion. To this end, the present study sought to investigate the correlation between heroin abuse and leukocyte telomere length (LTL). For a subgroup of heroin-dependent patients and healthy controls, we also analysed the association between LTL and the 5-HTTLPR polymorphism. The 5-HTTLPR polymorphism is a 44 bp insert / deletion located in the promoter region of the gene encoding for the serotonin transporter (hSERT). The short variant (S/S) is associated with a lower expression of 5-HTT and, as recently shown in a Chinese population, with shorter LTL.

The study was conducted on a sample of 99 heroin-dependent patients, in methadone maintenance therapy, and 99 healthy controls. The patients were diagnosed by the Drug Addiction Service in Cagliari (ASL8), according to the criteria of DSM-IV. The genomic DNA extraction was performed by conventional salting-out method and the relative quantification for LTL was carried out with qPCR by SYBR Green Assay using Step One Plus Instrument (ThermoFisher).

The LTL was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method ($\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ sample} - \Delta CT \text{ calibrator}$; $\Delta CT \text{ sample} = CT \text{ Tel gene} - CT \text{ Hgb gene}$). The Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to identify genotypes for the 5-HTTLPR polymorphism. The association between LTL and quantitative (e.g., age at sampling) and dichotomous variables (e.g., sex, diagnosis for heroin addiction) was evaluated using the Spearman correlation test and the U test of Mann-Whitney, respectively. To evaluate the association between LTL and clinical variables, correcting for age at sampling, a linear regression model was constructed using LTL as the dependent variable, clinical variables as predictors and age as covariate. Finally, the association between LTL and the 5-HTTLPR polymorphism genotype was also evaluated using a linear regression model with LTL as the dependent variable, the genotype as a predictor, and the age of withdrawal as a covariate.

We found a negative correlation between LTL and age at sampling (Spearman rho = -0.17, p = 0.015) and no association with sex. The Mann-Whitney's U test did not highlight a difference in mean LTL between heroin-dependent patients and healthy controls.

No clinical variable analysed was associated with LTL. Finally, the linear regression model did not reveal a significant association between LTL and the genotype for 5-HTTLPR polymorphism.

Our study didn't show a significant correlation between LTL, heroin addiction and the genotype for 5-HTTLPR polymorphism. This finding does not support the hypothesis of heroin addiction as an illness associated with accelerated telomere shortening. However, more studies on larger independent samples controlling for potential variables suggested to be able to exert an impact on LTL are necessary.

Keywords: Telomere, Leukocyte telomere length (LTL), heroin addiction, 5-HTTLPR

Indice

1. Dipendenza da Oppiacei	5
1.1 Definizione della “dipendenza”.....	5
1.2 Cenni sugli Oppiacei	6
1.3 Sistemi biologici coinvolti nella dipendenza da oppiacei	7
1.4 Basi genetiche della dipendenza	8
1.5 Incidenza della dipendenza da eroina e ripercussioni sociali.....	10
1.6 Trattamento farmacologico per la dipendenza da oppiacei	11
2. Eroina e invecchiamento	14
2.1 Sostanze d’abuso e invecchiamento cellulare	14
2.2 Telomeri: marker biologici dell’invecchiamento cellulare.....	16
2.3 Telomeri e dipendenza.....	19
2.4 Lunghezza dei telomeri negli eroinomani	20
2.5 Telomeri e trasportatore della serotonina	22
3. Scopo della ricerca	25
4. Materiale e Metodi	26
4.1 Valutazione della lunghezza media dei telomeri nei leucociti.....	26
a) Caratteristiche cliniche e demografiche del campione.....	26
b) Estrazione e quantificazione dei campioni di DNA	26
c) Analisi della lunghezza media dei telomeri	27
d) Real-Time PCR	29
4.2 Genotipizzazione del polimorfismo 5-HTTLPR del gene 5-HTT.....	30
4.3 Analisi statistiche.....	31
5. Risultati	33
6. Discussione	38
7. Conclusioni	40
Bibliografia	41

1. Dipendenza da Oppiacei

1.1 Definizione della “dipendenza”

Nel 1951 il termine “dipendenza” venne definito dall’organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come: “Stato d’intossicazione periodica prodotta dalle ripetute assunzioni di una sostanza naturale o sintetica con le seguenti caratteristiche: un irresistibile bisogno o desiderio di continuare ad assumere la sostanza e quindi di procurarsela con ogni mezzo; tendenza ad aumentare la dose per tolleranza; dipendenza psichica e dipendenza fisica caratterizzata da sindrome di astinenza; effetti dannosi per l’individuo e la società”.

L’OMS distingue perciò il concetto di “dipendenza psichica” e “dipendenza fisica” intendendo per la prima: “un sentimento di bisogno assoluto e la tendenza psicologica che richiede una somministrazione periodica o continuativa della droga per produrre l’effetto desiderato o per evitare disagio”.

La “dipendenza fisica”, invece, è caratterizzata dal fatto che l’interruzione della periodica assunzione di una sostanza stupefacente, oltre al disagio psicologico, provoca la cosiddetta “crisi di astinenza”, cioè una serie di disturbi fisici, clinicamente obiettabili, dovuti a un alterato stato fisiologico collegato a un’acquisita esigenza biochimica dell’organismo.

Più nello specifico, l’OMS, l’Ufficio Statunitense per droga e Crimini (UNODC) e il Programma Nazionale Statunitense su HIV/AIDS (UNAIDS) definiscono la “dipendenza da oppiacei” come: “un desiderio forte e irrefrenabile di assumere oppiacei; difficoltà nel controllare il comportamento di consumo; uno stato di astinenza quando l’uso di oppiacei è interrotto o ridotto; segni di assuefazione, come l’impiego di dosi maggiori per ottenere l’effetto originariamente prodotto con dosi minori; distacco od omissione del rapporto con fonti di piacere alternative; persistenza dell’uso di oppiacei nonostante la consapevolezza di evidenti conseguenze dannose” (Who, Unodc, Unaid, 2004).

1.2 Cenni sugli Oppiacei

La dipendenza da oppiacei è definita, secondo l'ICD-10 e il DSMIV, come “una malattia cronica caratterizzata da un insieme di sintomi che agiscono sulla sfera comportamentale, psicologica e somatica” (World Health Organization, 1992; American Psychiatric Association, 2000) con un elevato tasso di recidiva, di mortalità e di comorbidità psichiatriche associate (Peles *et al.*, 2010; Degenhardt *et al.*, 2011).

Gli oppiacei sono un gruppo di sostanze alcaloidi contenute nell'oppio, un lattice secco di colore brunastro che si estrae dalle capsule verdi del *Papaver Somniferum*; tra queste vi sono la morfina, la codeina, la papaverina, la tebaina e la noscapina (Dewick, 2009). L'utilizzo dell'oppio da parte dell'uomo risale a migliaia di anni fa, quando era somministrato come sostanza medicinale euforizzante, analgesica, induttrice del sonno, antidiarrea e ricreazionale (Rang *et al.*, 2003). Prodotto sintetico derivato dalla morfina è l'eroina, creata per la prima volta nel 1874 da A.C Wright e commercializzata nel 1898 come farmaco anti asma e anti tubercolosi (Sneader, 1998). La sintesi dell'eroina si ottiene per esterificazione con anidride acetica dei gruppi polari idrossilici della molecola della morfina in posizione C3 e C6 (Klemenc, 20029). L'aggiunta chimica dei gruppi esteri nella molecola della morfina ne aumenta la sua lipofilia (Williams FM., 1985; Williams PE., 1985) permettendo all'eroina di oltrepassare molto più velocemente la barriera ematoencefalica, conferendogli un più marcato e rapido effetto rispetto a quello del suo precursore (Oldendorf *et al.*, 1972; Cornford *et al.*, 1982). Sebbene i recettori per gli oppioidi abbiano una stereo specificità, l'eroina mostra una minor affinità per questi rispetto ai suoi metaboliti come la 6 monoacetilmorfina (6MA) e il 6-glucoronide (M6G) (Mignat *et al.*, 1996; Selley *et al.*, 2001); per questo l'eroina è considerata un profarmaco in quanto la sua attività è esplicata principalmente dai suoi metaboliti dopo la sua somministrazione (Inturrisi *et al.*, 1983; Selley *et al.*, 2001).

1.3 Sistemi biologici coinvolti nella dipendenza da oppiacei

Lo sviluppo della dipendenza da oppiacei è basato sull'azione che questi esercitano sui loro recettori. I recettori per gli oppioidi μ , κ , δ , (recentemente denominati MOP, KOP, DOP) sono stati descritti in maniera inequivocabile da Snyder, Simon e Terenius, grazie all'utilizzo di tecniche di binding recettoriale (Pert e Snyder, 1973; Simon *et al.*, 1973; Terenius, 1973). Essi si presentano in concentrazione diversa in base alla localizzazione anatomica (principalmente midollo spinale, tronco cerebrale, locus coeruleus, diencefalo, telencefalo). Tali recettori appartengono alla super famiglia dei recettori associati a proteine G.

Un'azione diretta su questi recettori è svolta dagli oppioidi endogeni: le endorfine, le encefaline, le dinorfine; queste hanno fisiologicamente un ruolo chiave nell'aumentare la soglia del dolore (ruolo che spiega l'effetto analgesico degli oppiacei) e la regolazione dell'umore (Kreek *et al.*, 2002).

Le proprietà stupefacenti degli oppioidi appaiono legate soprattutto alla rispettiva capacità di agonismo col recettore μ che, frenando a livello dell'Area Tegmentale Ventrale (AVT) la tonica inibizione esercitata dai neuroni GABAergici sul sistema dopaminergico (Johnson e North, 1992), determina un cospicuo aumento, dose dipendente, della concentrazione extraneuronale di dopamina (DA) a livello del sistema mesolimbico, parte coinvolta nel circuito della gratificazione. Infatti, la dopamina nel sistema limbico ha un ruolo fondamentale nelle proprietà di rinforzo di un dato stimolo e nell'apprendimento (Nestler, 1996 e 1997).

L'attivazione dei recettori μ e δ da parte della morfina e dell'eroina è responsabile dell'aumento della DA in queste aree del cervello e del loro effetto euforizzante; i recettori κ , invece, supportano l'analgesia e provocano disforia oltre che alterazioni delle secrezioni ormonali (Baccini, 1990).

In queste aree non agisce la sola dopamina, ma ad essere implicata è anche la serotonina.

Infatti gli oppiacei agirebbero facilitando la secrezione della serotonina (5-HT) attraverso una riduzione del controllo inibitorio GABAergico (Jolas *et al.*, 2000). Esperimenti condotti su animali con tolleranza per l'eroina hanno mostrato elevati livelli di 5-OH indolacetico, un metabolita della

serotonina (Haleem *et al.*, 1994). Alcuni studi suggeriscono il ruolo preponderante della 5-HT nell'azione degli oppiacei, come per esempio lo studio di Hain *et al.*(1999), il quale attribuisce il coinvolgimento centrale dei recettori serotoninergici nel ruolo analgesico esercitato dalla morfina (Hain *et al.*, 1999).

1.4 Basi genetiche della dipendenza

La dipendenza non è un'inevitabile conseguenza dell'uso di sostanze d'abuso, come dimostrato dall'uso di oppiacei nel trattamento del dolore cronico (Noble *et al.*, 2010). La dipendenza, infatti, è una malattia complessa e multifattoriale causata dall'impatto diretto del farmaco sull'individuo e da fattori ambientali come: le influenze sociali, l'ambiente familiare e, in particolare, la risposta allo stress.

Inoltre, la presenza di varianti specifiche su geni multipli può aumentare o diminuire la vulnerabilità allo sviluppo di dipendenze specifiche. Queste varianti geniche possono funzionare in sinergia con alcuni polimorfismi genetici coinvolti in comuni condizioni di comorbidità. Questi fattori genetici non solo contribuiscono alla vulnerabilità dello sviluppo della tossicodipendenza, ma condizionano anche la variabilità interindividuale nell'efficacia del trattamento per la dipendenza stessa (Kreek *et al.*, 2005).

Studi condotti su famiglie hanno evidenziato che la componente genetica ha un ruolo chiave nella vulnerabilità della dipendenza, (Merikangas *et al.*, 1998; Ball e Collier, 2002; Ball *et al.*, 2007).

Goldman *et al* definiscono la dipendenza come uno dei disturbi psichiatrici complessi caratterizzata da maggiore ereditabilità, considerando, ovviamente, la circostanza che l'individuo debba effettivamente ricorrere all'uso della sostanza d'abuso affinché la predisposizione genetica possa essere espressa (Goldman *et al.*, 2005).

Da studi condotti sui gemelli, è emerso che il 40-60% del rischio di sviluppare disturbi da abuso di sostanze è causato da fattori genetici, anche se tale percentuale varia secondo la sostanza in oggetto (Nestler, 2000; Uhl *et al.*, 2004).

E' necessario infatti tenere in considerazione la variabilità interindividuale nei processi farmacocinetici e farmacodinamici delle sostanze d'abuso (ad esempio il metabolismo della droga, il relativo assorbimento, l'escrezione, l'attività o la sensibilità alla droga), nei tratti comportamentali che influenzano la predisposizione di un individuo a provare le droghe (ad esempio l'impulsività, la ricerca di novità), oppure la probabilità di sviluppare dipendenza se si utilizzano droghe (per esempio quanto si considerino ricompensanti gli effetti della droga) (Rhee *et al.*, 2003). Nonostante le forti evidenze sui contributi genetici nei confronti della vulnerabilità alla dipendenza, i tentativi di identificare geni specifici coinvolti inequivocabilmente nella suscettibilità alla dipendenza si sono rivelati finora poco soddisfacenti. Studi di associazione su larga scala hanno permesso di identificare numerosi geni candidati promettenti che potrebbero modulare la vulnerabilità alla dipendenza (Ball e Collier, 2002; Tyndale, 2003). Tuttavia pochi di questi alleli sono stati replicati con successo, e molte di queste associazioni con un effetto perlopiù modesto (Tyndale, 2003).

La maggior parte dei geni candidati identificati finora codificano per elementi coinvolti nella neurotrasmissione dopaminergica, come recettori e trasportatori della dopamina, oppure per proteine che influenzano l'attività farmacologica o il metabolismo delle droghe.

Diversi studi hanno riportato associazione tra l'uso di sostanze e polimorfismi genetici localizzati nei geni che codificano per i recettori oppiacei (OPRM1 e OPRK1), per la serotonina (5-hydroxytryptamine-1B (HTR1B)), per la melanocortina (MC2R), per gli oppiacei endogeni (prodinorfina [PdYN]) e per gli enzimi coinvolti nel metabolismo e catabolismo delle monomanie (catecol-O-metiltransferasi [COMT] e triptofano-idrossilasi [TPH]) (Yuferov *et al.*, 2010).

1.5 Incidenza e ripercussioni sociali della dipendenza da oppiacei

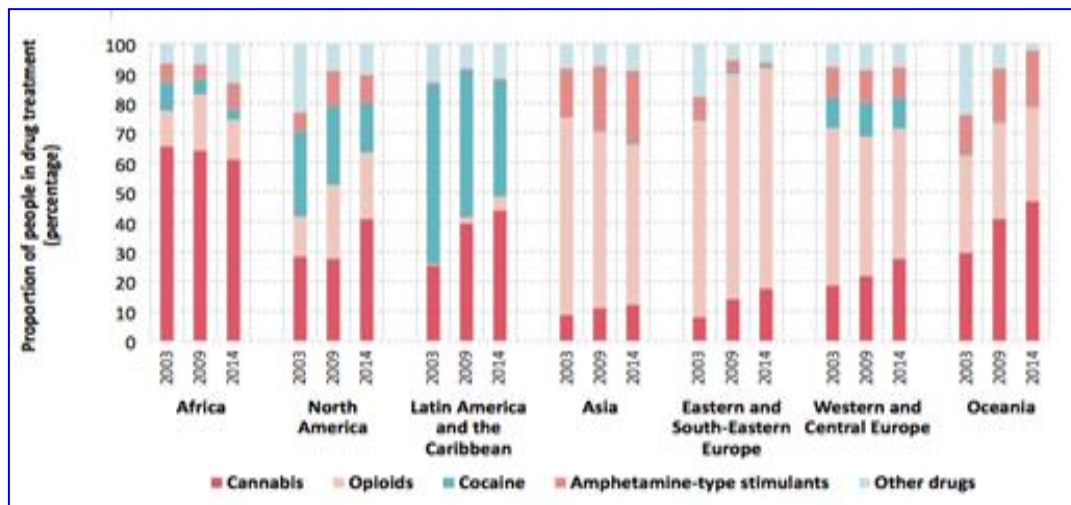
La dipendenza da oppiacei è una malattia cronica a decorso recidivante (Leshner, 1997), con ripercussioni immediate sulla sfera individuale della persona che tendono a estendersi, poi, sul piano sociale. Le persone dipendenti da oppioidi sono esposte a gravi rischi per la salute, quali l'overdose, la trasmissione di malattie infettive per via sessuale o parenterale, le frequenti ospedalizzazioni (Hulse, 1999).

Nel suo complesso la dipendenza rappresenta un problema economico per la società, sia in termini di costi sanitari diretti, sia in termini di qualità di vita della comunità. Inoltre, la dipendenza da oppiacei riduce la produttività lavorativa, crea disoccupazione, assenteismo e mortalità prematura dei lavoratori (Who, 2009). Studi epidemiologici condotti su scala mondiale indicano che ci sono 15.5 milioni di persone dipendenti da oppiacei in tutto il mondo (UNODC, 2006).

In Europa, secondo il World Drug report del 2016 (Figura 1), il tasso di consumo di oppioidi è diminuito negli ultimi anni (EMCDDA, 2014), sebbene ci siano ancora circa 1,3 milioni di individui che ne fanno utilizzo, con una prevalenza di circa lo 0,4%. Negli Stati Uniti invece circa 3.7 milioni di individui hanno utilizzato l'eroina almeno una volta nella loro vita, e 750.000 - 1.000.000 di individui sono attualmente dipendenti dall'eroina (Kleber et al., 2007; Kessler *et al.*, 2012). L'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che l'onere del danno derivante dall'uso di oppiacei è di circa 11,2 milioni di "Disability-adjusted life year" indicato con l'acronimo di DALY (Degendhardt e Charloson *et al.*, 2010; Degendhardt e Whiteford *et al.*, 2010). Il DALY è una misura su scala globale che stima la gravità di una malattia calcolata come il numero di anni persi a causa della disabilità o della morte prematura (WHO, 2004).

In particolare, negli Stati Uniti vi è un abuso dell'utilizzo di oppiacei prescritti a scopo terapeutico; tale abuso ha creato molteplici morti associate a un sovradosaggio di antidolorifici su base oppiacee e avvelenamenti accidentali nei bambini (Lavonas *et al.*, 2013; Imtiaz *et al.*, 2014).

Figura 1. Percentuali di utilizzo mondiale delle sostanze d'abuso dal 2003 fino al 2014



Da World drug report, 2016

1.6 Trattamento farmacologico della dipendenza

Superare la dipendenza da oppiacei nel senso di una guarigione completa non è facile; a livello cellulare, i cambiamenti che avvengono per l'esposizione alle sostanze possono persistere anche dopo anni che l'uso si è interrotto (Hyman, 2001; Kalivas e O'brien, 2008).

In aggiunta, i soggetti dipendenti generalmente abusano anche di altre sostanze quali alcool e benzodiazepine che possono interagire con gli oppiacei causando disfunzioni renali o epatiche. Gli obiettivi del trattamento farmacologico per la dipendenza da sostanze da abuso sono molteplici e tra questi vi sono quelli di: contrastare la dipendenza a livello di tutte le sostanze utilizzate, ridurre la mortalità e la morbilità, migliorare la salute fisica e psichica del paziente, ridurre i comportamenti criminali facilitandone la reintegrazione nel sistema scolastico o lavorativo (WHO, UNODOCS, UNAIDS. 2004).

Il trattamento di mantenimento con agonisti degli oppioidi (AOT) è il trattamento di prima linea e meglio consolidato nella tossicodipendenza da oppiacei; infatti metadone, buprenorfina o la combinazione di buprenorfina e naloxone (antagonista degli oppiacei) sono frequentemente utilizzati (Mammen e Bell, 2009; Soyka *et al.*, 2011). Il metadone e la buprenorfina hanno dimostrato avere una grande efficacia (Cannock *et al.*, 2007; Mattick *et al.*, 2014; Wittchen *et al.*, 2015), anche se a oggi sono stati eseguiti solo pochi studi a lungo termine, soprattutto nei pazienti in mantenimento con metadone (Hser *et al.*, 2015; Hser *et al.*, 2016). Inoltre, gli studi con pazienti in terapia di mantenimento con AOT sono poco rappresentativi poiché nella maggioranza dei casi sono esclusi da questi studi pazienti con altre comorbidità (Dennis *et al.*, 2015).

Al tal riguardo, lo studio condotto da Soyka *et al* (2017) ha messo in evidenza l'efficacia a lungo termine (sei anni) della terapia di mantenimento con l'utilizzo di agonisti degli oppiacei, in questo caso metadone e buprenorfina, in pazienti che ne erano dipendenti.

Durante questi sei anni sono stati registrati i tassi di mortalità e l'astinenza e valutato il grado di salute fisico e mentale di 2.694 pazienti.

I risultati hanno mostrato che il 76,6% dei pazienti ha seguito la terapia di mantenimento per la durata dei sei anni e il tasso di mortalità medio è stato dell'1,1%. Durante il follow-up, il 9,4% dei pazienti sono diventati "astinenti" e 1,9% sono stati indicati per il trattamento di mantenimento *drug-free*.

Anche l'eroina stessa è la base per preparati utilizzati sia nella terapia contro il dolore sia per il trattamento della dipendenza cronica da oppiacei in pazienti che non rispondono ai trattamenti convenzionali quali il metadone e la buprenorfina. Il trattamento farmacologico assistito con eroina medica è attualmente disponibile nel Regno Unito (Rolleston Report, 1926; Interdepartmental Committee on Drug Addiction, 1965), in Svizzera (Federal Law on Narcotics and Psychotropic Substances, 2008), in Olanda (van den Brink *et al.*, 2003), in Danimarca (Ministry of Health and Prevention. Denmark, 2008) e in Germania (Pfeiffer-Gerschel *et al.*, 2009) mentre, in Spagna,

Canada e Belgio questo tipo di trattamento è stato approvato come trial clinico (Ministerio de la Presidencia, 1990; Gartry *et al.*, 2009; Stran *et al.*, 2015).

L'uso di questa terapia di mantenimento ha mostrato essere in grado di ridurre in modo significativo la ricerca compulsiva della sostanza d'abuso da parte dei soggetti tossicodipendenti, con conseguente miglioramento del loro stato fisico, dello stato mentale e del loro comportamento sociale (van den Brink *et al.*, 1999; van den Brink e Van Ree, 2003).

La cura prevede un periodo iniziale di aggiustamento personalizzato della dose di eroina, che viene prescritta in funzione della tolleranza e degli effetti osservati sul paziente, seguito dal trattamento vero e proprio che può durare anche anni. In questa seconda fase si possono verificare nei pazienti rapidi cambiamenti dei livelli medi di eroina circolante e dei suoi metaboliti attivi che possono indurre sia eventi avversi tossici che sindrome da astinenza.

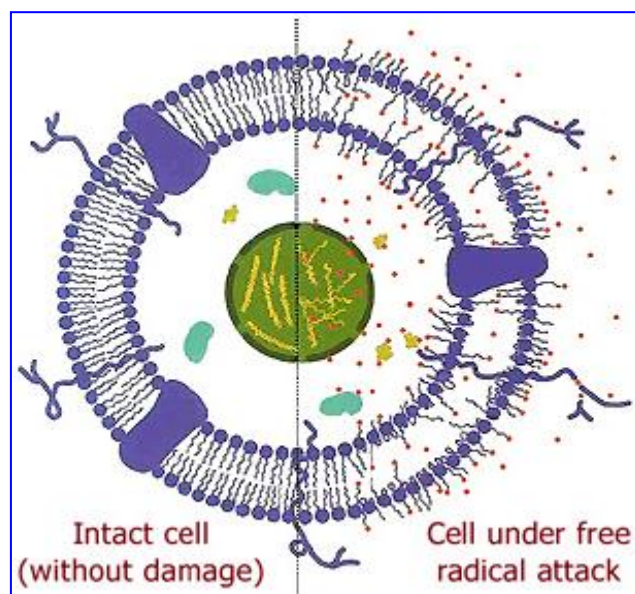
Durante la prima fase del trattamento di mantenimento, la dose iniziale di eroina si basa sul livello di tolleranza stimato del singolo paziente. Nel corso del trattamento, che potrà durare diversi mesi oppure anni, la dose prescritta dell'eroina si baserà prendendo in considerazione gli effetti clinici e la risposta personale dei pazienti (Guttinger *et al.*, 2003). Queste osservazioni portano alla conclusione che è importante avere conoscenze approfondite delle caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche dell'eroina e dei suoi metaboliti per essere in grado di predisporre un intervento terapeutico su basi razionali.

2. Eroina e invecchiamento

2.1 Sostanze d'abuso e invecchiamento cellulare

La dipendenza da sostanze d'abuso contribuisce ad accelerare l'invecchiamento cellulare e l'insorgenza di malattie legate all'età. Anche se i meccanismi con cui questi fattori possono accelerare il processo d'invecchiamento rimangono ancora non chiari, numerosi sono gli studi condotti a riguardo che evidenziano come lo stress ossidativo, l'eccitotossicità e le disfunzioni mitocondriali possono condurre alla degenerazione e all'apoptosi cellulare (Figura 2).

Figura 2. Effetti dei radicali liberi a livello cellulare



Lo stress ossidativo si verifica quando i livelli delle specie reattive dell'ossigeno assorbono la capacità antiossidante della cellula (Yan, 2014). Mentre bassi e moderati livelli di specie reattive dell'ossigeno nei mitocondri (mROS) hanno un effetto positivo sulla cellula, elevati livelli di mROS, invece, ne causano un danno diretto (Yan, 2014). Quando i livelli di ROS sono notevoli, le estese modifiche e i danni alle macromolecole, agli acidi nucleici, ai lipidi e proteine (Ames e

Shigenaga, 1992) possono indurre la morte cellulare e la lesione dei tessuti (Schon e Przedborski, 2011; Sena e Chandel, 2012)

Le sostanze d'abuso rallentano la crescita delle cellule e ne favoriscono l'apoptosi (Campisi, 2015). L'uso di cannabis (Sarafian., 2006), alcool, anfetamine o derivati (Sekine *et al.*, 2008), cocaina (Pomierny-Chamiolo *et al.*, 2013), oppiacei (Skrabalova *et al.*, 2013), droghe sintetiche, induce stress ossidativo e citotossicità nel cervello, nel cuore, nel fegato e nel rene (Cunha-Oliveira *et al.*, 2013). La cannabis aumenta il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa aumentando il flusso di radicali liberi a livello mitocondriale (Sarafian *et al.*, 2006). L'interazione con più sostanze può portare a ulteriori danni ossidativi (Cunha-Oliveira *et al.*, 2013). Ad esempio, la combinazione di cocaina e oppiacei (il cd. "speedball") accentua la disfunzione mitocondriale (Cunha-Oliveira *et al.*, 2010), e il co-abuso di cocaina e etanolo produce un metabolita attivo, il coca etilene, il quale determina una maggiore generazione di ROS (Bazuaye-Ekwuyasi *et al.*, 2015).

Lo stress ossidativo è associato, inoltre, a problemi di memoria e di apprendimento (Cunha-Oliveira *et al.*, 2013), eventi comuni nella tossicodipendenza (Ersche *et al.*, 2005).

La combinazione di etanolo e metilendiossimetamfetamina (MDMA) aumenta gli effetti ipertermici e quelli epatotossici (Pontes *et al.*, 2008); inoltre, l'infiammazione associata a una maggiore ossidazione può essere particolarmente dannosa e può favorire l'invecchiamento cellulare accelerato (Rawdin *et al.*, 2013).

Allo stesso modo, l'uso delle sostanze d'abuso accentua i cambiamenti nel cervello legati all'età e può essere alla base di alcune delle anomalie che si ritrovano nei modelli di studio per la dipendenza. Da quanto è emerso da alcuni studi, gli individui dipendenti dalla cocaina mostrano una riduzione del volume cerebrale per anno maggiore rispetto ai controlli sani, in particolare nelle regioni prefrontali e temporali (Ersche *et al.*, 2013). Negli utilizzatori di metamfetamina, invece, il tasso di riduzione della materia grigia è del 6,4-8,5% all'anno nella corteccia frontale, temporale, insulare e occipitale (Nakama *et al.*, 2011). La cannabis, invece, è associata a un volume ridotto dell'ippocampo (Battistella *et al.*, 2014); gli individui dipendenti dalla cocaina (Massardoet *et al.*,

2015), dalla metamfetamina (Ho *et al.*, 2009) e dall'eroina (Benoilid *et al.*, 2013) mostrano invece disfunzioni dell'arteria intracranica ed extracranica.

L'esposizione all'ossidazione, all'infiammazione e alla produzione di ormoni dello stress, esercita il suo effetto anche a livello dei telomeri, estremità nucleotidiche dei cromosomi, inducendo un acceleramento della loro erosione (Valdes *et al.*, 2005; Lindqvist *et al.*, 2015). Inoltre, è stato osservato che anche l'attività della telomerasi diminuisce in risposta allo stress ossidativo (Kurz *et al.*, 2004). Come emerso da recenti studi, l'uso di sostanze d'abuso, in particolare degli oppiacei, risulta essere associato ad una ridotta lunghezza dei telomeri (TL) (Yang *et al.*, 2013). L'accorciamento dei telomeri nei linfociti, con l'ipersecrezione di citochine pro-infiammatorie periferiche e di cellule immunitarie senescenti, può portare ad un circolo vizioso di infiammazione, stress ossidativo e accorciamento ulteriore dei telomeri (Effros, 2011). Strategie per ridurre lo stress ossidativo, mediante over espressione di enzimi anti-ossidanti, sono in grado di mantenere integri i telomeri prevenendone un prematuro accorciamento e aumentandone l'attività telomerasica (Serra *et al.*, 2003).

2.2 Telomeri: marker biologici dell'invecchiamento cellulare

La lunghezza dei telomeri (TL) è un marker biologico per la valutazione dell'invecchiamento cellulare, come dimostrato dalla relazione inversa tra l'età e la TL (Muezzinler A *et al.*, 2013) (Figura 3).

I telomeri sono delle sequenze di DNA ripetute non codificanti localizzate alle estremità dei cromosomi eucariotici (Blackburn, 1991). Nell'uomo la sequenza ripetuta in tandem per circa 15 kb è 5'-TTAGGG-3' (Moyzis RK *et al.*, 1988; Morin, 1989).

La loro presenza si ritiene essere necessaria per:

- 1) Il mantenimento dell'integrità dei cromosomi, proteggendone l'estremità dalla degradazione

degli enzimi cellulari (Blackburn, 1991).

- 2) Prevenire la fusione dei cromosomi e il riarrangiamento del DNA
- 3) Fornire un cuscinetto di DNA non codificante per prevenire l'accorciamento del cromosoma durante la replicazione (Lindsey, 199; Levy, 1992).

L'estremità telomerica può organizzarsi in una struttura secondaria formando una sorta di ansa detta *t-loop* (Griffith et al., 1999; De Lange, 2004). La caratteristica fondamentale del *t-loop* è che grazie ad esso le porzioni finali dei cromosomi risultano nascoste all'interno di una struttura chiusa e non accessibile. Tale struttura viene decorata con un complesso di sei proteine: TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2 e Rap1 denominate nel loro insieme *Shelterin* (De Lange, 2005; De Lange, 2009).

Le *shelterin* sono indispensabili per determinare la struttura dell'estremità del telomero, nella generazione e nella stabilizzazione del *t-loop* e nella sintesi del DNA telomerico da parte della telomerasi (De Lange, 2005).

Le *shelterin* regolano l'accesso della telomerasi sui telomeri stessi attraverso un meccanismo di feedback negativo. Ad ogni divisione cellulare è stimato che il filamento 5' neo sintetizzato perda dalle 50 alle 200 basi causando, così, una progressiva riduzione della molecola di DNA (Harley CB et al., 1990). Ne deriva che, partendo dalla loro lunghezza massima iniziale di 10-15 kb (nelle linee germinali), quando i telomeri raggiungono una lunghezza di 4-6 kb le cellule umane arrestano irreversibilmente la loro crescita ed entrano in senescenza, fino alla perdita del DNA telomerico e dei suoi effetti protettivi.

E' stimato che, dopo un numero compreso tra le 50 e le 70 replicazioni cellulari, la crescita cellulare si arresti. Il normale accorciamento dei telomeri è, tuttavia, contrastato dall'azione di un complesso enzimatico chiamato telomerasi, in grado di allungare le estremità del filamento di DNA attraverso un meccanismo ciclico di trascrizione inversa.

La telomerasi è un complesso ribonucleoproteico multimerico costituito da tre componenti:

- hTR, una catena di RNA di 445 nucleotidi ricca in guanina e adenina contenente la sequenza stampo per la sintesi delle ripetizioni telomeriche;

- hTERT, una proteina di circa 1100 aa, con attività di retrotrascrittasi che fornisce il sito attivo per la reazione di polimerizzazione;

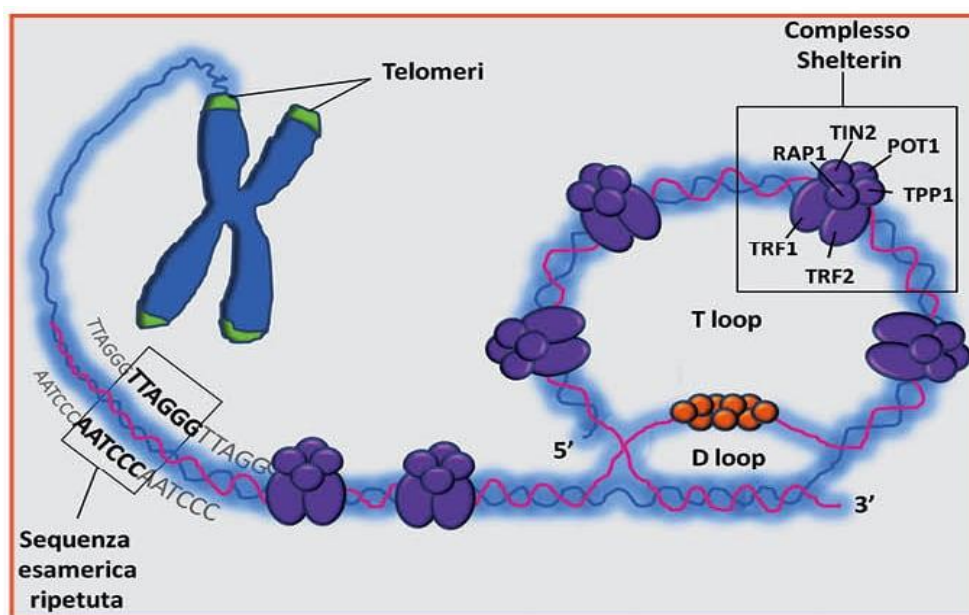
- diverse proteine accessorie associate (es. TP1), essenziali per l'assemblaggio di un complesso attivo.

La componente a RNA di questo enzima funge da stampo per la polimerizzazione di nuove sequenze telomeriche, che avviene grazie all'azione trascrittasi inversa dell'hTERT.

L'azione della telomerasi risulta essere essenziale per la salvaguardia della lunghezza telomeriche; uno studio condotto da Cawthon *et al* nel 2003 ha, infatti, dimostrato come telomeri eccessivamente corti e una ridotta attività telomerasica siano associati ad un prematuro invecchiamento nell'uomo.

Lo stesso studio dimostrò come la lunghezza dei telomeri diminuisca con l'età (stimabile in 14 paia di basi per ogni anno di incremento di età senza differenze per genere) e questa graduale perdita di DNA telomeriche possa contribuire all'apoptosi della cellula.

Figura 3. Rappresentazione schematica della struttura dei telomeri.



Da Calado RT and Young NS. *Telomere diseases. N Engl J Med* 2009; 361:2353-65.

2.3 Telomeri e dipendenza

L'accorciamento dei telomeri è un meccanismo fisiologico che previene la replicazione cellulare incontrollata. Tuttavia, tale accorciamento può essere accelerato da numerosi fattori quali: stress ossidativo, infiammazione, mutazioni a livello dei geni che rivestono un ruolo nella biologia del telomero e deplezione delle proteine telomeriche (Aubert e Lansdopr, 2008). In particolare, lo stress ossidativo causa un danno irreparabile al DNA, specificatamente nella regione telomerica (Rossiello *et al.*, 2014). Un possibile meccanismo che contribuisce ad accorciare la TL è lo stress ossidativo indotto dall'utilizzo di sostanze d'abuso, come cocaina ed eroina (Cheng *et al.*, 2013; Imam *et al.*, 201; Yang *et al.*, 2013).

Queste sostanze inducono un aumento dei mediatori della risposta infiammatoria causando una riduzione degli agenti antiossidanti (Zhou *et al.*, 2000; Kovacic, 2005; Levandowski *et al.*, 2014; Araos *et al.*, 2015; Zaparte *et al.*, 2015). Tali mediatori sono noti per danneggiare il DNA telomerico e accelerarne l'accorciamento (Houben *et al.*, 2008).

Uno studio recente, condotto da Levandowski e suoi collaboratori (Levandowski *et al.*, 2016), ha messo in evidenza il ruolo della dipendenza della cocaina nella lunghezza dei telomeri (TL), argomento ancora poco dibattuto prima di allora. Questo studio ha analizzato la TL in un campione di donne dipendenti da cocaina e un campione di controlli composto da donne anziane senza disturbi psichiatrici come gruppo di riferimento per la senescenza. Il campione di donne dipendenti da cocaina è stato suddiviso in due gruppi secondo i punteggi della “*Childhood Trauma Questionnaire*” (CTQ): il primo gruppo caratterizzato dalla presenza di storie d'abuso durante l'infanzia (ELS) e il secondo con assenza di storia d'abuso (CRACK). Dai risultati è emerso che soggetti con dipendenza da cocaina presentavano telomeri più corti rispetto al gruppo di controllo nonostante la loro minore età. Più nello specifico, a riprova del contributo sostanziale che lo stress esercita sui telomeri, il gruppo di donne dipendenti con ELS presentavano telomeri significativamente più corti rispetto a quelle dipendenti senza ELS. Così come nello studio appena

descritto, anche nello studio di Beach *et al.* (2014) si è indagato come l'assenza di cure parentali, o l'esposizione ad eventi traumatici durante le prime fasi della vita, siano associate a una ridotta lunghezza dei telomeri per via del rischio aumentato di sviluppare dipendenza verso sostanze d'abuso (Brody, Flor, Hollett-Wright, McCoy, 1998). Tra le sostanze d'abuso associate ad un acceleramento dei processi biologici cellulari legati all'invecchiamento vi è il consumo di sigarette e alcool (Pavanello *et al.*, 2011; Strandberg *et al.*, 2012). L'utilizzo di alcool infatti risulta essere associato negativamente alla TL e l'accorciamento dei telomeri risulta aumentare in relazione all'aumento del consumo di alcool (Pavanello *et al.*, 2011).

2.4 Lunghezza dei telomeri negli eroinomani

La dipendenza da eroina e l'invecchiamento naturale hanno delle azioni comuni sul funzionamento immunologico delle cellule.

Da questa osservazione alcuni studi hanno voluto indagare sulla possibile correlazione tra l'invecchiamento cellulare accelerato e la dipendenza da eroina.

Prendendo in considerazione la TL nei leucociti (LTL), come importante indice dell'età cellulare, lo studio di Yang *et al.* (2013) ha misurato con successo la LTL in una coorte di 415 persone di origine cinese dipendenti da diverse sostanze d'abuso (199 femmine e 216 maschi tra i 15 e i 61 anni) confrontato con un gruppo di controllo.

Dallo studio è emerso che le persone dipendenti da varie sostanze d'abuso presentavano una LTL significativamente ridotta rispetto al gruppo di controllo e, nello specifico, che il sottogruppo costituito da utilizzatori di eroina e diazepam presentava LTL ancora più corti rispetto a quelli delle persone dipendenti da altre droghe. La maggiore influenza sull'erosione dei telomeri da parte dell'eroina e del diazepam rispetto alle altre droghe in esame sembra risiedere, secondo gli autori, nella loro azione depressiva sul sistema nervoso centrale (Yang *et al.*, 2013). Un successivo step

dell'esplorazione sull'associazione tra abuso di eroina e invecchiamento biologico è stato condotto dal gruppo di Cheng *et al.* (2013), che ha indagato sull'influenza dell'eroina a livello molecolare e strutturale del cervello.

In questo studio sono stati reclutati 33 eroinomani e 30 controlli, e per ciascuno di questi sono stati misurati diversi indicatori biologici dell'invecchiamento. Queste misure comprendevano l'attività telomerasica nelle cellule del sangue periferico, che riflette l'invecchiamento cellulare, e le misure strutturali e funzionali di alcune aree cerebrali mediante risonanza magnetica (MRI). Lo studio ha messo in evidenza che le persone dipendenti da eroina sono caratterizzate da un'attività ridotta dell'enzima telomerasi. Inoltre, le analisi di correlazione hanno rivelato che, all'interno del gruppo degli eroinomani, l'attività ridotta della telomerasi è associata ad una minore integrità strutturale della materia grigia nella corteccia prefrontale dorso laterale (DLPFC).

Dopo aver identificato dallo step precedente la DLPFC come zona cerebrale compromessa dall'utilizzo di eroina e da una bassa attività dell'enzima telomerasi nel gruppo degli eroinomani, Cheng *et al.* (2013) hanno voluto valutare le caratteristiche funzionali e cognitive di questa regione cerebrale nel gruppo in esame. È noto già da tempo che la corteccia prefrontale è una delle aree cerebrali maggiormente coinvolte nel processo dell'invecchiamento (Reuter-Lorenz e Lustig, 2005; Burke e Barnes, 2006); infatti, la degenerazione ipocampale, causata dalla senilità o da malattie legate all'età (come la demenza), è associata a notevoli disturbi delle funzioni mnemoniche (Barnes, 2003).

In sintesi, studi pregressi avevano già suggerito che l'invecchiamento cerebrale indotto dall'abuso di eroina influenzasse l'integrità strutturale e funzionale della PFC, e che tali effetti sul cervello si riflettono anche a livello cognitivo.

Sempre prendendo in considerazione la PFC dallo studio di Cheng *et al.* (2013), è emerso che l'attività della telomerasi, interagendo con l'assunzione dell'eroina, può modificare i networks funzionali cerebrali legati all'età interagendo sulle performance comportamentali, sulla memoria e sul controllo dell'attenzione.

2.5 Telomeri e trasportatore della serotonina

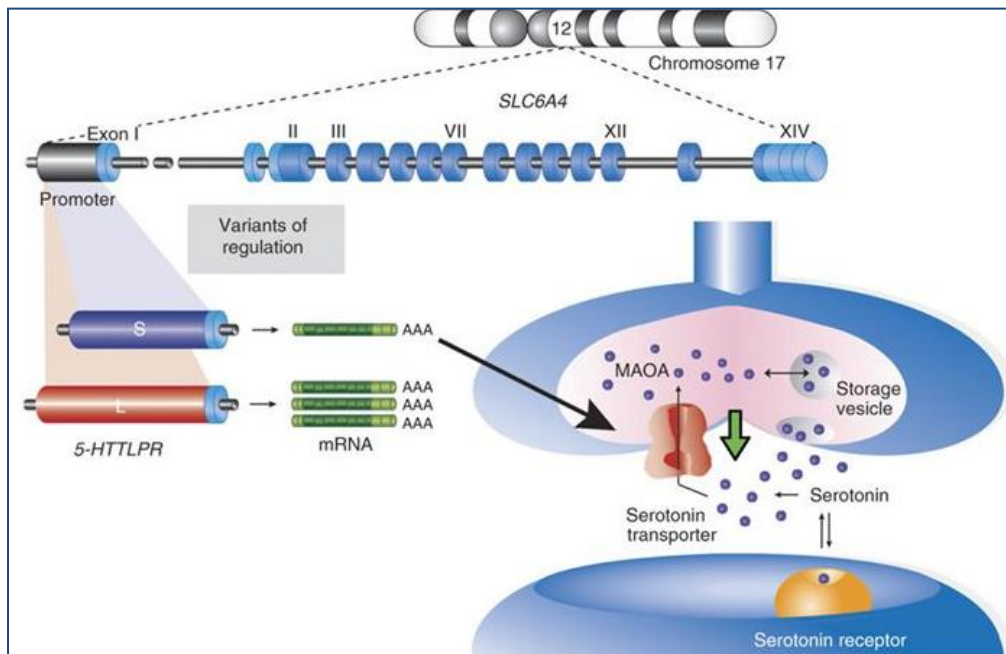
Numerosi studi hanno messo in luce il ruolo della serotonina (5-idrossitriptamina o 5-HT) nel circuito della dipendenza dalle droghe (Comings e Blum, 2000). Infatti, in persone dipendenti da eroina, alcune zone cerebrali, come lo striato, sono caratterizzate da bassi livelli di acido 5-idrossiindoleacetico, metabolita della serotonina (Kish *et al.*, 2001). Studi di neuroimaging hanno mostrato e messo in evidenza l'associazione tra la disponibilità del trasportatore della serotonina (5-HTT) e della dopamina, e la dipendenza da sostanze mettendo così in luce il ruolo della serotonina nella dipendenza da eroina (Cosgrove *et al.*, 2010; Yeh *et al.*, 2012).

Inoltre, disfunzioni a carico del sistema serotoninergico sembrano essere correlate a un'aumentata impulsività e a una sintomatologia depressiva, tutte caratteristiche riscontrate nei tossicodipendenti (Goodman, 2008).

Un ruolo chiave sulla suscettibilità e predisposizione alla dipendenza da eroina sembra risiedere nel trasportatore della serotonina (5-HTT). Il trasportatore della 5-HT, localizzato sulla membrana presinaptica dei neuroni serotoninergici, è codificato dal gene SLC6A4 (Figura 4), mappato nel cromosoma 17q11.1-q12 (Ramamoorthy *et al.*, 1993) e svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi della trasmissione della serotonina nello spazio sinaptico (Bengel *et al.*, 1998). L'espressione genica del 5-HTT è fortemente influenzata dalla presenza di un polimorfismo funzionale chiamato 5-HTTLPR, localizzato nella zona del promotore del gene. Le due varianti alleliche derivate da tale polimorfismo sono l'allele S, prodotto di una delezione di 44 bande di base (S allele), e l'allele L risultato di un'inserzione nucleotidica (Heils, 1996)

In linee cellulari linfoblastoidi, l'allele S è associato a una ridotta efficienza della trascrizione del gene con conseguente diminuzione dell'espressione del trasportatore della serotonina e, quindi, minor assorbimento della 5-HT (Lesch *et al.*, 1996).

Figura 4. Rappresentazione del gene SLC6A4, del polimorfismo 5-HTTLPR, delle sue varianti alleliche S e L.



Da Gitte Moss Knudsen, Centre for integrated molecular brain imaging (Cimbi), Neurobiology Research Unit (NRU), University of Copenhagen.

Diversi studi, tra cui uno studio di meta-analisi, hanno evidenziato l'associazione tra la dipendenza da eroina e l'allele S del polimorfismo 5-HTTLPR (Gerra *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Inoltre, lo stesso allele S del polimorfismo 5-HTTLPR risulta essere correlato ad altre forme di dipendenza, come quella da alcool, giochi d'azzardo (Perez de castro., 1999) e dipendenza da internet (Lee *et al.*, 2008), nonché a disturbi d'ansia e dell'umore (Brocke *et al.*, 2006; Gibb *et al.*, 2009). Inoltre, la variante "short" del polimorfismo 5-HTTLPR è associata ad una ipervigilanza, una maggiore sensibilità agli stimoli ambientali in pazienti anche non affetti da disturbi dell'umore (Homberg e Lesch, 2012). Questi soggetti, ad esempio, mostravano una iper-reattività dell'amigdala con difficoltà a discernere pericoli reali e non, con conseguente stress psicologico (Gibb *et al.*, 2004; Brocke, 2006). Perciò, proprio partendo da queste considerazioni e dalla conoscenza assodata

che gli eventi stressogeni hanno un forte impatto sull'accorciamento delle estremità cromosomiche (Epel *et al.*, 2004; Kiecolt-Glaser e Glaser, 2010), lo studio condotto da Li *et al.*(2014) ha voluto indagare sulla possibile associazione tra la variante S del polimorfismo del trasportatore della serotonina e una possibile accelerazione nell'accorciamento dei telomeri nei soggetti portatori dell'allele *short*, in una coorte di persone sane non affette da disturbi dell'umore. I risultati di tale studio hanno mostrato che gli individui con genotipo S/S presentavano TL significativamente più corta di quelle degli individui con genotipo L/S, dopo aver corretto per l'età. Inoltre, analizzando i genotipi L/S e L/L insieme rispetto al gruppo S/S, il primo gruppo risultava avere una TL significativamente maggiore rispetto agli omozigoti per entrambi gli alleli short.

3. Scopo della ricerca

Sulla base di queste evidenze, gli obiettivi dello studio sono stati i seguenti:

- a. valutare una possibile correlazione tra dipendenza da eroina e minore lunghezza dei telomeri dei leucociti in pazienti affetti da dipendenza da eroina rispetto a soggetti sani che non hanno fatto uso di sostanze stupefacenti;

- b. valutare una possibile influenza del polimorfismo 5-HTTLPR, e delle sue varianti alleliche, nella lunghezza dei telomeri dei leucociti in pazienti dipendenti da eroina rispetto a soggetti sani che non hanno fatto uso di sostanze stupefacenti;

4. Materiale e Metodi

4.1 Valutazione della lunghezza media dei telomeri nei leucociti

a) Caratteristiche cliniche e demografiche del campione

Lo studio è stato condotto su un campione di 99 pazienti affetti da dipendenza da eroina (M/F = 88/11; età media al prelievo = $34,86 \pm 5,67$ anni), in terapia di mantenimento con metadone, e 99 controlli sani (M/F = 87/12; età media al prelievo = $34 \pm 6,11$ anni) abbinati per sesso e per età.

La diagnosi è stata effettuata presso il Servizio Tossicodipendenze della ASL 8 di Cagliari, in accordo con i criteri del “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV” (DSM-IV).

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico della ASL 8 di Cagliari.

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato previa inclusione nello studio e sono stati sottoposti a un prelievo di sangue.

b) Estrazione e quantificazione dei campioni di DNA

L'estrazione del DNA genomico è stata condotta con metodo convenzionale “*salting-out*” a partire da 10 ml di sangue periferico anticoagulato con EDTA (Lahiri e Nurnberger, 1991).

La valutazione quali-quantitativa del DNA estratto è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica.

In ciascun campione, opportunamente diluito, è stata valutata l'assorbanza a 260 nm per una stima quantitativa, considerando che una unità di densità ottica (D.O.) corrisponde ad una concentrazione pari a 50 µg/ml di DNA a doppia elica.

La valutazione qualitativa è stata effettuata verificando il rapporto OD260/OD280, come indice di contaminazione da proteine (considerando accettabile un valore compreso fra 1,6 e 1,8) e

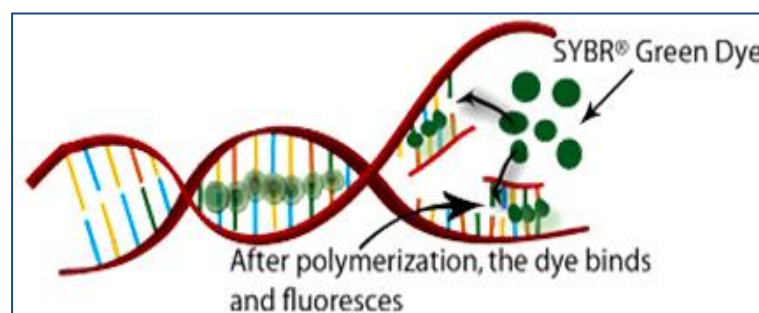
OD260/OD230, come indice di contaminazione da carboidrati e fenoli (considerando ottimale il valore di 2.2)

c) Analisi della lunghezza media dei telomeri

La valutazione della LTL è stata effettuata utilizzando la tecnica della **PCR Real Time Quantitativa (QPCR)**, messa a punto da Cawthon (2002), il cui protocollo è stato modificato nel nostro laboratorio. Questa tecnica, ampiamente validata, ha i vantaggi di potere essere applicata ad un alto numero di campioni, nonché di essere relativamente poco costosa e di rapida esecuzione.

Il saggio consente di misurare quanto ciascun campione differisca da un campione di DNA di riferimento nel suo rapporto tra i numeri di ripetizioni telomeriche rispetto al numero di ripetizioni del gene hemoglobin-b (**HBB**) (codificante per la subunità beta dell'emoglobina), localizzato in singola copia nel cromosoma 11 (11p15.4). La tecnica si basa sull'utilizzo di una molecola fluorescente, SYBR® Green I, facente parte del gruppo delle cianine asimmetriche, che si lega al solco minore del DNA a doppio filamento (dsDNA) (Zipper *et al.*, 2004). Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda max di 488 nm ed emette luce verde a una lunghezza d'onda di 522 nm. Durante la fase di denaturazione, il Sybr Green è libero in soluzione, mentre nella fase di annealing dei primers esso si intercala in maniera aspecifica nel solco minore del dsDNA ed inizia ad emettere fluorescenza. Infine, durante la fase di extension, la fluorescenza emessa aumenta in modo proporzionale al numero di copie di DNA prodotte (Figura 5) .

Figura 5. Chimica SYBR® Green



Il segnale fluorescente emesso durante la reazione viene registrato ad ogni ciclo di PCR dal sensore dello strumento e riportato in un sistema di assi cartesiani in cui è rappresentato in ascisse il numero di cicli ed in ordinate una scala logaritmica dell'emissione di fluorescenza associata ad ogni ciclo (espressa come ΔR_n). Si ottiene così una curva ad andamento tipicamente sigmoideale con una fase esponenziale, una fase lineare e una fase di plateau in cui termina l'amplificazione e la fluorescenza si stabilizza a un valore di regime.

Al termine della reazione un software calcola per ciascun campione il **ciclo soglia (CT)** che rappresenta il numero di cicli di PCR richiesti perché il segnale di fluorescenza superi la linea di riferimento (*threshold line*), automaticamente settata dallo strumento in un punto intermedio delle curve di amplificazione dei campioni.

Il valore del CT è inversamente proporzionale al numero iniziale di molecole stampo presenti nel campione: minore è il numero di cicli necessari a superare il *threshold*, maggiore sarà la quantità di DNA di partenza.

Il Sybr Green, legandosi in maniera aspecifica al solco minore del DNA, può generare segnali aspecifici. Pertanto, è necessario verificare la specificità della reazione mediante l'analisi della *curva di melting* (curva di dissociazione), specifica per ciascun amplicone prodotto.

Per *Temperatura di melting (T_m)* si intende la temperatura alla quale il 50% del DNA è in forma di singolo filamento. Essa dipende da diversi fattori, tra cui la lunghezza della molecola di DNA e la sua sequenza (ordine delle basi e percentuale di CG), ed è quindi caratteristica di ciascun frammento.

L'analisi della curva di dissociazione viene eseguita dallo strumento al termine della PCR e consiste in un graduale innalzamento della temperatura da 60°C, condizione in cui tutto il DNA è a doppia elica e la fluorescenza è massima, a 95 °C, temperatura alla quale tutto il DNA è presente in forma dissociata e la fluorescenza è minima. Il software dello strumento trasforma i dati relativi alla curva di *melting* nella derivata prima negativa della funzione descritta dal segnale. Ne risulta quindi un grafico che presenta un picco nel punto di massima pendenza della curva, corrispondente alla T_m di

quello specifico amplicone. La rilevazione di un unico picco nella stessa reazione di PCR dimostra l'unicità e la specificità del prodotto di PCR; al contrario la presenza di più flessi di fluorescenza, indica la formazione di prodotti amplificati aspecifici.

d) Real-Time PCR

Le reazioni di PCR sono state eseguite su uno strumento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

Per ciascun campione di DNA genomico è stata effettuata una reazione di qPCR relativa alle estremità telomeriche ed in parallelo una analoga reazione per l'amplificazione del gene HBB.

Pertanto sono state preparate due diverse miscele di reazione in un volume finale di 10 µl, una contenente i primers (Tel 1 e Tel 2, concentrazione finale 200 nM), capaci di ibridare lungo le ripetizioni esameriche presenti alle estremità telomeriche, e l'altra contenente primers specifici per il gene HBB (HBB1 e HBB2), alla concentrazione di 300 nM (Tabella 1).

Tabella 1. Sequenza dei primer

Primer	Sequenza 5' → 3'
Tel-1	GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT
Tel-2	TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA
HBB1	GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACACTAGC
HBB2	CACCAACTTCATCCACGTTACACC

Entrambe le miscele contengono Mastermix Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG con ROX (Invitrogen, by Thermofisher Scientific).

Le due miscele sono state dispensate nei pozzetti di due diverse piastre ottiche da 96 pozzetti, a cui sono stati aggiunti 20 ng di ciascun campione di DNA.

Tutti i campioni sono stati testati in triplicato per valutare la riproducibilità dei dati ottenuti e in ogni saggio è stato inserito un controllo negativo, in cui il DNA è stato sostituito da acqua sterile. Inoltre, in ogni piastra di PCR sono stati riservati 3 pozzetti per un campione di DNA di riferimento (calibratore) alla stessa concentrazione dei campioni, necessario a normalizzare eventuali differenze tra i diversi saggi.

Infine, allo scopo di monitorare l'efficienza delle reazioni, in ogni piastra è stata allestita una curva di diluizione standard con un DNA di riferimento, relativa alle sequenze telomeriche e al gene HBB, con range da 6.25 a 100 ng.

Le condizioni di amplificazione per le estremità telomeriche e per il gene HBB prevedono uno step di denaturazione a 95°C per 3 min, per favorire l'attivazione della *Taq polimerasi*. Seguono 23 cicli (15 secondi a 95°C, 1 min. a 58°C) per le estremità telomeriche e 32 cicli (15 secondi a 95°C, 1 min. a 62°C) per il gene HBB.

Tutte le reazioni di PCR sono state seguite da una curva di melting per confermare la specificità della reazione.

4.1 Genotipizzazione del polimorfismo 5-HTTLPR del gene 5-HTT

Il polimorfismo 5-HTTLPR è un'inserzione/delezione di 44bp localizzata nella regione del promotore del gene che codifica per il trasportatore della serotonina (5-HTT). La variante lunga (inserzione) è associata a un'espressione del gene 3 volte maggiore rispetto alla variante corta (delezione) (Heils *et al.*, 1996).

Il DNA è stato amplificato mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), secondo il metodo descritto da Lesch *et al.* (1996).

La miscela di reazione conteneva, in un volume finale di 30 µl, 100 ng di DNA, 0.2 mM dATP, dCTP, dTTP, 0.1 mM dGTP e 7-deazaGTP, 25 pmol di ciascun primer (5'-GGC GTT GCC

GCT CTG AAT C-3' e 5'-GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACC AC), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 10% DMSO and 1.5 U AmpliTaq (Perkin Elmer).

Sono stati eseguiti 35 cicli di amplificazione con le seguenti temperature: 30 sec a 95°C, 30 sec a 61°C e 60 sec a 72°C. I prodotti della PCR sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3% contenente etidio bromuro e gli alleli l (528 bp) e s (484 bp) sono stati identificati con il densitometro (GelDoc 2000, BioRad).

4.2 Analisi statistiche

La LTL relativa è stata calcolata utilizzando il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$, dove $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ campione – ΔCT calibratore, e ΔCT campione = CT Tel – CT HBB.

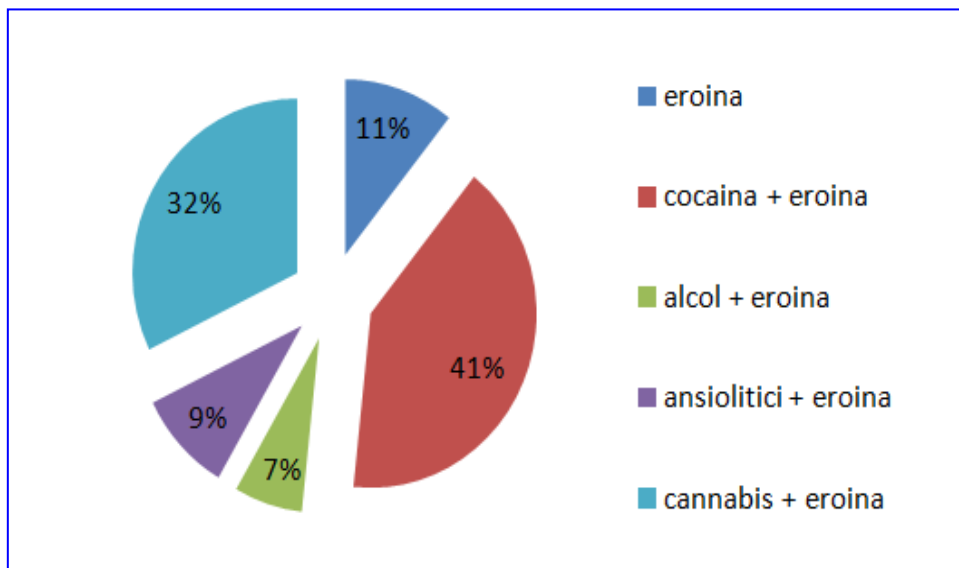
La normalità della distribuzione è stata testata utilizzando il test di Shapiro-Wilk. La presenza di outlier è stata valutata utilizzando il test di Grubbs (o extreme studentized deviate test). Le caratteristiche demografiche quantitative e categoriche sono state confrontate fra soggetti affetti da dipendenza da eroina e controlli utilizzando il test U di Mann Whitney e il test esatto di Fisher, rispettivamente.

L'associazione tra lunghezza dei telomeri dei leucociti (LTL) e variabili quantitative (età al momento del prelievo) e categoriche (sesso, diagnosi di dipendenza da eroina) è stata valutata utilizzando il test di correlazione di Spearman e il test U di Mann-Whitney, rispettivamente.

Nel campione di pazienti affetti da dipendenza da eroina è stata valutata l'associazione tra LTL e le seguenti caratteristiche cliniche potenzialmente rilevanti: età al primo contatto con l'eroina, mesi di astensione al momento del prelievo, anni di esposizione alla sostanza, comorbidità con altre forme di abuso/dipendenza (comorbidità, età all'esordio e mesi di astensione per forme di abuso o dipendenza da cannabis, cocaina, alcool e ansiolitici), familiarità per abuso o dipendenza da eroina o altre sostanze (Figura 6). Per valutare l'associazione tra LTL e le variabili cliniche è stato costruito un modello di regressione lineare utilizzando la LTL come variabile dipendente, le variabili cliniche come predittori e l'età come covariata.

Infine, in un sottocampione di pazienti e controlli per i quali questo dato era disponibile (n = 170), è stata valutata l'associazione tra LTL e il genotipo del polimorfismo 5-HTTLPR utilizzando un modello di regressione lineare, utilizzando la LTL come variabile dipendente, il genotipo come predittore e l'età al prelievo come covariata.

Figura 6. Comorbidità con altre forme di dipendenza



5. Risultati

La valutazione della LTL nei soggetti inclusi nello studio è stata effettuata mediante qPCR.

La Figura 7 rappresenta le curve di amplificazione osservate per i telomeri (7.A) e per il gene HBB (7.B), dalle quali sono stati estrapolati i valori dei Ct. I valori medi di CT relativi all'amplificazione delle estremità telomeriche sono risultati $13,82 \pm 0,60$, mentre per il gene HBB $21,73 \pm 0,45$.

Nella figura 8 sono rappresentate le curve di *melting* specifiche per le sequenze analizzate. Le curve relative alle sequenze telomeriche (8.A) e al gene HBB (8.B) presentano un unico picco, rispettivamente a 81°C e a 84°C , a dimostrazione della specificità delle reazioni.

Inoltre, i controlli negativi, corrispondenti all'assenza di DNA, non presentano alcun segnale.

Figura 7. Curve di amplificazione osservate per i telomeri (A) e per il gene HBB (B)

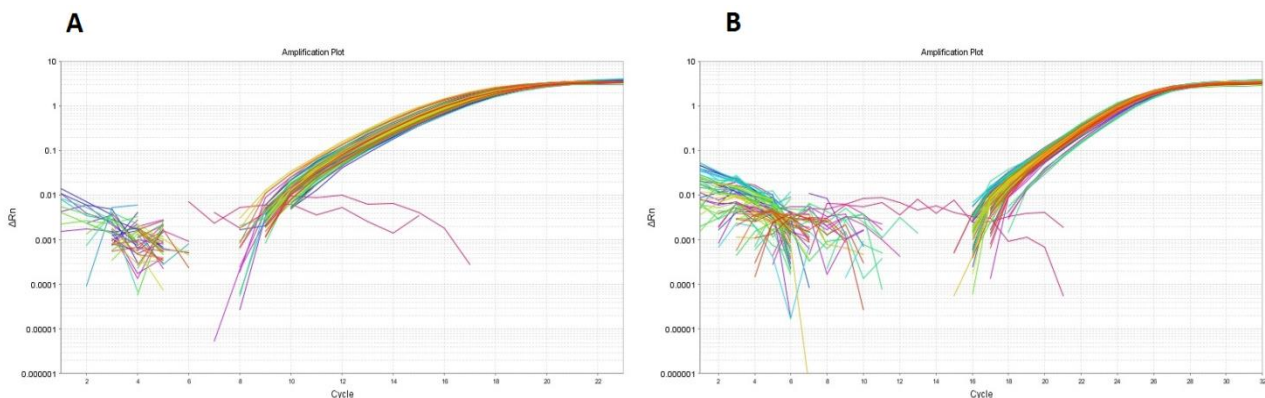
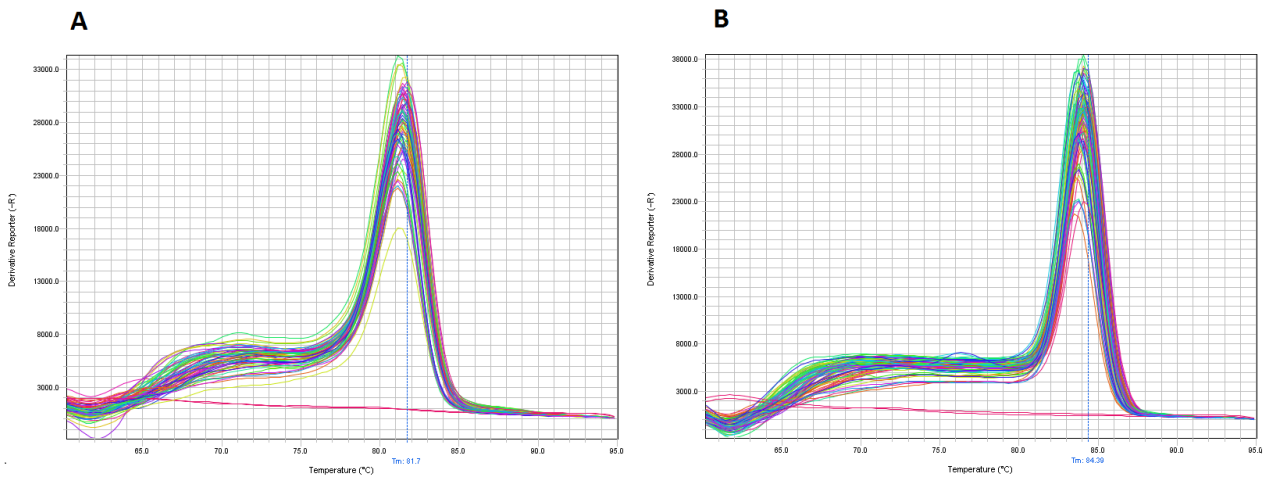


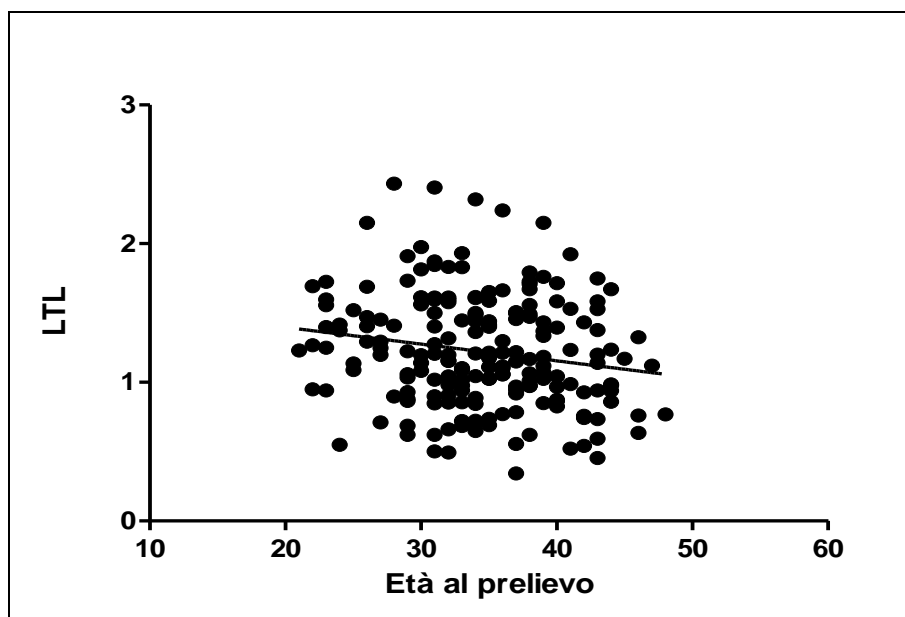
Figura 8. Curve di *melting* osservate per i telomeri (A) e per il gene HBB (B)



La distribuzione della LTL è risultata essere non normale secondo il test di Shapiro-Wilk ($p < 0.025$). Il test di Grubbs non ha evidenziato la presenza di outlier.

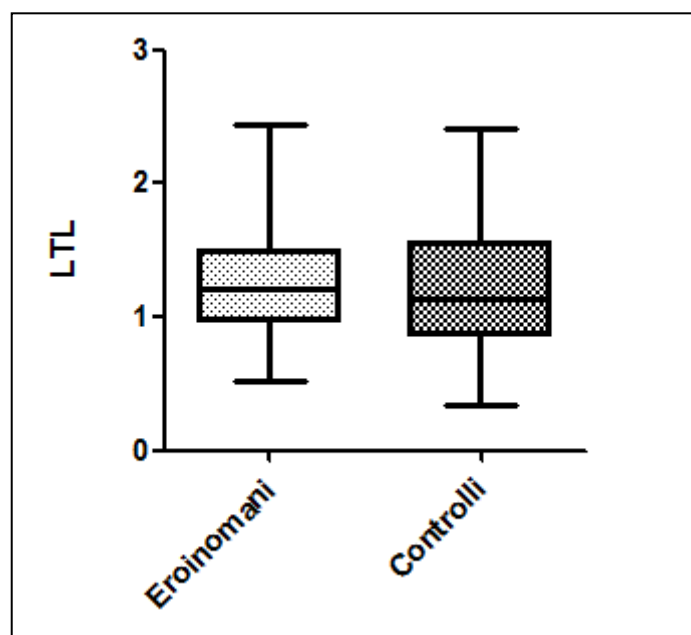
L'analisi di correlazione ha mostrato una correlazione negativa tra LTL ed età al momento del prelievo (ρ di Spearman = $-0,17$, $p = 0.015$, Figura 9) e nessuna associazione con il sesso (Mann Whitney $U = 1896$, $p = 0,65$).

Figura 9. Correlazione tra lunghezza dei telomeri dei leucociti ed età al prelievo



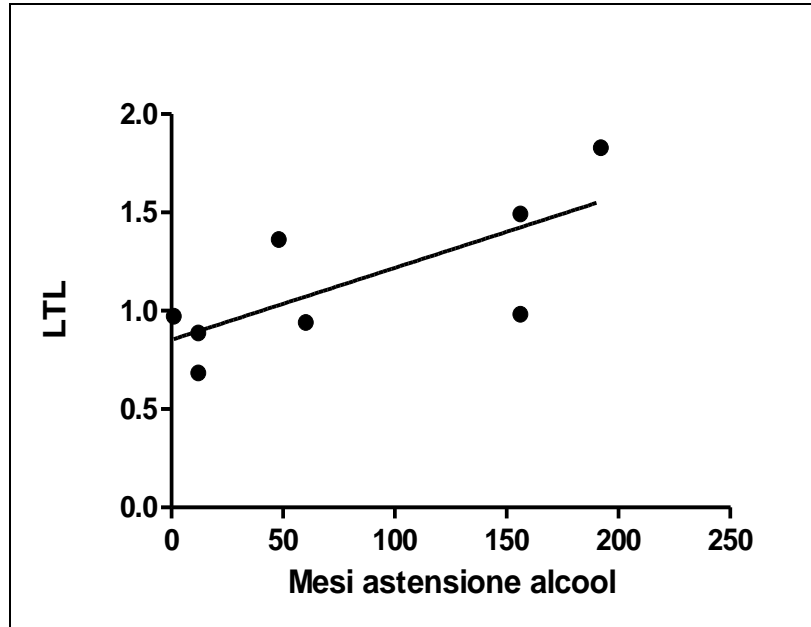
Il test U di Mann Whitney non ha evidenziato una differenza nella LTL tra pazienti affetti da dipendenza da eroina e controlli sani (Mann Whitney U = 4586, p = 0.44, Figura 10).

Figura 10. Lunghezza dei telomeri dei leucociti nei pazienti affetti da dipendenza da eroina e controlli sani



Il modello di regressione lineare ha evidenziato una correlazione positiva tra LTL e il numero di mesi di astensione dall'utilizzo di alcool nel sottocampione di pazienti con dipendenza da eroina e comorbidità per abuso/dipendenza da alcool in astensione dall'alcool al momento del prelievo (n = 8, beta=0.774, p = 0.04, Tabella 1, Figura 11).

Figura 11. Correlazione tra lunghezza dei telomeri dei leucociti e mesi di astensione dall'assunzione di alcool



Nessuna delle altre variabili cliniche analizzate è risultata associata con la LTL (Tabella 2)

Tabella 2. Caratteristiche cliniche del campione dei pazienti dipendenti da eroina

Variabili cliniche	Beta	P
età al primo contatto	-0,002	0,98
mesi di astensione	-0,006	0,95
anni di esposizione alla sostanza	0,003	0,98
comorbidità con altre forme di abuso/dipendenza	-0,174	0,09
Cannabis		
comorbidità con abuso/dipendenza	-0,154	0,13
età all'esordio	-0,173	0,16
mesi di astensione	0,148	0,62
Cocaina		
comorbidità con abuso/dipendenza	-0,033	0,74
età all'esordio	-0,033	0,81
mesi di astensione	-0,195	0,42
Alcool		
comorbidità con abuso/dipendenza	0,143	0,16
età all'esordio	0,175	0,66
mesi di astensione (n = 8)	0,774	0,04
Ansiolitici		
comorbidità con abuso/dipendenza	-0,002	0,98
età all'esordio	-0,465	0,14
familiarità per abuso o dipendenza da eroina	0,06	0,55
familiarità per abuso o dipendenza da altre sostanze	-0,022	0,83

Il modello di regressione lineare non ha evidenziato un'associazione significativa tra LTL e genotipo del polimorfismo 5-HTTLPR (beta = 0.065, p = 0.39).

Discussioni

In questo studio abbiamo misurato la LTL in un campione di pazienti affetti da dipendenza da eroina e di controlli sani. I risultati non hanno mostrato alcuna differenza tra la LTL nei pazienti rispetto ai controlli. Questo risultato non è in accordo con lo studio effettuato da Yang et al. (2013) che ha evidenziato una ridotta LTL nel gruppo degli eroinomani confrontato con un gruppo di controllo. Risulta invece in linea con lo studio di Yang e collaboratori l'assenza di associazione riscontrata nelle nostre analisi tra la LTL e le variabili cliniche: periodo di esposizione all'eroina e uso concomitante di altre sostanze.

Stratificando il campione per comorbidità, è emersa una correlazione positiva tra la LTL e i mesi di astensione dall'assunzione di alcool. Seppure questo risultato sia relativo ad un sotto campione numericamente ridotto, questo dato potrebbe riflettere l'instaurarsi di una nuova omeostasi cellulare, ovvero dell'equilibrio ritrovato tra ROS e antiossidanti, durante i mesi di astensione da abuso di alcool nei soggetti eroinomani.

Come già documentato da altri studi, l'abuso di alcool è associato ad un accorciamento dei telomeri (Pavanello et al., 2011) e un conseguente prematuro invecchiamento cellulare. La causa di questo fenomeno sembrerebbe risiedere nella produzione di alti livelli di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OH-dG). Infatti, proprio la 8-OH-dG sembrerebbe causare la rottura del doppio filamento del DNA e/o interferire con la formazione della forcella di replicazione (von Zglinicki, 2002).

Il secondo obiettivo della nostra tesi è stato quello di valutare la possibile influenza del polimorfismo 5-HTTLPR nella lunghezza dei telomeri dei leucociti in pazienti dipendenti da eroina. Come già detto nell'introduzione, precedenti studi hanno confermato l'associazione tra la dipendenza da eroina e l'allele *Short* del polimorfismo 5-HTTLPR (Gerra et al., 2004; Lin et al., 2016; Wang et al., 2016), e la correlazione tra l'allele S del trasportatore della serotonina e l'accorciamento della lunghezza telomerica in una coorte di individui sani (Li et al., 2014).

Benché il nostro studio non abbia evidenziato alcun risultato significativo, i dati devono essere interpretati con cautela, in quanto il nostro studio è a oggi il primo ad aver valutato l'influenza del polimorfismo 5-HTTLPR sulla TL in pazienti eroinomani, seppure nei limiti della dimensione del campione in esame.

I risultati complessivi di questo studio devono essere interpretati in considerazione delle loro limitazioni. In primo luogo non è stato possibile stratificare il campione in esame in base alle informazioni sulla storia dei trattamenti pregressi a cui i pazienti sono stati sottoposti. Inoltre, seppure la Real-Time PCR sia una delle tecniche maggiormente usate per la quantificazione relativa delle TL per via della sua versatilità e del suo costo, risulta essere una tecnica non accurata e precisa come ad esempio l'ibridazione quantitativa in situ a fluorescenza (q-FISH).

Inoltre, considerando che la LTL è stata associata in altri studi a numerose variabili quali fumo di sigaretta, esperienze avverse durante il corso della vita ("Early life stress"), diverse modalità di assunzione delle sostanze d'abuso, che non sono state valutate nel nostro campione, non possiamo escludere un effetto di interazione tra abuso di eroina e le suddette variabili su LTL.

Conclusioni

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che la LTL non differisce in pazienti con dipendenza da eroina rispetto a soggetti che non hanno mai abusato. I dati suggeriscono inoltre che il polimorfismo 5-HTTLPR del trasportatore della serotonina non determina un accorciamento accelerato delle estremità cromosomiche nei due gruppi di studio.

Tuttavia, considerate le evidenze scientifiche a riguardo, sarebbe di fondamentale importanza la replicazione di questo studio in un campione più numeroso al fine di investigare l'effettivo ruolo che la dipendenza da eroina può avere sull'invecchiamento cellulare accelerato.

Bibliografia

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, ed 4th, text revision. Washington, American Psychiatric Association, 2000.

Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1992; 663:85-96.

Araos P, Pedraz M, Serrano A, Lucena M, Barrios V, García-Marchena N, Campos-Cloute R, Ruiz JJ, Romero P, Suárez J, Baixeras E, de la Torre R, Montesinos J, Guerri C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Martínez-Riera R, Torrens M, Chowen JA, Argente J, Mason BJ, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F. Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addict Biol.* 2015; 20(4):756-72.

Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev.* 2008; 88:557-579

Ball D e Collier D. ‘Substance misuse’, in: McGuffin, P., Owen, M. J. and Gottesman, I. I. (eds.), *Psychiatric genetics and genomics*, Oxford University Press, Oxford. 2002; pp. 267-302.

Ball D, Pembrey M e Stevens D. “Genomics”, in: Nutt D, Robbins T, Stimson G, Ince M e Jackson A (eds.). *Drugs and the future: Brain science, addiction and society*, Academic Press, London; 2007; pp. 89-132.

Barnes CA. Long-term potentiation and the ageing brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003; 358: 765–772.

Battistella G, Fornari E, Annoni J-M, Chtioui H, Dao K, Fabritius M, Favrat B, Mall J-F, Maeder P, Giroud C. Long-term effects of cannabis on brain structure. *Neuropsychopharmacology*. 2014; 39:2041-2048.

Bazuaye-Ekwuyasi EA, Ogunbileje JO, Kaphalia BS, Eltorkey MA, Okorodudu AO: Comparative effects of cocaine and cocaethylene on alveolar epithelial type II cells. *Toxicol Mech Methods*. 2015; 25:604-613.

Beach SR, Lei MK, Brody GH, Yu T, Philibert RA. Non supportive parenting affects telomere length in young adulthood among African Americans: mediation through substance use. *J Fam Psychol*. 2014; 28(6):967-72.

Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mössner R, Westphal H, Lesch KP. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4 methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol*. 1998; 53(4):649-55.

Benoilid A, Collongues N, de Seze J, Blanc F: Heroin inhalation induced unilateral complete hippocampal stroke. *Neurocase*. 2013; 19:313-315.

Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991; 350: 569–573.

Brocke B, Armbruster D, Muller J, Hensch T, Jacob CP, et al. Serotonin transporter gene variation impacts innate fear processing: Acoustic startle response and emotional startle. *Mol Psychiatry*. 2006; 11: 1106–12.

Brody GH, Flor DL, Hollett-Wright N, McCoy JK, Donovan J. Parent-child relationships, child temperament profiles and children's alcohol use norms. *J Stud Alcohol Suppl.* 1999; 13:45-51.

Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7:30–40.

Calado RT e Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med.* 2009; 361:2353-65.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 2005; 120:513-522.

Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 2003; 361 (9355), 393–395

Cheng GL, Zeng H, Leung MK, Zhang HJ, Lau BW, Liu YP, Liu GX, Sham PC, Chan CC, So KF, Lee TM. Heroin abuse accelerates biological aging: a novel insight from telomerase and brain imaging interaction. *Transl Psychiatry.* 2013; 21;3:e260.

Comings DE, Blum K. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog Brain Res.* 2000; 126:325-41.

Connock M, Juarez-Garcia A, Jowett S, Frew E, Liu Z, Taylor RJ, Fry-Smith A, Day E, Lintzeris N, Roberts T, Burls A, Taylor RS. Methadone and buprenorphine for the management of opioid dependence: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2007; 11: 1–171, iii-iv.

Cornford EM, Braun LD, Oldendorf WH, Hill MA. Comparison of lipid-mediated blood-brain-

barrier penetrability in neonates and adults. *Am J Physiol.* 1982; 243: C161-C168.

Cosgrove KP, Tellez-Jacques K, Pittman B, Petrakis I, Baldwin RM, Tamagnan G, Seibyl J, Kosten T, Staley JK. Dopamine and serotonin transporter availability in chronic heroin users: a [¹²³I]β-CIT SPECT imaging study. *Psychiatry Res.* 2010; 184(3):192-5.

Cunha-Oliveira T, Cristina Rego A, Oliveira RC: Oxidative stress and drugs of abuse: an update. *Mini-Rev Org Chem* 2013, 10:321-334.

Cunha-Oliveira T, Rego AC, Garrido J, Borges F, Macedo T, Oliveira CR: Neurotoxicity of heroin–cocaine combinations in rat cortical neurons. *Toxicology.* 2010; 276:11-17.

de Lange T. How Telomeres Solve the End-Protection Problem. *Science.* 2009; 326(5955):948-952.

de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005; 19(18):2100-2110.

Degenhardt L, Bucello C, Mathers B, Briegleb C, Ali H, Hickman M, McLaren J. Mortality among regular or dependent users of heroin and other opioids: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Addiction.* 2011; 106: 32–51.

Degenhardt L, Charlson F, Mathers B, Hall WD, Flaxman AD, Johns N, Vos T. The global epidemiology and burden of opioid dependence: results from the global burden of disease 2010 study. *Addiction.* 2014; 109: 1320– 1333.

Degenhardt L, Whiteford HA, Ferrari AJ, Baxter AJ, Charlson FJ, Hall WD, Freedman G, Burstein R, Johns N, Engell RE, Flaxman A, Murray CJ, Vos T. Global burden of disease attributable to illicit drug use and dependence: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2013; 382 (9904):1564-74.

Dennis BB, Roshanov PS, Naji L, Bawor M, Paul J, Plater C, Pare G, Worster A, Varenbut M, Daiter J, Marsh DC, Desai D, Samaan Z, Thabane L: Opioid substitution and antagonist therapy trials exclude the common addiction patient: a systematic review and analysis of eligibility criteria. *Trials* 2015; 16: 475.

Dewick PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2009; 978-0-470-74168-9.

Effros RB: Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: effect of chronic infection and stress. *Exp Gerontol*. 2011; 46:135-140.

EMCCDA. European drug report 2014. Lisbon, 2014.

Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 17312–5.

Ersche KD, Clark L, London M, Robbins TW, Sahakian BJ: Profile of executive and memory function associated with amphetamine and opiate dependence. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 31:1036-1047.

Ersche KD, Roiser JP, Robbins TW, Sahakian BJ. Chronic cocaine but not chronic amphetamine use is associated with perseverative responding in humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008; 197(3):421-31.

Federal Law on Narcotics and Psychotropic Substances. Department of Health, 2008.

Gartry CC, Oviedo-Joekes E, Laliberte N, Schechter MT. NAOMI: the trials and tribulations of implementing a heroin assisted treatment study in North America. *Harm Reduct J* 2009; 6: 2.

Gerra G, Garofano L, Santoro G, et al. Association between low-activity serotonin transporter genotype and heroin dependence: behavioral and personality correlates. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004; 126(1):37–42.

Gibb BE, Benas JS, Grassia M, McGeary J. Children's attentional biases and 5-HTTLPR genotype: potential mechanisms linking mother and child depression. *J Clin Child Adolesc Psychol*. 2009; 38: 415–26.

Goldman D, Oroszi G e Ducci F. 'The genetics of addictions: Uncovering the genes', *Nature Reviews Genetics* 6. 2005; pp. 521-32.

Goodman A. Neurobiology of addiction. An integrative review. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75(1):266-322.

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999; 14;97(4):503-14.

Güttinger F, Gschwend P, Schulte B, Rehm J, Uchtenhagen A. Evaluating long-term effects of heroin-assisted treatment: the results of a 6-year follow-up. *Eur Addict Res.* 2003; 9(2):73-9.

Hain HS, Belknap JK, Mogil JS. Pharmacogenetic evidence for the involvement of 5-hydroxytryptamine (Serotonin)-1B receptors in the mediation of morphine antinociceptive sensitivity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 291(2):444-9.

Haleem DJ, Zafar A, Azam S, Yasmeen A. Tolerance to diacetyl morphine antinociception: effects on brain serotonin. *Neuroreport.* 1994; Mar 21;5(7):781-4.

Harley CB, Futcher AB, and Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990; 345, 458–460.

Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem.* 1996; 66(6):2621-4.

Ho EL, Josephson SA, Lee HS, Smith WS: Cerebrovascular complications of methamphetamine abuse. *Neurocrit Care.* 2009; 10:295-305.

Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(3):235-46.

Hser YI, Evans E, Grella C, Ling W, Anglin D. Long-term course of opioid addiction. *Harv Rev Psychiatry.* 2015; 23: 76–89.

Hser YI, Evans E, Huang D, Weiss R, Saxon A, Carroll KM, Woody G, Liu D, Wakim P, Matthews AG, Hatch-Maillette M, Jelstrom E, Wiest K, McLaughlin P, Ling W: Long-term outcomes after randomization to buprenorphine/ naloxone versus methadone in a multisite trial. *Addiction*. 2016; 111: 695–705.

Hulse GK, English DR, Milne E, Holman CD. The quantification of mortality resulting from the regular use of illicit opiates. *Addiction*. 1999; 94:(2) 221-229.

Hyman SE, Malenka RC. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2:(10) 695-703.

Imam T, Jitratkosol MH, Soudeyns H, Sattha B, Gadawski I, Maan E, Forbes JC, Alimenti A, Lapointe N, Lamarre V, Money DM, Côté HC; CIHR Emerging Team Grant on HIV Therapy and Aging: CARMA. Leukocyte telomere length in HIV-infected pregnant women treated with antiretroviral drugs during pregnancy and their uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012; 15;60(5):495-502.

Intiaz S, Shield KD, Fischer B, Rehm J. Harms of prescription opioid use in the United States. *Subst Abuse Treat Prev Policy* 2014; 9: 43.

Interdepartmental Committee on Drug Addiction (Brain Committee). *Drug Addiction, Second Report*. Her Majesty's Stationery Office, 1965.

Inturrisi CE, Schultz M, Shin S, *et al*. Evidence from opiate binding studies that heroin acts through its metabolites. *Life Sci*. 1983; 33 Suppl 1: 773-6.

Jolas T, Nestler EJ, Aghajanian GK. Chronic morphine increases GABA tone on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus: association with an up-regulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroscience*. 2000; 95(2):433-43.

Kalivas PW, O'Brien C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33(1) 166-180.

Kessler RC, Avenevoli S, Costello EJ, Georgiades K, Green JG, Gruber MJ, He JP, Koretz D, McLaughlin KA, Petukhova M, Sampson NA, Zaslavsky AM, Merikangas KR. Prevalence, persistence, and sociodemographic correlates of DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication adolescent supplement. *Arch Gen Psychiatry*. 2012; 69: 372–380.

Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Psychological stress, telomeres, and telomerase. *Brain Behav Immun*. 2010; 24: 529–30.

Kish SJ, Kalasinsky KS, Derkach P, Schmunk GA, Guttman M, Ang L, Adams V, Furukawa Y, Haycock JW. Striatal dopaminergic and serotonergic markers in human heroin users. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24(5):561-7.

Kleber HD, Weiss RD, Anton RF Jr, George TP, Greenfield SF, Kosten TR, O'Brien CP, Rounsaville BJ, Strain EC, Ziedonis DM, Hennessy G, Connery HS, McIntyre JS, Charles SC, Anzia DJ, Cook IA, Finnerty MT, Johnson BR, Nininger JE, Summergrad P, Woods SM, Yager J, Pyles R, Cross CD, Peele R, Shemo JP, Lurie L, Walker RD, Barnovitz MA, Gray SH, Saxena S, Tonnu T, Kunkle R, Albert AB, Fochtmann LJ, Hart C, Regier D. Treatment of patients with substance use disorders, second edition. American psychiatric association. *Am J Psychiatry*. 2007; 164(4 suppl):5–123

Klemenc S. 4-Dimethylaminopyridine as a catalyst in heroin synthesis. *Forensic Sci Int.* 2002; 129: 194-9.

Kovacic P. Role of oxidative metabolites of cocaine in toxicity and addiction: oxidative stress and electron transfer. *Med Hypotheses.* 2005; 64(2):350-6.

Kreek MJ , Levran O, Reed B, Schlussman SD, Zhou Y, Butelman ER. Opiate addiction and cocaine addiction: underlying molecular neurobiology and genetics. *J Clin Invest.* 2012; 122(10):3387-93.

Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS. Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci.* 2005; 8(11):1450-7.

Kreek MJ, Vocci FJ. History and current status of opioid maintenance treatments: blending conference session. *J Subst Abuse Treat.* 2002; 23(2):93-105.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 11):2417-26.

Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(19):5444.

Lavonas EJ, Banner W, Bradt P, Bucher-Bartelson B, Brown KR, Rajan P, Murrelle L, Dart RC, Green JL. Root causes, clinical effects, and outcomes of unintentional exposures to buprenorphine by young children. *J Pediatr.* 2013; 163: 1377–1383.e1–e3.

Lee YS, Han DH, Yang KC, et al. Depression like characteristics of 5HTTLPR polymorphism and temperament in excessive internet users. *J Affect Disord.* 2008; 109(1–2):165–169.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 1996; 274(5292):1527-31.

Leshner A I. Addiction is a brain disease, and it matters. *Science.* 1997; 278:(5335) 45-47.

Levandowski ML, Viola TW, Wearick-Silva LE, Wieck A, Tractenberg SG, Brietzke E, Bauer ME, Teixeira AL, Grassi-Oliveira R. Early life stress and tumor necrosis factor superfamily in crack cocaine withdrawal. *J Psychiatr Res.* 2014; 53:180-6.

Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB et al. Telomere end replication problem and cell aging. *J Mol Biol.* 1992; 225:951–960.

Li P, Liu T, Liu J, Zhang Q, Lou F, Kong F, Cheng G, Björkholm M, Zheng C, Xu D. Promoter polymorphism in the serotonin transporter (5-HTT) gene is significantly associated with leukocyte telomere length in Han Chinese. *PLoS One.* 2014;9(4):e94442

Lin PY, Wu YS. Association between serotonin transporter gene polymorphisms and heroin dependence: a meta-analytic study. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016;12:3061-3067.

Lindqvist D, Epel ES, Mellon SH, Penninx BW, Revesz D, Verhoeven JE, Reus VI, Lin J, L, Hough CM et al.: Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: underlying mechanisms linking mental illness with cellular aging. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015; 55:333-364.

Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA et al. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res.* 1991; 256:45–48.

Mammen K, Bell J. The clinical efficacy and abuse potential of combination buprenorphine-naloxone in the treatment of opioid dependence. *Expert Opin Pharmacother.* 2009; 10(15):2537-44.

Massardo T, Quintana JC, Jaimovich R, Saez CG, Cabrerias MJ, Pereira-Flores K, Ibanez C, Pallavicini J, Veliz J, Mezzano D, Pereira J. Changes in regional cerebral blood flow are associated with endothelial dysfunction markers in cocaine dependent patients under recent abstinence. *J Addict Med.* 2015; 9:139-146.

Mattick RP, Breen C, Kimber J, Davoli M. Buprenorphine maintenance versus placebo or methadone maintenance for opioid dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 2:CD002207.

Merikangas KR, Stolar M, Stevens D E et al. Familial transmission of substance use disorders, *Archives of General Psychiatry.* 1998; 55, pp. 973-79.

Mignat C, Heber D, Schlicht H, Ziegler A. Synthesis, opioid receptor affinity, and enzymatic hydrolysis of sterically hindered morphine 3-esters. *J Pharm Sci.* 1996; 85: 690-4.

Ministerio De La Presidencia. Real Decreto 75/1990 De 19 De Enero, Por El Que Se Regulan Los Tratamientos Con Opiaceos De Las Personas Dependientes De Los Mismos. Boletín Oficial Del Estado del 11 De Abril 1990. Ministerio de la Presidencia, 1990.

Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*. 1989; 59:521-529

Moyzis RK., Buckingham JM., Cram LS., Dani M., Deaven LL., Jones MD., Meyne J., Ratliff RL., Wu JR. A Highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:6622-6626.

Muezzinler A, Zaineddin AK, Brenner H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev*. 2013; 12: 509-519.

Nakama H, Chang L, Fein G, Shimotsu R, Jiang CS, Ernst T: Methamphetamine users show greater than normal age-related cortical gray matter loss. *Addiction (Abingdon, England)*. 2011; 106:1474-1483.

Nestler EJ. "Genes and addiction", *Nature Genetics*. 2000; 26, pp. 277-81.

Nestler EJ. Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr Opin Neurobiol*. 1997; 7(5):713-9.

Nestler EJ. Under siege: The brain on opiates. *Neuron*. 1996;16(5):897-900.

Noble M, Treadwell JR, Tregear SJ, Coates VH, Wiffen PJ, Akafomo C, Schoelles KM. Long-term opioid management for chronic noncancer pain. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; 20;(1):CD006605.

Oldendorf WH, Hyman S, Braun L, Oldendorf SZ. Blood-brainbarrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science.* 1972; 178: 984-6.

Order 29.5.2008 of the Ministrz of Health and Prevention. Denmark, 2008.

Pacini PP, Pacini M, Maremanni I. Fondamenti da tossicodipendenza degli oppiacei. *EUROPAD e AUC-NS, Real science communications.* 2011.

Pavanello S, Hoxha M, Dioni L, Bertazzi PA, Snenghi R, Nalesso A, Ferrara SD, Montisci M, Baccarelli A. Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. *Int J Cancer.* 2011; 129(4):983-92.

Peles E, Schreiber S, Adelson M. 15-year survival and retention of patients in a general hospital-affiliated methadone maintenance treatment (MMT) center in Israel. *Drug Alcohol Depend.* 2010; 107: 141–148.

Perez de Castro I, Ibanez A, Saiz-Ruiz J, Fernandez-Piqueras J. Genetic contribution to pathological gambling: possible association between a functional DNA polymorphism at the serotonin transporter gene (5-HTT) and affected men. *Pharmacogenetics.* 1999; 9(3):397–400.

Pert CB and Snyder SH. Properties of opiate-receptor binding in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1973; 70: 2243–2247.

Pfeiffer-Gerschel T, Kipke I, Floter S, Lieb C, Raiser P. German National Report on Drugs to the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Munich, Germany, 2009.

Pontes H, Sousa C, Silva R, Fernandes E, Carmo H, Remiao F, Carvalho F, Bastos ML: Synergistic toxicity of ethanol and MDMA towards primary cultured rat hepatocytes. *Toxicology*. 2008; 254:42-50.

Pomierny-Chamiolo L, Moniczewski A, Wydra K, Suder A, Filip M: Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. *Neurotoxicity Res*. 2013, 23:92-102.

Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(6):2542-6.

Rang, H P. *Pharmacology* (5th ed). Churchill Livingstone, Edinburgh; New York, 2003.

Rawdin BJ, Mellon SH, Dhabhar FS, Epel ES, Puterman E, Su Y, Burke HM, Reus VI, Rosser R, Hamilton SP, Nelson JC, Wolkowitz OM: Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain Behav Immun*. 2013; 31:143-152.

Reuter-Lorenz PA, Lustig C. Brain aging: reorganizing discoveries about the aging mind. *Curr Opin Neurobiol*. 2005; 15: 245–251.

Rhee SH, Hewitt JK, Young SE et al. Genetic and environmental influences on substance initiation, use, and problem use in adolescents, *Archives of General Psychiatry*. 2003; 60, pp. 1256-64.

Richard M. Cawthon. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(10): e47.

Rolleston Report: Report of the Departmental Committee on Morphine and Heroin Addiction. Ministry of Health, 1926.

Rossiello F, Herbig U, Longhese MP, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Curr Opin Genet Dev.* 2014; 26:89-95

Sarafian TA, Habib N, Oldham M, Seeram N, Lee RP, Lin L, Tashkin DP, Roth MD. Inhaled marijuana smoke disrupts mitochondrial energetics in pulmonary epithelial cells in vivo. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290:L1202- L1209.

Schon EA, Przedborski S. Mitochondria: the next (neurode) generation. *Neuron.* 2011, 70:1033-1053.

Sekine Y, Ouchi Y, Sugihara G, Takei N, Yoshikawa E, Nakamura K, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Suda S, Suzuki K et al. Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci.* 2008; 28:5756-5761.

Selley DE, Cao CC, Sexton T, *et al.* mu Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62: 447-55.

Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem.* 2003; 278(9):6824-30.

Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70(7):1947-9.

Sneider W. The discovery of heroin. *Lancet.* 1998; 352: 1697-9.

Soyka M, Strehle J, Rehm J, Bühringer G, Wittchen HU. Six-Year Outcome of Opioid Maintenance Treatment in Heroin-Dependent Patients: Results from a Naturalistic Study in a Nationally Representative Sample. *Eur Addict Res.* 2017; 23(2):97-105.

Soyka M, Trader A, Klotsche J, Backmund M, Buhringer G, Rehm J, Wittchen HU. Six-year mortality rates of patients in methadone and buprenorphine maintenance therapy: results from a nationally representative cohort study. *J Clin Psychopharmacol.* 2011; 31: 678– 680.

Strand MC, Fjeld B, Arnestad M, Morland J. Can patients receiving opioid maintenance therapy safely drive? A systematic review of epidemiological and experimental studies on driving ability with a focus on concomitant methadone or buprenorphine administration. *Traffic Inj Prev.* 2013; 14(1):26-38.

Strandberg TE, Strandberg AY, Saijonmaa O, Tilvis RS, Pitkälä KH, Fyhrquist F. Association between alcohol consumption in healthy midlife and telomere length in older men. The Helsinki Businessmen Study. *Eur J Epidemiol.* 2012; 27(10):815-22.

Terenius L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1973; 32(3):317-20.

The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. Geneva, World Health Organization, 1992.

Tyndale R F. Genetics of alcohol and tobacco use in humans, *Annals of Medicine*. 2003; Vol. 35, No 2, pp. 94-121.

Uhl GR, Li MD, Gelertner J, Berrettini W e Pollock J. "Molecular genetics of addiction vulnerability and treatment responses", *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29, pp. S26-S26.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. World drug report 2006. United Nations Publication Sales No. E.06.XI.10, Volume 1, ISBN 92-1-148214-3

Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*. 2005; 366(9486):662-4.

von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*. 2002; 27:339–344.

W van den Brink and JM Van Ree. Pharmacological treatments for heroin and cocaine addiction. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2003; 75(13):476-487.

W van den Brink, Hendriks VM e Van Ree JM. Medical coprescription of heroin to chronic treatment resistant methadone patients in the netherlands. *J Drug Issues*, 1999; 75(29):587-608.

Wang TY, Lee SY, Chung YL, Chen SL, Li CL, Chang YH, Wang LJ, Chen PS, Chen SH, Chu CH, Huang SY, Tzeng NS, Hsieh TH, Lee IH, Chen KC, Yang YK, Hong JS, Lu RB. TPH1 and 5-HTTLPR Genes Specifically Interact in Opiate Dependence but Not in Alcohol Dependence. *Eur Addict Res.* 2016; 22(4):201-9.

Who: Guidelines for the Psychosocially Assisted Pharmacological Treatment of Opioid dependence. 2009.

WHO/ UNODC/UNAIDS. Substitution maintenance therapy in the management of opioid dependence and HIV/AIDS prevention. World Health Organization, 2004.

Williams FM. Clinical significance of esterases in man. *Clin Pharmacokinet.* 1985; 10: 392-403.

Williams PE. Factors affecting the oral absorption of esterified antibiotics. *Biochem Soc Trans.* 1985; 13: 511-3

Wittchen HU, Apelt SM, Buhringer G, Gastpar M, Backmund M, Golz J, Kraus MR, Tretter F, Klotsche J, Siegert J, Pittrow D, Soyka M. Buprenorphine and methadone in the treatment of opioid dependence: methods and design of the cobra study. *Int J Methods Psychiatr Res.* 2005; 14: 14–28.

Yan LJ. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol.* 2014; 2:165-9.

Yang Z, Ye J, Li C, Zhou D, Shen Q, Wu J, Cao L, Wang T, Cui D, He S, Qi G, He L, Liu Y: Drug addiction is associated with leukocyte telomere length. *Scientific Rep.* 2013, 3:1542

Yeh TL, Chen KC, Lin SH, Lee IH, Chen PS, Yao WJ, Lee SY, Yang YK, Lu RB, Liao MH, Chiu NT. Availability of dopamine and serotonin transporters in opioid-dependent users--a two-isotope SPECT study. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012; 220(1):55-64.

Yuferov V, Levran O, Proudnikov D, Nielsen DA, Kreek MJ. Search for genetic markers and functional variants involved in the development of opiate and cocaine addiction and treatment. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1187:184–207.

Zaparte A, Viola TW, Grassi-Oliveira R, da Silva Morrone M, Moreira JC, Bauer ME. Early abstinence of crack-cocaine is effective to attenuate oxidative stress and to improve antioxidant defences. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015; 232(8):1405-13.

Zhou BBS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408:433-39.