



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



UNIONE EUROPEA  
Fondo sociale europeo



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA  
IN TOSSICOLOGIA  
XXVIII Ciclo**

**Effetto dell'esposizione cronica volontaria di eroina e  
WIN55,212-2 sull'espressione di micro RNA nelle aree  
cerebrali coinvolte nella dipendenza da sostanze d'abuso.**

Settore scientifico disciplinari di afferenza

BIO/14

Presentata da:	Dott. Gian Pietro Serra
Coordinatore Dottorato	Prof. Gaetano Di Chiara
Tutor	Dott.ssa Valentina Valentini

Esame finale anno accademico 2014 – 2015



# INDICE

<b>1. Introduzione</b>	4
<b>1.1. I miRNA</b>	5
1.1.1. La scoperta	5
1.1.2. Biosintesi	6
1.1.3. L'interazione miRNA bersaglio	10
1.1.4. Funzioni biologiche	12
<b>1.2. Analisi computazionale e strumenti di predizione</b>	14
1.2.1. miRWalk	15
1.2.2. miRanda	15
1.2.3. TargetScan	15
<b>1.3. Modificazioni epigenetiche</b>	17
1.3.1. Rimodellamento della cromatina	17
1.3.2. Metilazione del DNA	19
1.3.3. Regolazione posttrascrizionale	19
<b>1.4. Il fenomeno della dipendenza</b>	21
1.4.1. Il circuito cerebrale di gratificazione e ricompensa	22
1.4.2. Il sistema oppioide e l'eroina	26
1.4.3. Il sistema cannabinoide e WIN55,212-2	27
<b>1.5. Micro RNA e dipendenza</b>	30
1.5.1. Cocaina	30
1.5.2. Alcol	32
1.5.3. Nicotina	33
1.5.4. Oppioidi	34
<b>2. Scopo della ricerca</b>	37
<b>3. Materiali e metodi</b>	39
<b>3.1. Animali</b>	39
<b>3.2. Impianto del catetere in vena giugulare</b>	39
<b>3.3. Auto-somministrazione di eroina e WIN55,212-2</b>	39
<b>3.4. Prelievo del tessuto</b>	41
<b>3.5. Estrazione RNA totale</b>	41
3.5.1. Estrazione RNA totale con miRNeasy mini Kit (QIAGEN)	41
3.5.2. Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto	42

<b>3.6. Analisi dell'espressione dei miRNA</b>	42
3.6.1. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	42
3.6.2. Real Time PCR per l'espressione dei miRNA (miRNoma)	42
3.6.3. Real Time PCR per la convalida dei risultati ottenuti dall'analisi del miRNoma	43
<b>3.7. Analisi di espressione degli RNA messaggeri</b>	43
3.7.1. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	43
3.7.2. Real Time PCR	43
<b>3.8. Analisi delle proteine mediante Western Blot</b>	44
<b>3.9. Analisi computazionale per la predizione miRNA:mRNA</b>	44
<b>3.10. Analisi statistica</b>	45
<b>4. Risultati (eroina)</b>	46
<b>4.1. Auto-somministrazione di eroina</b>	46
<b>4.2. Espressione dei miRNA in seguito a trattamento con eroina</b>	48
4.2.1. Variazioni dell'espressione dei miRNA nella Shell del Nucleo Accumbens	48
4.2.2. Variazione dell'espressione dei miRNA nel Core del Nucleo Accumbens	50
4.2.3. Variazioni dell'espressione dei miRNA in Corteccia Prefrontale	53
4.2.4. Variazioni dell'espressione dei miRNA in Caudato Putamen	55
<b>4.3. Analisi della variazione di espressione genica indotta da         AS di eroina</b>	57
<b>4.4. Analisi dell'espressione proteica in seguito a trattamento         con eroina</b>	58
4.4.1. Nucleo Accumbens Shell	58
4.4.2. Nucleo Accumbens Core	60
4.4.3. Corteccia Prefrontale	62
4.4.4. Caudato Putamen	64
<b>4.5. Analisi computazionale per i miRNA modificati da         AS di eroina</b>	67
4.5.1. BDNF	67
4.5.2. CCKBR	69
4.5.3. CLOCK	70
4.5.4. CREB	71
4.5.5. DRD3	72

4.5.6.MeCP2	73
4.5.7.NOS1	75
4.5.8.NOS2	76
4.5.9.MOR1	78
4.5.10.SIRT1	80
4.5.11.SIRT2	82
<b>5. Risultati WIN55,212-2</b>	<b>84</b>
<b>5.1. Auto-somministrazione di WIN55,212-2</b>	<b>84</b>
<b>5.2. Espressione dei miRNA in seguito a trattamento con WIN55,212-2</b>	<b>85</b>
5.2.1. Variazioni dell'espressione dei miRNA nella Shell del Nucleo Accumbens	85
5.2.2. Variazione dell'espressione dei miRNA nel Core del Nucleo Accumbens	87
5.2.3. Variazioni dell'espressione dei miRNA in Corteccia Prefrontale	90
5.2.4. Variazioni dell'espressione dei miRNA in Caudato Putamen	91
<b>5.3. Analisi della variazione di espressione genica indotta da AS di WIN55,212-2</b>	<b>94</b>
<b>5.4. Analisi computazionale per i miRNA modificati da AS di WIN55,212-2</b>	<b>96</b>
5.4.1. BDNF	96
5.4.2. CCKBR	98
5.4.3. CLOCK	100
5.4.4. CREB	101
5.4.5. DRD3	102
5.4.6. MeCP2	104
5.4.7. NOS1	105
5.4.8. NOS2	107
5.4.9. MOR1	109
5.4.10. SIRT1	111
5.4.11. SIRT2	114
<b>6. Discussione e conclusioni</b>	<b>116</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>129</b>
<b>8. Ringraziamenti</b>	<b>151</b>

# 1. Introduzione

Storicamente il termine *epigenetico* è stato riferito ad un fenotipo trasmissibile alla progenie e codificato da un meccanismo cellulare al di fuori (epi) del genoma (Haig, 2004). Più recentemente il termine epigenetico viene riferito a caratteri, sia ereditabili che non ereditabili, non codificati dalla sequenza del DNA (Allis et al., 2007). Quest'ultima definizione dei caratteri epigenetici, come indipendenti dal DNA e non necessariamente ereditabili, è stata adottata dal National Institutes of Health ed è quella correntemente utilizzata in neurobiologia. L'epigenetica studia quindi i processi attraverso i quali stimoli ambientali, tra cui l'esposizione a farmaci e sostanze d'abuso, modifica l'espressione genica agendo su meccanismi che non comportano un'alterazione della sequenza delle basi del DNA.

Fino a qualche decennio si riteneva che il ruolo dell'RNA fosse solamente quello di intermediatore nel flusso di informazioni che dal DNA, depositario dell'informazione genetica, perveniva alle proteine, molecole effettrici delle funzioni cellulari. Infatti, le più note classi di RNA cellulari, RNA messaggeri (mRNA), RNA transfer (tRNA) ed RNA ribosomali (rRNA) sono, direttamente o indirettamente, coinvolte nel processo di trasferimento dell'informazione da DNA a proteine.

Tuttavia la scoperta di piccoli RNA non codificanti, abbondanti e ubiquitari in tutte le cellule animali e vegetali, ha modificato in parte tale dogma. Questi sono rappresentati da due principali classi: short interfering RNA (siRNA) e microRNA (miRNA o miR) che funzionano da modulatori dell'espressione genica, e sono stati ritrovati nelle piante, negli animali e nei funghi. Altri piccoli RNA includono i tiny non-coding RNA (tncRNA) non conservati evolutivamente, ma regolati durante lo sviluppo e gli small modulatory RNA (smRNA), implicati nell'espressione di geni neuronali.

## 1.1. I miRNA

### 1.1.1. La scoperta

Il primo membro della famiglia fu scoperto nel 1993 nel nematode *Caenorhabditis elegans* (Wightman et al., 1993). In questo verme, mutazioni di *lin-4* sono causa di reiterazione del primo dei quattro stadi larvali. Viceversa, l'assenza del primo stadio e lo sviluppo del secondo, fu osservato in mutanti *lin-14*. Quest'ultimo codifica per una proteina nucleare LIN-14 i cui livelli diminuiscono al termine del primo stadio, meccanismo fondamentale per l'inizio del secondo stadio. *Lin-4* codifica per un piccolo RNA di 22 nucleotidi parzialmente complementari a 7 sequenze presenti nella regione 3' non codificante (3'UTR) di *lin-14*. La dimostrazione che la regolazione negativa di LIN-14 era dipendente dalla integrità della regione 3' UTR e dall'espressione del gene *lin-4* indicò che il meccanismo di regolazione negativa di LIN-14 era legato all'appaiamento di *lin-4* con la regione 3'UTR dell'mRNA di *lin-14* (Lee et al., 1993). La capacità di *lin-4* di regolare l'espressione di LIN-14 avviene attraverso il controllo della traduzione. Analogamente nel passaggio dallo stadio larvale L2 a L3, si osserva una regolazione negativa di *lin-28* esercitata da *lin-4*. Per diversi anni si è ritenuto che questo meccanismo potesse essere una peculiarità di questo organismo.

Nel 1998, fu scoperto in *C. elegans* un meccanismo definito RNA interference (RNAi) (Fire et al., 1998). Questo meccanismo, mediato da RNA bicatenari, provocava l'inibizione dell'espressione di specifici geni con una maggiore efficacia rispetto a quella ottenuta da ciascuna delle singole catene, proponendo che alla base non vi fosse una semplice inibizione dovuta all'interazione tra sequenze anti-senso, ma un meccanismo enzimatico o di amplificazione nel processo di interferenza. Successivamente, le basi molecolari del meccanismo furono chiarite, dimostrando la necessità di piccoli RNA non codificanti di circa 20-23 nucleotidi, definiti short interfering RNA (siRNA), per determinare il silenziamento genico in maniera sequenza specifica. Fu anche scoperto che tale meccanismo era presente in tutti gli organismi studiati, dagli eucarioti inferiori fino alle piante e all'uomo.

Quasi sette anni dopo l'identificazione di *lin-4*, fu scoperto il secondo membro di questa famiglia di piccoli RNA, *let-7* (*let-7*). *Let-7* codifica per un piccolo RNA di 22 nucleotidi che regola la transizione dallo stadio L4 allo stadio adulto (Reinhart et al., 2000, Abrahante et al., 2003, Lin et al., 2003) in *C. elegans*. Similmente a *lin-4*, *let-7* si lega alla regione 3' UTR di *lin-41* e *hbl-1* (*lin-57*) inibendone la traduzione. Questa scoperta non solo dava una conferma del meccanismo osservato con *lin-4* ma analisi filogenetiche dimostrarono che *let-7*, a differenza di *lin-4*, era conservato in tutti gli organismi studiati (Pasquinelli et al., 2000), suggerendo che il meccanismo di regolazione dell'espressione genica messo in atto da questi piccoli RNA non codificanti fosse esso stesso filogeneticamente conservato. Con la caratterizzazione di *let-7* si poté proporre anche l'esistenza di un meccanismo comune alla base dell'azione dei miRNA: questi funzionavano come anti-senso regolando l'espressione di mRNA a livello post-trascrizionale. In base alla loro similitudine funzionale, gli RNA trascritti dai geni *lin-4* e *let-7* vennero definiti stRNA (*small temporary RNA*), in relazione

alla loro proprietà di regolatori temporali dello sviluppo cellulare. In meno di un anno, numerosi studi successivi si focalizzarono sull'identificazione del maggior numero possibile di stRNA, scoprendo più di un centinaio di geni in diverse specie animali.

Oltre ad essere relativamente conservati dal punto di vista evolutivo tra le specie, questi trascritti mostravano, insieme ad una determinata funzione temporale nel ciclo cellulare, anche una caratteristica specificità tissutale. Nel 2001 venne coniato il termine *microRNA*, che indicava tutti quei stRNA con struttura simile, di cui non si conosceva la funzione (Lagos-Quintana et al., 2001, Lau et al., 2001, Lee and Ambros, 2001). L'ipotesi che i vari miRNA fossero espressi in base al tipo di tessuto venne confermata dalla scoperta che miR-1 era espresso principalmente nel cuore dei mammiferi (Lee e Ambros, 2001), mentre miR-122 soprattutto nel fegato (Aravin et al., 2003). Inoltre, l'analisi di miRNA cerebrali dei mammiferi mostrò come differenti schemi di espressione corrispondevano ai diversi stadi di sviluppo neuronale (Krichevsky et al., 2003). L'ipotesi dedotta fu che i miRNA fossero uno strumento di precisione col quale ciascun tipo cellulare regola il proprio sviluppo, e che i vari miRNA tessuto-specifici fossero espressi a seconda dei diversi stadi di crescita e differenziamento.

Progressivamente, gli studi mirati a chiarirne il ruolo si sono moltiplicati fino a mettere in luce il coinvolgimento dei miRNA in una vasta gamma di processi biologici, come la sincronizzazione dello sviluppo cellulare, i processi apoptotici e di proliferazione, l'ematopoiesi, la coordinazione delle reti neurali, la tumorigenesi, malattie genetiche e alterazioni nella funzionalità del sistema immunitario (Bartel, 2004, Chen et al., 2004, He and Hannon, 2004, Esquela-Kerscher and Slack, 2006, Kocerha et al., 2009, Saal and Harvey, 2009, Yang et al., 2009, Wu et al., 2010a, Wu et al., 2010b, Jung et al., 2012).

### **1.1.2 Biosintesi**

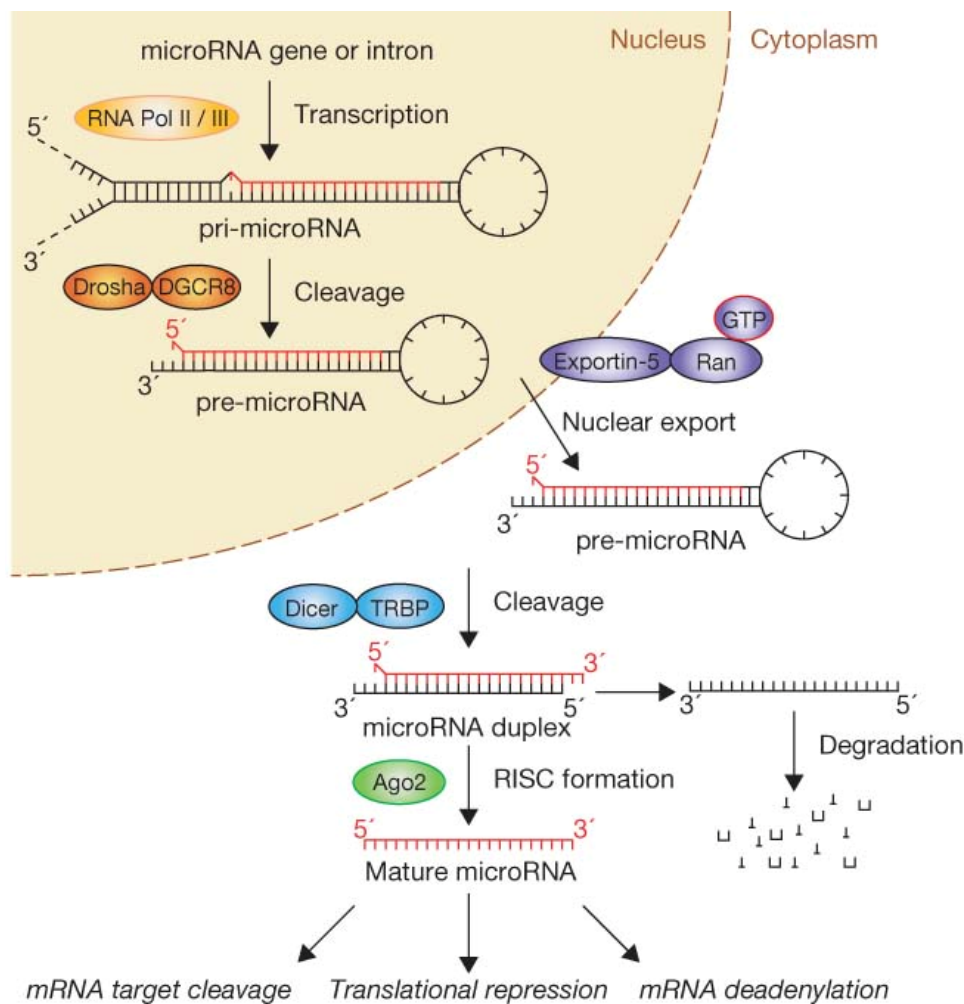
Oggi i miRNA sono definiti come brevi sequenze endogene di acido ribonucleico, composte da circa 22 nucleotidi (nt), che agiscono come regolatori post-trascrizionali mediante il legame complementare alle sequenze 3'-UTR presenti negli RNA messaggeri (mRNA). Rappresentano uno strumento molto versatile nella regolazione post-trascrizionale in quanto ciascun miRNA è potenzialmente capace di legarsi a centinaia di mRNA. Ad oggi sono stati identificati circa duemila miRNA nell'uomo: i geni codificanti i miRNA sono distribuiti su tutti i cromosomi, eccetto il cromosoma Y, e nel 50% dei casi i geni per differenti miRNA sono localizzati in loci adiacenti, organizzandosi in veri e propri *clusters*, come nel caso dei geni codificanti per miRNA hsa-let-7a-1, hsa-let-7f-1 e hsa-let-7d presenti nel cromosoma 9. Ciò comporta il fatto che tali geni vengano trascritti simultaneamente generando un trascritto primario policistronico. I miRNA in *clusters* spesso sono correlati funzionalmente, ma non sempre poiché questo dipende principalmente dalla sequenza primaria del maturo. Inoltre, si ritiene che la similarità di sequenza tra i diversi miRNA in *cluster* sia dovuta a fenomeni di duplicazione genica simile a quella che avviene per i geni codificanti proteine. Per quanto concerne la localizzazione genomica dei miRNA, essi possono essere distinti in:



- miRNA intergenici
- miRNA intronici in trascritti codificanti
- miRNA intronici in trascritti non codificanti
- miRNA esonici in trascritti non codificanti

La biogenesi dei miRNA può essere suddivisa in 5 fasi, le prime due avvengono nel nucleo cellulare e le rimanenti tre hanno luogo nel citoplasma (**Fig 1**):

1. Trascrizione: i geni per i miRNA vengono generalmente trascritti dalla RNA polimerasi II, anche se alcuni vengono co-trascritti dalla RNA polimerasi III insieme a elementi ripetitivvicinali. Ai filamenti generati viene aggiunto un “cappuccio” di 7-metil guanosina (capping) all'estremità 5' e la coda di poliA all'estremità 3'. La sequenza iniziale viene definita **pri-miRNA**, ed è costituita da diverse centinaia di coppie di basi che formano una struttura secondaria ad appaiamento imperfetto detta *hairpin* (forcina) o *stem-loop*.
2. Clivaggio: i pri-miRNA vengono elaborati da parte di un complesso proteico denominato **Microprocessor Complex**, costituito da un enzima ad azione ribonucleasica detto **Drosha**, che taglia il pri-miRNA in corrispondenza delle estremità 3' e 5', e la dsRNA-binding protein DGCR8 (**Pasha**), che individua il sito di clivaggio. Il prodotto dell'elaborazione è un nuovo filamento a forcina di dimensioni molto inferiori, lungo circa 70 paia di basi, detto **pre-miRNA**. Il taglio mediato dal Microprocessor Complex non è il solo meccanismo di produzione del pre-miRNA: un evento alternativo consiste nello splicing di sequenze di RNA dette “pri-miRNA cluster”, nelle quali sono presenti più pre-miRNA, già ripiegati in strutture a forcina. Questo secondo meccanismo è indipendente dall'azione di Drosha.
3. Trasporto nel citoplasma: il pre-miRNA si lega a **Exportin-5**, una proteina trasportatrice presente nella membrana nucleare, per formare un complesso che promuove la traslocazione del pre-miRNA nel citoplasma tramite il cofattore Ran-GTP.
4. Clivaggio: nel citoplasma avviene una nuova fase di clivaggio ad opera di **Dicer**, una proteina ad attività ribonucleasica che fa parte di un complesso enzimatico che include anche altre componenti, tra cui il cofattore TRBP, le proteine Argonata (AGO1-4) e l'elicasi MOV-10. Dicer opera un nuovo taglio tramite l'azione delle AGO ed elimina l'ansa di basi non appaiate, liberando una breve sequenza di RNA a doppio filamento (dsRNA), le cui estremità 3' mostrano dei segmenti terminali disaccoppiati di 2-3 nucleotidi.
5. Selezione del filamento guida e inclusione nel RISC (**Rna Induced Silencing Complex**): la doppia catena comprende un filamento “passeggero”, che viene separato e degradato, e un filamento “guida” che viene incluso nel RISC, permettendo al complesso enzimatico di riconoscere l'mRNA bersaglio tramite diverse modalità di legame del miRNA alle sequenze complementari nella 3'-UTR.



**Figura 1:** Rappresentazione delle varie fasi che portano alla formazione del miRNA maturo.  
Fonte: (Winter et al., 2009).

I miRNA possono regolare l'espressione genica andando ad interagire, una volta complessati con RISC, con l'mRNA target. Il RISC costituisce il complesso proteico effettore dell'attività di questi piccoli RNA. In questo complesso solo una delle catene del miRNA viene incorporata. Questa dirigerà in maniera sequenziale il complesso sul mRNA bersaglio. Quale delle due catene complementari sarà incorporata nel complesso RISC sembra dipendere dalla stabilità del terminale 5', infatti dopo il processamento da parte di Dicer si ha la formazione del doppio filamento "miRNA:miRNA\*" dove sono presenti entrambe le catene complementari. Solitamente queste sono caratterizzate da una diversa stabilità del terminale 5', e anche se teoricamente il miRNA maturo può derivare da entrambi i filamenti generalmente questo deriva da quello che presenta una stabilità minore del terminale 5' (Khvorova et al., 2003, Schwarz et al., 2003). La relativa instabilità del terminale 5' del miRNA maturo può facilitare l'incorporazione preferenziale nel RISC. Pertanto le proprietà termodinamiche del miRNA precursore determinano, a causa della maggiore facilità

con cui una delle due catene si svolge dal “miRNA:miRNA\*”, l’asimmetrica specificità con la quale una delle due catene viene assemblata col RISC, e quindi una specificità dell’inibizione post-trascrizionale. Nei rari casi in cui le due catene complementari abbiano la stessa stabilità a livello del terminale 5’, queste potranno essere incorporate nel complesso RISC con la stessa frequenza, e questo è stato confermato dal recupero di livelli simili di miRNA e miRNA\* da tessuti endogeni (Schwarz et al., 2003). I miRNA che hanno completato la loro attività o che non si legano al messaggero target si dissociano dal complesso RISC e vengono degradati, nelle cellule animali, dall’esonucleasi 5’-3’ XRN-2 che catalizza la reazione.

### 1.1.3. L'interazione miRNA-bersaglio

L'estesa caratterizzazione delle interazioni tra miRNA e mRNA ha dimostrato che l'appaiamento delle basi costituisce il fattore chiave nel riconoscimento dei bersagli da parte del miRNA. La regione *seed*, compresa tra i nucleotidi in posizione 2-8 sulla estremità 5' del miRNA, rappresenta il componente cruciale per indirizzare l'assemblaggio con RISC (Hammell et al., 2008). Numerosi studi hanno confermato l'associazione tra la regione *seed* e le regioni complementari presenti nell'mRNA target, che possono interagire attraverso una complementarità perfetta (*stringent*) o imperfetta (*moderate-stringent*), a seconda dei casi (Gaidatzis et al., 2007). Il RISC può riconoscere le sequenze *seed* anche quando queste si trovino in posizione diversa (offset: nucleotidi 3-10) da quella classica compresa nelle posizioni 2-8. Inoltre un appaiamento supplementare di basi all'estremità 3' del filamento di miRNA incrementa l'efficienza del riconoscimento del sito di interazione miRNA-mRNA, o ne compensa l'appaiamento imperfetto nella regione *seed*. Per i casi di perfetto appaiamento in corrispondenza delle posizioni 2-7 della regione *seed* con la sequenza di mRNA bersaglio, si può procedere ad una ulteriore classificazione in quattro tipologie, basata sulle interazioni dei nucleotidi in pos. 1 e 8 (**Fig. 2**):

1. 8mer → adenina in pos. 1 del sito bersaglio e appaiamento in posizione 8;
2. 7mer-m8 → appaiamento in posizione 8;
3. 7mer-A1 → una adenina in posizione 1;
4. 6mer → non è presente né l'adenina in posizione 1 né l'appaiamento in posizione 8;

Un'adenina in posizione 1 del miRNA aumenta l'efficienza e la precisione dell'appaiamento del miRNA-mRNA bersaglio (Lewis et al., 2005b).

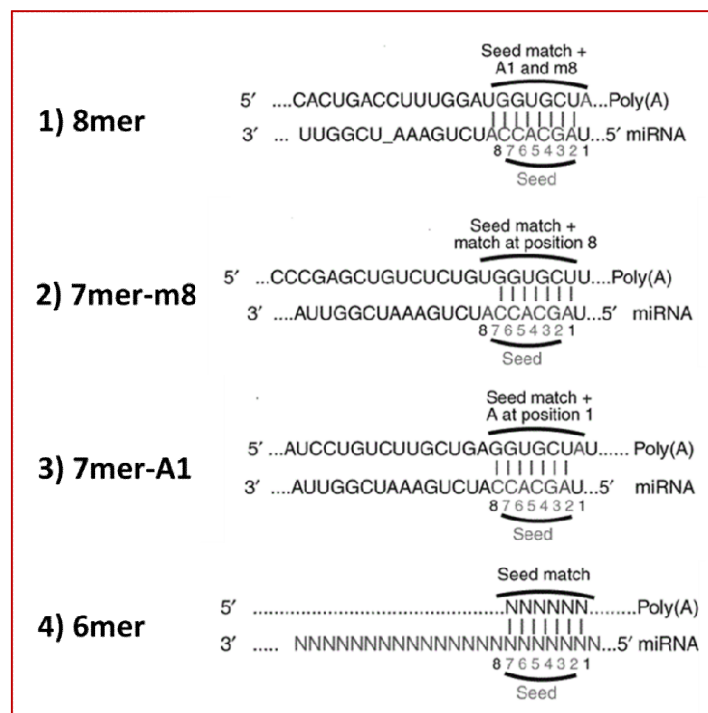
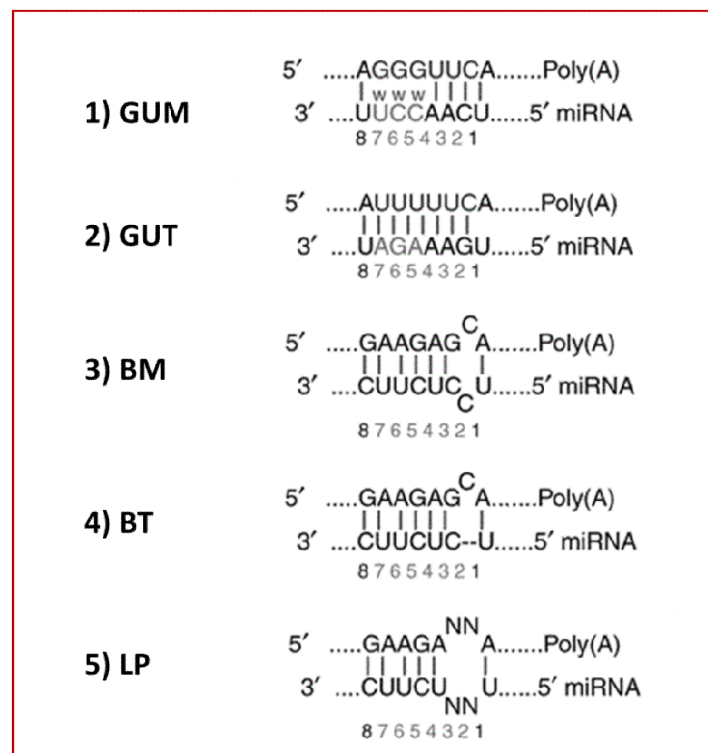


Figura 2: Tipologie di appaiamento perfetto tra miRNA e mRNA.

Oltre alla possibilità di avere un appaiamento perfetto nella regione *seed* con icasi suddetti, è ammissibile anche un appaiamento “moderato” o imperfetto, in quanto il RISC può tollerare piccole discrepanze nell’appaiamento tra basi (*mismatches*) e la presenza di coppie G-U all’interno della regione *seed* (*wobble pairing*). Si distinguono 5 tipi di appaiamento moderato (**Fig.3**), definiti in base al tipo di mismatch e alle strutture secondarie che si generano di conseguenza:

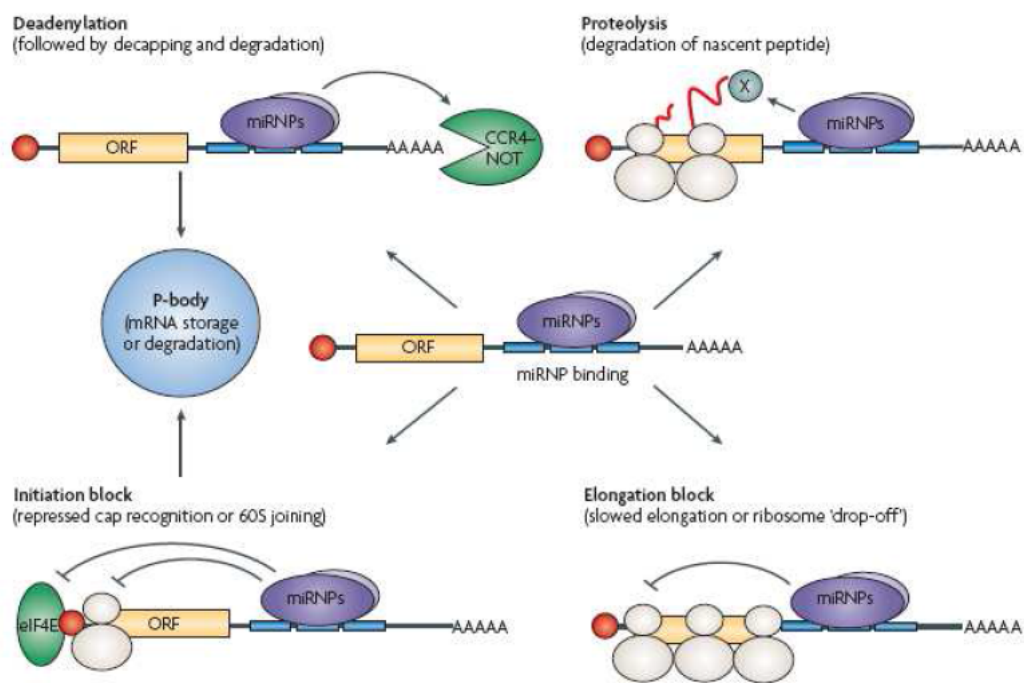
1. GUM: un solo appaiamento G-U, con l’uracile sulla regione *seed* del miRNA.
2. GUT: un solo appaiamento G-U ma in questo caso l’uracile è sul sito dell’mRNA bersaglio.
3. BM: è presente un “*bulge*” (protuberanza dovuta ad un nucleotide non appaiato) nella regione *seed* del miRNA.
4. BT: il “*bulge*” si trova sul sito target dell’mRNA.
5. LP: da “*loop*”, ossia la presenza di vuoto nell’appaiamento dovuto a più coppie di basi adiacenti non complementari.



**Figura 3:** Tipologie di appaiamento imperfetto tra miRNA e mRNA.

Una volta associato all’mRNA bersaglio, la funzione inibitoria del complesso RISC si esplica mediante diversi possibili meccanismi che ricadono in due grandi categorie, a seconda appunto che complementarietà del filamento guida del miRNA sia completa o parziale. Infatti è proprio il grado di complementarietà tra miRNA e mRNA a determinare il destino di quest’ultimo. Una complementarietà solo parziale porta all’inibizione della traduzione tramite l’accelerazione del processo di deadenilazione e decapping, determinando un rapido decadimento del trascritto, poichè dalla lunghezza della coda di poli-A dipende il tempo di

permanenza del filamento di mRNA nella cellula e di conseguenza il numero di volte che esso viene tradotto. In caso di complementarità imperfetta, il complesso RISC-miRNA agisce quindi diminuendo la vita citoplasmatica del trascritto e diminuendo la quantità di proteina tradotta. Diversamente, in caso di complementarità perfetta del filamento guida di miRNA, il RISC esercita un'azione ribonucleasica diretta attraverso la proteina AGO2, scindendo l'mRNA in vari frammenti, che vanno incontro a rapida degradazione (**Fig. 4**).



**Figura 4:** Possibili meccanismi d'azione del complesso RISC indotto dai miRNA. Il messaggero target può essere deadenilato e degradato, oppure può essere inibita la sua traduzione, in diversi modi qui rappresentati. Fonte: Filipowicz et al.,(2008)

#### 1.1.4. Funzioni biologiche

Date le caratteristiche associate ai miRNA, essi svolgono certamente un ruolo importante nella biologia cellulare e nello sviluppo di numerosi organismi. Nei mammiferi è stato riportato che miR-1 e miR-124, espressi rispettivamente nel muscolo scheletrico e nel cervello, sono in grado di indurre la riduzione dei livelli di circa un centinaio di mRNA, guidando le cellule verso un profilo di espressione rispettivamente muscolare o neuronale (Lim et al., 2005). Alcuni miRNA sono coinvolti nel differenziamento di vari tipi di cellule specializzate. Nel topo, il miR-181 è espresso preferenzialmente nei linfociti B e la sua espressione ectopica nelle cellule progenitrici staminali promuove il differenziamento verso la filiera B sia in coltura cellulare che in vivo (Chen et al., 2004). Questi risultati indicano che il miR-181 è un componente

dell'apparato molecolare responsabile del differenziamento ematopoietico. Il miR-143 è implicato nel differenziamento degli adipociti (Esau et al., 2004). Il miR-134, espresso in modo specifico a livello cerebrale e localizzato nel compartimento sinapto-dendritico, regola negativamente le dimensioni delle spine dendritiche (Schratt et al., 2006). Un altro miRNA, potenzialmente cerebrale, miR-124, svolge un ruolo fondamentale nella transizione delle cellule progenitrici neuronali in neuroni adulti. Uno studio ha dimostrato che il miR-375 è in grado di bloccare la secrezione di insulina indotta dal glucosio e, al contrario, l'inibizione del miR-375 endogeno incrementa la secrezione di insulina (Poy et al., 2004). Questi risultati suggeriscono che i miRNA abbiano un ruolo rilevante nello sviluppo e nel differenziamento cellulare di svariati tessuti dai nematodi ai mammiferi. Sebbene essi abbiano il noto ruolo di inibitori trascrizionali, è stata attribuita loro una funzione più ampia nel regolare l'espressione dei geni. Per esempio, recentemente è stata osservata l'ampia versatilità dei miRNA in risposta al ciclo cellulare. Questi piccoli filamenti di RNA oscillano tra la repressione e l'attivazione in modo coordinato con il ciclo cellulare. Nelle cellule proliferanti prevale la repressione della traduzione, mentre nella fase di arresto del ciclo cellulare ( $G_1/G_0$ ), che spesso precede il differenziamento, prevale l'attivazione (Vasudevan et al., 2007). Sebbene i complessi meccanismi di riconoscimento che permettono a ciascun miRNA di legare e regolare centinaia di geni bersaglio diversi non permettano ancora di avere un quadro chiaro ed univoco della loro attività biologica, recenti studi hanno evidenziato che deviazioni dal loro caratteristico profilo di espressione, o alterazioni che colpiscono componenti dell'apparato proteico di maturazione ed effetto, possono essere causa di malattie in cellule normali. Infatti i miRNA sono implicati nella patofisiologia di vari disordini neuropsichiatrici e sindromi di ritardo mentale come la malattia di Alzheimer, la malattia di Parkinson (Conn et al., 2005), la malattia di Huntington (Marti et al., 2010), schizofrenia (Beveridge et al., 2010); (Santarelli et al., 2011), disturbo bipolare (Moreau et al., 2011), alcolismo (Lewohl et al., 2011) e sindrome di Rett (Urduingio et al., 2010, Wu et al., 2010b). Recenti studi hanno anche dimostrato il coinvolgimento di miRNA nella dipendenza da sostanze d'abuso.

## 1.2. Analisi computazionale e strumenti di predizione

Sono numerosi gli strumenti presenti sul web sviluppati per la predizione dei target dei miRNA, ma la tipologia di metodi applicati, la sequenza di miRNA e mRNA usata nella predizione e la valutazione della performance variano ampiamente tra i vari strumenti. La comparazione tra i risultati ottenuti usando diversi strumenti di predizione non è inequivocabile poiché l'insieme dei geni target predetti dai diversi strumenti non è ben sovrapponibile. La maggior parte dei metodi computazionali applicati nella ricerca dei miRNA, che si basavano sulla predizione della semplice complementarità miRNA-mRNA, erano soggetti ad un grado elevato di falsi positivi, perciò, ad oggi, la maggior parte degli strumenti sono programmati per ridurre il numero di falsi positivi e massimizzare l'accuratezza allo stesso tempo.

Qualche anno fa si iniziarono a determinare le interazioni miRNA-mRNA sperimentalmente attraverso delle tecniche genetiche, questa strada però venne abbandonata per la mancanza di tecniche capaci di processare un grandissimo numero di campioni in un tempo molto ridotto.

Per questo motivo diventò di enorme importanza ideare metodiche basate sull'analisi computazionale per predire le interazioni tra i miRNA e i loro potenziali target.

I criteri di predizione per l'identificazione dei target dei miRNA animali sono i seguenti:

- **Complementarità delle basi.** I programmi di predizione identificano dei siti di legame sulla sequenza 3'UTR degli mRNA su cui i miRNA possono legarsi tramite la loro regione *seed*. In aggiunta alla regione 3'UTR, alcuni algoritmi, come miRWalk (Dweep et al., 2011), identificano altre sotto sequenze di complementarità tra il miRNA e l'intera sequenza del gene, come il promoter, CDS (sequenza codificante) e 5'UTR.
- **Stabilità termodinamica dell'accoppiata miRNA-mRNA.** Basato sull'energia libera dell'interazione termodinamica tra miRNA e mRNA che può essere misurata attraverso specifici programmi (RNA folding programs) (Dweep et al., 2013). Maggiore è la stabilità termodinamica del legame (minima energia libera), migliore sarà l'interazione miRNA-mRNA. Alcuni studi comunque hanno evidenziato come questo parametro possa essere omesso senza che si perda specificità di rilevamento dell'algoritmo attraverso l'integrazione con altre informazioni (Lewis et al., 2005a).
- **Conservazione dei siti target.** Delle analisi comparative tra specie correlate che servono a verificare se le sequenze target sono evolutivamente conservate tra le specie. Alcuni algoritmi tengono conto di questo parametro utilizzando dei filtri che selezionano solo le sequenze conservate. Questo parametro sicuramente riduce i falsi positivi ma allo stesso tempo aumenta la probabilità dei falsi negativi (Dweep et al., 2013).
- **Molteplicità di siti target.** Visto che diversi miRNA possono agire sullo stesso sito target e che un miRNA può a sua volta avere molteplici targets, alcuni algoritmi controllano la presenza di più siti target nella regione di interesse. (Stark et al., 2005, Dweep et al., 2011).



Predire i target per i miRNA animali è compito più arduo a causa dell'appaiamento imperfetto di questi con i rispettivi siti target, rispetto alle piante dove si ha una perfetta complementarità di sequenza. Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi programmi di predizione dei targets per i mRNA animali, i quali basano il loro algoritmo sulle regole di appaiamento delle basi che vengono integrate, per aumentare accuratezza dell'analisi, con altre caratteristiche come discusso precedentemente.

Tra i tantissimi programmi esistenti, alcuni dei più impiegati (e utilizzati anche nel nostro studio) sono ad esempio miRWalk, miRanda e TargetScan.

### **1.2.1. miRWalk**

L'algoritmo miRWalk (Dweep et al., 2011) è basato sull'identificazione di molteplici appaiamenti consecutivi di basi tra miRNA e la sequenze geniche. Esso opera mediante la ricerca, su tutta la sequenza del gene, delle regioni di complementarità con la regione seed del miRNA che viene identificata come un eptamero (7 nucleotidi) che parte dalla posizione 1 o 2 del terminale 5' del miRNA. Nel momento in cui identifica una regione di 7 nt perfettamente complementare, automaticamente estende la lunghezza della regione seed del miRNA sino a che non trova una coppia non appaiata. In questo modo fornisce tutti i possibili appaiamenti costituiti da 7 o più nucleotidi. Questi siti di interazione sono classificati in funzione della loro localizzazione nella sequenza analizzata e il programma fornisce i risultati di predizione suddivisi in 5 parti (promoter, 5'UTR, CDS, 3'UTR e geni mitocondriali).

### **1.2.2. miRanda**

Questo algoritmo è basato sulla comparazione della complementarità esistente tra miRNA e regione 3'UTR del trascritto genico. Sono tre le regole seguite per selezionare i geni target per ogni miRNA:

- 1- complementarità di sequenza basata su un algoritmo di allineamento ponderato sulla posizione;
- 2- Energia libera degli appaiamenti RNA-RNA;
- 3- Conservazione dei siti target in genomi correlati (Betel et al., 2008).

Nella versione più recente (John et al., 2004) l'algoritmo permette un'oscillazione di appaiamento nella regione seed bilanciata da appaiamenti sul terminale 3' del miRNA maturo. Questa strategia viene adottata allo scopo di integrare diverse tipologie di interazioni miRNA-target. Inoltre promuove i miRNA che presentano molteplici siti di legame sulla regione 3'UTR del target, fattore che contribuisce ad aumentarne la specificità, rispetto a quei miRNA con un singolo sito di appaiamento, anche se con perfetta complementarità.

### **1.2.3. TargetScan**

Questo algoritmo (Lewis et al., 2005b) fa affidamento su diversi approcci per identificare le possibili interazioni miRNA-target. Identifica perfetti appaiamenti tra regioni seed dei miRNA di 7 nt (dalla posizione

2 alla 8) sull'estremità 5' del miRNA e le sequenze 3'UTR, oltre a verificare altri possibili appaiamenti. In aggiunta calcola l'energia libera dell'interazione termodinamica miRNA-target avvalendosi dell'uso del pacchetto RNAFold (Hofacker, 2003). Alla fine assegna un punteggio per ogni regione UTR e scansiona anche le regioni UTR di altre specie per un'analisi poligenetica.

### 1.3. Modificazioni epigenetiche

Una recente definizione data dal National Institutes of Drug Addiction (NIDA) descrive l'*addiction* come "una patologia cerebrale di tipo cronico e recidivo, caratterizzata dalla compulsiva ricerca e assunzione della sostanza nonostante le conseguenze nocive. È considerata una patologia cerebrale perché le droghe modificano il cervello, la sua struttura e il suo modo di funzionare. Queste modifiche cerebrali possono essere a lungo termine e possono condurre a vari comportamenti nocivi, spesso autolesionisti." Questa definizione mette in evidenza una questione centrale nello studio dei fenomeni patologici correlati all'*addiction*: le modifiche strutturali a carico del sistema nervoso centrale, ovvero l'alterazione della plasticità sinaptica come risposta alla ripetuta esposizione alle sostanze d'abuso. Il grado di stabilità delle anomalie comportamentali che caratterizzano l'*addiction* suggerisce che l'espressione alterata di determinati geni possa svolgere un ruolo estremamente importante nell'ambito di questo processo. La natura adattativa di queste alterazioni conduce quindi nel campo dell'epigenetica, termine coniato nel 1942 da Conrad Waddington che la definì come "*la branca della biologia che studia le interazioni causali fra i geni e i loro prodotto cellulare e pone in essere il fenotipo*". In tempi più recenti le definizioni si sono moltiplicate, andando a comprendere "tutto l'insieme di processi biochimici tramite cui i cambiamenti nell'espressione genica vengono acquisiti durante il ciclo vitale dell'organismo, senza modificare la sequenza del DNA" (Jaenisch and Bird, 2003). Con una definizione più stringente, possiamo dire che le modificazioni epigenetiche determinano il **fenotipo** cellulare senza alterare il **genotipo**. I meccanismi epigenetici meglio descritti in letteratura possono essere inclusi in tre categorie.

#### 1.3.1. Rimodellamento della cromatina

I processi di rimodellamento della cromatina tramite l'aggiunta di gruppi funzionali (acetilazione, metilazione, fosforilazione etc.) alle code delle proteine istoniche, hanno la funzione di modificare fisicamente l'accessibilità ad un determinato gene da parte dell'apparato trascrizionale. Gli enzimi che mediano le alterazioni covalenti degli istoni vengono distinti in tre classi: *writers*, *erasers* e *readers* (**Fig.5**). I primi due modulano la trascrizione rispettivamente introducendo (per es. *istoneacetiltransferasi*, HAT) o eliminando (*istondeacetilasi*, HDAC) determinati gruppi funzionali. Gli effetti delle modifiche apportate da questi enzimi sono in parte tradotti dai *readers*, proteine che si legano agli istoni e rappresentano gli effettori della modificazione trascrizionale (Jenuwein and Allis, 2001, Jaenisch and Bird, 2003).

Le HAT trasferiscono dal cofattore acetil-CoA un gruppo acetilico sul gruppo amminico ε delle lisine degli istoni; al contrario, la rimozione del gruppo acetilico è catalizzata dalle HDAC. La maggior parte delle HAT fa parte di larghi complessi multiproteici che vengono portati specificatamente sui promotori tramite l'interazione con gli attivatori trascrizionali, producendo come risultato finale un'attivazione della trascrizione, mentre le HDAC, anch'esse parte di complessi multiproteici, sono coinvolti nella repressione

trascrizionale. L'attività delle HAT produce, attraverso l'aggiunta di questo gruppo acetilico, una riduzione della carica netta positiva delle code istoniche rendendo più debole l'interazione con il DNA e quindi inducendo una conformazione della cromatina più accessibile ai fattori di trascrizione (eucromatina). Le HDAC, invece, rimuovendo questi gruppi acetilici dai residui di lisina, garantiscono la reversibilità di questo processo.

Un'altra modificazione che può verificarsi a livello delle proteine istoniche è la metilazione, in questo caso è coinvolto un atomo di azoto presente sulla catena laterale o della lisina o dell'arginina. A differenza dell'acetilazione, la metilazione non altera la carica netta del residuo interessato. Dei quattro istoni del core, sicuramente H3 risulta quello maggiormente metilato, seguito da H4. A differenza dell'acetilazione che determina attivazione genica, la metilazione degli istoni può condurre sia a induzione che a repressione trascrizionale e questo dipende sia dal residuo modificato che da altri cambiamenti contemporaneamente presenti sugli istoni. Fino a poco tempo fa si pensava che la metilazione degli istoni fosse un processo irreversibile mentre, grazie alle nuove tecniche di biologia molecolare, è stato possibile rivelare l'esistenza delle prime istone demetilasi ed è stato dimostrato come la rimozione del gruppo metilico dagli istoni possa avvenire attraverso diversi meccanismi.

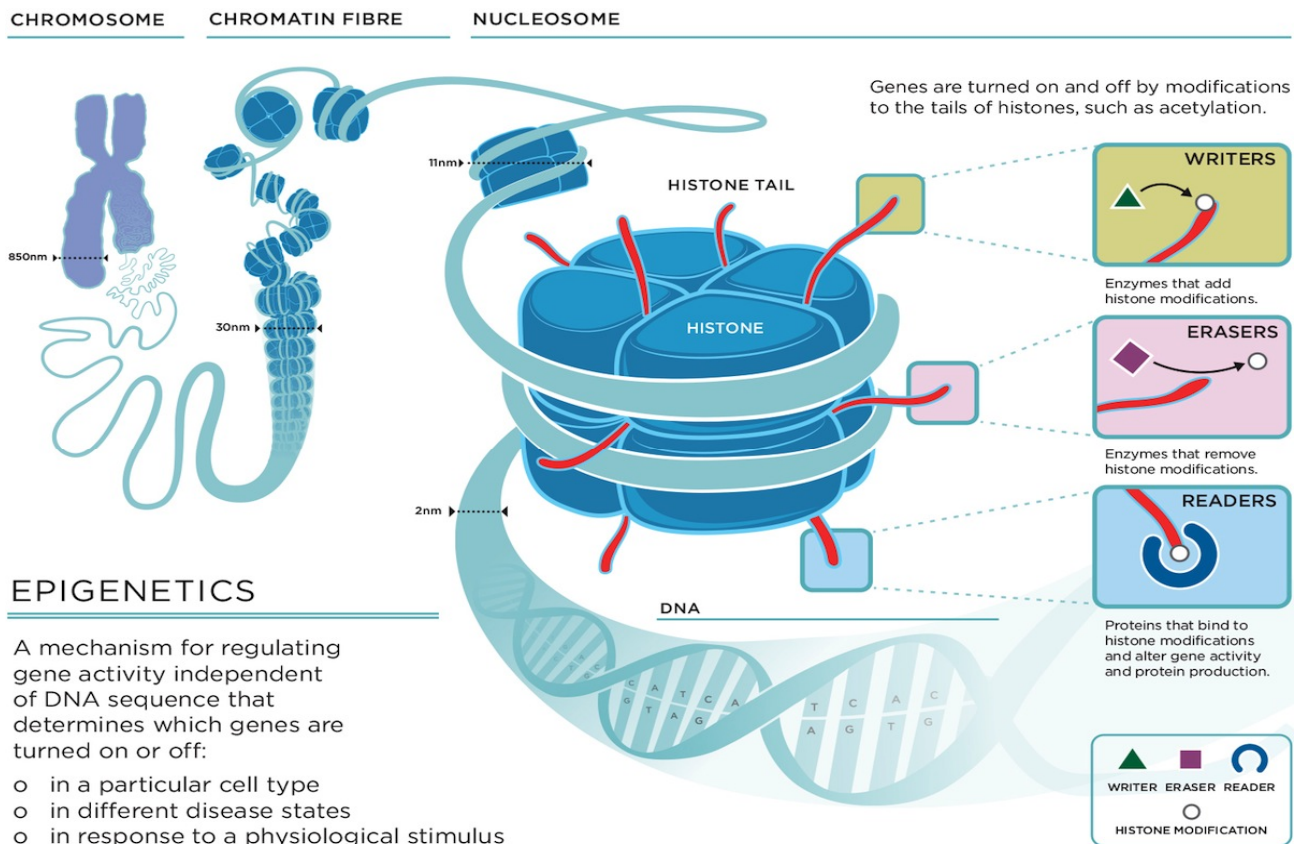
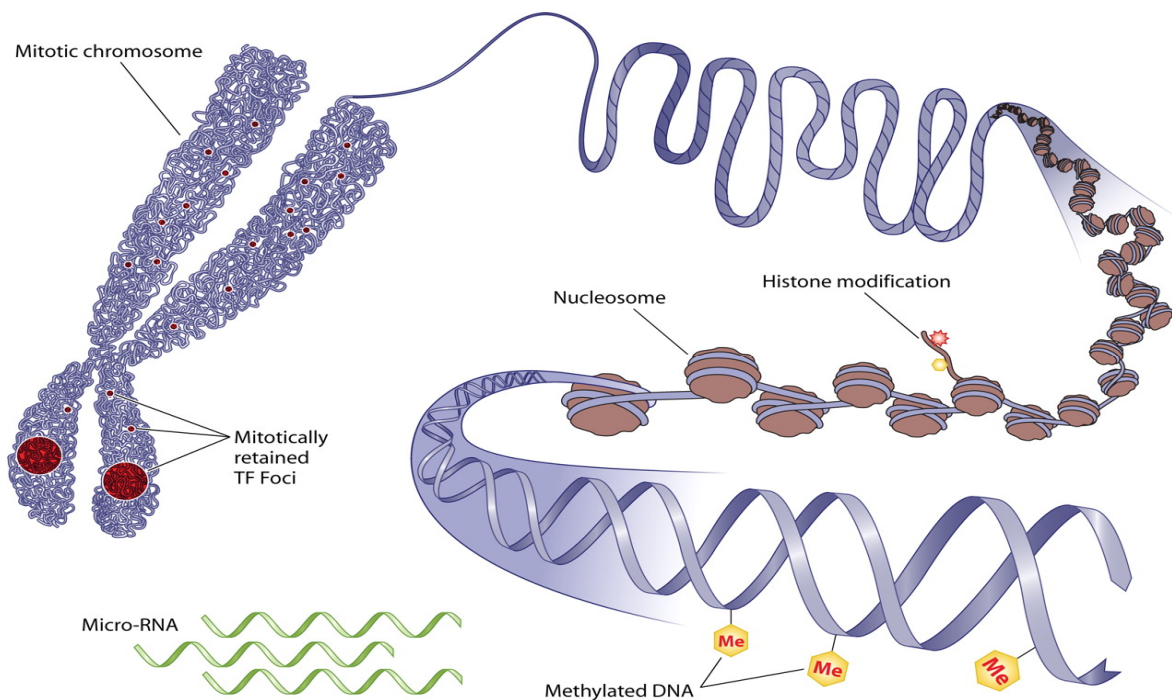


Figura 5: Modifiche a carico degli istoni (Fonte: [www.resverlogix.com](http://www.resverlogix.com)).

### 1.3.2. Metilazione del DNA

La metilazione del DNA consiste nell'aggiunta di gruppi metilici alla sequenza nucleotidica, quasi sempre in corrispondenza dei siti CpG (citosina-fosfato-guanina), determinando l'inibizione della trascrizione. Le DNA-metiltransferasi (DNMT) aggiungono un gruppo metilico in posizione C5 della citosina, che si trova preferenzialmente nei dinucleotidi citosina-guanina (CpG: Cytosine-phosphate-Guanine) nel genoma (Suzuki and Bird, 2008). La metilazione delle isole CpG impedisce ai fattori di trascrizione di legarsi alla sequenza di DNA attraverso il reclutamento di un insieme di co-repressori (Jaenisch and Bird, 2003), come ad esempio MeCP2 (MEthyl CpG binding Protein 2), che riconosce le regioni di DNA metilate e recluta a sua volta altri co-repressori come HDAC e DNMT sulle sequenze promotrici dei geni (**Fig.6**). Il risultato di queste modificazioni è quindi una repressione trascrizionale.



**Figura 6:** Schema generale dei meccanismi epigenetici, (Fonte: [www.episona.com](http://www.episona.com))

### 1.3.3. Regolazione post-trascrizionale

La regolazione post-trascrizionale da parte dei microRNA (*miRNA*) gioca un ruolo di spicco nelle risposte adattative rapide di tipo epigenetico, in virtù delle caratteristiche peculiari di questi piccoli RNA non codificanti. In primo luogo, la ridotta dimensione e la natura non codificante permette loro di essere trascritti più rapidamente dei tradizionali geni regolatori, che sono molto più lunghi e necessitano di una fase aggiuntiva di traduzione. Inoltre si legano direttamente all'mRNA e regolano la sintesi proteica a livello

ribosomiale, permettendo di localizzare con precisione i compartimenti subcellulari dove si verifica l'alterazione, come le sinapsi nervose. La localizzazione dei miRNA nei compartimenti dendritici fornisce un chiarimento per l'alterata regolazione genica in risposta diretta all'attività sinaptica, fornendo una spiegazione dell'adattamento sinapto-specifico indipendentemente dal restante compartimento cellulare, caratteristica unica dei neuroni (Li and van der Vaart, 2011). Alcune delle prime evidenze sulla traduzione locale a livello sinaptico vengono dalle preparazioni di sinaptoneurosomi (SN), che risultano arricchite nei compartimenti pre- e post-sinaptici di neuroni, astrociti, oligodendrociti e microglia (Hollingsworth et al., 1985). Le preparazioni SN e quelle arricchite in compartimenti cellulari post-sinaptici hanno aiutato a definire il meccanismo attraverso cui gli mRNA vengono distribuiti spazialmente nei vari compartimenti sinaptici. Il direzionamento degli mRNA avviene tramite sequenze *cis-acting*, note anche col termine *zip codes* (Meer et al., 2012), contenute generalmente nella regione 3'-UTR, ma anche nella regione codificante intermedia e nella 5'-UTR (Jambhekar and DeRisi, 2007, Holt and Bullock, 2009). Queste sequenze determinano la localizzazione dell'mRNA a livello subcellulare e la modalità di traduzione (Kislauskis and Singer, 1992, Mayford et al., 1996, Smith et al., 2001, Martin and Ephrussi, 2009). Gli elementi *cis-acting* vengono riconosciuti da fattori *trans-acting*, consentendo un appropriato direzionamento e regolazione a livello dendritico. La regolazione della traduzione locale avviene tramite estese interazioni tra gli zip-code della 3'-UTR degli mRNA e i miRNA, in concerto con altre proteine che legano l'RNA. L'assunzione di sostanze d'abuso, provocando una modificazione dei livelli di miRNA, può quindi interferire con la traduzione e la distribuzione degli mRNA nella sinapsi attraverso questi meccanismi.

## 1.4. Il fenomeno della dipendenza

Le radici etimologiche del termine inglese *"addiction"*, usato per indicare il fenomeno della dipendenza da sostanze d'abuso, risalgono alla lingua latina, dove *addictus* era colui che diveniva schiavo per aver contratto un debito col padrone. Le radici latine del termine mettono in evidenza l'analogia tra la condizione di schiavitù e quella di dipendenza patologica dalle sostanze d'abuso, dove la libertà dell'individuo è in entrambi i casi sottomessa ad una entità esterna alla propria volontà. La prima definizione in campo neuropsichiatrico compare nel 1951: nel DSM-I (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), l'*addiction* era classificata come un disordine di personalità di tipo sociopatico e l'alcool era la sola sostanza d'abuso presa in considerazione.

La definizione odierna del DSM descrive l'*addiction* come un insieme di disturbi cognitivi, comportamentali e fisiologici che sono sintomatici di un uso continuato di sostanze nonostante i problemi di rilevanza clinica ad esso correlati. Perché si possa parlare di dipendenza l'*American Psychiatric Association* (APA, 1994) ha riportato nel Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-IV) i criteri diagnostici per la definizione di tossicodipendenza identificando sette condizioni caratteristiche di questo disturbo. Per fare diagnosi di dipendenza almeno tre di esse devono essere presenti nel soggetto in modo continuativo in un periodo di 12 mesi. Le condizioni di cui sopra includono:

- il fenomeno della tolleranza, definita come la necessità di assumere dosi più elevate di sostanza per raggiungere l'effetto desiderato,
- il fenomeno dell'astinenza,
- l'uso della sostanza in modo incontrollato da parte del soggetto,
- il desiderio persistente e tentativi infruttuosi di ridurre o controllare l'uso della sostanza,
- le grandi quantità di tempo spese nella ricerca della sostanza, nell'assunzione della stessa e nel riprendersi dai suoi effetti,
- l'interruzione delle attività sociali, lavorative e ricreative,
- l'uso continuativo della sostanza nonostante la consapevolezza di avere un problema di natura fisica o psicologica causato dalla sostanza.

L'impiego di sostanze d'abuso, saltuario o compulsivo, porta l'individuo ad un'assunzione ripetuta delle stesse in quanto agiscono come rinforzi positivi (provocando effetti piacevoli), infatti esse possono essere considerate come dei potenti surrogati degli stimoli gratificanti naturali (cibo, acqua, sesso), in quanto dotate di proprietà rinforzanti e motivazionali che inducono comportamenti compulsivi. Il fatto che le sostanze d'abuso possiedano proprietà di rinforzo positivo suggerisce che esse agiscano su meccanismi comuni a quelli degli stimoli gratificanti naturali, sono infatti in grado di stimolare le stesse aree cerebrali, in particolare la shell del NAc e i sistemi neurotrasmettitoriali, in particolare quello dopaminergico (Di Chiara, 1998, Di Chiara et al., 2004). Ci sono anche degli stimoli condizionati alla droga che si presentano in

modo non contingente (per esempio i luoghi in cui si è soliti consumare la droga) e nonostante non possiedano intrinseche proprietà gratificanti hanno proprietà di rinforzo del comportamento, cioè motivano il comportamento e producono delle risposte volte ad ottenere lo stimolo stesso.

In generale, numerose evidenze sperimentali supportano l'ipotesi che la dipendenza sia una aberrante forma di plasticità neurale indotta da sostanze (Nestler and Aghajanian, 1997, Nestler, 2001, Pulvirenti and Diana, 2001, Robinson and Kolb, 2004, Melis et al., 2005), di cui i neuroni dopaminergici che hanno origine nella VTA rappresentano il substrato cellulare principale a livello molecolare (Nestler, 2001), cellulare (White, 1996, Pulvirenti and Diana, 2001, Diana and Tepper, 2002) e comportamentale (Koob and Le Moal, 1997, Berridge and Robinson, 1998, Di Chiara, 1999, Robinson and Berridge, 2001).

Una caratteristica fondamentale di tutte le sostanze che creano dipendenza è la capacità di aumentare i livelli di un particolare neurotrasmettitore, la dopamina, in una struttura del cervello chiamata nucleo accumbens, ed in particolare nella shell di tale struttura (Pontieri et al., 1995, Di Chiara, 2002). L'intensificata trasmissione di dopamina nel cosiddetto sistema della gratificazione durante l'uso della sostanza è ritenuta la causa dell'effetto piacevole percepito dal soggetto e dell'innesco del meccanismo che motiva il comportamento di ricerca della droga.

#### **1.4.1. Il circuito cerebrale di gratificazione e ricompensa**

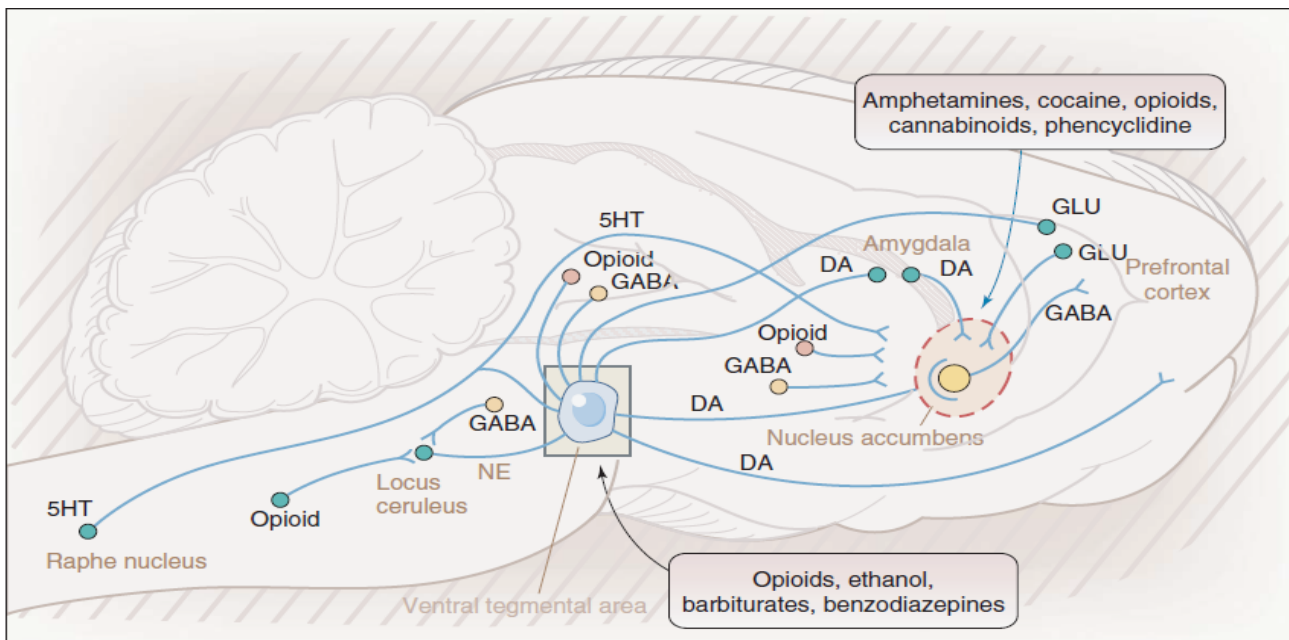
È ormai noto che alla base delle cause della tossicodipendenza vi sia un'alterazione dei meccanismi cerebrali che rientrano nel sistema della ricompensa o gratificazione e degli stati motivazionali, cioè i comportamenti compulsivi associati al consumo delle sostanze, e di numerosi altri sistemi funzionali quali quelli implicati nell'apprendimento e nella memoria. Il sistema della gratificazione ci permette di sperimentare un insieme di sensazioni fisiche ed emotive che a livello della coscienza riconosciamo come piacere. Il cibo e il sesso rappresentano gli stimoli primari o gratificanti, in virtù anche della loro intrinseca proprietà di determinare un *rinforzo positivo* (cioè l'insieme di condizioni sostenute da uno stimolo capaci di determinare una risposta che favorisce o evita la presentazione dello stimolo stesso). Lo *stato motivazionale* viene definito come quel comportamento teso a focalizzare le proprie azioni verso l'ambiente in relazione alle proprie necessità. Le sostanze d'abuso, pur agendo con meccanismi farmacologici diversi, hanno in comune alcune caratteristiche:

- 1) possiedono spiccate proprietà gratificanti, sostituendosi e agendo a livello cerebrale con meccanismi simili agli stimoli primari;
- 2) danno origine a un vero e proprio disturbo della motivazione nel momento stesso in cui determinano la dipendenza;
- 3) sono tutte in grado di agire da rinforzo positivo, soprattutto sul comportamento di procacciamento della sostanza, rinforzandolo, e inducono nell'uomo e nell'animale modalità di auto-somministrazione e di



assunzione simili, facendo supporre che i meccanismi biologici implicati rimangano inalterati nel processo filogenetico evolutivo (Debiec et al., 2002).

Le sostanze d'abuso sono perciò in grado di alterare le più nobili funzioni cerebrali che controllano appunto il desiderio, l'umore, i processi dell'apprendimento e della memoria, le capacità di giudizio e la volontà **(Fig.7)**. I centri cerebrali che controllano i meccanismi della gratificazione furono identificati per la prima volta nel 1954 da James Olds e Peter Milner. Essi osservarono che l'auto-stimolazione elettrica in ratti da esperimento, conseguita tramite comportamento volontario sulle aree cerebrali del sistema limbico, poteva dar luogo a un forte stimolo gratificante che veniva attivamente ricercato dagli animali. Numerose evidenze scientifiche più recenti (Koob and Le Moal, 2001, Nestler, 2001, Di Chiara, 2002, Volkow et al., 2004, Wise, 2004, Nestler, 2005); convergono sul primario coinvolgimento del circuito dopaminergico mesocorticolimbico, che include sia le proiezioni dopaminergiche che dall'area tegmentale ventrale (VTA) irradiano sul Nucleus Accumbens (NAc) e sulla corteccia prefrontale (PFCx), sia le connessioni glutammatergiche che dalla PFCx tornano al NAc (Kauer and Malenka, 2007). Questo sistema sembrerebbe controllare la spinta motivazionale per la ricerca dello stimolo gratificante e alcuni studi negli anni successivi hanno messo in evidenza anche altre componenti che svolgono un ruolo modulatorio sul sistema della gratificazione, tra cui 1) il sistema oppioide, che medierebbe i processi di gratificazione conseguenti al consumo della sostanza; 2) il sistema glutammatergico, che modula il rilascio della dopamina (DA) e 3) il sistema gabaergico, che sembra anch'esso modulare il rilascio di DA nell'area mesolimbica (Xi and Stein, 1998, 1999). Cocaina e amfetamine determinano l'attivazione del sistema direttamente, aumentando il rilascio di DA nel NAc. Gli oppioidi aumentano la frequenza di scarica dei neuroni dopaminergici nell'area tegmentale ventrale (VTA), inibendo i neuroni GABAergici che esercitano a loro volta un tono inibitorio sui neuroni dopaminergici nel NAc, con conseguente aumento del rilascio di DA. La capacità di aumentare i livelli di DA nel NAc è alla base dell'aumento dei comportamenti di *self-administration* (auto-somministrazione), uno dei modelli animali più utilizzati per misurare l'effetto di rinforzo indotto da queste sostanze. Indipendentemente dalla classe farmacologica di appartenenza, tutte le sostanze d'abuso hanno la caratteristica di attivare il sistema dopaminergico attraverso l'azione sui neuroni della VTA **(Fig.7)** o direttamente nel NAc che svolge un ruolo chiave nell'integrare gli effetti gratificanti indotti da queste sostanze (Nestler and Aghajanian, 1997, Berke and Hyman, 2000, Nestler, 2005, Hyman et al., 2006, Peters et al., 2009).



**Figura 7:** I principali circuiti nervosi coinvolti negli effetti di gratificazione causati da sostanze d'abuso.  
 Tratto da: (Camí and Farré, 2003)

La presentazione di una droga associata a stimoli che ne suscitano il desiderio negli individui tossicodipendenti non è solo correlata all'attivazione di reti limbiche cortico-striatali, tra cui l'amigdala e lo striato ventrale, ma anche a regioni cerebrali associate alla "conoscenza dell'azione", suggerendo che gli stimoli associati alla droga attivano direttamente schemi d'azione ben consolidati.

I processi che stanno alla base della ricerca patologica di droghe nella dipendenza, che supportano la transizione dal consumo casuale di droga alla ricerca compulsiva della stessa, sono stati proposti per riflettere l'interazione dei processi che mediano il controllo di azioni goal-directed e azioni abituali per ricompense naturali (Ostlund and Balleine, 2009). Nello sviluppo della dipendenza, la ricerca di droghe d'abuso diventa progressivamente meno goal-directed e più abituale, andando sotto il controllo di stimoli e stati sia interni che esterni. Pertanto gli studi sulla dipendenza hanno cominciato a concentrarsi sui meccanismi di apprendimento abituale e le loro basi neurali e comportamentali. Studi sul condizionamento strumentale (instrumental conditioning) nei ratti hanno riferito che le azioni che sono strumentali per ottenere una ricompensa, come premere una leva per avere il cibo, possono essere controllati da due processi: un sistema goal-directed e un comportamento abituale, supportati rispettivamente dalla Corteccia Orbitofrontale e Striato Dorsomediale (DMS), e dallo Striato Dorsolaterale (DLS), (Yin and Knowlton, 2006, Balleine and O'Doherty, 2010). Le azioni goal-directed rinforzate da ricompense naturali dipendono da reti cortico-striatali che comprendono la corteccia orbitofrontale e lo striato dorsomediale (che riceve proiezioni dai neuroni dopaminergici nella Sostanza Nera pars compacta), nonché l'amigdala basolaterale e il core del Nucleo Accumbens, che possono essere entrambi sotto l'influenza della corteccia prelimbica (Coutureau et al., 2009). La connettività funzionale tra l'amigdala basolaterale e lo striato

dorsomediale può essere un meccanismo che fornisce il legame tra motivazione, stimoli condizionati e azioni goal-directed. Il controllo del comportamento abituale dipende invece dallo striato dorsolaterale (Yin et al., 2005) che riceve proiezioni dalla corteccia motoria primaria, M1) insieme alla sua funzionale connessione con il nucleo centrale dell'amigdala tramite proiezioni dopaminergiche provenienti dalla sostanza nera pars compacta e l'influenza eccitatoria della corteccia infralimbica (Coutureau and Killcross, 2003). In seguito a una prolungata esposizione alle sostanze d'abuso, gli adattamenti che inizialmente sono limitati allo striato ventrale e alla corteccia prefrontale ventromediale, si diffondono alle aree dorsolaterali del circuito cortico-striatale (Porrino et al., 2004).

Il ruolo dello striato dorsolaterale (DLS) nel comportamento abituale (habitization) è stato ben descritto nella review di Gasbarri e coll. (2014). La lesione di una porzione del DLS mantiene il comportamento finalizzato nel ratto anche dopo un allenamento prolungato che al contrario causa habitization nei ratti sham di controllo. Nell'uomo, un ruolo simile è stato attribuito alla regione postero laterale del putamen, area che corrisponde funzionalmente allo striato dei roditori (Tricomi et al., 2009).

Gran parte della ricerca sulla dipendenza è focalizzata sulle aree del sistema limbico del cervello a causa del suo ruolo nella ricompensa dei farmaci (Di Chiara, 1999). Studi clinici e preclinici, hanno rivelato neuroadattamenti nella corteccia prefrontale (PFCX) che sono attivati unicamente dalla droga o dagli stimoli associati alla droga in individui tossicodipendenti ma non in individui sani, suggerendo quindi un ruolo chiave nel fenotipo di dipendenza (Goldstein and Volkow, 2002). Negli individui tossicodipendenti, la riduzione del recettore D2 striatale, che è implicato in alcuni fenotipi comportamentali impulsivi e compulsivi, (Volkow et al., 2013) è associata a una ridotta attività delle regioni della PFC, tra cui la corteccia orbitofrontale (OFC), la corteccia cingolata anteriore (ACC) e la corteccia prefrontale dorsolaterale (DLPFC), (Volkow et al., 1993, Volkow et al., 2001, Volkow et al., 2007). Gli studi hanno anche evidenziato una diminuita attività corticale frontale durante l'intossicazione di molte delle droghe d'abuso che rimane anche in seguito alla sospensione del farmaco in consumatori cronici, (Volkow et al., 1992). Tra le regioni frontali coinvolte nella dipendenza, la OFC, la ACC e la DLPFC si distinguono per la loro partecipazione rispettivamente nel controllo inibitorio e regolazione delle emozioni, processo decisionale e inibizione comportamentale. Poiché menomazioni nella OFC e nella ACC sono associate a comportamenti compulsivi e impulsività, l'alterata modulazione di dopamina in queste regioni probabilmente contribuisce alla ricerca di droga compulsiva vista nella dipendenza.

### 1.4.2. Il sistema oppioide e l'eroina

I composti oppioidi sono tutte quelle sostanze, sia naturali che sintetiche, che vantano proprietà farmacologiche simili all'oppio. Le caratteristiche principali di queste molecole sono la capacità narcotica e analgesica, motivo per cui sono state utilizzate per migliaia di anni e vengono usate tutt'oggi nella terapia del dolore. Gli effetti delle sostanze oppiacee sono mediati dalla stimolazione dei recettori dei peptidi oppioidi endogeni (beta-endorfina, encefaline e dinorfine), espressi a livello del sistema nervoso centrale (SNC) nelle regioni del mesencefalo, telencefalo e diencefalo e nel midollo spinale. Alcuni recettori ( $\mu$  e  $\kappa$ ) sono situati anche nella parete del tratto gastrointestinale, in misura maggiore nello stomaco e nel tratto prossimale del colon. Il recettore delta è localizzato anche nei neuroni e nei gangli mienterici e sottomucosi. I recettori oppioidi umani sono stati clonati agli inizi degli anni novanta ed estensivamente caratterizzati (Eguchi, 2004). Essi sono caratterizzati da 7 domini transmembrana, i cui loops intracellulari sono accoppiati a proteine appartenenti alla famiglia delle proteine G, che agiscono sulla neurotrasmissione GABAergica. Esistono quattro differenti tipologie di recettori oppioidi:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  e ORL-1, recentemente denominati rispettivamente MOP, DOP, KOP e NOP. Esistono tre sottotipi di recettori  $\mu$  ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$  e  $\mu_3$ ), tre sottotipi di recettori  $\kappa$  ( $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$ ) e due tipi di recettori  $\delta$  ( $\delta_1$  e  $\delta_2$ ). Il recettore ORL<sub>1</sub> (Opioid-Like Receptor) è di grande importanza clinica in quanto coinvolto nelle risposte del dolore: viene infatti chiamato anche NOP, ovvero Nociceptin Receptor. La risposta farmacodinamica a un oppioide dipende dal tipo di recettore a cui si lega, dalla sua affinità per tale recettore, e dal fatto che l'oppioide sia un agonista oppure un antagonista recettoriale. Ad esempio, le proprietà analgesiche sopraspinali dell'agonista morfina sono mediate dall'attivazione del recettore  $\mu_1$ , mentre la depressione respiratoria e la dipendenza fisica dai recettori  $\mu_2$ , e la sedazione e l'analgesia spinale dal recettore  $\kappa$ . Ogni gruppo di recettori oppioidi provoca una serie distinta di risposte neurologiche e i sottotipi recettoriali (come  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  e  $\mu_3$ , per esempio) forniscono risposte ancora più specifiche. Ogni sostanza oppioide possiede una distinta affinità di legame per le diverse classi di recettori  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  e questi sono attivati in modo differente a seconda delle specifiche affinità di legame dei vari composti, che siano essi endogeni, naturali o sintetici. Quindi gli oppioidi possono agire come agonisti totali o parziali, oppure come antagonisti. Ad esempio, l'alcaloide oppiaceo morfina presenta un'alta affinità di legame per il recettore  $\mu$ , mentre la ketazocina mostra elevata affinità per i recettori  $\kappa$ . Esistono anche molecole antagoniste-agoniste: la pentazocina agisce come agonista sui recettori  $\kappa$  e antagonista sui recettori  $\mu$ . Naloxone è invece un oppioide con attività antagonista sui recettori  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ . È questo meccanismo combinatorio la causa della vasta gamma di effetti attribuibili all'azione su questi recettori da parte delle varie molecole, ciascuna con il proprio unico profilo di azione. Le sostanze oppioidi quindi, anche se dotate di proprietà farmacodinamiche simili, differiscono notevolmente tra loro per le differenti caratteristiche farmacocinetiche: il tempo di insorgenza, la durata d'azione, il ritardo che intercorre tra le concentrazioni nel sangue e l'insorgenza delle proprietà analgesiche, il tempo necessario perché le concentrazioni tra sangue, cervello e midollo spinale raggiungano un

equilibrio. Oltre a quanto già detto, si deve anche considerare che alcune molecole, con l'aumento del dosaggio, vedono incrementare proporzionalmente i loro effetti (come nel caso della morfina). Altre molecole invece, ed in particolare alcuni composti agonisti parziali oppure agonisti-antagonisti, si caratterizzano per una sorta di *effetto plateau*, tale per cui oltre un certo dosaggio i loro effetti non aumentano proporzionalmente con l'incremento della dose.

L'eroina, risulta in cima al grafico stilato nella rivista medica Lancet (Nutt et al., 2007) che mette in relazione il rischio di dipendenza col danno fisico provocato dalle sostanze più diffuse. L'eroina (diacetilmorfina) è sintetizzata a partire dalla morfina, principale alcaloide dell'oppio (lattice che si ottiene dalle capsule acerbe di *papaver somniferum*) con una semplice reazione di acetilazione. Una volta assunta viene rapidamente metabolizzata a 6-monoacetilmorfina, la quale a sua volta viene idrolizzata a morfina. Sia l'eroina che la monoacetilmorfina sono più liposolubili della morfina, e attraversano più facilmente la barriera emato-encefalica. Ne risulta una maggiore diffusione a livello cerebrale con concentrazioni di morfina superiori a quelle ottenute in seguito all'assunzione della forma non acetilata, col risultato di produrre gli effetti in maniera più immediata e intensa. La morfina è quindi responsabile degli effetti dell'eroina, insieme al suo metabolita monoacetilato. L'iniezione endovenosa produce tutta una serie di sensazioni descritte come calore, gusto, un grande piacere e una sensazione paragonabile all'orgasmo sessuale diffusa in tutto il corpo. Altri effetti noti sono la potente analgesia, sonnolenza, cambi di umore, offuscamento mentale, miosi (pupilla a capocchia di spillo), nausea e vomito, blocco della respirazione (causa di morte da overdose) e del riflesso della tosse, infine riduzione del tono e della peristalsi intestinale (l'oppio veniva usato contro la dissenteria). La somministrazione cronica prolungata di eroina induce una rapida tolleranza, che spinge i consumatori ad incrementare le dosi fino a 100 volte quella iniziale. Induce anche una forte dipendenza fisica, che porta ad una crisi d'astinenza importante che dura da 5 a 7 giorni, con una serie di sintomi opposti agli effetti indotti dal farmaco. Si può infatti osservare midriasi (dilatazione pupillare), sbadigli, sudorazione profusa, irrequietezza, umore instabile, senso di freddo, vomito, crampi addominali, diarrea profusa.

### **1.4.3. Il sistema cannabinoide e WIN55,212-2**

Viene indicato con questo termine l'insieme dei recettori, dei ligandi e dei sistemi di sintesi e di degradazione degli endocannabinoidi, classe di mediatori chimici derivati da acidi grassi polinsaturi, presenti nel SNC e nei tessuti periferici.

In base alla localizzazione dei recettori cannabinoidi nell'organismo, è stato ipotizzato che il sistema endocannabinoide sia coinvolto in un gran numero di processi fisiologici, tra i quali il controllo motorio, la memoria e l'apprendimento, la percezione del dolore, la regolazione dell'equilibrio energetico, e in comportamenti come l'assunzione di cibo (Di Marzo, 1998, Ameri, 1999). Altre funzioni del sistema

endocannabinoide, nella normale fisiologia, potrebbero essere correlate alle funzioni endocrine, alle risposte vascolari, alla modulazione del sistema immunitario, alla neuroprotezione (Correa et al., 2005, Idris et al., 2005, van der Stelt and Di Marzo, 2005, Arenos et al., 2006, de Oliveira Alvares et al., 2006, Guindon et al., 2006, Mikics et al., 2006, Wang et al., 2006).

I recettori per i cannabinoidi sino ad ora isolati sono due: i recettori CB1, distribuiti prevalentemente nel SNC, e i recettori CB2, prettamente periferici. I recettori CB1 possiedono la classica struttura dei recettori accoppiati alle proteine G, con sette domini transmembrana, la porzione N-terminale extracellulare e quella C-terminale intracellulare. Attraverso le proteine Gi/o i recettori CB1 trasducono il segnale su diversi effettori intracellulari. In particolare i cannabinoidi inibiscono l'adenilato ciclasi, i canali del calcio di tipo N e P/Q, mentre attivano i canali per il potassio rettificanti entranti, e stimolano la via delle MAP kinasi.

Nel SNC i recettori CB1 sono prevalentemente presinaptici, suggerendo un loro ruolo generalmente inibitorio nella modulazione della liberazione dei neurotrasmettitori. A livello dell'encefalo, la distribuzione dei CB1 è particolarmente marcata nelle regioni responsabili della coordinazione motoria e del movimento (gangli della base, cervelletto), dell'attenzione e delle funzioni cognitive complesse come il giudizio (corteccia cerebrale), dell'apprendimento, della memoria e delle emozioni (ippocampo), delle sensazioni di piacere e gratificazione (nucleo accumbens), della modulazione del dolore (alcune zone del midollo spinale, sostanza grigia periacqueduttale). L'assenza di recettori CB1 nel tronco encefalico dove sono localizzati i centri regolatori della funzione respiratoria e cardiaca spiega la bassa letalità legata all'overdose da Cannabis. I recettori CB2 sono espressi principalmente a livello periferico. Sono presenti prevalentemente nelle cellule immunocompetenti, tra cui i leucociti, la milza e le tonsille, il midollo osseo ematopoietico ma anche nel pancreas. Recentemente sono stati identificati anche nel SNC, pur se a basse concentrazioni (Van Sickle et al., 2005), in particolare sulle cellule gliali e microgliali. Una delle loro funzioni nel sistema immunitario è la modulazione del rilascio di citochine, che sono responsabili delle risposte infiammatorie e della regolazione del sistema immunitario. Dal momento che i composti che attivano selettivamente i recettori CB2 (agonisti selettivi dei recettori CB2) non esplicano effetti psicologici, essi sono diventati oggetto di studi sempre più numerosi per l'uso terapeutico dei cannabinoidi, in particolare per quanto riguarda gli effetti analgesici, antinfiammatori e antitumorali.

Anche i recettori CB2 trasducono il segnale mediante proteine G, ma gli effettori sono solo parzialmente sovrapponibili a quelli del CB1. In particolare il recettore CB2 non è in grado di modulare i canali ionici, mentre è in grado di inibire l'adenilato ciclasi e di attivare le MAP Kinasi.

I ligandi endogeni naturali di questi recettori sono gli endocannabinoidi, derivati dall'acido arachidonico, capaci di legare gli stessi recettori cannabinoidi a cui si legano anche i Fitocannabinoidi (cannabinoidi naturali) e i Cannabinoidi sintetici. Gli endocannabinoidi non vengono immagazzinati in vescicole, ma vengono sintetizzati "su richiesta" a partire da precursori fosfolipidici di membrana in seguito ad uno stimolo che provoca la depolarizzazione della membrana stessa, agendo con azione autocrina o paracrina.

I fitocannabinoidi sono cannabinoidi di origine naturale vegetale, idrocarburi aromatici contenenti ossigeno. Sono stati identificati più di 60 cannabinoidi, ma la maggior parte delle ricerche farmacologiche si sono focalizzate sul  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC) che è il cannabinoide principale, responsabile degli effetti psicoattivi della cannabis.

Un altro importante principio attivo è rappresentato dal cannabidiolo (CBD), un composto con un effetto antagonista rispetto al THC (antagonista non specifico dei recettori CB1 e CB2 mentre agisce come agonista nei confronti dei recettori dei vanilloidi TRPV1 e TRPV2).

Questo cannabinoide non è psicotropo ma contribuisce a migliorare l'azione del THC perché ne influenza positivamente la farmacocinetica e riduce gli effetti collaterali sul respiro, frequenza cardiaca e temperatura. Inoltre esso ha effetti analgesici, antinfiammatori, ansiolitici e antipsicotici.

I cannabinoidi sintetici appartengono ad una grande famiglia di composti con struttura chimica differente ma che agisce, direttamente o indirettamente, sui medesimi recettori cannabinoidi su cui agisce anche il THC. Sono composti con attività di agonisti e antagonisti dei recettori CB1 e CB2, dotati di maggiore o minore selettività recettoriale. Tra gli agonisti dei recettori cannabinoidi, i più importanti sono l'HU-210, il CP-55940 e il WIN-55,212-2.

Il WIN-55,212-2 è un potente agonista dei recettori CB1, utilizzato in vari modelli animali nell'ambito di specifici protocolli sperimentali. Studi di drug discrimination hanno evidenziato che come i ratti imparano a discriminare il WIN-55,212-2 rispetto al veicolo (Perio et al., 1996), fornendo un modello predittivo di quelle che sono le sensazioni percepite dall'uomo in seguito all'assunzione di Cannabis. Studi di auto-somministrazione hanno dimostrato come questo potente agonista dei recettori CB1 abbia proprietà di rinforzo (Martellotta et al., 1998, Lecca et al., 2006).

Il WIN-55,212-2, così come le sostanze d'abuso, è capace di aumentare il burst firing ed il firing rate dei neuroni DAergici del VTA che proiettano al NAc e dei neuroni DAergici della Sostanza Nera pars compacta (French et al., 1997, Gifford et al., 1997), responsabili dell'aumento delle concentrazioni extracellulari di DA nello striato, nella corteccia prefrontale e nel NAc (Ton et al., 1988, Chen et al., 1990, Chen et al., 1991, Pontieri et al., 1995, Pontieri et al., 1996, Tanda et al., 1997). Studi recenti hanno evidenziato che la somministrazione risposta-contingente (somministrazione attiva e volontaria) di WIN-55,212-2 determina un aumento preferenziale del rilascio di DA nella shell del NAc rispetto al core, analogamente a quanto si osserva con altri farmaci d'abuso (Lecca et al., 2006). Da questi studi emerge che i cannabinoidi hanno la capacità di influenzare i meccanismi di regolazione dei processi di gratificazione.

## 1.5. Micro RNA e dipendenza

Uno degli obiettivi fondamentali della ricerca nell'ambito della dipendenza è quello di definire i meccanismi molecolari indotti dalle sostanze d'abuso che dal breve termine (alterazione dei segnali sinaptici) portano ad adattamenti a lungo termine (alterazione stabile dei profili di espressione genica). Numerosi studi hanno evidenziato un importante ruolo dei miRNA in questi processi, data la loro rapidità di risposta ai segnali cellulari e al controllo dinamico che esercitano sulla regolazione locale degli mRNA nel tessuto cerebrale. Dato che ciascun miRNA può regolare fino ad un centinaio di geni, i cambiamenti nel profilo di espressione di ognuno di essi può risultare in significative alterazioni della risposta cellulare agli stimoli indotti dalle sostanze d'abuso. La loro azione partecipa ai cambiamenti neuroadattativi che hanno luogo dopo esposizione ripetuta a varie sostanze d'abuso (alcol, nicotina, cocaina, amfetamine, oppioidi etc.), ai cambiamenti di espressione genica e proteica ed anche alle alterazioni comportamentali che si osservano dopo l'esposizione. Alterazioni dell'espressione dei miRNA è stata osservata in associazione alla somministrazione di sostanze d'abuso come cocaina, nicotina, oppiacei, antidepressivi e alcol (Dreyer, 2010).

### 1.5.1. Cocaina

La cocaina può indurre consistenti alterazioni nell'espressione di numerosi miRNA nello striato, un'importante area cerebrale nota per il suo coinvolgimento nell'addiction (Schaefer et al., 2010).

Tali miRNA possono controllare i livelli di espressione di numerosi geni noti per la capacità di influenzare le proprietà motivazionali della cocaina, come per esempio il BDNF (Brain derived neurotrophic factor), il CREB (cAMP response element binding protein), il FosB (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B), il CDK5R1 (cyclin dependent kinase 5 activator 1) e il MecP2 (Methyl CpG binding protein).

Un ruolo chiave è stato attribuito ad Ago 2. Infatti, l'ablazione selettiva di Ago 2 nei neuroni MSNs (medium spiny neurons) dello striato che esprimono recettori D2 per la dopamina (RD2) e la conseguente riduzione dell'espressione e dell'attività dei miRNA riduce gli effetti gratificanti della cocaina nei topi (Schaefer et al., 2010). Viceversa, la somministrazione cronica di cocaina porta ad un aumento del livello sia dell'mRNA che delle proteine di Ago 2 nello striato ed una concomitante alterazione del livello di espressione dei miRNA quali miR-8, miR-145 e miR-451 che hanno presumibilmente come target alcuni geni implicati nell'addiction, come il recettore TrkB, che trasduce l'azione del BDNF nel cervello e gioca un ruolo cruciale nei processi di plasticità sinaptica (Eipper-Mains et al., 2011).

Nel 2009 Chandrasekar e Dreyer hanno identificato un altro set di miRNA (miR-124, miR-181a e let-7d) la cui espressione è regolata dalla cocaina (Chandrasekar and Dreyer, 2009). L'esposizione cronica allo psicostimolante sopprime l'espressione di miR-124 e let-7d e induce miR-181a a livello del sistema dopaminergico mesolimbico. La sovra espressione in vitro di questi miRNA ha mostrato una modulazione dei livelli di espressione di proteine



come BDNF e DRD3 (dopamine D3 receptor), note per avere una forte implicazione nella dipendenza da sostanze d'abuso (Heidbreder et al., 2005, Ghitza et al., 2010). La modulazione in vivo di questi miRNA nello striato ventrale (Nucleus Accumbens, NAc) influenza il condizionamento spaziale indotto da cocaina (CPP) (Chandrasekar and Dreyer, 2011).

Questi dati supportano l'idea che diversi miRNA, nonché i loro targets giochino un ruolo importante nello sviluppo della dipendenza.

La sovra espressione di miR-124 e let-7d produce una sovra regolazione del trasportatore della dopamina (DAT) mentre la sovra espressione di miR-181a ne provoca la sotto regolazione. Essendo il DAT il target diretto della cocaina e dei suoi effetti sul sistema dopaminergico, questi risultati potrebbero spiegare l'azione di tali miRNA osservata sulla CPP e indirettamente sulla gratificazione indotta dalla cocaina, riflettendo dei cambiamenti compensatori nel caso di miR-124 e let-7d e di sensitizzazione nel caso di miR-181a.

L'alterazione del segnale dopaminergico può portare a modificazioni neuroadattative a lungo termine che possono risultare in un aumento o una diminuzione della propensione ad assumere la droga. L'espressione di miR-181a nel NAc viene aumentata dalla trasmissione dopaminergica e da sostanze psicostimolanti come cocaina e amfetamina (Saba et al., 2012).

È stata osservata una riduzione dell'espressione di BDNF con il silenziamento di miR-124 e con il silenziamento o la sovra espressione di let-7d.

Il MeCP2 risulta significativamente sotto regolato nel caso venga silenziato uno qualsiasi dei tre suddetti miRNA (Lüscher and Malenka, 2011).

D'altra parte, la concentrazione della proteina CREB risulta notevolmente aumentata dal silenziamento di miR-124. Infatti miR-124 svolge un ruolo importante nei processi di apprendimento e della memoria attraverso l'inibizione del CREB (Rajasehupathy et al., 2009). L'esposizione cronica alla cocaina determina una sottoregolazione di questo miRNA con conseguente sovra regolazione di due dei suoi targets, il CREB e il REST (RE1 silencing transcription factor). Inoltre si ha una reciproca inibizione tra miR-124 e REST. Quest'ultimo funge da repressore comune dei miRNA.

Sia il miR-124 che il REST inibiscono l'espressione del BDNF, e sembra che quando il miR-124 è sottoespresso, per esposizione cronica alla cocaina, il controllo inibitorio del BDNF passi dal miR-124 al REST, che invece viene sovraespresso. Questo passaggio permette di comprendere l'aumento del CREB osservato in seguito al silenziamento di miR-124, poiché il CREB viene regolato negativamente dal miR-124 ma non dal REST.

Elevate concentrazioni della proteina CREB o del BDNF nel NAc provocano rispettivamente una riduzione o un aumento del comportamento di auto-somministrazione di cocaina (Graham et al., 2007). Questo è piuttosto sorprendente dato che il CREB induce la trascrizione del BDNF, ma sembra essere indicativo di un generale controbilanciamento tra gli adattamenti che aumentano e quelli che compensano gli effetti indotti dalla cocaina. miR-124 e miR-212 sembrano mediare questo bilanciamento attraverso un targeting selettivo e un'espressione attività-dipendente.

Hollander e colleghi (2010), hanno esaminato il ruolo dei miRNA nella regolazione dell'assunzione compulsiva di cocaina. I livelli di miR-212 risultano significativamente elevati in ratti che hanno avuto una elevata esposizione alla droga (6h al giorno) ma non in quelli che hanno avuto una breve esposizione o che hanno ricevuto la sostanza in maniera non contingente (yoked control). La sovra espressione o la sotto regolazione di miR-212 nello striato dorsale rispettivamente riduce o aumenta l'auto-somministrazione di cocaina in condizioni di prolungata esposizione alla sostanza, suggerendo che in quest'area cerebrale il miR-212 sia coinvolto in una risposta adattativa che inibisce l'aumento nel consumo di cocaina. Tale effetto può essere dovuto almeno in parte alla sovra regolazione di CREB (noto antagonista nella regolazione della ricompensa da cocaina) (Carlezon et al., 1998) mediata da miR-212. Una regolazione positiva della pathway del cAMP è un meccanismo compensatorio che si instaura in seguito all'esposizione cronica alla droga, e l'aumento di CREB nel NAc riduce gli effetti gratificanti indotti dalla cocaina.

Studi successivi hanno messo in evidenza che MeCP2 regola l'assunzione di cocaina e l'espressione di BDNF attraverso un'interazione omeostatica con miR-212 (Im et al., 2010). L'espressione di BDNF nel NAc provoca forti conseguenze a livello comportamentale, facilitando il comportamento di assunzione compulsiva della sostanza ed aumentando la gratificazione indotta dalla cocaina (Schoenbaum et al., 2007). Poichè il CREB induce sia il BDNF che il MeCP2, sembrerebbe che il miR-212 attraverso la soppressione di MeCP2 (e conseguentemente di BDNF) funga da filtro per i geni che rispondono al CREB (Im et al., 2010). La sovra regolazione di miR-212 nello striato può riflettere un meccanismo di tolleranza nel neurone. L'uso di cocaina produce una sovra regolazione di BDNF e l'azione del BDNF sui suoi recettori TrkB è uno dei numerosi meccanismi che inducono la trascrizione di miR-212 e miR-132. Ciò spiegherebbe l'aumento di miR-212 osservato nei ratti che hanno avuto una lunga esposizione alla cocaina. Un aumento sostenuto dell'espressione del miR-212 potrebbe ridurre l'attività dipendente dalla trascrizione di BDNF, con una riduzione degli effetti gratificanti ad ogni successiva esposizione alla cocaina e quindi la necessità di assumere dosi maggiori per ottenere lo stesso effetto. Recentemente miR-142-3p e miR-382 sono stati identificati come potenziali regolatori dell'espressione del recettore D1 (Tobón et al., 2012, Li et al., 2013a) e successivamente è stato osservato che la somministrazione di cocaina in topi pre-sensibilizzati risulta in una significativa riduzione di questi due miRNA dopo soli 5 minuti dal trattamento. Questo suggerisce per la prima volta che i livelli dei miRNA possono essere regolati nel breve periodo dalla cocaina (Tobon et al., 2015).

### **1.5.2. Alcol**

L'esposizione all'alcol induce una differente espressione di circa il 2% dei miRNA nel fegato di topo (Dolganic et al., 2009). Nei neuroni dello striato del topo ed in neuroni di ratto adulto il mir-9 subisce un'importante sovra regolazione in risposta alla somministrazione di alcol e pare contribuisca alla tolleranza all'alcol attraverso la regolazione del canale BK (Pietrzykowski et al., 2008). Questo canale è

molto importante per la funzione neuronale in quanto regola l'eccitabilità, la formazione del potenziale d'azione ed il rilascio del neurotrasmettitore (Shipston, 2001, Pietrzykowski, 2010).

Nei mammiferi l'alcol induce tolleranza del canale BK (Martin et al., 2004). Il miR-9 ha come target preferenzialmente le isoforme del canale BK sensibili al potenziamento dell'alcol provocandone la degradazione dei trascritti. Invece nei trascritti che codificano per i canali tolleranti all'alcol tendono a mancare i siti di legame per miR-9 nei loro terminali 3'UTR (Pietrzykowski, 2010). Quindi, la sovra espressione del miR-9 indotta dall'alcol sposta l'espressione del canale BK verso isoforme più tolleranti.

Il miR-9 ha come target anche il recettore DRD2 (Pietrzykowski et al., 2010) ed una diminuita espressione di questo recettore è stato associato all'abuso di alcol (Volkow et al., 2006), indicando che miR-9 potrebbe influenzare l'effetto gratificante dell'alcol oltre ad un suo coinvolgimento nella tolleranza.

L'assunzione volontaria di alcool diminuisce l'espressione di miR-124a nello striato dorsolaterale dei ratti, e la sovra espressione mediata da vettori lentivirali di tale miRNA riduce il condizionamento spaziale e l'assunzione di alcool (Bahi and Dreyer, 2013). In un altro studio, Li e collaboratori hanno mostrato che il consumo di alcool nei ratti ha ridotto l'espressione di miR-382 nel NAc (Li et al., 2013b). È stato inoltre mostrato come lo stesso miRNA regoli negativamente l'espressione del recettore dopaminergico D1, processo che attenua l'aumento alcool-indotto del fattore di trascrizione  $\Delta$ FosB, noto per avere un importante ruolo negli effetti gratificanti dell'alcool e di altre sostanze d'abuso. La sovra espressione virus-mediata di miR-382 nel NAc dei ratti ha ridotto in modo notevole l'espressione di  $\Delta$ FosB e l'assunzione di alcool.

Tapocik e colleghi(2014) hanno dimostrato che dosi crescenti di alcool causano un aumento dei livelli del miR-206 nella corteccia prefrontale (PFC) dei ratti (Tapocik et al., 2013). Si ipotizza che tale miRNA giochi un ruolo importante nella risposta cellulare allo stress, ma anche a livello dello sviluppo muscolare e nel cancro. L'espressione del miR-206 non viene alterata dall'alcool nel NAc e nell'amigdala, ma solo nella PFC. Il miR-206 regola negativamente l'espressione del BDNF, di cui è noto il ruolo chiave nel modulare gli effetti motivazionali dell'alcool e di altre sostanze d'abuso. In accordo a queste osservazioni, la sovra regolazione del miR-206 indotta dall'alcool è associata alla diminuita espressione del BDNF. Inoltre, l'aumento dell'espressione del miRNA indotto tramite vettori virali diminuisce i livelli di BDNF e accelera l'assunzione di alcool nei ratti.

### **1.5.3. Nicotina**

Huang et al. hanno studiato le differenze di espressione del recettore dopaminergico D1 (DRD1) in risposta alla nicotina (Huang et al., 2008). Precedentemente è stato osservato che questo gene possiede un polimorfismo a singolo nucleotide (rs686) significativamente associato alla dipendenza da nicotina (Huang and Li, 2009). Poiché il polimorfismo rs686 si trova sulla 3'UTR, è stato ipotizzato che l'associazione genetica del polimorfismo con la dipendenza da nicotina possa essere mediata dai miRNA. L'indagine sui possibili miRNA coinvolti ha rivelato che

il miR-504 ha come bersaglio diretto il DRD1 con un inaspettato effetto di sovra regolazione dell'espressione. Il ruolo della dopamina nella gratificazione e motivazione suggerisce che questa via mediata dai miRNA sarebbe alla base dell'assunzione cronica di nicotina attraverso un'aumentata sintesi del recettore D1 nella sinapsi modificata dalla nicotina. Potrebbe anche esserci una modificazione della plasticità a valle poiché l'attivazione dei recettori D1 produce fosforilazione del CREB (Xing et al., 2010), ed il CREB fosforilato, nel NAc, svolge un ruolo nella CPP indotta da nicotina (Brunzell et al., 2009).

Da uno studio effettuato con microarray, 25 miRNA hanno mostrato modificazioni significative a dimostrazione del fatto che la nicotina esercita effetti specifici ma molto diffusi nella regolazione dei miRNA (Huang and Li, 2009).

Uno di questi, il miR-140\*, possiede un sito di legame fortemente predetto sulla dinamina 1 (Dnm1), una GTPasi importante per l'endocitosi sinaptica e significativamente associata alla dipendenza da nicotina (Xu et al., 2009). Successivamente è stato dimostrato che questo miRNA è sovra regolato in larga misura in risposta al trattamento con nicotina e si lega direttamente al Dnm1 per inibire la sua espressione (Huang and Li, 2009). La dinamina 1 potrebbe avere un ruolo chiave nella dipendenza chimica attraverso la sua azione di terminazione del segnale dei recettori associati alla proteina G, tra cui i recettori per la dopamina e i recettori oppioidi, la cui alterata sensibilità è alla base degli effetti acuti della droga (Koob and Le Moal, 1997). Poiché la dinamina è fondamentale per l'endocitosi dei recettori associati alle proteine G (Artalejo et al., 2002) la sotto regolazione indotta dal miR-140\* potrebbe contribuire alle caratteristiche della dipendenza della nicotina, come tolleranza e craving. È interessante notare come molti miRNA, la cui espressione viene modificata dalla nicotina, sono anche implicati nella schizofrenia ed in altre patologie neurodegenerative. Per esempio, il miR-181b, che viene sovra espresso dalla nicotina, è sovra espresso nella corteccia temporale dei pazienti schizofrenici (Beveridge et al., 2008), mentre il miR-30a-5p, uno dei miRNA che regola il BDNF nella corteccia prefrontale (Mellios et al., 2008), ed il miR-29c sono entrambi sottoregolati dalla nicotina e nella corteccia prefrontale di pazienti schizofrenici (Perkins et al., 2007). Il miR-125b viene sovraregolato dalla nicotina e nell'ippocampo dei pazienti affetti da Alzheimer (Lukiw, 2007), mentre il miR-93, sovra regolato dalla nicotina, risulta sotto regolato nella corteccia dei malati di Alzheimer (Hébert et al., 2008). Probabilmente il correlato più importante è il miR-328 che risulta essere sovra regolato dalla nicotina e sembra avere un ruolo significativo nell'etiologia dell'Alzheimer (Fukumoto et al., 2002, Holsinger et al., 2002).

#### **1.5.4. Oppioidi**

Il recettore oppioide  $\mu$  (MOR) media la maggior parte degli effetti farmacologici degli oppioidi. La sotto regolazione dei recettori MOR, un meccanismo di tolleranza che si instaura in seguito al trattamento cronico con gli agonisti, è il risultato di una aumentata degradazione dei recettori o di una diminuzione nella sintesi. Uno studio del 1995 esclude una relazione diretta tra l'uso cronico di morfina e i livelli di mRNA del MOR (Chan et al., 1995). Dato che i livelli del trascritto non diminuiscono in seguito al trattamento

prolungato, lo studio dimostra che di per sé la morfina non svolge un ruolo importante nel regolare la trascrizione del gene MOR.

Recenti studi hanno evidenziato un meccanismo regolatore per il recettore a valle del processo trascrizionale, avanzando l'ipotesi di una via intracellulare che trasduce il segnale prodotto dal recettore attivato, regolandone la sintesi tramite i miRNA a livello post-trascrizionale. Nel 2009, Wu et al. hanno identificato nella regione 3'-UTR del trascritto principale del gene del recettore  $\mu$  (MOR1) un sito complementare al miR-23b (Wu et al., 2009). Dato che il trattamento cronico con morfina incrementa l'espressione del miR-23b in modo proporzionale alla dose e alla durata del trattamento, questo, interagendo col trascritto MOR1, ne ostacola l'associazione con il polisoma inibendone la traduzione. Questo passaggio inibitorio suggerisce l'ipotesi di una via intracellulare che trasduce il segnale prodotto dal recettore attivato, definendo una potenziale relazione tra il trattamento con l'agonista morfina e l'espressione del MOR, regolata dall'azione post-trascrizionale del miR-23b (Wu et al., 2009).

Il miR-133b è coinvolto nella regolazione della differenziazione, maturazione e della funzionalità dei neuroni dopaminergici mediante l'inibizione trascrizionale del gene PITX3 (Hébert and De Strooper, 2009). Il gene PITX3 è un gene regolatore che induce la trascrizione di geni specifici per la differenziazione dei neuroni dopaminergici, come la tirosina idrossilasi (TH) e il trasportatore della dopamina (DAT) (Kim et al., 2007). In uno studio del 2009, de Velasco e collaboratori hanno esaminato gli effetti della morfina sulla regolazione del miR-133b in embrioni di zebrafish (de Velasco et al., 2009). La morfina induce la sotto regolazione del miR-133b, e poichè quest'ultimo inibisce il gene PITX3 e i suoi prodotti di attivazione trascrizionale TH e DAT, tale sotto regolazione dovrebbe aumentare i livelli di questi trascritti nei neuroni dopaminergici. Gli effetti della morfina sui livelli di miR-133b sembrerebbero mediati dall'attivazione del zfMOR. Tali effetti sono stati analizzati anche in colture di cellule ippocampali, evidenziando che solo i neuroni in via di sviluppo mostrano variazioni nei livelli del miRNA in seguito alla somministrazione dell'agonista oppioide. Infatti, neuroni di 3 settimane non mostravano alterazioni nei livelli di miR-133b, mentre in neuroni di una settimana i livelli del miRNA risultavano diminuiti. L'azione del miR-133b riflette un ruolo diretto del zfMOR nella regolazione della traduzione di geni specifici per la differenziazione dei neuroni dopaminergici. Pertanto, il meccanismo regolatore che modula i livelli di miR-133b tramite l'attivazione del MOR potrebbe contribuire allo sviluppo della dipendenza da morfina e altre sostanze d'abuso (de Velasco et al., 2009)

He et al. (2010) hanno identificato un sito di legame per il miR-let-7 sempre nella regione 3'-UTR dell'mRNA del recettore oppioide MOR, scoprendo che il let-7 ne inibisce l'espressione. Essi hanno inoltre scoperto che la morfina regola positivamente l'espressione di let-7 in colture cellulari SH-SY5Y e in un modello animale di tolleranza oppioide. L'inibizione di let-7 tramite l'iniezione di un oligonucleotide antisenso ha attenuato parzialmente la tolleranza antinocicettiva. Come nel caso del miR-23b, la diminuita sintesi di MOR non risulta da una diminuita trascrizione del relativo mRNA, ma dalla inibizione let-7 dipendente della

formazione del complesso traduzionale col polisoma. Il miR-let-7 funziona quindi come mediatore, traslocando l'mRNA del MOR nei corpi P (*P bodies*) causandone la repressione traduzionale e suggerendone un ruolo integrante nella tolleranza agli oppioidi (He et al., 2010). Il legame di miR-339 sul terminale 3'UTR di MOR1 sopprime l'espressione del recettore, e questa azione viene invertita dall'aggiunta di un inibitore di miR-339 (Hwang et al., 2012, Wu et al., 2013).

Zheng et al. (2010) hanno mostrato come due diversi agonisti oppioidi, morfina e fentanil, modulino in maniera differente i livelli di alcuni miRNA nelle cellule ippocampali del topo. La stimolazione dei recettori MOR modifica l'attività dei geni tramite la via di segnalazione cellulare ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), la quale viene attivata da due diversi meccanismi in base all'agonista che si lega al recettore: la morfina attiva la via PKC (*Protein Kinase C*) mentre il fentanil agisce tramite la  $\beta$ -arrestina 2. Le due vie inducono la fosforilazione delle ERK in compartimenti cellulari diversi, attivando differenti set di fattori trascrizionali. Tra i 7 miRNA modificati dai due agonisti, l'espressione del miR-190 viene inibita in maniera selettiva dal fentanil, ma non dalla morfina. Il miR-190 svolge un ruolo regolatore sul fattore trascrizionale NeuroD, il quale modula la stabilità delle spine dendritiche in risposta alla stimolazione dei recettori MOR. Lo studio ha rilevato come i livelli di NeuroD aumentino in seguito alla diminuzione di miR-190 indotta dal fentanil, evidenziando il coinvolgimento dei miRNA nella morfogenesi e differenziazione dei neuroni del sistema oppioide (Zheng et al., 2010). Un recente studio ha dimostrato che il trattamento cronico con morfina produce una sovra regolazione dose e tempo dipendente dei livelli di miR-103 e miR-107 e innalza i livelli della proteina MOR1A in cellule Be(2)C, che esprimono il recettore umano MOR1A, e nello striato di topi tolleranti alla morfina (Lu et al., 2014).

## 2. Scopo della ricerca

Un problema ricorrente associato alla riabilitazione di soggetti tossicodipendenti è la continua possibilità di ricaduta, che non viene pienamente scongiurata ne da lunghi periodi di astinenza ne da trattamenti psicologici. Questo suggerisce che si siano instaurati dei cambiamenti a livello molecolare conseguenti la lunga esposizione alla sostanza d'abuso, i quali non son reversibili dalla sola astinenza alla droga. Il risultato finale è un complesso cambiamento neuronale per il quale non sono completamente noti i substrati implicati e il ruolo specifico che possono svolgere. La comprensione dei meccanismi attraverso i quali gli stimoli extracellulari inducono variazioni dell'espressione genica è fondamentale per la comprensione di come le cellule si adattano agli stimoli ambientali.

La regolazione dell'espressione genica è considerata un meccanismo di importanza primaria tramite cui l'esposizione cronica ad una droga determina cambiamenti persistenti in alcune aree del cervello, regioni che sono alla base delle anomalie comportamentali che definiscono uno stato di dipendenza.

La tossicodipendenza può essere considerata una alterazione della plasticità neuronale, che si presenta in individui vulnerabili in risposta all'esposizione ripetuta di sostanze d'abuso. Tale vulnerabilità è determinata sia da fattori sia di tipo genetico che di natura ambientale (Nestler, 2014).

L'esposizione ai farmaci e alle sostanze d'abuso attiva quindi la trascrizione e l'espressione di numerosi geni in specifiche regioni cerebrali. Numerosi fattori di trascrizione, che legano la regione regolatoria di specifici geni e ne controllano i livelli di espressione, hanno, negli ultimi 10 anni, assunto un ruolo nei processi di dipendenza.

In seguito a somministrazione acuta e cronica di sostanze d'abuso si attivano una serie di geni che codificano per altrettanti fattori di trascrizione, modificando lo stato trascrizionale della cromatina e la risposta genica ad un successivo trattamento. Le caratteristiche temporali di queste modificazioni neuroadattative e in particolare la loro durata, suggeriscono che alla base di esse vi siano meccanismi di natura epigenetica. È stato precedentemente descritto come i microRNA, piccoli trascritti di RNA non codificante (ncRNA) che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale, siano degli strumenti particolarmente versatili in campo epigenetico. Recenti studi hanno evidenziato un ruolo chiave dei miRNA nelle alterazioni dei sistemi di ricompensa cerebrali indotte dalle sostanze d'abuso. Tali studi sono stati condotti prevalentemente o esclusivamente con l'uso di cocaina, amfetamina, oppioidi come morfina e fentanil, etanolo e nicotina, ma non con l'eroina e cannabinoidi.

Nonostante l'eroina sia considerata la più dannosa tra le sostanze d'abuso più diffuse, in letteratura mancano degli studi che la mettano in relazione con le alterazioni epigenetiche cerebrali a livello dei microRNA. Anche il potenziale d'abuso della Cannabis e dei suoi derivati è ormai noto grazie a numerose evidenze sperimentali, (Chen et al., 1997), con chiare evidenze degli effetti di rinforzo del THC (Tanda et al., 2000, Justinova et al., 2003) .

Date queste premesse, lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare i meccanismi epigenetici implicati negli effetti dell'eroina e del WIN55,212-2, basati sull'attivazione o sulla repressione della sintesi dei microRNA. In particolare è stato valutato l'effetto dell'esposizione cronica volontaria di questi due farmaci sull'espressione di 736 miRNA conosciuti per la specie *rattus norvegicus* (genome-wide analysis al momento dello studio). Inoltre è stata valutata la correlazione delle modificazioni osservate con la variazione nell'espressione degli RNA messaggeri di 11 geni implicati nei processi di dipendenza da sostanze d'abuso e predetti come potenziali targets di alcuni dei miRNA trovati modificati. Le analisi sono state condotte nelle due subregioni del nucleo accumbens, shell (NAc shell) e core (NAc core), nella corteccia prefrontale (PFCX) e nel caudato putamen (CPU), quattro aree notoriamente coinvolte nei processi della gratificazione e dipendenza.

La ricerca è stata articolata in diverse fasi:

- 1) Creazione di due modelli animali di auto somministrazione, uno per l'eroina e uno per WIN55,212-2. Ognuno costituito da due gruppi di animali: il primo ha assunto volontariamente la droga (gruppo dei trattati) mentre il gruppo di controllo ha ricevuto soluzione fisiologica (gruppo dei controlli).
- 2) Valutazione dell'effetto dell'esposizione cronica all'eroina sull'espressione di 736 microRNA (genome-wide analysis) nel nucleo accumbens shell e core a circa 15 giorni di astinenza.
- 3) Valutazione delle modificazioni dei livelli relativi agli RNA messaggeri codificati da geni noti per il loro coinvolgimento nello sviluppo della dipendenza da sostanze d'abuso e determinazione delle differenze tra i gruppi trattati (eroina o WIN55,212.2) e gruppi controllo.
- 4) Analisi computazionale per la predizione delle interazioni miRNA-mRNA target tramite il database miRWalk 2.0, allo scopo di evidenziare quali messaggeri, tra quelli la cui espressione è stata trovata modificata in seguito al trattamento con una delle due sostanze, possano essere il bersaglio dei miRNA la cui espressione è stata modificata dalla somministrazione contingente delle sostanze stesse.
- 5) Analisi dell'espressione delle proteine codificate dai geni precedentemente analizzati attraverso la metodica del western blot e valutazione delle differenze tra gruppo trattato con eroina e gruppo controllo.



### **3. Materiali e metodi**

#### **3.1. Animali**

In questa ricerca sono stati utilizzati ratti maschi "Sprague-Dawley" forniti dalla ditta Harlan Italy (S. Pietro al Natisone Udine, Italia) del peso di 250-300 grammi. I ratti, prima dell'inizio degli esperimenti, sono stati stabulati in gruppi di quattro per gabbia, per un minimo di cinque giorni prima dell'esperimento, in condizioni standard di temperatura (23° C), umidità (60%), sotto un ciclo artificiale luce/buio di 12 ore ciascuno (luce dalle 8 AM alle 8 PM), con acqua e cibo standard ad libitum. Dopo la chirurgia, gli animali sono stati stabulati singolarmente, nelle medesime condizioni sopra riportate e manipolati due volte al giorno per un periodo di 7-10 giorni durante il quale è stata effettuata la terapia antibiotica preventiva con 0,1 ml di Baytril (50mg/ml) per via endovenosa. Tutti gli esperimenti sono stati condotti secondo le direttive italiane per la cura e l'uso degli animali da esperimento (D.L. 116/92 and 152/06) sancite dalla Comunità Economica Europea (609/86 and 63/2010) e dalla Commissione Etica per la cura e l'uso degli animali da laboratorio (CESA) dell'Università di Cagliari.

#### **3.2. Impianto del catetere in vena giugulare**

I ratti, anestetizzati con Equitesin (2.5 mg/kgi.p.), sono stati sottoposti ad impianto del catetere cronico (Medical-Grade Tubing; Silastic, Down Corning MI, USA) nella vena giugulare destra, passato sotto la cute e fissato al centro della regione scapolare grazie all'ausilio di una rete in polipropilene macroporosa (Evolution basic, BULEV, peso 48gr/mq, Dipromed, Italia). Questa rete è utilizzata anche nelle ernioplastiche nell'uomo, in quanto garantisce una rapida incorporazione fibroblastica da parte del tessuto dell'ospite e quindi una rapida fissazione, assoluta assenza di rigetto e d'infezione. Durante il periodo post-operatorio il catetere cronico è stato risciacquato con 0,1 ml di enrofloxacin, soluzione fisiologica sterile ed eparina (250 U/ml in soluzione fisiologica sterile).

#### **3.3. Auto-somministrazione di eroina e WIN55,212-2**

Dopo il periodo post-operatorio, i ratti sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali, il gruppo dei trattati (che ha ricevuto eroina o WIN55,212-2) ed il gruppo controllo (che ha ricevuto soluzione fisiologica). Gli animali del gruppo trattati sono stati allenati ad acquisire il comportamento di auto-somministrazione (AS) di eroina (dose di 0,05 mg/kg, 48 µl/bolo d'infusione) o WIN55,212-2 (dose di 12.5 µg/kg, 48 µl/bolo d'infusione) in sessioni giornaliere della durata di 1-h (5 giorni/settimana), mediante un comportamento di nose-poking (inserimento del muso in un foro). Il gruppo di controllo ha ricevuto soluzione fisiologica nelle medesime condizioni. Gli esperimenti sono stati condotti tra le 9:00 A.M. e le 5:00 P.M. in gabbie

acusticamente isolate munite di due fessure (nose-pokes) provviste di fotocellule, attivabili dall'animale mediante il muso (**Fig.8**). Uno dei due nose-pokes, illuminato tramite luce giallo-verde è stato definito attivo poiché per suo tramite l'animale è stato in grado di attivare la pompa di infusione del farmaco collocata esternamente alla gabbia, mentre la fessura illuminata con luce rossa, tramite la quale il ratto non ha potuto esercitare alcun controllo sulla pompa di infusione, è stata definita nose-poke inattivo. La differente illuminazione dei due nose-pokes ha costituito lo stimolo discriminativo. Prima che la sessione avesse inizio il catetere cronico è stato lavato con 0,1 ml di soluzione fisiologica sterile e quindi gli animali posizionati nel sistema di AS. La sessione di AS è monitorata da un sistema computerizzato (Graphic State 2 software, Colbourn Instrument, PA, USA) che registra le risposte effettuate da ciascun ratto in entrambi i nose-pokes e il numero delle somministrazioni ricevute.

Per l'esperimento con eroina, durante la fase di acquisizione (1°-10° sessione) è stata utilizzata una schedula operativa FR-1, successivamente (11°-23° sessione) incrementata a FR-5 (5:1, 5 nose-pokes: 1 infusione). Allo scopo di studiare il comportamento operante di *nosepoking* in assenza di rinforzo farmacologico, gli animali sono stati sottoposti alla fase di estinzione (24°-35° sessione) durante la quale il farmaco è stato sostituito con soluzione fisiologica.

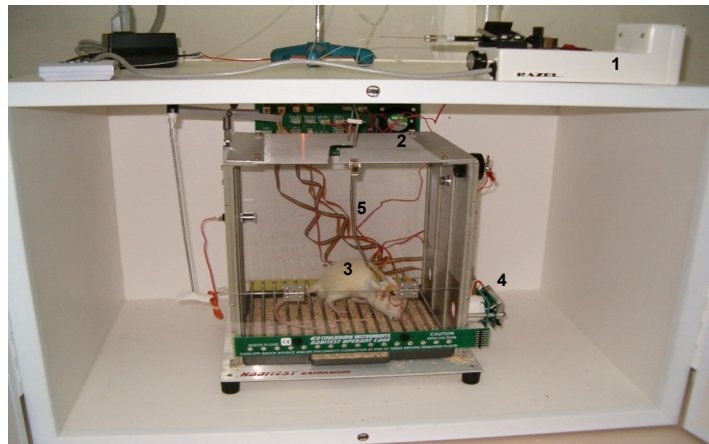
Per l'esperimento con WIN55,212-2, durante la fase di acquisizione (1°-15° sessione) è stata utilizzata una schedula operativa FR-1, successivamente (16°-20° sessione) incrementata a FR-2 (2:1, 2 nose-pokes: 1 infusione) e riportata a FR-1 per le successive 4 sessioni (21°-24°) prima di passare alla fase di estinzione. Gli animali sono stati sottoposti alla fase di estinzione (25°-35° sessione) durante la quale il farmaco è stato sostituito con soluzione fisiologica.

Ciascuna sessione di AS è stata caratterizzata da quattro stati (S) programmati:

- S1-Ready phase (fase preparatoria), della durata di 3-sec, caratterizzata dall'attivazione della pompa di infusione allo scopo di riempire il catetere con la soluzione di droga/salina (volume morto del catetere: 50 µl); S2-Drug availability phase (fase di disponibilità del farmaco), durante la quale il comportamento attivo e volontario di nose-poking da parte di ciascun ratto nel foro attivo, sulla base della schedula operativa utilizzata, determina l'iniezione endovena delle suddette dosi di farmaco o soluzione fisiologica in un volume di 48µl/bolo di infusione, in un tempo di 4-sec (S3-Infusion phase, fase d'infusione); S4-time-out phase (fase di intervallo), della durata di 20-sec, nel corso della quale ogni nose-poke attivo e/o inattivo è stato registrato, ma non ha determinato alcun effetto sul sistema d'infusione del farmaco. Durante la fase di time-out, l'abitacolo è stato illuminato in maniera programmata ed entrambi i nose-pokes sono stati illuminati con luce rossa, allo scopo di indicare all'animale la non disponibilità del farmaco. Al termine del time-out la disponibilità del farmaco è stata segnalata dallo spegnimento della luce dell'abitacolo e dall'illuminazione del nose-poke attivo con luce giallo-verde.

Alla fine di ciascuna sessione, i ratti sono stati riposizionati nelle rispettive gabbie, previo lavaggio del catetere con soluzione fisiologica eparinizzata (250 U.I./ml e hanno ricevuto una razione controllata di cibo (20 g).

In questo progetto è stato utilizzato come criterio di acquisizione l'aumento del comportamento di nose-poking attivo rispetto all'inattivo nel gruppo sperimentale.



*Figura 8:* Ratto all'interno di una box. 1. Pompa di infusione 2. Operant box 3. Ratto 4. Nose-poke 5. Catetere.

### 3.4. Prelievo del tessuto

Al termine del periodo di astinenza (15 giorni), gli animali sono stati sacrificati e il cervello è stato immediatamente rimosso. In questa fase sono state prelevate separatamente le quattro aree cerebrali (NAc shell, NAc core, PFCX e CPu) attraverso l'utilizzo di un "punch". I pool di tessuto di ciascuna area sono stati conservati in 700  $\mu$ l di QIAzol Lysis Reagent per essere omogeneizzate mediante l'omogenizzatore T8 ultra-turrax.

### 3.5. Estrazione RNA totale

#### 3.5.1. Estrazione RNA totale con miRNeasy mini Kit (QIAGEN)

I campioni sono stati addizionati ciascuno con 140  $\mu$ l di cloroformio e agitati vigorosamente per 15", centrifugati a 12000 rpm a 4°C per 15 min, ottenendo così la separazione dei campioni in tre fasi. È stata prelevata la sovrastante fase acquosa (contenente l'RNA) e trasferita in una nuova provetta dove sono stati aggiunti 525  $\mu$ l di etanolo puro. Quindi la miscela è stata trasferita direttamente nelle colonne di

estrazione, centrifugata a 10000 rpm per 15" a temperatura ambiente. Dopo tre passaggi di lavaggio con i buffer RWT e RPE l'RNA è stato eluito in 14 µL d'acqua RNasi free. Gli estratti ottenuti sono stati uniti in un unico pool per ogni area cerebrale per tutti i gruppi sperimentali.

### **3.5.2. Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA estratto**

Dal tessuto cerebrale prelevato è stato estratto l'RNA totale contenente i miRNA e gli mRNA. La quantità e la qualità dell'RNA è stata verificata mediante il nanodrop e il Bioanalyzer 2100 (Agilent). Si sono ottenute concentrazioni comprese tra 1343.65 e 117.82 ng/µl, RIN (relative integration number) compresi tra 8.30 e 7.20, ed è stato possibile rilevare la presenza dei miRNA compresa tra i 25 e i 30 svedberg.

## **3.6. Analisi dell'espressione dei miRNA**

### **3.6.1. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)**

Ad un aliquota di 250 ng di RNA totale estratto, per ogni campione, sono stati aggiunti (miScript II RT QIAGEN) 4 µL 5x miScript HiSpec Buffer, 2 µL 10x miScript Nucleics Mix, 2 µL miScript Reverse Transcriptase Mix e una quantità variabile di acqua Rnasi free sino al raggiungimento di un volume totale di 20 µL. Il tutto è stato incubato a 37 °C per 60' e 95°C per 5' ed infine diluito con 200 µL di acqua RNase free.

### **3.6.2. Real Time PCR per l'espressione dei miRNA (miRNoma)**

Al fine di valutare i livelli di espressione dei microRNA il cDNA, precedentemente ottenuto, è stato sottoposto ad una reazione di amplificazione. Tale reazione è avvenuta in un volume totale di 25 µl così composto: 0.22 µl di cDNA [0.5-1 ng], 12.5 µl di SYBR Green PCR Master Mix 2.5 µl di 10x miScript Universal e 9.77 µl di acqua. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con il macchinario ABI PRISM 7300HT (Applied Biosystems, Life Technologies, Monza). I parametri utilizzati hanno compreso uno step iniziale di attivazione a 95°C per 15 minuti, seguito da 40 cicli di amplificazione condotti a 94°C per 15 secondi, 55°C per 30 secondi e 70°C per 34 secondi. Sono stati analizzati in totale 736 miRNA distribuiti in 8 piastre contenenti ognuna 2 controlli per la retrotrascrizione (PPC), 2 controlli per l'RT-PCR (miRTC) e 6 controlli snoRNA/snRNA per la normalizzazione dei dati. Al fine di valutare i livelli di espressione dei miRNA (Ct, threshold cycle) l'analisi dei risultati è avvenuta utilizzando the web-based software (Sabiosciences) e il miScriptmiRNA PCR Array Data Analysis Excel Template che utilizzano il metodo del  $\Delta\Delta C_t$  per la quantificazione relativa. L'analisi dei 736 miRNA è stata compiuta utilizzando l'RNA degli animali trattati e degli animali di controllo ed è stato calcolato per ogni miRNA il Fold-changes (variazione di espressione) tra il campione trattato e il campione di controllo così da poter evidenziare le modificazioni dei miRNA in seguito al trattamento.

### **3.6.3. Real Time PCR per la convalida dei risultati ottenuti dall'analisi del miRNoma**

Al fine di validare i risultati di espressione dei microRNA, l'RNA è stato retro-trascritto in cDNA mediante l'utilizzo dei Kit miScript II RT (QIAGEN). 1,5 µL di cDNA (2ng/µL) è stato sottoposto ad una reazione di amplificazione (ABI PRISM 7300HT AppliedBiosystems) in seguito all'aggiunta di 12,5 µL di SYBER Green, 2,5 µL di 10x miScript universal primer, 2,5 µL di 10x primer specifico e 6 µL di Rnase free water. Uno step iniziale di attivazione a 95°C per 15 minuti è seguito da 40 cicli di amplificazione (ogni ciclo condotto a 94°C per 15 secondi, 55°C per 30 secondi e 70°C per 34 secondi). I campioni sono stati analizzati in triplicato ed è stato amplificato, oltre al gene target, il gene housekeeping SNORD61 per corteccia e striato per valutare eventuali variazioni nella quantità di cDNA utilizzato. I livelli di espressione genica sono stati valutati con il metodo del  $\Delta\Delta C_t$ .

## **3.7. Analisi di espressione degli RNA messaggeri**

### **3.7.1. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)**

1 µg di RNA per ogni campione, addizionato a 2 µL gDNA Wipeout Buffer 7x ed un volume variabile di acqua RNasi free sino al raggiungimento di un volume finale di 14 µL, è stato incubato per 2 min a 42°C. Successivamente ad ogni campione sono stati addizionati 1 µL di Quantiscript Reverse Transcriptase (QuantiTect Rev. Transcription Kit, QIAGEN), 4 µL di Quantiscript RT Buffer 5x e 1 µL RT Primer Mix per un volume totale di 20 µL. L'incubazione è stata fatta a 42 °C per 15' e 95°C per 3'.

### **3.7.2. Real Time PCR**

Per analizzare i livelli di espressione genica 4 µL di cDNA ottenuti attraverso la retrotrascrizione sono stati amplificati mediante 7,5 µL di master mix QuantiTect SYBR Green PCR, 1,5 µL di specifici QuantiTect primer assay e 2 µL di acqua Rnase free (ABI PRISM 7300HT AppliedBiosystems). È stato condotto uno step iniziale di attivazione a 95°C per 15 minuti, seguito da 40 cicli di amplificazione (ogni ciclo condotto a 94°C per 15 secondi, 55°C per 30 secondi e 72°C per 30 secondi). Per la normalizzazione dei dati son stati scelti il gene housekeeping ACTB per la corteccia e il gene housekeepingPPIAS per lo striato. Tale analisi effettuata in triplicato.

### 3.8. Analisi delle proteine mediante Western Blot

I tessuti sono stati sospesi in 1 ml di TritonLysis Buffer (1% Triton X-100, 50mM HCl pH 7,4; 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT; 1mM PMSF, 5mM acido iodoacetico, 10µg/µl di apoproteina, 10 µg/µl pepstatina, 10 µg/µl leupeptina). Per minimizzare la degradazione proteica durante il protocollo di isolamento delle proteine, sono stati aggiunti al buffer di isolamento diversi inibitori delle proteasi. Dopo omogeneizzazione, gli estratti sono stati incubati per 30 min. in ghiaccio, centrifugati a 12.000 g a 4°C, e successivamente è stato recuperato il surnatante. Le proteine sono state quantizzate secondo il metodo di Bradford usando BSA come standard (Dc protein Assay, BioRad Laboratories, USA). Uguali quantità di proteine sono state sottoposte a separazione elettroforetica su gel di 33 poliacrilammide al 4%. Dopo elettro-trasferimento dei gels su membrane di nitrocellulosa, queste sono state colorate con Ponceau S Redin 1% di acido acetico per alcuni minuti, in modo tale da poter accertare che il caricamento delle proteine e il trasferimento fossero uguali per tutti i pozzetti. Prima della colorazione i gels sono stati fissati in 25% (v/v) isopropanolo e 10% acido acetico. Dopo un passaggio in TBS contenente 0,5% Tween 20 e 5% BSA, per 1 ora a temperatura ambiente, le membrane sono state lavate in TBS-T e poi incubate con l'anticorpo primario appropriato opportunamente diluito. Successivamente, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-coniglio e anti-topo coniugato con perossidasi (Santa Cruz Biotechnology). Le bande immunoreattive sono state identificate mediante chemiluminescenza, tramite il Chemiluminescence Detection System (Supersignaling Substrate, Pierce). Per le analisi di Western blot sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anticorpo monoclonale anti-DRD3, anti-BDNF, anti-SIRT1, anti-SIRT2, anti-CLOCK, anti-CCKBR, anti-MOR-1, anti-NOS1, anti-NOS2, anti-CREB e anti-MECP2.

### 3.9. Analisi computazionale per la predizione miRNA:mRNA

L'analisi è stata effettuata utilizzando il database miRWalk 2.0 accessibile gratuitamente dal sito <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>, che permette di predire grazie ad uno specifico algoritmo i potenziali geni target di determinati miRNA partendo da questi ultimi ma anche di effettuare l'operazione inversa, quindi predire i miRNA partendo dai geni target. È inoltre possibile migliorare l'analisi con l'ausilio altri database (10 in totale basati su differenti algoritmi) e selezionare specifiche impostazioni di ricerca.

Le impostazioni di ricerca utilizzate nella nostra analisi per la predizione dei miRNA partendo dai geni target sono le seguenti:

- Specie: Rattus Norvegicus
- Database per i geni: Gene
- Regioni della sequenza genica analizzate: 3'UTR, 5'UTR e CDS

- Parametri della regione *seed*: A partire dalla posizione 1, lunghezza minima 7 nucleotidi,  $p < 0.05$
- Database selezionati per la predizione dei miRNA: miRWalk, miRanda, TargetScan

Per ogni gene target sono stati predetti i potenziali miRNA per le tre regioni: la regione 3' terminale (3'UTR), la regione 5' terminale (5'UTR) e la regione codificante (CDS) e tra i risultati ottenuti sono stati presi in esame solamente quelli predetti da tutti e tre gli algoritmi utilizzati. Dopo di che si è proceduto alla tabulazione dei risultati con excel mettendoli in relazione con i dati ottenuti dall'analisi del miRNoma in modo da evidenziare le corrispondenze.

### **3.10. Analisi statistica**

L'analisi statistica dei dati di comportamento è stata condotta mediante computer utilizzando il programma "Statistica per Windows". Il numero di nose-pokes effettuati durante ogni fase dell'esperimento è stato analizzato con analisi della varianza (ANOVA) a due o tre vie per misure ripetute. Quando l'ANOVA ha rivelato differenze significative nei fattori principali ( $p < 0.05$ ) sono stati effettuati contrasti multipli mediante il test del post-hoc delle minime differenze significative (LSD test) con un livello di significatività  $p < 0.05$ .

L'analisi statistica per la parte biochimica è stata eseguita tra i due gruppi (eroina vs controlli) attraverso Student's t-test. Le differenze sono state considerate significative quando i p-value risultavano  $p < 0.05$ .

## 4. Risultati (eroina)

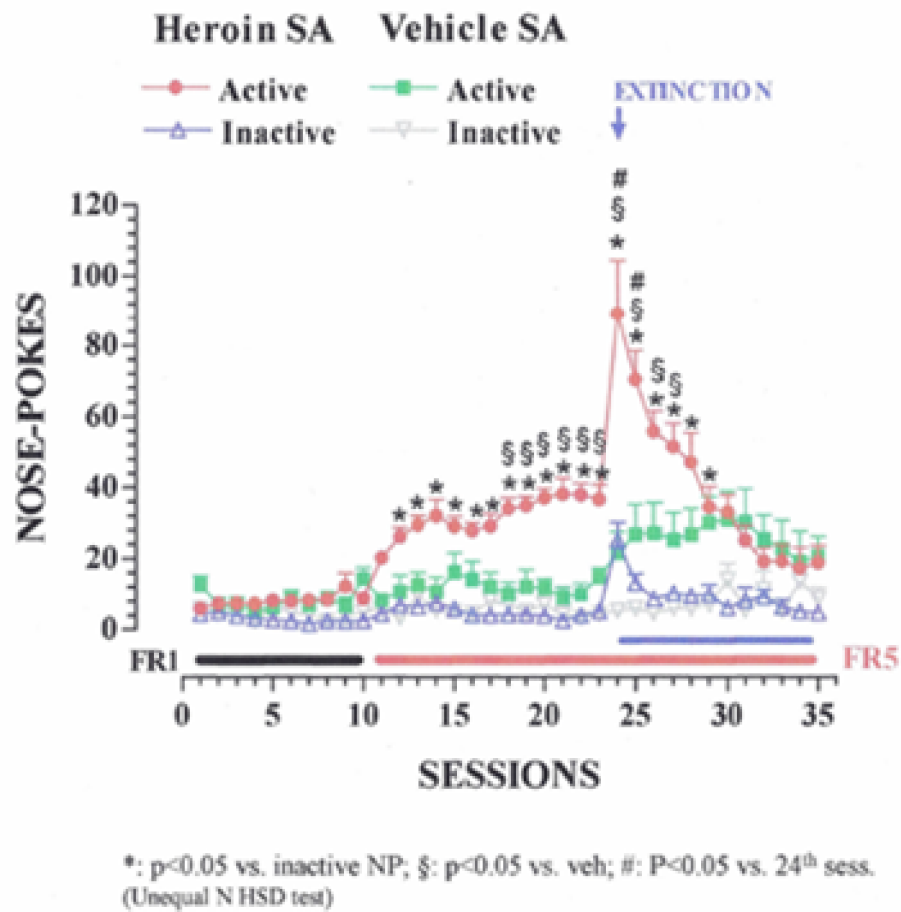
### 4.1. Auto-somministrazione di eroina

La figura 9 mostra la media del numero di nose-poke cumulativi attivi e inattivi dei ratti allenati ad autosomministrarsi *eroina* per sette settimane consecutive. L'analisi statistica ANOVA a tre vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore gruppo ( $F_{1,30}=10.9$ ;  $p<0.01$ ); nose-poke ( $F_{1,30}=78.4$ ;  $p<0.01$ ); sessione ( $F_{34,1020}=17.7$ ;  $p<0.001$ ) e un'interazione significativa gruppo x nose-poke ( $F_{1,30}=11.1$ ;  $p<0.01$ ); gruppo x sessione ( $F_{34,1020}=8.75$ ;  $p<0.001$ ); nose-poke x sessione ( $F_{34,1020}=9.23$ ;  $p<0.001$ ) e gruppo x nose-poke x sessione ( $F_{34,1020}=4.35$ ;  $p<0.001$ ). Il test post hoc di Tukey ha mostrato per il gruppo sperimentale *eroina* un progressivo aumento del numero dei *nose-pokes* attivi rispetto agli inattivi a partire dalla seconda settimana (criterio di discriminazione). L'incremento della schedula operativa (FR-5) ha determinato un adeguamento dell'attività comportamentale dei ratti mostrando un aumento significativo dei *nose-pokes* attivi rispetto agli inattivi dalla 12<sup>a</sup> sessione e una differenza significativa tra i nose-poke attivi del gruppo trattato con eroina rispetto al gruppo trattato con salina a partire dalla 18<sup>a</sup> sessione. Durante la fase di estinzione (sessioni 24-35), che corrisponde al periodo di astinenza, l'eroina è stata sostituita con soluzione fisiologica (salina 0,9%). Durante tale fase, il comportamento di *nosepoking* attivo degli animali (secondo la schedula FR-5) ha determinato l'infusione in vena di soluzione fisiologica. In questa fase il gruppo eroina ha mostrato un ripido e duraturo aumento del numero di nose-poke attivi ad indicare la compulsiva ricerca del farmaco. L'estinzione del comportamento di *nosepoking* ha dimostrato un comportamento operante di AS di eroina di tipo strumentale, correlabile al rinforzo farmacologico (eroina). Solo alla 29<sup>a</sup> sessione, il comportamento dei due gruppi sperimentali è divenuto sovrapponibile.

Per quanto riguarda il gruppo *controllo*, esso ha mostrato nella fase di acquisizione in FR-1 un comportamento di nose-poke attivo simile al gruppo *eroina* ed un maggior numero di nose-poke inattivi rispetto al gruppo *eroina*. Nel passaggio alla schedula operativa FR-5, il numero dei nose-poke attivi non è stato adeguato e tale risultato dimostra che il comportamento potrebbe essere di tipo abituale, caratterizzato dalla persistenza per un lungo tempo dell'attività di *nosepoking* anche in assenza di effetti farmacologici o indotto da stimoli secondari. Tale comportamento abituale si è mantenuto alto nella fase di estinzione, in cui gli animali hanno continuato a ricevere soluzione fisiologica come nelle precedenti fasi del protocollo.



## Heroin and vehicle self-administration: cumulative nose-pokes



**Figura 9** : Comportamento di autosomministrazione di eroina o soluzione fisiologica. Risposte cumulative (nose-pokes) durante l'AS di eroina o sol. fisiologica (1°-23° sessione) e durante la fase di estinzione (24°-35° sessione). I risultati sono espressi come media  $\pm$  ES dei nose-pokes cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti) registrati durante ciascuna sessione di AS. \* $p < 0.05$  vs. NP inattivi; §  $p < 0.05$  vs. veicolo; #  $p < 0.05$  vs. 24° sessione.

## 4.2. Espressione dei miRNA in seguito a trattamento con eroina

### 4.2.1. Variazioni dell'espressione dei miRNA nella Shell del Nucleo Accumbens

L'analisi dei campioni nella shell del nucleo accumbens (NAc shell) ha evidenziato che nei controlli sui 736 miRNA analizzati 559 hanno presentato un Ct inferiore a 35 e 108 un Ct superiore mentre nei trattati 572 hanno presentato un Ct inferiore a 35 e 105 un Ct superiore (**Tab.1**). Il valore Ct, dall'inglese *cycle threshold*, è un valore che rappresenta i cicli di PCR necessari ad ottenere un aumento statisticamente significativo di prodotto. Il valore è inversamente proporzionale alla quantità di prodotto: minore è il valore, maggiore è il prodotto presente nel campione.

tRange	Distribution of Ct Values	
	controllo	eroina
<25	163	186
25-30	220	213
30-35	176	173
Absent Calls	108	105
Percent Distribution of Ct Values		
<25	24%	27%
25-30	33%	31%
30-35	26%	26%
Absent Calls	16%	16%

**Tabella 1:** Valori di Ct nel NAc shell del gruppo controllo e trattato con eroina

Per ogni miRNA è stato normalizzato il valore del Ct ottenuto sia nel trattato che nel controllo utilizzando i geni Housekeeping presenti in ogni piastra e in seguito è stato calcolato il Fold-change (FC). Tale analisi ha evidenziato 39 miRNA modificati, 16 sovra regolati con un FC superiore a 2 e 23 sotto regolati con una sotto regolazione inferiore a -2. (**Tab.2**)

miRNA	FC	miRNA	FC	miRNA	FC
let-7b*	2,16	miR-224	-2,14	miR-493	2,68
miR-1193-3p	2,69	miR-23b*	2,36	miR-540	2,39
miR-122	-2,37	miR-298	-2,03	miR-540*	2,39
miR-133b	-2,51	miR-331*	2,51	miR-542-5p	19,07
miR-141	-2,07	miR-343	-2,13	miR-598-3p	2,87
miR-181b-2*	-2,62	miR-3550	-3,02	miR-652	-794,00
miR-181c*	-2,42	miR-3586-5p	2,02	miR-653	-2,27

miR-188	-2,44	miR-3597-3p	-2,23	miR-653*	-2,12
miR-192*	3,57	miR-423*	2,15	miR-742	-2,92
miR-193*	-2,17	miR-463*	-3,62	miR-760-5p	3,62
miR-199a-3p	-4,82	miR-485*	3,13	miR-764	2,48
miR-201	25,24	miR-487b*	-3,12	miR-7a-1*	-2,12
miR-201*	-2,68	miR-489*	-2,42	miR-92b	-6,74

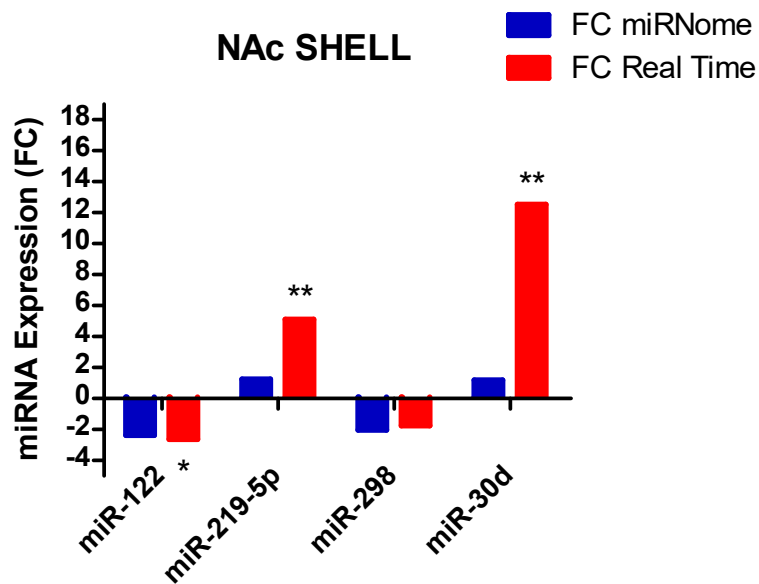
**Tabella 2:** Valori di fold-change per i 39 miRNA modificati.

Successivamente, allo scopo di verificare l'attendibilità e la riproducibilità dei dati ottenuti sono stati selezionati 16 miRNA (miR-32, miR-122, miR-137, miR-144, miR-214, miR-217, miR-298, miR-330, miR-130a-3p, miR-138-5p, miR-199a-5p, miR-219-5p, miR-301a-3p, miR-30d-3p, miR-34c, miR-532-5p) tra quelli trovati modificati nelle quattro regioni prese in esame, per i quali si è proceduto alla conferma in triplicato tramite Real Time PCR (**Tab.3**). Alcuni di questi miRNA risultavano modificati in solo una delle quattro aree analizzate mentre per altri la modifica di espressione era stata osservata in più di un'area.

Due di questi miRNA (miR-122 e miR-298) sono risultati sotto regolati in Shell alla prima analisi del miRNoma. Solamente per il miR-122 è stato possibile confermare questo dato con l'analisi in triplicato effettuata tramite RT-PCR. Il risultato ottenuto per miR-298, pur confermando una sotto regolazione, non risulta statisticamente significativo. Due miRNA (miR-219-5p e miR-30d-3p), che risultano modificati all'analisi del miRNoma, sono al contrario sovra regolati con l'analisi in triplicato effettuata tramite Real Time PCR (**Fig.10**).

SHELL miRNA	FC miRNome	FC Real Time	P value equals
miR-122	-2,37	-2,63	0,019
miR-219-5p	1,25	5,11	0,002
miR-298	-2,03	-1,75	NS
miR-30d	1,19	12,53	0,0003

**Tabella 3:** Validazione dei risultati tramite Real Time PCR.



**Figura 10:** Confronto tra valori di fold- change dei miRNA analizzati con miRNome (blu) e validazione in triplicato con Real time (rosso) in NAc shell. \*  $p < 0.05$  rispetto al controllo. \*\*  $p < 0.01$

#### 4.2.2. Variazione dell'espressione dei miRNA nel Core del Nucleo Accumbens

Nel NAc core su 736 miRNA analizzati, i controlli hanno mostrato 483 miRNA con un Ct inferiore a 35 e 101 con un Ct superiore, mentre nei trattati 537 hanno mostrato un Ct inferiore a 35 e 94 un Ct superiore (Tab.4).

tRange	Distribution of Ct Values	
	controllo	eroina
<25	60	138
25-30	207	201
30-35	216	198
Absent Calls	101	94
Percent Distribution of Ct Values		
<25	10%	22%
25-30	35%	32%
30-35	37%	31%
Absent Calls	17%	15%

**Tabella 4:** Valori di Ct nel NAc core del gruppo controllo e trattato con eroina.

Per ogni miRNA è stato normalizzato il valore del Ct ottenuto sia nel trattato che nel controllo utilizzando i geni Housekeeping presenti in ogni piastra e in seguito è stato calcolato il fold-change. Tra i 537 miRNA sopra citati sono risultati altamente modificati 114, 97 sovraregolati con un FC superiori a 2 e 17 sotto regolati con FC inferiore a -2. **(Tab.5)**

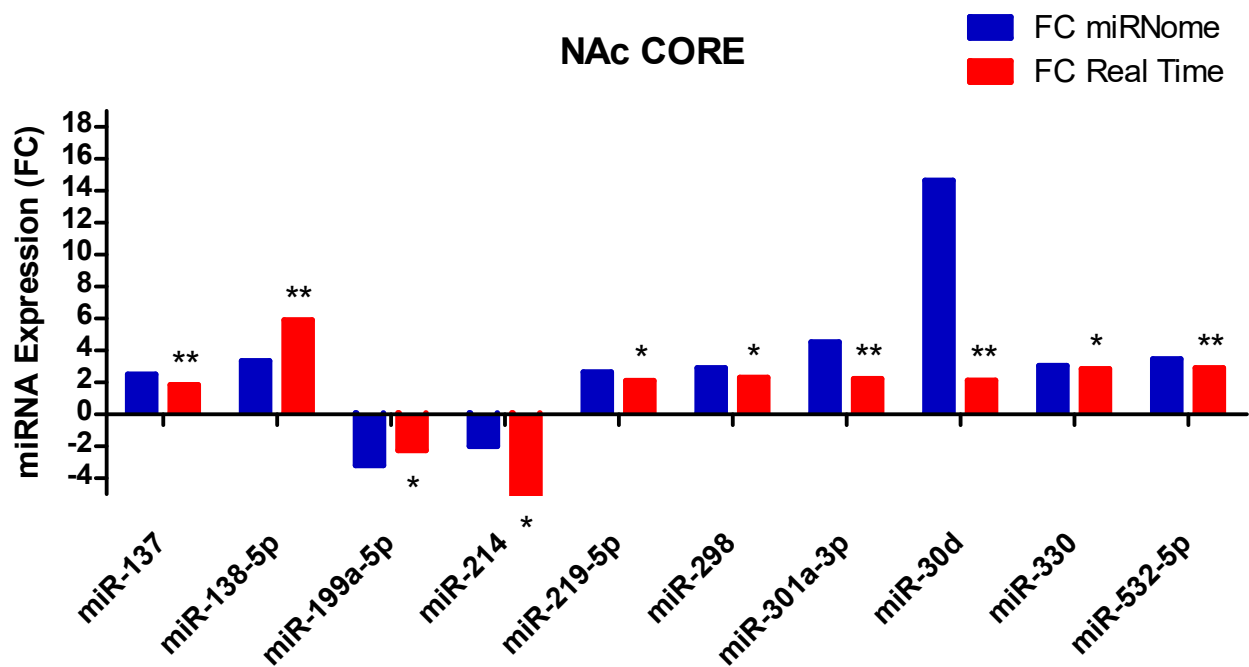
miRNA	FC	miRNA	FC	miRNA	FC
let-7a-2*	2,25	miR-291a-5p	2,45	miR-376b-3p	2,76
let-7i*	5,16	miR-298	2,90	miR-377	2,98
miR-1	-2,41	miR-298*	2,31	miR-378*	4,77
miR-101a	4,37	miR-299*	3,09	miR-380*	4,13
miR-101b	3,50	miR-29a	2,37	miR-383*	2,81
miR-106b*	2,44	miR-29a*	2,46	miR-410	3,68
miR-107*	2,52	miR-29c	2,64	miR-410*	-2,18
miR-128-2*	2,66	miR-29c*	2,50	miR-425	3,14
miR-130a*	2,71	miR-300-5p	3,30	miR-429	3,57
miR-135a*	2,84	miR-301a-3p	4,52	miR-431	2,74
miR-136*	3,45	miR-301b	4,52	miR-466c	-3,17
miR-137	2,52	miR-3065-5p	3,90	miR-466c*	4,50
miR-138-5p	3,36	miR-3085	3,68	miR-488	2,79
miR-142-3p	4,38	miR-30b-3p	3,51	miR-490	-3,34
miR-143	2,17	miR-30b-5p	2,02	miR-490*	3,75
miR-145	2,02	miR-30c-2*	3,56	miR-497	2,79
miR-153	2,47	miR-30d	14,66	miR-501	-2,34
miR-153*	2,89	miR-31*	4,14	miR-503*	2,91
miR-154	2,06	miR-32	-3,41	miR-532-5p	3,47
miR-154*	4,16	miR-326	2,49	miR-540	-2,02
miR-187*	3,83	miR-328a	2,13	miR-542-5p	-2,02
miR-18a*	4,10	miR-330	3,05	miR-551b	3,11
miR-191*	2,00	miR-331	2,61	miR-582*	3,14
miR-192*	-3,04	miR-337	3,52	miR-598-5p	-2,39
miR-193	2,27	miR-339-3p	3,60	miR-664-1*	3,67
miR-193*	-2,28	miR-339-5p	2,83	miR-664-2*	5,04
miR-1949	2,42	miR-341	3,11	miR-666*	2,12
miR-195	2,28	miR-342-5p	2,23	miR-667*	-2,99
miR-199a-5p	-3,18	miR-344a-3p	2,12	miR-668	-2,12
miR-19a	3,91	miR-34a	3,26	miR-708*	2,63
miR-19b	3,80	miR-34c	3,91	miR-758	2,28
miR-200a	4,29	miR-3542	2,12	miR-760-3p	2,93
miR-20a*	2,78	miR-3586-5p	3,32	miR-760-5p	2,24
miR-214	-2,00	miR-362*	2,75	miR-764*	2,25
miR-219-5p	2,64	miR-370*	2,91	miR-802	3,10
miR-22	2,69	miR-375	-3,67	miR-873	2,34
miR-24-1*	2,95	miR-376a	2,13	miR-873*	-3,11
miR-24-2*	8,53	miR-376a*	2,94	miR-874	2,70

**Tabella 5:** Valori di fold-change per i 114 miRNA trovati modificati.

Anche nel NAc core, come in precedenza per NAc shell, sono stati analizzati gli stessi 16 miRNA (miR-32, miR-122, miR-137, miR-144, miR-214, miR-217, miR-298, miR-330, miR-130a-3p, miR-138-5p, miR-199a-5p, miR-219-5p, miR-301a-3p, miR-30d-3p, miR-34c, miR-532-5p) scelti per la conferma in triplicato tramite Real Time PCR (**Tab.6**) Di questi miRNA 10 risultano modificati in NAc core in seguito alla prima analisi dell'intero miRNoma, 8 sovra regolati (miR-30d-3p, miR-301a-3p, miR-219-5p, miR-532-5p, miR-298, miR-137, miR-330, miR-138-5p) e due sotto regolati (miR-199a-5p e miR-214). Per tutti è stato possibile confermare le variazioni osservate precedentemente del miRNoma attraverso l'analisi in triplicato effettuata tramite RT-PCR (**Fig.11**)

CORE miRNA	FC miRNome	FC Real Time	P value equals
miR-137	2,52	1,84	0,0029
miR-138-5p	3,36	5,91	0,0005
miR-199a-5p	-3,18	-2,26	0,0153
miR-214	-2,00	-8,00	0,0450
miR-219-5p	2,64	2,11	0,0373
miR-298	2,90	2,30	0,0320
miR-301a-3p	4,52	2,24	0,0045
miR-30d	14,66	2,13	0,0026
miR-330	3,05	2,84	0,0113
miR-532-5p	3,47	2,90	0,0075

**Tabella 6** :Validazione dei risultati tramite Real Time PCR.



**Figura 11:** Confronto tra valori di fold-change dei miRNA analizzati con miRNome (blu) e validazione in triplicato con Real time (rosso) in NAc core. \*  $p < 0.05$  rispetto al controllo. \*\*  $p < 0.01$

### 4.2.3. Variazioni dell'espressione dei miRNA in Corteccia Prefrontale

In quest'area su 736 miRNA analizzati nei controlli 584 hanno presentato un Ct inferiore a 35 e 96 un Ct superiore, mentre nei trattati 592 hanno presentato un Ct inferiore a 35 e 96 un Ct superiore (Tab.7).

tRange	Distribution of Ct Values	
	controllo	eroina
<25	192	194
25-30	209	225
30-35	183	173
Absent Calls	96	96
Percent Distribution of Ct Values		
<25	28%	28%
25-30	31%	33%
30-35	27%	25%
Absent Calls	14%	14%

**Tabella 7:** Valori di Ct nella Corteccia Prefrontale del gruppo controllo e trattato con eroina

Per ogni miRNA è stato normalizzato il valore del Ct ottenuto sia nel trattato che nel controllo utilizzando i geni Housekeeping presenti in ogni piastra e in seguito è stato calcolato il FC. Tra i 584 miRNA sopra citati sono risultati altamente modificati 52, 39 sovra regolati con un FC superiori a 2 e 12 sotto regolati con FC inferiore a -2. (Tab.8) Tra questi è stato preso in considerazione in anche 1 miRNA sovra regolato con FC=1,95 (miR-138-5p) perché presente nell'elenco dei miRNA selezionati per la convalida con Real Time PCR.

miRNA	FC	miRNA	FC	miRNA	FC
let-7d*	2,07	miR-206	2,06	miR-3559-3p	-3.51
miR-122*	-4.37	miR-20a*	2,84	miR-3577	-2.31
miR-125a-3p	2,17	miR-217	2,18	miR-3596c	-2.01
miR-125b-3p	4,14	miR-218a-1*	2,33	miR-362	2,01
miR-135a*	-2.12	miR-23a	2,96	miR-377*	-2.59
miR-135b*	-2.58	miR-23a*	3,16	miR-378*	2,00
miR-138-5p	1,95	miR-295*	2,57	miR-412	2,28
miR-141	2,11	miR-3065-5p	-2.31	miR-429	4,12
miR-142-3p	-2.08	miR-30b-3p	2,72	miR-451*	-2.05
miR-144*	9,74	miR-30c-1*	2,27	miR-483	2,26
miR-147	4,16	miR-329	2,21	miR-483*	2,59
miR-152	2,16	miR-330*	2,20	miR-489	2,06
miR-184	4,60	miR-340-3p	2,02	miR-496*	-2.01

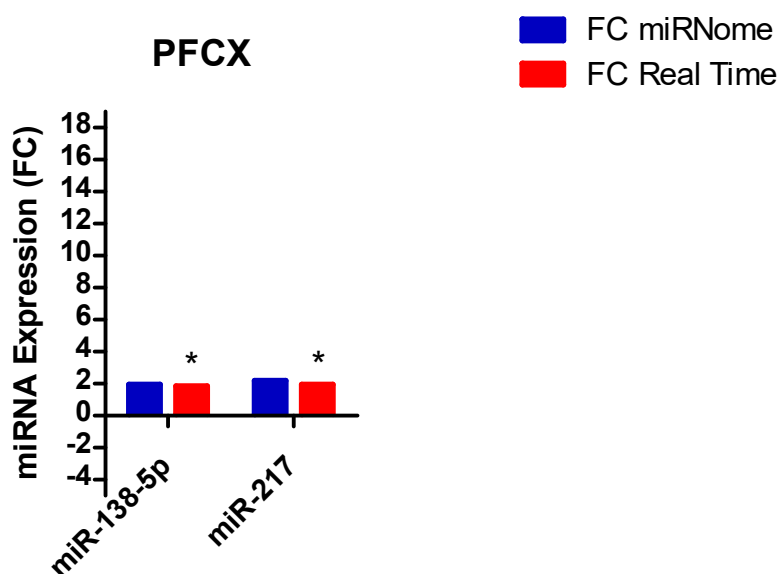
miR-192*	2,54	miR-341	2,24	miR-500	11,98
miR-200a	20,23	miR-342-5p	2,15	miR-760-3p	2,21
miR-201	3,56	miR-345-3p	2,03	miR-92b	2,15
miR-203	2,19	miR-3541	2,08		
miR-203*	-2.22	miR-3550	2,11		

**Tabella 8:** Valori di fold-change per i 51 miRNA trovati modificati.

Anche per quest'area sono stati analizzati gli stessi miRNA (miR-32, miR-122, miR-137, miR-144, miR-214, miR-217, miR-298, miR-330, miR-130a-3p, miR-138-5p, miR-199a-5p, miR-219-5p, miR-301a-3p, miR-30d-3p, miR-34c, miR-532-5p) per la conferma in triplicato tramite Real Time PCR(**Tab.9**). Di questi miRNA solo due risultavano sovra regolati alla prima analisi del miRNoma (miR-217 e miR-138-5p) e per entrambi è stato possibile confermare tale modifica di espressione (**Fig.12**)

PFCX miRNA	FC miRNome	FC Real Time	P value equals
miR-138-5p	1,95	1,84	0,0402
miR-217	2,18	1,94	0,05

**Tabella 9:** Validazione dei risultati tramite Real Time PCR.



**Figura 12:** Confronto tra valori di foldchange dei miRNA analizzati con miRNome (blu) e validazione in triplicato con Real time (rosso) in PFCX. \*  $p < 0.05$  rispetto al controllo.



#### 4.2.4. Variazioni dell'espressione dei miRNA in Caudato Putamen

L'analisi in quest'area ha messo in evidenza che 604 miRNA dei controlli su 736 miRNA analizzati aveva Ct inferiore a 35 e 101 un Ct superiore, mentre nei trattati 625 hanno mostrato un Ct inferiore a 35 e 82 un Ct superiore (**Tab.10**)

tRange	Distribution of Ct Values	
	controllo	eroina
<25	207	236
25-30	216	224
30-35	181	165
Absent Calls	101	82
Percent Distribution of Ct Values		
<25	29%	33%
25-30	31%	32%
30-35	26%	23%
Absent Calls	14%	12%

**Tabella 10:** Valori di Ct nel caudato putamen del gruppo controllo e trattato con eroina

Tra i 625 miRNA sopra citati sono risultati altamente modificati 125, di cui 105 sovra regolati con un FC superiore a 2e 20 sotto regolati con FC inferiore a -2(**Tab.11**).

miRNA	FC	miRNA	FC	miRNA	FC
let-7b	2,57	miR-200a	2,63	miR-34c	4,50
let-7b*	-2,34	miR-200b	3,10	miR-3544	-2,78
let-7c	2,53	miR-200c	2,84	miR-3562	5,02
let-7d	2,56	miR-20a	2,69	miR-3578	-2,20
let-7e	2,38	miR-21	2,21	miR-3588	3,83
let-7f	3,32	miR-21*	5,41	miR-3594-3p	-2,87
miR-101a	4,01	miR-214	-2,59	miR-3596a	8,09
miR-103	3,03	miR-215	2,21	miR-3596b	7,12
miR-105	2,01	miR-218a-1*	2,46	miR-3596c	-5,47
miR-106b	3,34	miR-218a-2*	3,26	miR-3596d	2,98
miR-122	7,61	miR-218b	-2,63	miR-376a	2,66
miR-124*	2,35	miR-219-1-3p	2,62	miR-376c	2,09
miR-125a-5p	2,13	miR-219-5p	2,67	miR-377*	2,25
miR-126	2,98	miR-22	2,92	miR-378	2,24
miR-128	2,16	miR-222	2,39	miR-410*	3,07
miR-130a	4,28	miR-223	2,67	miR-423	2,49
miR-135b*	-2,23	miR-224	-2,11	miR-449c-5p	-2,84
miR-136	2,10	miR-23b	2,21	miR-450a*	2,38

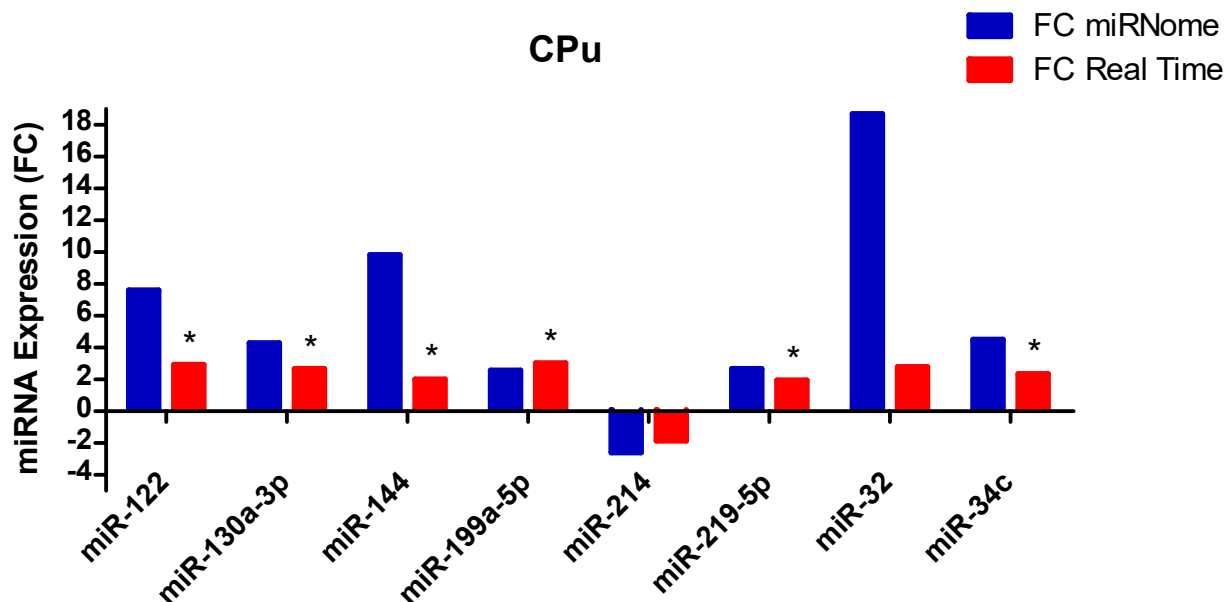
miR-140	2,67	miR-24	2,18	miR-455	2,73
miR-141	5,48	miR-26a	2,19	miR-463*	-4,97
miR-142-3p	3,73	miR-26b	2,21	miR-465	2,25
miR-142-5p	4,05	miR-27a	2,90	miR-487b	12,59
miR-143	2,96	miR-27a*	2,50	miR-489*	2,09
miR-144	9,83	miR-27b	2,46	miR-501	2,54
miR-146a	6,66	miR-28	2,77	miR-598-5p	-2,40
miR-150	2,08	miR-291a-3p	-2,38	miR-615	-2,38
miR-151	2,08	miR-29b	2,31	miR-666*	2,30
miR-15b	3,33	miR-30d	2,43	miR-673	2,12
miR-16	2,31	miR-30e	2,61	miR-708*	2,59
miR-17-5p	2,98	miR-32	18,69	miR-742	4,52
miR-181a	3,24	miR-320	2,80	miR-743b	4,75
miR-181b	2,74	miR-324-5p	2,43	miR-7a	2,12
miR-181c*	3,29	miR-326	2,06	miR-875	-2,03
miR-182	6,33	miR-328b-3p	4,92	miR-883	-3,29
miR-185	2,45	miR-329	-10,48	miR-9	2,47
miR-188*	2,59	miR-33	2,26	miR-92a	2,07
miR-18a	2,79	miR-336	-4,83	miR-92a-1*	2,06
miR-194	2,33	miR-338*	-2,38	miR-93	2,21
miR-195	2,39	miR-341	2,05	miR-96	2,87
miR-199a-5p	2,57	miR-342-3p	2,37	miR-99a	2,28
miR-19a	2,41	miR-344a-5p	-2,31	miR-99a*	2,45
miR-19b	3,34	miR-34b	3,37		

**Tabella 11:** Valori di fold-change per i 125 miRNA modificati.

Dei 16 miRNA selezionati per la convalida (miR-32, miR-122, miR-137, miR-144, miR-214, miR-217, miR-298, miR-330, miR-130a-3p, miR-138-5p, miR-199a-5p, miR-219-5p, miR-301a-3p, miR-30d-3p, miR-34c, miR-532-5p) 8 risultavano modificati all'analisi del miRNoma (**Tab.12**). Di questi, 7 erano sovra regolati (miR-122, miR-130a-3p, miR-144, miR-199a-5p, miR-219-5p, miR-32, miR-34c) e per tutti si è potuta confermare tale modifica attraverso l'analisi in triplicato. Solo un miRNA risultava sotto regolato (miR-214) per il quale pur confermando una sotto regolazione non si è ottenuto un dato statisticamente significativo (**Fig.13**)

VALIDATION	FC miRNome	FC Real Time	P value equals
miR-122	7,61	2,92	0,0432
miR-130a-3p	4,28	2,67	0,0293
miR-144	9,83	2,01	0,0245
miR-199a-5p	2,57	3,03	0,0153
miR-214	-2,59	-1,85	NS
miR-219-5p	2,67	1,94	0,0172
miR-32	18,69	2,79	0,0208
miR-34c	4,50	2,36	0,0159

**Tabella 12:** Validazione dei risultati tramite Real Time PCR.



**Figura 13:** Confronto tra valori di foldchange dei miRNA analizzati con miRNome (blu) e validazione in triplicato con Real time (rosso) in CPU. \*  $p < 0.05$  rispetto al controllo.

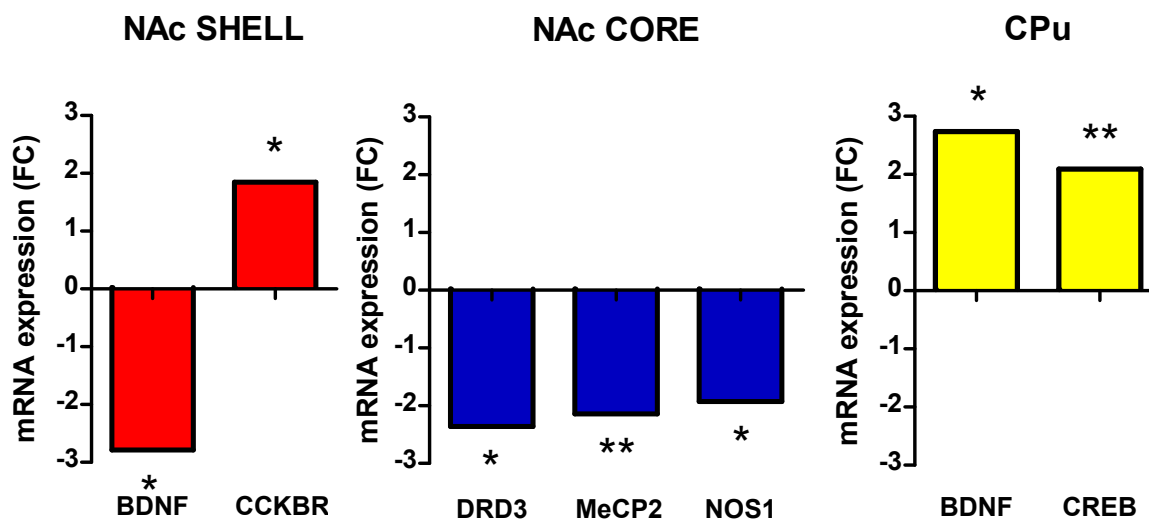
### 4.3. Analisi della variazione di espressione genica indotta da AS di eroina

Lo step successivo ha riguardato la scelta di alcuni geni (BDNF, CREB, MeCP2, OPRM1, SIRT1, SIRT2, DRD3, CLOCK, NOS1, NOS2 e CCKBR) dei quali analizzare il trascritto. Tale selezione è stata fatta, sulla base dei dati presenti in letteratura, scegliendo quei geni implicati nei processi coinvolti nella somministrazione di sostanze d'abuso ma che avessero allo stesso tempo delle correlazioni con alcuni dei miRNA trovati modificati.

Si è cercato, tenendo presente l'impossibilità di poter fare un controllo su tutti i geni, di includere in questa selezione sia geni noti per essere modificati dopo esposizione a sostanze d'abuso, sia geni che avessero un profilo meno studiato o comunque un po' più marginale nei processi di sviluppo delle dipendenze in modo tale da poter avere, in questo primo step, un'idea generale della vastità dei processi implicati.

Al fine di validare i risultati di espressione genica l'RNA è stato retro-trascritto in cDNA e successivamente analizzato tramite RT-PCR. La figura 14 mostra le variazioni d'espressione (esprese come valore di fold-change) degli mRNA analizzati per le quattro aree cerebrali oggetto di studio dei ratti trattati con eroina rispetto ai controlli. In NAc shell è stata osservata una riduzione dell'espressione dell'mRNA di due soli geni su undici: BDNF (FC=-2.79,  $p=0.0381$ ) e CCKBR (FC=-1.85,  $p=0.0419$ ) mentre in NAc core i geni sotto regolati sono stati: DRD3 (FC=-2.36,  $p=0.0177$ ), MeCP2 (FC=-2.14,  $p=0.0032$ ) e NOS1 (FC=-1.93,  $p=0.0125$ ). In corteccia prefrontale non si è osservata nessuna modifica tra gli 11 trascritti analizzati. Nel caudato putamen si ha un aumento di espressione di 2 geni su 11 analizzati: BDNF (FC=2.74,  $p=0.0297$ ) e CREB (FC=2.09,  $p=0.0043$ ).

Come mostrato in figura 14, le variazioni di espressione nelle diverse aree coinvolgono geni differenti e ciò lascia ipotizzare che la somministrazione contingente di eroina ha prodotto delle modificazioni specifiche a livello post trascrizionale in queste regioni cerebrali, parallelamente alle variazioni area-specifiche di espressione dei miRNA.



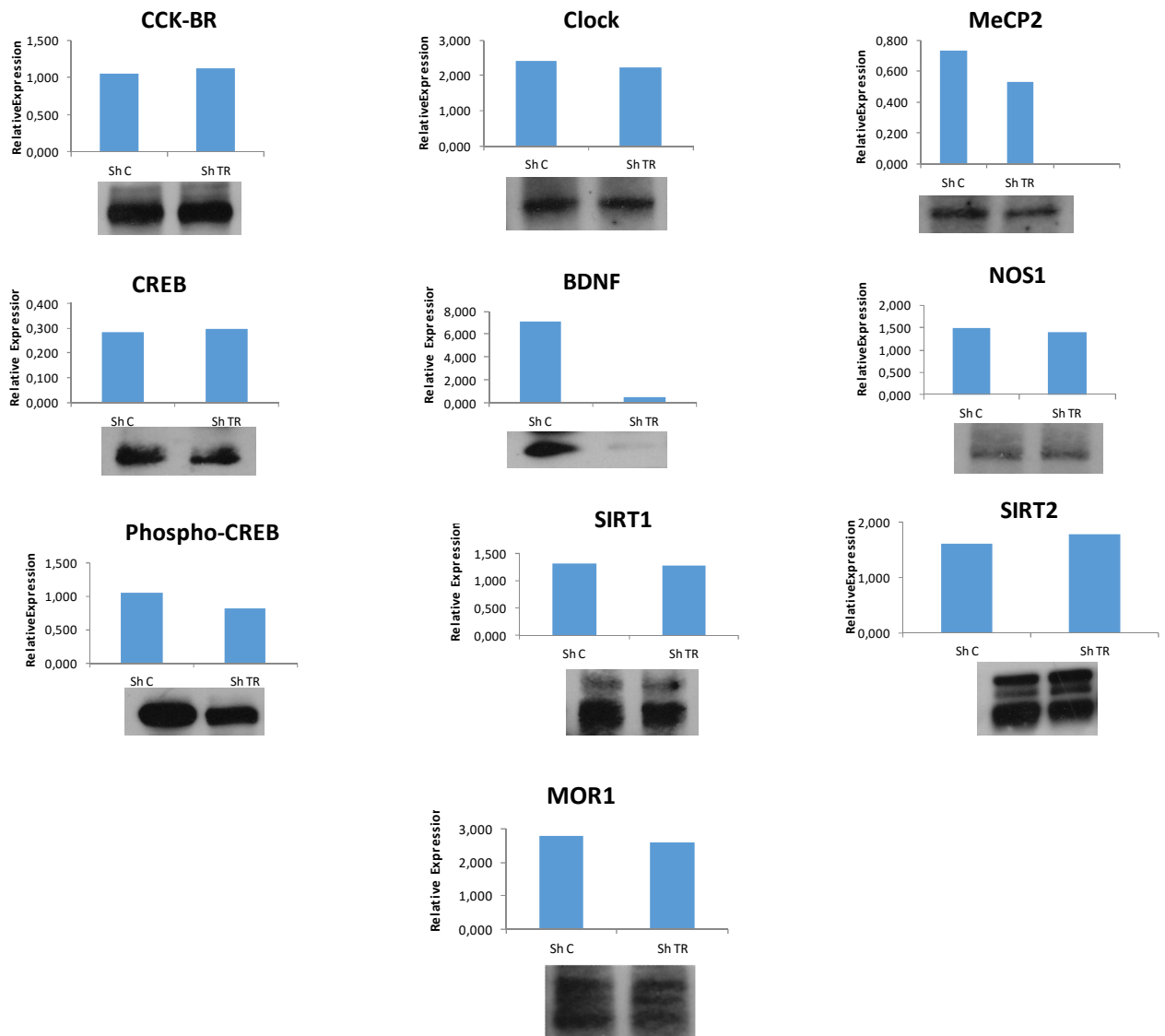
**Figura 14:** Variazioni di espressione (esprese come valore di fold-change) degli mRNA dei geni target trovati modificati nelle tre aree cerebral (NAc shell, NAc core e CPu). \* $p < 0.05$  rispetto al controllo. \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.4. Analisi dell'espressione proteica in seguito a trattamento con eroina

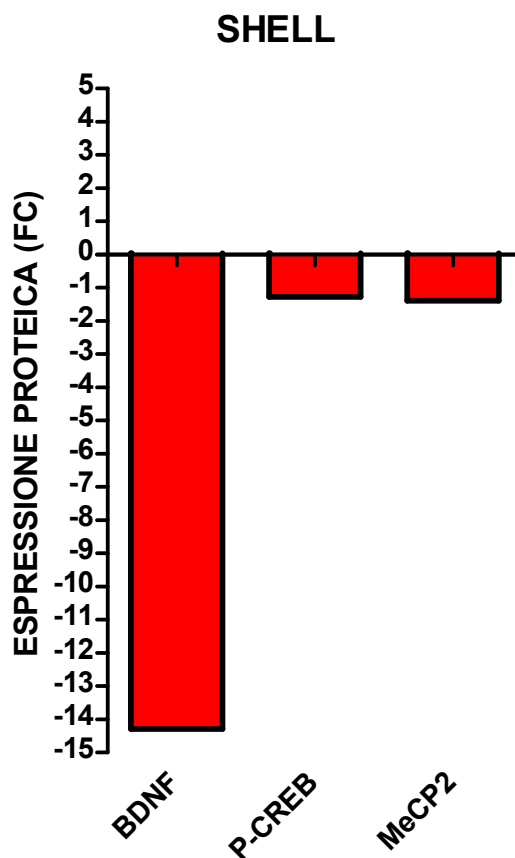
Allo scopo di valutare se ci fosse correlazione fra i livelli di espressione dei miRNA e i livelli di espressione proteica è stata effettuata l'analisi di Western blotting relativamente alle proteine CCKBR, CLOCK, MeCP2, CREB, p-CREB, BDNF, NOS1, SIRT1, SIRT2 e MOR1 nelle quattro aree cerebrali. Non è stato possibile effettuare l'analisi per NOS2 e DRD3 per mancanza del campione da analizzare.

##### 4.4.1. Nucleo Accumbens Shell

Come mostrato in figura 15 e 16 l'analisi dell'espressione proteica nella shell del NAc ha rivelato che la somministrazione di eroina è associata a una forte riduzione dell'espressione della proteina BDNF (FC=-14,29), in accordo con i ridotti livelli del corrispettivo mRNA. L'espressione della proteina CCKBR (FC=1,07), al contrario, non è risultata modificata a dispetto della riduzione significativa dell'espressione del relativo messaggero. Per quanto riguarda i livelli delle proteine codificate dai geni CLOCK, MeCP2, CREB, p-CREB, NOS1, MOR1, SIRT1 e SIRT2, per i quali l'analisi effettuata con Real Time PCR non ha mostrato variazioni significative nei livelli di espressione dei relativi mRNA in seguito al trattamento, solamente le proteina CREB fosforilata (FC=-1,28) e MeCP2 (FC=-1,39) sono risultate essere leggermente sotto regolate.



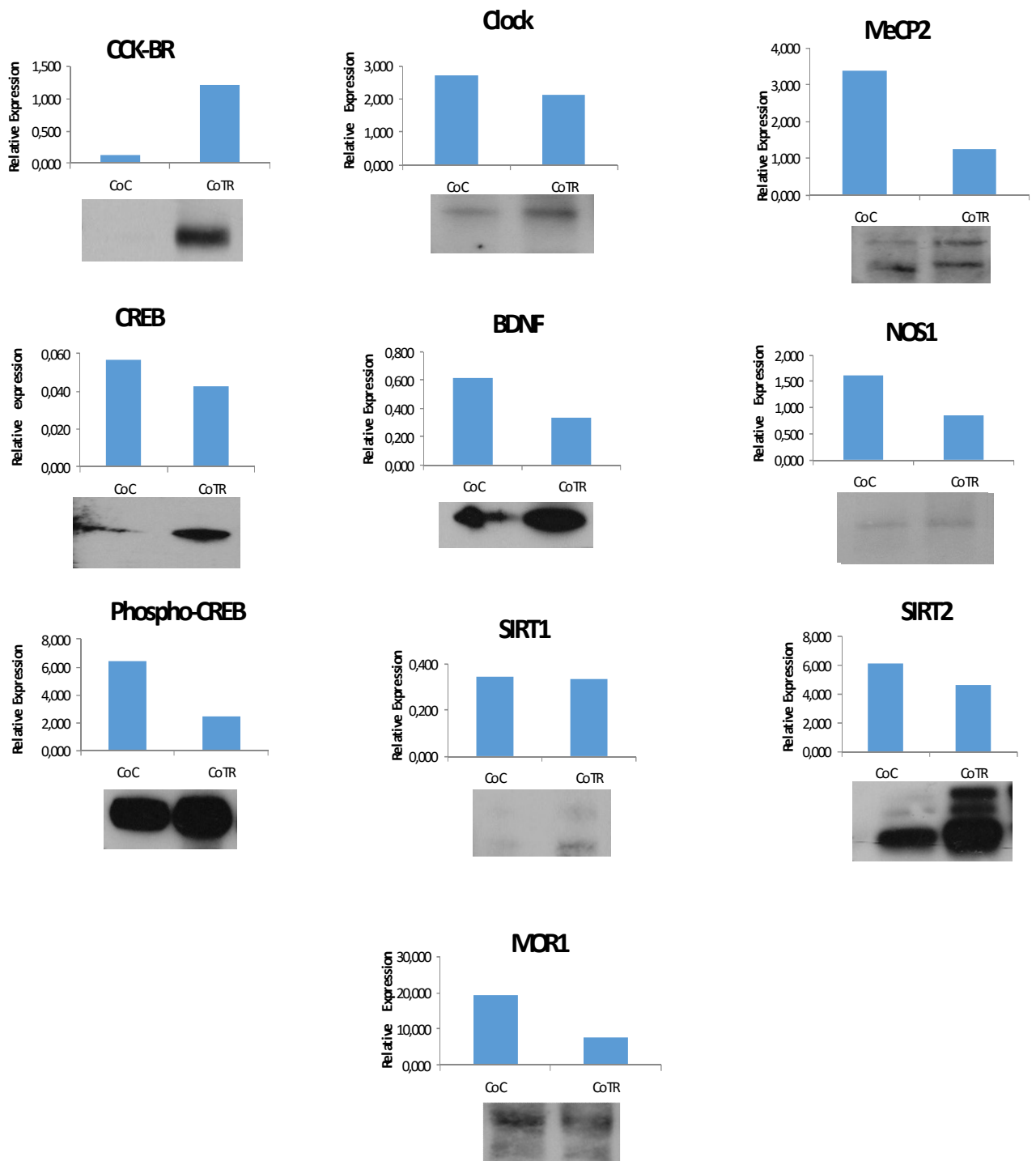
**Figura 15** : Analisi di Western Blotting per le proteine indicate nella regione NAc shell. I dati sono espressi come rapporto densitometrico della proteina target rispetto al controllo di caricamento(beta-actina) in unità arbitrarie.



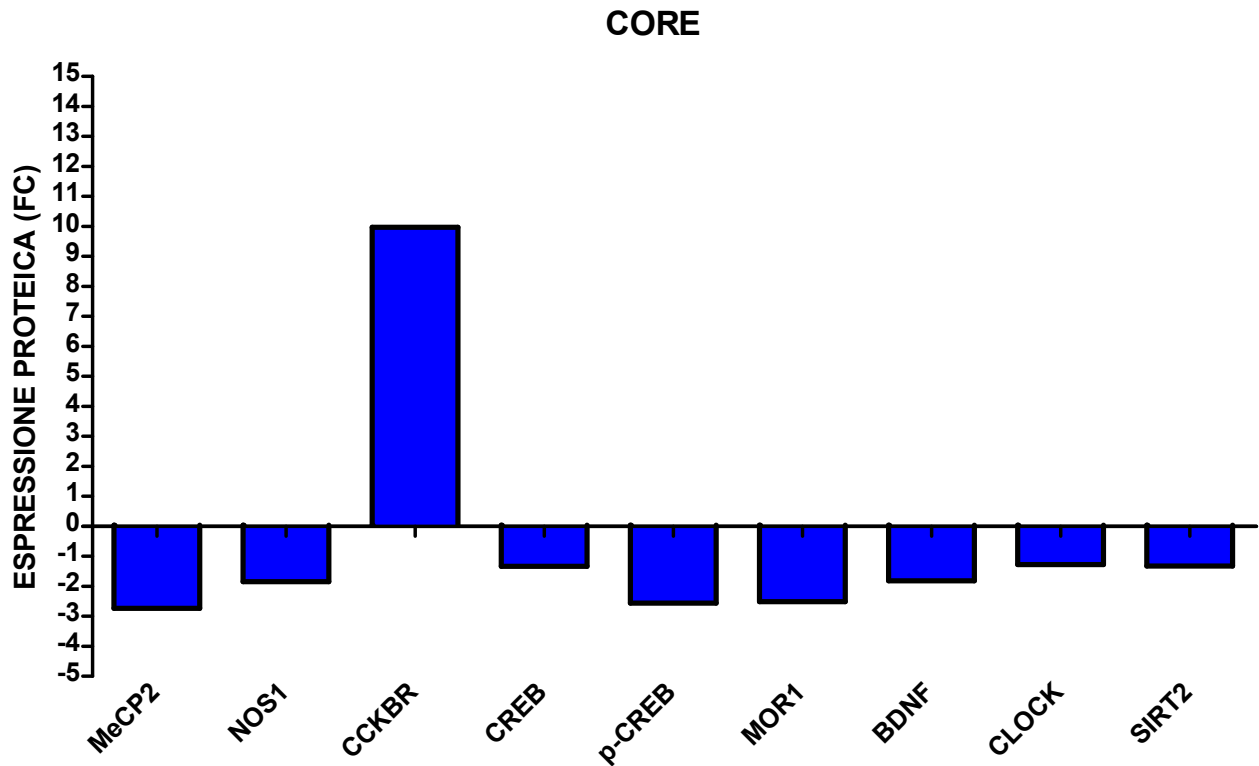
**Figura 16:** Variazione di espressione proteica per NAc shell espressa come fold-change (FC), calcolato dividendo il valore normalizzato del campione trattato con eroina per il valore normalizzato del controllo. Sono state considerate solo quelle proteine con valore di FC superiore o inferiore a +/- 1,19.

#### 4.4.2. Nucleo Accumbens Core

Nel core, il trattamento ha determinato una forte sovra espressione della proteina CCKBR (FC=9,97), una sotto regolazione di MeCP2 (FC=-2,73) e una riduzione dei livelli di NOS1 (FC=-1,85), in accordo con la ridotta espressione dei loromessaggeri . Inoltre, pur non essendo state osservate variazioni significative a livello dei rispettivi mRNA, si è osservata una riduzione consistente relativamente alle proteine p-CREB (FC=-2,56) e MOR1 (FC=-2,51), moderata per quanto riguarda BDNF (FC= -1,82) e più lieve per SIRT2 (FC=-1,32), CREB (FC=-1,33) e CLOCK (FC=-1,28)(Fig.17 e 18).



**Figura 17:** Analisi di Western Blotting per le proteine indicate nella regione NAc core. I dati sono espressi come rapporto densitometrico della proteina target rispetto al controllo di caricamento (beta-actina) in unità arbitrarie.

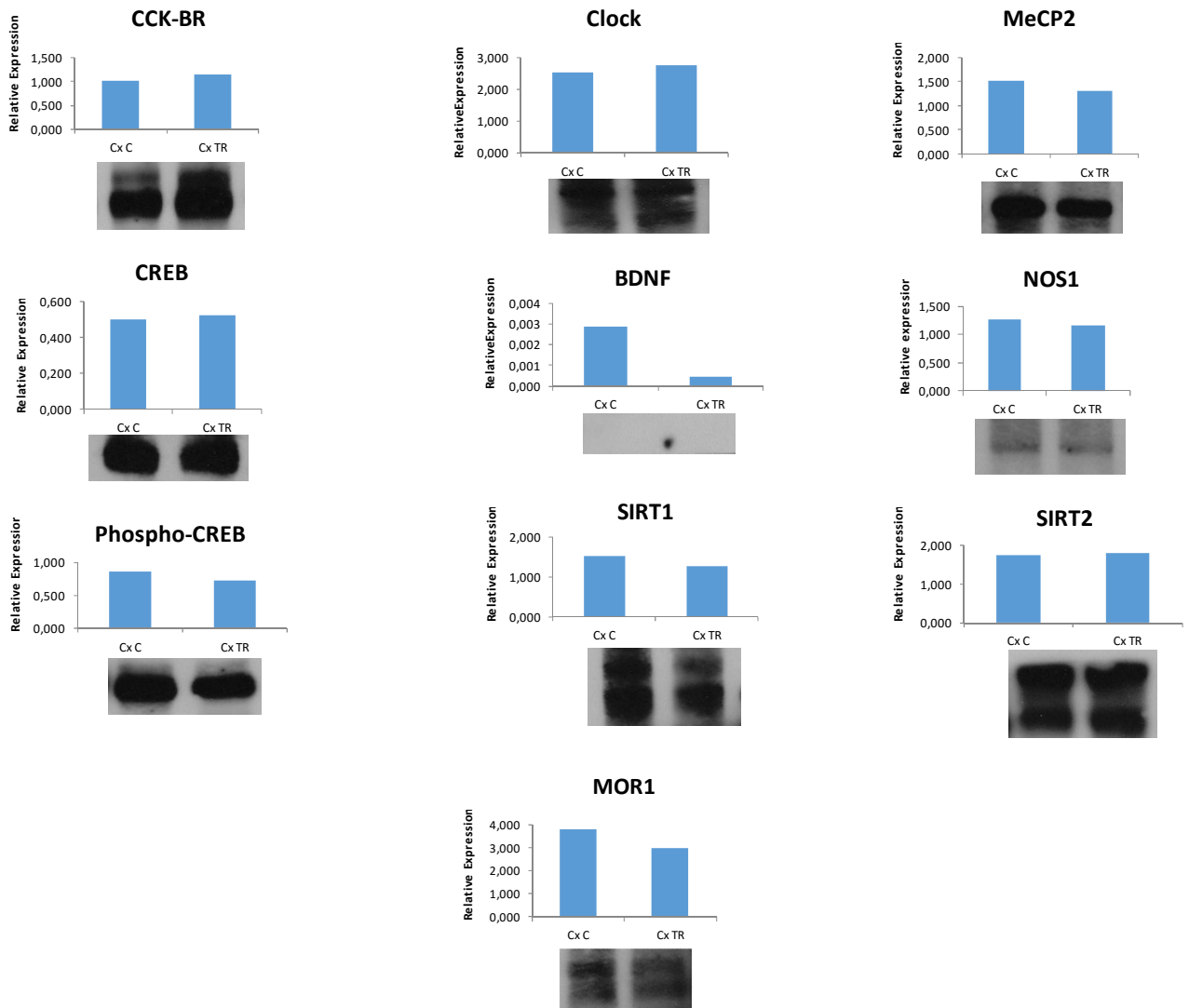


*Figura 18: Variazione di espressione proteica per NAc core espressa come fold-change (FC), calcolato dividendo il valore normalizzato del campione trattato con eroina per il valore normalizzato del controllo. Sono state considerate considerate solo quelle proteine con valore di FC superiore o inferiore a +/- 1,19.*

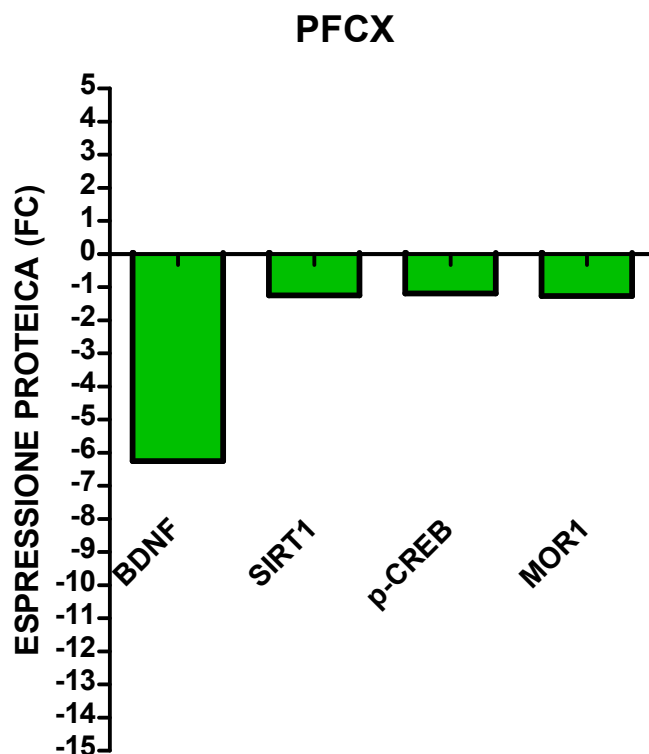
#### 4.4.3. Corteccia Prefrontale

Come mostrato nelle figure 19 e 20, in corteccia prefrontale, sebbene la somministrazione di eroina non sia risultato essere associata ad alcuna variazione di espressione dei messengeri degli 11 geni analizzati, l'analisi dell'espressione proteica ha rivelato una forte riduzione della proteina BDNF (FC=-6,25) e una lieve sotto regolazione dei livelli di, SIRT1 (FC=-1,25), p-CREB (FC=-1.19) e MOR1 (FC=-1.27).





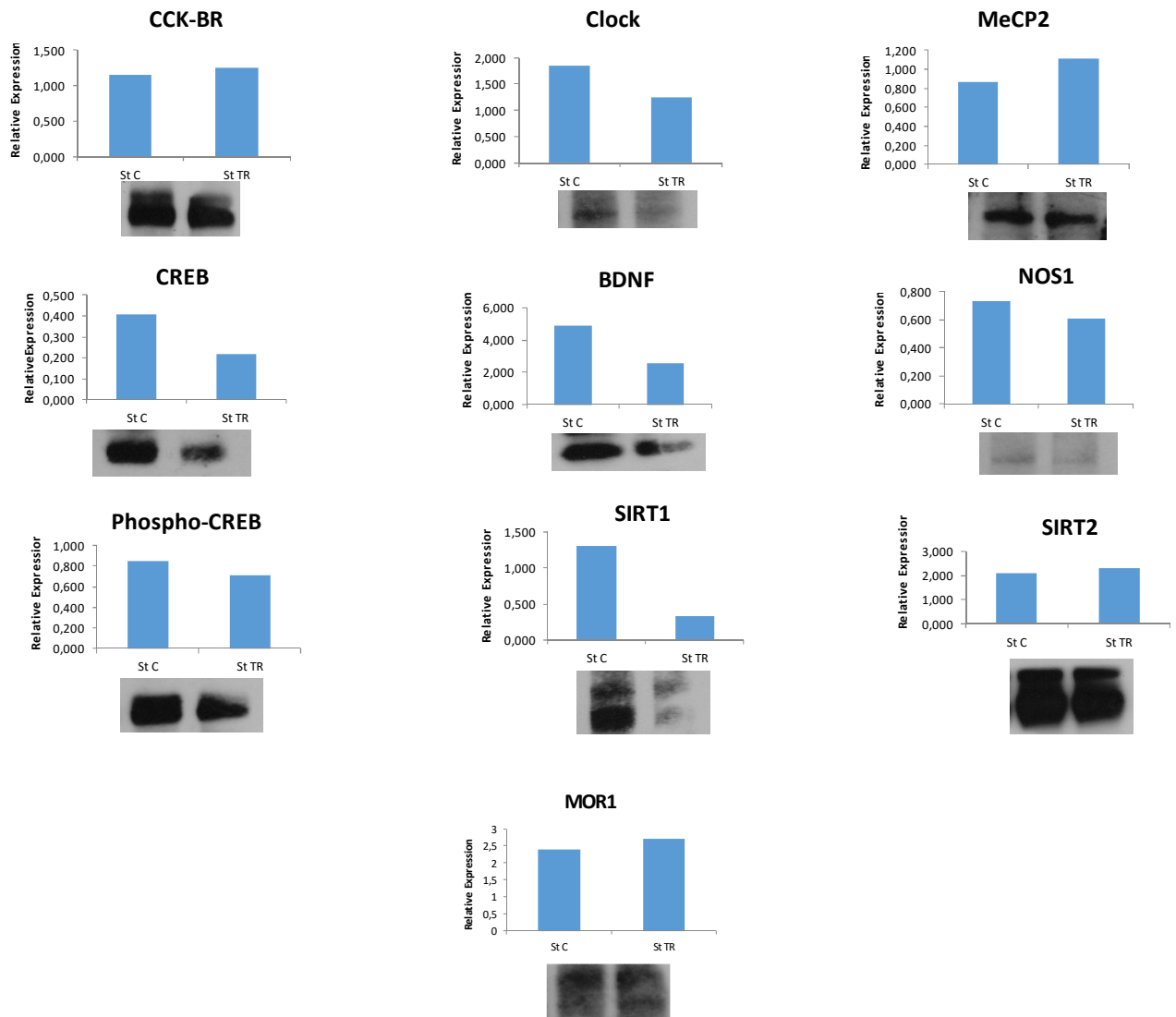
**Figura 19:** Analisi di Western Blotting per le proteine indicate nella regione PFCX. I dati sono espressi come rapporto densitometrico della proteina target rispetto al controllo di caricamento (beta-actina) in unità arbitrarie.



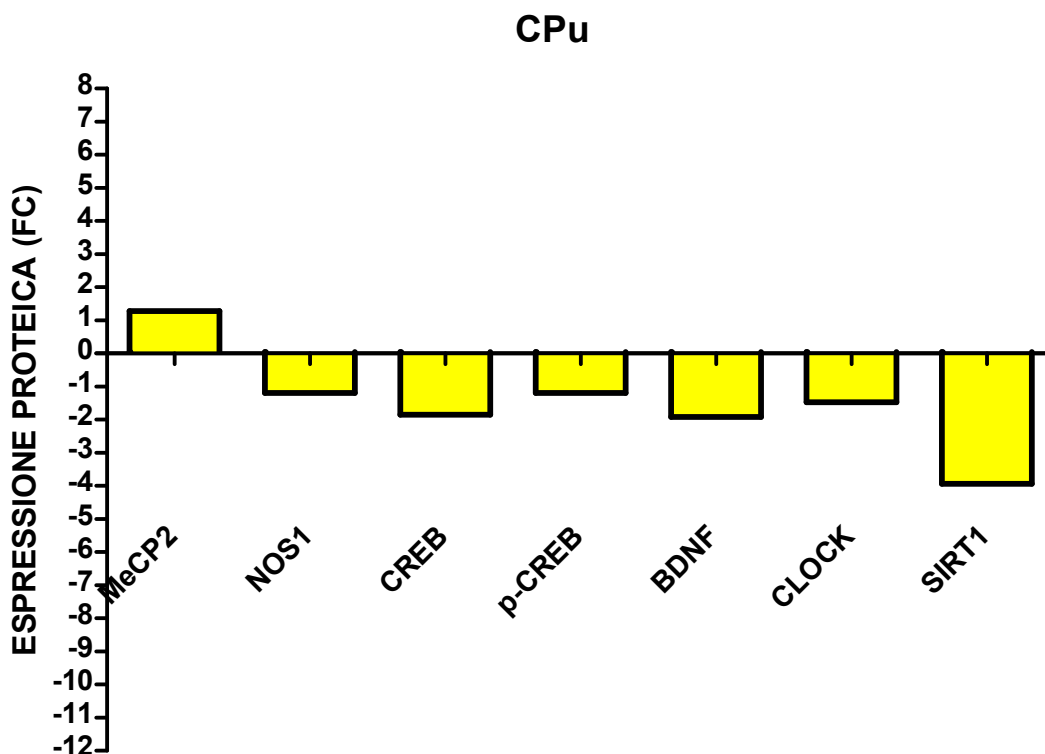
**Figura 20:** Variazione di espressione proteica per PFCX espressa come fold-change (FC), calcolato dividendo il valore normalizzato del campione trattato con eroina per il valore normalizzato del controllo. Sono state considerate solo quelle proteine con valore di FC superiore o inferiore a +/- 1,19.

#### 4.4.4. Caudato Putamen

Nel Caudato Putamen, infine, l'analisi di Western blotting ha mostrato che il trattamento ha determinato una riduzione dei livelli di espressione delle proteine BDNF (FC=-1,92) e CREB (FC=-1,85), in disaccordo con gli aumentati livelli di espressione dei relativi mRNA. Per quanto riguarda le proteine codificate dai geni per i quali non si erano osservate variazioni dei livelli dei rispettivi messaggeri, si evidenzia una decisa sotto regolazione dei livelli della proteina SIRT1 (FC=-3,94) e, seppure in maniera più trascurabile, di CLOCK (FC=-1,47) NOS1 (FC=-1,19) e pCREB (FC=-1,19). Al contrario, i livelli proteici di MeCP2 sono risultati essere leggermente aumentati (FC=1,28) (**Fig.21 e 22**).



**Figura 21:** Analisi di Western Blotting per le proteine indicate nella regione CPu. I dati sono espressi come rapporto densitometrico della proteina target rispetto al controllo di caricamento (beta-actina) in unità arbitrarie.



**Figura 22:** Variazione di espressione proteica per CPu espressa come fold-change (FC), calcolato dividendo il valore normalizzato del campione trattato con eroina per il valore normalizzato del controllo. Sono state considerate solo quelle proteine con valore di FC superiore o inferiore a +/- 1,19.

L'analisi mediante Western blotting ha permesso di evidenziare, nelle quattro aree cerebrali prese in considerazione, le variazioni nell'espressione proteica associate alla somministrazione di eroina, non sempre direttamente correlabili alle variazioni dei livelli di espressione dei corrispondenti RNA messaggeri. Riassumendo, è stato osservato che il trattamento ha determinato la diminuzione dei livelli basali di un elevato numero di proteine (4 in PFCX, 3 in NAc shell, 8 in NAc core e 6 in CPu) mentre solo molto poche (1 in NAc core e 1 in CPu) sono risultate essere sovra espresse. Ciò suggerisce che molti dei miRNA, la cui espressione è stata trovata aumentata in seguito all'esposizione degli animali ad eroina, possano aver regolato negativamente l'espressione delle proteine tradotte a partire dai corrispondenti mRNA target, non direttamente mediante degradazione dei messaggeri, ma attraverso il blocco del meccanismo traduzionale.

## 4.5. Analisi computazionale per i miRNA modificati da AS di eroina

Allo scopo di analizzare che livello di correlazione ci fosse tra i miRNA trovati modificati nel nostro studio e i geni presi in esame si è deciso di procedere, come ulteriore verifica, ad una analisi computazionale effettuata tramite il database miRWalk 2.0, che permette di integrare i risultati ottenuti grazie al suo algoritmo con quelli provenienti da altri dieci diversi database (selezionabili dall'utente). Quelli scelti per la nostra analisi sono stati tre, miRWalk, miRanda e TargetScan. Questo database ci permette inoltre di selezionare le regioni di interesse per quanto riguarda la sequenza del gene, potendo scegliere tra le regioni 3'UTR, 5'UTR, CDS (la sequenza codificante) e il promoter. In questo lavoro le regioni analizzate sono state 3'UTR, 5'UTR e CDS. Partendo dai geni precedentemente analizzati abbiamo effettuato una ricerca a ritroso per mettere in evidenza quali miRNA potessero potenzialmente agire su di essi e successivamente poter comparare questi risultati con i miRNA effettivamente modificati nel nostro esperimento (analisi dell'intero miRNoma). Sono stati presi in considerazione solo i miRNA che sono risultati predetti da tutti e tre i database in modo tale da ridurre i falsi positivi e restringere il campo di analisi.

### 4.5.1 BDNF

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 143 miRNA in 3'UTR. Tra questi 5 miRNA in NAc shell, 15 in NAc core, 7 in PFCX e 12 in CPU (6 comuni a più di una regione) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma (Tab.13a e 13b).

miRNA BDNF	3'UTR	Tabella 13a			
let-7a-1-3p	miR-150-3p	miR-210-5p	miR-328a-3p	miR-3596c	miR-532-5p
let-7b-3p	miR-15b-5p	miR-21-3p	miR-328b-3p	miR-3596d	miR-543-5p
let-7c-2-3p	miR-16-5p	miR-216a-3p	miR-330-3p	miR-363-5p	miR-547-3p
let-7f-1-3p	miR-17-2-3p	miR-216a-5p	miR-33-3p	miR-370-3p	miR-551b-5p
let-7i-3p	miR-182	miR-216b-3p	miR-336-5p	miR-376b-5p	miR-568
miR-101b-5p	miR-184	miR-218a-5p	miR-337-3p	miR-376c-5p	miR-582-5p
miR-103-3p	miR-1843-5p	miR-26a-5p	miR-344i	miR-377-3p	miR-6331
miR-107-3p	miR-185-5p	miR-26b-5p	miR-34a-5p	miR-382-3p	miR-632
miR-1199-5p	miR-186-5p	miR-27a-3p	miR-34b-3p	miR-382-5p	miR-6328
miR-125a-5p	miR-190a-5p	miR-27a-5p	miR-34b-5p	miR-383-3p	miR-653-5p
miR-125b-5p	miR-190b-5p	miR-27b-3p	miR-34c-3p	miR-411-3p	miR-664-3p
miR-126b	miR-1912-3p	miR-28-5p	miR-34c-5p	miR-425-5p	miR-665
miR-127-5p	miR-1912-5p	miR-298-3p	miR-351-5p	miR-449a-5p	miR-672-3p
miR-128-3p	miR-191a-3p	miR-3065-3p	miR-3541	miR-449c-5p	miR-673-5p
miR-129-1-3p	miR-191a-5p	miR-3065-5p	miR-3548	miR-463-5p	miR-708-5p
miR-129-2-3p	miR-191b	miR-3085	miR-3551-3p	miR-466b-2-3p	miR-711
miR-129-5p	miR-194-3p	miR-30a-3p	miR-3559-5p	miR-466c-3p	miR-7a-1-3p
miR-1306-5p	miR-195-5p	miR-30b-3p	miR-3564	miR-487b-5p	miR-872-3p
miR-130a-5p	miR-196a-3p	miR-30d-3p	miR-3566	miR-490-5p	miR-880-5p
miR-130b-5p	miR-202-5p	miR-30e-3p	miR-3573-3p	miR-495	miR-98-3p

miR-133b-5p	miR-203a-3p	miR-3120	miR-322-5p	miR-3592	miR-509-5p
miR-1-3p	miR-203a-5p	miR-31a-3p	miR-32-3p	miR-3595	miR-511-5p
miR-140-3p	miR-206-3p	miR-31b	miR-3583-5p	miR-497-3p	miR-9b-5p
miR-146b-3p	miR-207	miR-320-3p	miR-3584-5p	miR-497-5p	

Tabella 13b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
let-7b-3p		x		x
miR-3065-5p	x		x	
miR-30b-3p	x		x	
miR-3596c	x			x
miR-377-3p	x			x
miR-708-5p			x	x

**Tabella 13a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene BDNF complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR sono stati predetti per BDNF 25 miRNA e di questi 4 in NAc shell e 4 in NAc core (1 comune ad entrambe le aree) sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma (**Tab.14a e 14b**).

miRNA BDNF	5'UTR	Tabella 14a	
miR-1188-5p	miR-212-5p	miR-344g	miR-702-3p
miR-1193-3p	miR-222-5p	miR-3473	miR-7a-5p
miR-18a-3p	miR-24-3p	miR-3586-5p	miR-7b
miR-190a-3p	miR-3099	miR-3590-3p	miR-872-5p
miR-201-5p	miR-331-5p	miR-370-5p	
miR-204-5p	miR-339-5p	miR-381-5p	
miR-211-5p	miR-344b-5p	miR-409a-5p	

Tabella 14b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-3586-5p		x	x	

**Tabella 14a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene BDNF complementari alla regione 5'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, viola miRNA comuni a più di una regione.

Nella regione CDS sono stati predetti 33 miRNA per BDNF tra i quali 8 in NAc core, 1 in PFCX e 1 in CPU (1 comune a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (**Tab.15a e 15b**).

miRNA BDNF	CDS	Tabella 15a	
let-7c-1-3p	miR-18a-3p	miR-3572	miR-6327
miR-103-1-5p	miR-200b-3p	miR-376a-3p	miR-673-3p
miR-103-2-5p	miR-200c-3p	miR-376b-3p	miR-764-3p
miR-107-5p	miR-205	miR-429	miR-764-5p
miR-1188-3p	miR-20b-3p	miR-466b-1-3p	miR-874-3p
miR-124-3p	miR-298-5p	miR-493-5p	miR-93-3p
miR-129-5p	miR-3557-3p	miR-543-5p	
miR-137-3p	miR-3557-5p	miR-6216	

miR-17-1-3p	miR-3561-3p	miR-6321
-------------	-------------	----------

Tabella 15b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-429	x		x	

**Tabella 15a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene BDNF complementari alla regione CDS; blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.2. CCKBR

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 43 miRNA in 3'UTR. Tra questi 1 miRNA in NAc shell, 6 in NAc core, 1 in PFCX e 2 in CPU (1 comune a più di una regione) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma (Tab.16a e 16b).

miRNA CCKBR	3'UTR	Tabella 16a	
miR-124-5p	miR-17-2-3p	miR-3569	miR-488-3p
miR-129-1-3p	miR-191a-3p	miR-3584-5p	miR-501-5p
miR-129-2-3p	miR-201-3p	miR-361-5p	miR-505-5p
miR-129-5p	miR-202-5p	miR-365-5p	miR-544-3p
miR-130a-3p	miR-224-5p	miR-376a-5p	miR-582-3p
miR-130b-3p	miR-29b-1-5p	miR-376b-5p	miR-592
miR-130b-5p	miR-301a-3p	miR-376c-5p	miR-632
miR-135b-3p	miR-301b-3p	miR-380-5p	miR-6326
miR-148b-3p	miR-30a-3p	miR-412-3p	miR-6330
miR-150-5p	miR-30d-3p	miR-466d	miR-665
miR-152-3p	miR-30e-3p	miR-471-3p	

Tabella 16b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-135b-3p	x			x

**Tabella 16a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene CCKBR complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR è stato predetto per CCKBR un solo miRNA (miR-1199-3p) non presente in nessuna regione all'analisi del miRNoma.

Nella regione CDS sono stati predetti 73 miRNA per CCKBR tra i quali 6 in NAc shell, 11 in NAc core, 3 in PFCX e 7 in CPU (6 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (Tab.17a e 17b).

miRNA CCKBR	CDS	Tabella 17a	
let-7a-5p	miR-16-5p	miR-322-5p	miR-652-3p
let-7b-5p	miR-181a-1-3p	miR-34b-3p	miR-653-5p
let-7c-5p	miR-181b-1-3p	miR-34c-3p	miR-665

let-7d-5p	miR-181c-3p	miR-351-5p	miR-666-5p
let-7e-5p	miR-1839-5p	miR-3557-3p	miR-667-5p
let-7f-5p	miR-1843-5p	miR-3583-5p	miR-671
let-7i-5p	miR-193-3p	miR-3594-5p	miR-672-3p
miR-103-1-5p	miR-195-5p	miR-377-5p	miR-672-5p
miR-103-2-5p	miR-199a-5p	miR-383-3p	miR-673-5p
miR-103-3p	miR-214-3p	miR-411-5p	miR-758-5p
miR-107-3p	miR-217-5p	miR-425-3p	miR-761
miR-107-5p	miR-222-5p	miR-455-3p	miR-770-5p
miR-122-5p	miR-24-3p	miR-455-5p	miR-871-3p
miR-125a-5p	miR-291a-5p	miR-465-5p	miR-874-5p
miR-125b-5p	miR-296-5p	miR-485-5p	miR-92a-1-5p
miR-134-3p	miR-29b-2-5p	miR-487b-5p	miR-98-5p
miR-143-3p	miR-300-3p	miR-497-5p	
miR-153-5p	miR-3072	miR-6315	
miR-15b-5p	miR-3085	miR-6321	

Tabella 17b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
let-7b-5p		x		x
miR-181c-3p		x		x
miR-193-3p		x	x	
miR-199a-5p			x	x
miR-377-5p	x			x
miR-666-5p			x	x

**Tabella 17a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene CCKBR complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.3. CLOCK

Non vi sono per questo gene miRNA predetti per la regione 3'UTR e 5'UTR.

Nella regione CDS sono stati predetti 120 miRNA per CLOCK tra i quali 2 in NAc shell, 17 in NAc core, 8 in PFCX e 5 in CPU (1 comune a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (Tab.18a e 18b).

miRNA CLOCK	CDS	Tabella 18a		
let-7a-2-3p	miR-153-5p	miR-3085	miR-3575	miR-628
let-7d-3p	miR-17-5p	miR-30a-5p	miR-3584-5p	miR-6316
miR-101a-3p	miR-181a-2-3p	miR-30b-5p	miR-3585-5p	miR-632
miR-101b-3p	miR-1912-3p	miR-30c-5p	miR-3588	miR-6322
miR-105	miR-1912-5p	miR-30d-5p	miR-370-3p	miR-6323
miR-106b-5p	miR-194-3p	miR-30e-5p	miR-376b-5p	miR-6329
miR-1188-5p	miR-203b-3p	miR-320-3p	miR-376c-5p	miR-664-1-5p
miR-1193-5p	miR-204-3p	miR-322-3p	miR-382-5p	miR-664-2-5p



miR-125a-3p	miR-206-3p	miR-326-3p	miR-383-5p	miR-675-5p
miR-129-1-3p	miR-20a-5p	miR-330-5p	miR-384-5p	miR-678
miR-129-2-3p	miR-20b-5p	miR-335	miR-411-5p	miR-759
miR-129-5p	miR-214-3p	miR-338-3p	miR-421-3p	miR-761
miR-1298	miR-216a-3p	miR-340-3p	miR-425-3p	miR-764-3p
miR-1306-3p	miR-216a-5p	miR-343	miR-433-3p	miR-764-5p
miR-130a-5p	miR-219a-1-3p	miR-344a-3p	miR-448-3p	miR-802-3p
miR-133c	miR-219a-5p	miR-344b-5p	miR-455-3p	miR-874-5p
miR-134-5p	miR-22-5p	miR-344g	miR-466d	miR-878
miR-138-5p	miR-26a-3p	miR-345-5p	miR-483-3p	miR-881-3p
miR-139-5p	miR-26a-5p	miR-351-3p	miR-495	miR-883-5p
miR-1-3p	miR-26b-5p	miR-3543	miR-511-5p	miR-93-3p
miR-141-5p	miR-291a-3p	miR-3561-5p	miR-532-5p	miR-93-5p
miR-143-5p	miR-295-3p	miR-3568	miR-540-5p	miR-96-5p
miR-146a-3p	miR-29a-5p	miR-3573-3p	miR-544-3p	miR-9a-5p
miR-148b-5p	miR-3075	miR-3574	miR-551b-5p	miR-9b-3p

Tabella 18b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-138-5p	x		x	

**Tabella 18a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene CLOCK complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAC shell, blu in NAC core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.4. CREB

Per l'mRNA codificato da questo gene è stato predetto un solo miRNA (miR-455-3p) complementare alla regione 3'UTR e uno (miR-150-3p) per la regione 5'UTR. Nessuno dei due presentava modifiche all'analisi del miRNoma. Nella regione CDS sono stati predetti 73 miRNA per CREB tra i quali 1 in NAC shell, 10 in NAC core, 3 in PFCX e 5 in CPU (1 comune a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (**Tab.19a e19b**).

miRNA CREB	CDS	Tabella 19a	
miR-103-1-5p	miR-203b-3p	miR-3548	miR-6316
miR-103-2-5p	miR-20a-3p	miR-3568	miR-6319
miR-103-3p	miR-212-5p	miR-3575	miR-6326
miR-105	miR-214-3p	miR-3583-3p	miR-6327
miR-107-3p	miR-216a-3p	miR-3593-5p	miR-664-1-5p
miR-107-5p	miR-218b	miR-362-5p	miR-664-2-5p
miR-10b-5p	miR-224-3p	miR-378a-3p	miR-667-5p
miR-1193-5p	miR-22-5p	miR-410-5p	miR-702-5p
miR-122-3p	miR-26b-3p	miR-448-3p	miR-761
miR-130b-5p	miR-291a-3p	miR-490-5p	miR-7a-5p
miR-137-3p	miR-294	miR-493-5p	miR-7b
miR-146a-3p	miR-29a-5p	miR-494-5p	miR-872-5p

miR-15b-5p	miR-322-5p	miR-496-5p	miR-873-3p
miR-16-5p	miR-324-3p	miR-497-5p	miR-876
miR-17-2-3p	miR-331-3p	miR-499-3p	miR-935
miR-191a-3p	miR-33-3p	miR-500-5p	miR-96-5p
miR-194-3p	miR-33-5p	miR-509-5p	
miR-195-5p	miR-346	miR-544-3p	
miR-196c-3p	miR-3544	miR-6314	

Tabella 19b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-410-5p			x	x

**Tabella 19a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene CREB complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.5. DRD3

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 3 miRNA in 3'UTR (miR-1193-5p, miR-207 e miR-6318) Tra questi nessuno risultava modificato all'analisi del miRNoma.

In 5'UTR sono stati predetti per DRD3 11 miRNA e di questi 1 in NAc core e 1 in CPU sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma (**Tab.20**).

miRNA DRD3	5'UTR	Tabella 20	
miR-134-3p	miR-344a	miR-3559-5p	miR-6334
miR-299a-3p	miR-344a-5p	miR-384-3p	miR-743b-3p
miR-299b-3p	miR-3542	miR-484	

**Tabella 20**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene DRD3 complementari alla regione 5'UTR; in blu i miRNA modificati in NAc core, giallo in CPU.

Nella regione CDS sono stati predetti 82 miRNA per DRD3 tra i quali 4 in NAc shell, 10 in NAc core, 5 in PFCX e 7 in CPU (6 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (**Tab.21a e 21b**).

miRNA DRD3	CDS	Tabella 21a	
miR-100-3p	miR-26b-3p	miR-34a-5p	miR-6326
miR-1188-5p	miR-28-5p	miR-34b-5p	miR-6334
miR-125a-3p	miR-296-3p	miR-34c-5p	miR-666-3p
miR-1306-5p	miR-296-5p	miR-3551-3p	miR-672-3p
miR-136-5p	miR-300-5p	miR-3552	miR-673-5p
miR-15b-5p	miR-3065-3p	miR-3557-3p	miR-708-5p
miR-1-5p	miR-3068-5p	miR-3559-3p	miR-742-3p
miR-16-5p	miR-3085	miR-3561-3p	miR-7578
miR-183-5p	miR-30b-3p	miR-3590-3p	miR-758-5p
miR-194-3p	miR-3120	miR-383-3p	miR-760-3p
miR-1949	miR-322-5p	miR-449a-5p	miR-760-5p
miR-195-5p	miR-323-5p	miR-449c-5p	miR-761
miR-196a-5p	miR-325-3p	miR-484	miR-7a-5p

miR-196b-5p	miR-326-3p	miR-485-5p	miR-7b
miR-196c-5p	miR-327	miR-489-3p	miR-874-5p
miR-203b-3p	miR-328a-3p	miR-490-3p	miR-878
miR-206-5p	miR-328b-3p	miR-497-5p	miR-92a-2-5p
miR-214-3p	miR-330-5p	miR-615	miR-93-3p
miR-216a-3p	miR-343	miR-6314	miR-9a-3p
miR-221-5p	miR-344a	miR-6323	
miR-24-3p	miR-344a-5p	miR-6324	

Tabella 21b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-30b-3p	x		x	
miR-489-3p		x		x
miR-666-3p			x	x
miR-708-5p			x	x
miR-760-3p	x		x	
miR-760-5p		x	x	

**Tabella 21a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene DRD3 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.6. MeCP2

Per l'mRNA codificato da questo gene non sono stati predetti miRNA in 3'UTR.

In 5'UTR sono stati predetti 22 miRNA e di questi 2 in PFCX e 2 in CPU (1 comune alle 2 aree) sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma (**Tab.22a e 22b**).

miRNA MeCP2	5'UTR	Tabella 22a	
miR-10b-5p	miR-186-5p	miR-336-3p	miR-674-3p
miR-1249	miR-203b-5p	miR-351-5p	miR-872-5p
miR-125a-5p	miR-205	miR-3574	miR-879-5p
miR-125b-5p	miR-221-5p	miR-377-3p	miR-9b-3p
miR-145-3p	miR-330-5p	miR-6318	
miR-181a-2-3p	miR-335	miR-673-3p	

Tabella 22b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-377-3p	x			x

**Tabella 22a,b**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MeCP2 complementari alla regione 5'UTR; in verde i miRNA modificati in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

Nella regione CDS sono stati predetti 139 miRNA per MeCP2 tra i quali 12 in NAc shell, 26 in NAc core, 13 in PFCX e 11 in CPU (11 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (**Tab.23a e 23b**).

miRNA MeCP2	CDS	Tabella 23a			
let-7i-3p	miR-155-5p	miR-29a-3p	miR-3577	miR-489-3p	miR-674-5p
miR-10a-5p	miR-181a-1-3p	miR-29b-3p	miR-361-3p	miR-494-5p	miR-678
miR-1188-5p	miR-181b-2-3p	miR-29c-3p	miR-362-5p	miR-496-5p	miR-711
miR-1193-3p	miR-181c-3p	miR-300-5p	miR-363-3p	miR-500-5p	miR-759
miR-1193-5p	miR-184	miR-30a-3p	miR-363-5p	miR-501-5p	miR-760-5p
miR-1199-3p	miR-185-3p	miR-30b-3p	miR-365-5p	miR-503-5p	miR-764-3p
miR-1199-5p	miR-186-3p	miR-30d-3p	miR-370-3p	miR-509-5p	miR-770-5p
miR-1224	miR-18a-5p	miR-30e-3p	miR-370-5p	miR-511-3p	miR-7a-5p
miR-124-3p	miR-191a-5p	miR-32-5p	miR-375-5p	miR-532-3p	miR-7b
miR-127-5p	miR-192-3p	miR-326-3p	miR-377-5p	miR-540-5p	miR-871-3p
miR-128-1-5p	miR-193-5p	miR-326-5p	miR-378a-3p	miR-544-3p	miR-874-5p
miR-128-2-5p	miR-194-3p	miR-330-5p	miR-380-5p	miR-582-5p	miR-878
miR-130b-5p	miR-19b-1-5p	miR-331-3p	miR-383-5p	miR-615	miR-879-5p
miR-133a-5p	miR-19b-2-5p	miR-337-3p	miR-409b	miR-6314	miR-92a-1-5p
miR-133c	miR-203a-3p	miR-340-3p	miR-410-5p	miR-6317	miR-92a-2-5p
miR-134-5p	miR-208a-5p	miR-344a	miR-412-5p	miR-6318	miR-92a-3p
miR-135b-3p	miR-208b-5p	miR-344a-5p	miR-423-5p	miR-6324	miR-92b-3p
miR-136-3p	miR-210-5p	miR-344b-5p	miR-434-3p	miR-6326	miR-92b-5p
miR-138-5p	miR-22-3p	miR-344g	miR-463-5p	miR-6333	miR-93-3p
miR-140-3p	miR-24-3p	miR-345-5p	miR-466c-5p	miR-6334	
miR-144-3p	miR-25-3p	miR-346	miR-483-3p	miR-653-3p	
miR-145-5p	miR-27a-3p	miR-3552	miR-483-5p	miR-666-3p	
miR-151-5p	miR-27b-3p	miR-3557-5p	miR-484	miR-667-5p	
miR-153-5p	miR-298-5p	miR-3573-5p	miR-485-5p	miR-672-5p	

Tabella 23b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-135b-3p	x			x
miR-138-5p	x		x	
miR-181c-3p		x		x
miR-192-3p	x	x	x	
miR-193-5p		x	x	
miR-30b-3p	x		x	
miR-377-5p	x			x
miR-410-5p			x	x
miR-489-3p		x		x
miR-666-3p			x	x
miR-760-5p		x	x	

**Tabella 23a e 23b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MeCP2 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.7. NOS1

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 7 miRNA in 3'UTR. Tra questi solo 1 in CPU è risultato modificato all'analisi del miRNoma(**Tab.24**).

miRNA NOS1	3'UTR	Tabella 24	
miR-1199-3p	miR-326-5p	miR-3562	miR-466d
miR-1249	miR-328a-5p	miR-3574	

**Tabella 24** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS1 complementari alla regione 3'UTR; in giallo i miRNA modificati in CPU.

In 5'UTR sono stati predetti per NOS1 4 miRNA e di questi 1 in CPU risultava modificato nella prima analisi del miRNoma(**Tab.25**).

miRNA NOS1	5'UTR	Tabella 25	
miR-31a-5p	miR-335	miR-3544	miR-873-5p

**Tabella 25**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS1 complementari alla regione 5'UTR; in giallo i miRNA modificati in CPU.

Nella regione CDS sono stati predetti 221 miRNA per NOS1 tra i quali 16 in NAc shell, 31 in NAc core, 18 in PFCX e 17 in CPU (16 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma(**Tab.26a e 26b**).

miRNA NOS1	CDS	Tabella 26a			
let-7a-2-3p	miR-141-5p	miR-21-3p	miR-338-3p	miR-378a-3p	miR-6320
let-7a-5p	miR-143-3p	miR-214-5p	miR-340-3p	miR-378b	miR-6321
let-7b-5p	miR-143-5p	miR-216b-5p	miR-342-3p	miR-380-3p	miR-6323
let-7c-5p	miR-145-3p	miR-218a-1-3p	miR-342-5p	miR-382-5p	miR-6327
let-7d-5p	miR-146a-3p	miR-218b	miR-343	miR-409b	miR-6328
let-7e-5p	miR-146a-5p	miR-219a-5p	miR-345-5p	miR-410-5p	miR-6331
let-7f-2-3p	miR-146b-5p	miR-219b	miR-349	miR-412-3p	miR-6333
let-7f-5p	miR-147	miR-23a-3p	miR-351-5p	miR-421-5p	miR-664-1-5p
let-7i-5p	miR-15b-5p	miR-23a-5p	miR-352	miR-423-3p	miR-664-2-5p
miR-103-1-5p	miR-1-5p	miR-23b-3p	miR-3541	miR-423-5p	miR-664-3p
miR-103-2-5p	miR-16-5p	miR-25-5p	miR-3543	miR-425-5p	miR-665
miR-103-3p	miR-181a-1-3p	miR-27a-3p	miR-3549	miR-449c-3p	miR-666-3p
miR-107-3p	miR-181a-2-3p	miR-27b-3p	miR-3550	miR-466c-5p	miR-667-5p
miR-107-5p	miR-181c-3p	miR-28-5p	miR-3551-3p	miR-483-3p	miR-668
miR-1224	miR-1839-5p	miR-296-5p	miR-3551-5p	miR-485-5p	miR-671
miR-124-3p	miR-185-3p	miR-299a-3p	miR-3552	miR-490-5p	miR-672-3p
miR-1249	miR-186-3p	miR-299b-3p	miR-3557-3p	miR-493-5p	miR-672-5p
miR-125a-5p	miR-18a-5p	miR-29a-3p	miR-3561-5p	miR-494-5p	miR-674-3p
miR-125b-5p	miR-190a-3p	miR-29b-3p	miR-3569	miR-496-5p	miR-674-5p
miR-128-3p	miR-192-3p	miR-29c-3p	miR-3573-5p	miR-497-5p	miR-678
miR-129-5p	miR-193-5p	miR-300-3p	miR-3574	miR-499-3p	miR-708-5p

miR-1306-5p	miR-195-5p	miR-300-5p	miR-3575	miR-503-5p	miR-759
miR-130b-5p	miR-196a-5p	miR-3065-3p	miR-3576	miR-505-5p	miR-760-5p
miR-132-5p	miR-196b-3p	miR-3072	miR-3580-5p	miR-509-5p	miR-770-3p
miR-133a-3p	miR-196b-5p	miR-3085	miR-3584-5p	miR-511-3p	miR-7a-5p
miR-133a-5p	miR-196c-5p	miR-30c-1-3p	miR-3587	miR-532-3p	miR-7b
miR-133b-3p	miR-199a-3p	miR-30c-2-3p	miR-3589	miR-539-5p	miR-873-3p
miR-133c	miR-199a-5p	miR-3120	miR-3590-5p	miR-540-3p	miR-873-5p
miR-134-3p	miR-200a-3p	miR-320-5p	miR-3591	miR-544-5p	miR-879-5p
miR-135a-5p	miR-201-3p	miR-322-5p	miR-3593-5p	miR-547-5p	miR-880-5p
miR-135b-5p	miR-203b-3p	miR-323-5p	miR-3594-5p	miR-598-3p	miR-883-3p
miR-136-5p	miR-203b-5p	miR-326-3p	miR-361-3p	miR-615	miR-883-5p
miR-138-1-3p	miR-204-3p	miR-326-5p	miR-365-3p	miR-628	miR-93-3p
miR-138-5p	miR-204-5p	miR-327	miR-369-5p	miR-6314	miR-98-5p
miR-139-3p	miR-206-5p	miR-330-5p	miR-370-3p	miR-6316	miR-9a-5p
miR-140-3p	miR-211-5p	miR-331-3p	miR-375-3p	miR-6318	miR-9b-3p
miR-141-3p	miR-212-5p	miR-336-3p	miR-377-5p	miR-6319	

Tabella 26b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
let-7b-5p		x		x
miR-135a-5p	x		x	
miR-135b-5p	x			x
miR-138-5p	x		x	
miR-181c-3p		x		x
miR-192-3p	x	x	x	
miR-193-5p		x	x	
miR-199a-5p			x	x
miR-218a-1-3p	x			x
miR-342-5p	x		x	
miR-3550	x	x		
miR-377-5p	x			x
miR-410-5p			x	x
miR-666-3p			x	x
miR-708-5p			x	x
miR-760-5p		x	x	

**Tabella 26a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS1 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.8. NOS2

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 6 miRNA in 3'UTR. Tra questi 1 miRNA in NAc shell, 1 in NAc core sono risultati modificati all'analisi del miRNoma(**Tab.27**).

miRNA NOS2	3'UTR
miR-143-3p	miR-199a-3p
miR-153-5p	miR-3570
miR-185-5p	miR-877

**Tabella 27** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS2 complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core.

In 5'UTR sono stati predetti per NOS25 miRNA e di questi nessuno è risultato modificato nella prima analisi del miRNoma(**Tab.28**).

miRNA NOS2	5'UTR
miR-218a-5p	miR-3580-3p
miR-26b-3p	miR-497-3p
miR-3561-5p	

**Tabella 28**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS2 complementari alla regione 5'UTR.

Nella regione CDS sono stati predetti 141 miRNA per NOS2 tra i quali 8 in NAc shell, 16 in NAc core, 12 in PFCX e 14 in CPU (9 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma(**Tab.29a e 29b**).

miRNA NOS2	CDS	Tabella 29a			
miR-103-1-5p	miR-140-3p	miR-22-3p	miR-330-3p	miR-421-5p	miR-665
miR-103-2-5p	miR-141-5p	miR-23a-3p	miR-330-5p	miR-423-5p	miR-666-3p
miR-105	miR-143-5p	miR-23b-3p	miR-331-5p	miR-429	miR-672-3p
miR-107-5p	miR-154-5p	miR-23b-5p	miR-33-3p	miR-433-3p	miR-674-3p
miR-10b-3p	miR-185-3p	miR-28-5p	miR-33-5p	miR-466c-5p	miR-675-3p
miR-1188-3p	miR-188-5p	miR-291a-3p	miR-346	miR-466d	miR-675-5p
miR-1193-3p	miR-18a-3p	miR-295-3p	miR-352	miR-471-5p	miR-678
miR-122-3p	miR-1912-3p	miR-299a-3p	miR-3556a	miR-485-5p	miR-708-5p
miR-124-3p	miR-193-5p	miR-299b-3p	miR-3562	miR-504	miR-711
miR-125a-3p	miR-199a-3p	miR-300-5p	miR-3573-5p	miR-505-5p	miR-7578
miR-126a-3p	miR-199a-5p	miR-301a-5p	miR-3580-5p	miR-541-5p	miR-758-3p
miR-128-3p	miR-200b-3p	miR-301b-5p	miR-3584-5p	miR-542-3p	miR-759
miR-129-5p	miR-200c-3p	miR-3065-3p	miR-3590-3p	miR-543-3p	miR-760-3p
miR-1306-5p	miR-203b-5p	miR-3068-5p	miR-3590-5p	miR-544-3p	miR-761
miR-130b-5p	miR-204-3p	miR-30b-3p	miR-3593-5p	miR-544-5p	miR-770-3p
miR-132-5p	miR-206-5p	miR-320-5p	miR-3594-3p	miR-547-5p	miR-873-5p
miR-133a-5p	miR-20a-3p	miR-323-5p	miR-3594-5p	miR-615	miR-876
miR-133b-5p	miR-210-3p	miR-325-3p	miR-361-3p	miR-6215	miR-883-5p
miR-133c	miR-210-5p	miR-326-3p	miR-369-3p	miR-6314	miR-92a-1-5p
miR-134-3p	miR-21-3p	miR-326-5p	miR-370-5p	miR-6318	miR-93-3p
miR-135a-5p	miR-214-3p	miR-327	miR-374-3p	miR-6323	miR-9b-3p
miR-135b-5p	miR-216b-5p	miR-328a-3p	miR-378a-3p	miR-6326	
miR-136-5p	miR-218a-5p	miR-328a-5p	miR-383-5p	miR-6327	
miR-138-2-3p	miR-219b	miR-328b-3p	miR-409a-3p	miR-6333	

Tabella 29b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-135a-5p	x		x	
miR-135b-5p	x			x
miR-193-5p		x	x	
miR-199a-5p			x	x
miR-30b-3p	x		x	
miR-429	x		x	
miR-666-3p			x	x
miR-708-5p			x	x
miR-760-3p	x		x	

**Tabella 29a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS2 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.9. MOR1

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 92 miRNA in 3'UTR. Tra questi 4 miRNA in NAc shell, 8 in NAc core, 2 in PFCX e 8 in CPU (2 comuni a più di una regione) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma (**Tab.30a e 30b**).

miRNA MOR 1	3'UTR	Tabella 30a	
let-7a-5p	miR-187-5p	miR-329-3p	miR-501-5p
let-7b-5p	miR-188-3p	miR-336-3p	miR-505-3p
let-7c-5p	miR-188-5p	miR-342-3p	miR-532-3p
let-7d-5p	miR-1912-5p	miR-344a	miR-539-5p
let-7e-5p	miR-203b-5p	miR-344a-5p	miR-540-3p
let-7f-5p	miR-204-5p	miR-34b-3p	miR-540-5p
let-7i-5p	miR-20b-3p	miR-34c-3p	miR-544-3p
miR-1188-5p	miR-211-5p	miR-350	miR-632
miR-122-5p	miR-214-3p	miR-3542	miR-6323
miR-124-5p	miR-216b-3p	miR-3551-3p	miR-6334
miR-1306-5p	miR-216b-5p	miR-3553	miR-653-3p
miR-134-5p	miR-218a-2-3p	miR-3557-3p	miR-708-3p
miR-139-5p	miR-218a-5p	miR-3557-5p	miR-741-5p
miR-140-3p	miR-219a-2-3p	miR-3560	miR-742-5p
miR-141-5p	miR-29b-2-5p	miR-3569	miR-743a-5p
miR-143-5p	miR-29b-2-5p	miR-3573-3p	miR-743b-5p
miR-151-3p	miR-300-5p	miR-3589	miR-759
miR-152-5p	miR-3068-3p	miR-362-3p	miR-761
miR-153-5p	miR-3068-5p	miR-369-3p	miR-7a-2-3p
miR-1-5p	miR-30a-3p	miR-376c-3p	miR-871-5p
miR-17-1-3p	miR-30d-3p	miR-484	miR-877
miR-181a-2-3p	miR-30e-3p	miR-488-5p	miR-881-5p
miR-181b-2-3p	miR-3120	miR-493-5p	miR-98-5p



Tabella 30b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
let-7b-5p		x		x
miR-708-3p			x	x

**Tabella 30a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MOR1 complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR sono stati predetti per MOR112 miRNA e di questi 2 in NAc core e 1 in PFCX sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma(**Tab.31**).

miRNA MOR 1	5'UTR	Tabella 31	
miR-185-3p	miR-22-3p	miR-3580-3p	miR-6328
miR-18a-3p	miR-23a-5p	miR-3580-5p	miR-673-5p
miR-207	miR-3072	miR-370-3p	miR-880-5p

**Tabella 31**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MOR1 complementari alla regione 5'UTR; in blu i miRNA modificati in NAc core, verde in PFCX.

Nella regione CDS sono stati predetti 80 miRNA per MOR1 tra i quali 3 in NAc shell, 15 in NAc core, 9 in PFCX e 8 in CPU (4 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma(**Tab.32a e 32b**).

miRNA MOR 1	CDS	Tabella 32a	
miR-105	miR-203a-3p	miR-323-3p	miR-451-3p
miR-10b-3p	miR-218a-2-3p	miR-328a-3p	miR-466c-3p
miR-1188-3p	miR-22-5p	miR-328b-3p	miR-487b-5p
miR-1224	miR-23a-3p	miR-330-3p	miR-488-3p
miR-128-3p	miR-23b-3p	miR-336-3p	miR-490-5p
miR-133c	miR-291a-3p	miR-346	miR-505-5p
miR-138-5p	miR-2985	miR-34a-5p	miR-544-3p
miR-145-3p	miR-298-5p	miR-34b-5p	miR-615
miR-145-5p	miR-29a-3p	miR-34c-5p	miR-6320
miR-153-5p	miR-29b-2-5p	miR-3551-3p	miR-6331
miR-1-5p	miR-29b-3p	miR-3556a	miR-664-1-5p
miR-186-3p	miR-29c-3p	miR-3559-3p	miR-664-2-5p
miR-193-3p	miR-29c-5p	miR-3561-3p	miR-665
miR-196a-5p	miR-3065-3p	miR-3568	miR-667-5p
miR-196b-5p	miR-3068-5p	miR-3577	miR-672-3p
miR-196c-5p	miR-3085	miR-3589	miR-672-5p
miR-19b-1-5p	miR-30b-3p	miR-3594-5p	miR-675-5p
miR-19b-2-5p	miR-30c-1-3p	miR-377-5p	miR-743b-3p
miR-200a-5p	miR-30c-2-3p	miR-449a-5p	miR-743b-5p
miR-200b-5p	miR-3120	miR-449c-5p	miR-92a-1-5p

Tabella 32b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-138-5p	x		x	
miR-193-3p		x	x	

miR-30b-3p	x		x	
miR-377-5p	x			x

**Tabella 32a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MOR1 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.10. SIRT1

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 103 miRNA in 3'UTR. Tra questi 6 miRNA in NAc shell, 13 in NAc core, 8 in PFCX e 7 in CPU (8 comuni a più di una regione) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma (Tab.33a e 33b).

miRNA SIRT1	3'UTR	Tabella 33a	
let-7c-1-3p	miR-200a-3p	miR-30d-5p	miR-466b-2-3p
miR-1188-3p	miR-200b-3p	miR-30e-5p	miR-488-3p
miR-1188-5p	miR-200c-3p	miR-31b	miR-494-3p
miR-125b-2-3p	miR-201-3p	miR-320-5p	miR-499-5p
miR-128-3p	miR-203b-3p	miR-323-3p	miR-539-3p
miR-132-3p	miR-204-5p	miR-328a-5p	miR-540-3p
miR-135a-3p	miR-208a-5p	miR-32-3p	miR-543-3p
miR-135a-5p	miR-208b-5p	miR-338-5p	miR-544-3p
miR-135b-5p	miR-20a-3p	miR-3542	miR-544-5p
miR-138-5p	miR-20b-3p	miR-3557-5p	miR-6215
miR-140-3p	miR-211-5p	miR-3560	miR-6216
miR-141-3p	miR-212-3p	miR-3564	miR-628
miR-150-5p	miR-21-3p	miR-3570	miR-6315
miR-153-5p	miR-217-5p	miR-3583-3p	miR-6317
miR-154-3p	miR-22-3p	miR-3590-3p	miR-6322
miR-17-1-3p	miR-23a-3p	miR-3595	miR-6325
miR-181a-5p	miR-23b-3p	miR-361-5p	miR-653-5p
miR-181b-5p	miR-27a-3p	miR-369-3p	miR-664-3p
miR-181c-5p	miR-27b-3p	miR-380-5p	miR-743a-5p
miR-181d-5p	miR-290	miR-381-3p	miR-743b-5p
miR-1843-5p	miR-292-5p	miR-384-5p	miR-802-5p
miR-188-5p	miR-293-5p	miR-421-3p	miR-871-5p
miR-190a-3p	miR-298-3p	miR-429	miR-881-3p
miR-190b-3p	miR-30a-5p	miR-448-3p	miR-881-5p
miR-192-3p	miR-30b-5p	miR-455-3p	miR-9a-5p
miR-199a-5p	miR-30c-5p	miR-466b-1-3p	

Tabella 33b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-135a-3p	x		x	
miR-135a-5p	x		x	
miR-135b-5p	x			x

miR-138-5p	x		x	
miR-181c-5p		x		x
miR-192-3p	x	x	x	
miR-199a-5p			x	x
miR-429	x		x	

**Tabella 33a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene SIRT1 complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR non è stato predetto per SIRT1 nessun miRNA.

Nella regione CDS sono stati predetti 104 miRNA per SIRT1 tra i quali 5 in NAc shell, 19 in NAc core, 9 in PFCX e 9 in CPU (7 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (Tab.34a e 34b).

miRNA SIRT1	CDS	Tabella 34a	
let-7a-2-3p	miR-296-5p	miR-3559-3p	miR-6324
miR-1193-3p	miR-298-5p	miR-3568	miR-6325
miR-1199-3p	miR-29a-3p	miR-3570	miR-6331
miR-125a-3p	miR-29a-5p	miR-3587	miR-652-3p
miR-129-5p	miR-29b-3p	miR-3589	miR-664-1-5p
miR-132-5p	miR-29c-3p	miR-3594-5p	miR-664-2-5p
miR-135b-5p	miR-300-5p	miR-370-3p	miR-672-5p
miR-145-3p	miR-3065-3p	miR-370-5p	miR-673-5p
miR-146a-3p	miR-3065-5p	miR-375-3p	miR-708-3p
miR-148b-5p	miR-30a-3p	miR-377-5p	miR-741-3p
miR-150-3p	miR-30c-1-3p	miR-379-3p	miR-742-3p
miR-152-5p	miR-30c-2-3p	miR-383-3p	miR-7578
miR-153-5p	miR-30d-3p	miR-411-3p	miR-758-3p
miR-155-5p	miR-30e-3p	miR-425-5p	miR-770-3p
miR-188-3p	miR-3120	miR-433-3p	miR-7a-1-3p
miR-193-5p	miR-31a-5p	miR-449c-3p	miR-7a-2-3p
miR-200c-5p	miR-326-5p	miR-450a-5p	miR-802-3p
miR-203a-5p	miR-327	miR-451-3p	miR-872-3p
miR-210-5p	miR-328a-5p	miR-455-5p	miR-873-5p
miR-216b-5p	miR-329-5p	miR-489-3p	miR-875
miR-218a-1-3p	miR-331-5p	miR-501-5p	miR-877
miR-219a-2-3p	miR-337-3p	miR-503-5p	miR-878
miR-22-5p	miR-337-5p	miR-544-3p	miR-883-5p
miR-26b-3p	miR-338-3p	miR-547-5p	miR-92a-2-5p
miR-294	miR-351-3p	miR-6320	miR-96-3p
miR-295-3p	miR-3557-3p	miR-6322	miR-9a-5p

Tabella 34b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-135b-5p	x			x
miR-193-5p		x	x	
miR-218a-1-3p	x			x

miR-3065-5p	x		x	
miR-377-5p	x			x
miR-489-3p		x		x
miR-708-3p		x		x

**Tabella 34a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene SIRT1 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.11. SIRT2

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 36 miRNA in 3'UTR. Tra questi 2 miRNA in NAc shell, 8 in NAc core, 1 in PFCX e 1 in CPU sono risultati modificati all'analisi del miRNoma(**Tab.35**).

miRNA SIRT2	3'UTR	Tabella 35	
miR-103-1-5p	miR-221-5p	miR-3584-5p	miR-539-5p
miR-103-2-5p	miR-296-5p	miR-376a-5p	miR-540-5p
miR-107-5p	miR-29b-2-5p	miR-449c-3p	miR-6215
miR-1199-5p	miR-3085	miR-466d	miR-664-1-5p
miR-134-3p	miR-30c-2-3p	miR-487b-5p	miR-664-2-5p
miR-140-5p	miR-326-3p	miR-504	miR-702-3p
miR-181d-3p	miR-330-5p	miR-505-5p	miR-711
miR-204-3p	miR-342-3p	miR-511-5p	miR-764-3p
miR-216a-3p	miR-3549	miR-532-5p	miR-874-5p

**Tabella 35:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene GENE complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU.

In 5'UTR sono stati predetti per SIRT224 miRNA e di questi 4 in NAc shell, 3 in NAc core, 3 in PFCX e 1 in CPU (2 comuni a più aree) sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma(**Tab.36a e 36b**).

miRNA SIRT2	5'UTR	Tabella 36a	
miR-125a-3p	miR-206-3p	miR-3564	miR-6318
miR-128-3p	miR-216a-3p	miR-463-5p	miR-6333
miR-135a-3p	miR-27a-3p	miR-466b-5p	miR-7578
miR-1-3p	miR-27b-3p	miR-485-5p	miR-760-5p
miR-181a-2-3p	miR-30c-1-3p	miR-490-5p	miR-883-5p
miR-194-3p	miR-329-5p	miR-540-3p	miR-93-3p

Tabella 36b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-135a-3p	x		x	
miR-760-5p		x	x	

**Tabella 36a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene SIRT2 complementari alla regione 5'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

Nella regione CDS sono stati predetti 56 miRNA per SIRT2 tra i quali 2 in NAc shell, 6 in NAc core, 1 in PFCX e 1 in CPU presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma(**Tab.37**).

miRNA SIRT2	CDS	Tabella 37	
miR-128-3p	miR-18a-5p	miR-326-3p	miR-532-3p
miR-130a-5p	miR-195-3p	miR-330-5p	miR-540-5p
miR-130b-5p	miR-195-5p	miR-337-3p	miR-541-5p
miR-133a-3p	miR-196b-3p	miR-342-3p	miR-544-5p
miR-133b-3p	miR-203b-3p	miR-343	miR-6325
miR-139-3p	miR-207	miR-349	miR-6332
miR-145-3p	miR-212-5p	miR-3552	miR-665
miR-146a-3p	miR-214-3p	miR-3557-3p	miR-668
miR-150-5p	miR-217-5p	miR-3557-5p	miR-679
miR-152-5p	miR-219a-1-3p	miR-3593-5p	miR-759
miR-153-3p	miR-294	miR-466c-5p	miR-761
miR-15b-5p	miR-3075	miR-497-5p	miR-770-3p
miR-16-5p	miR-320-5p	miR-503-5p	miR-92a-2-5p
miR-185-3p	miR-322-5p	miR-511-3p	miR-9a-5p

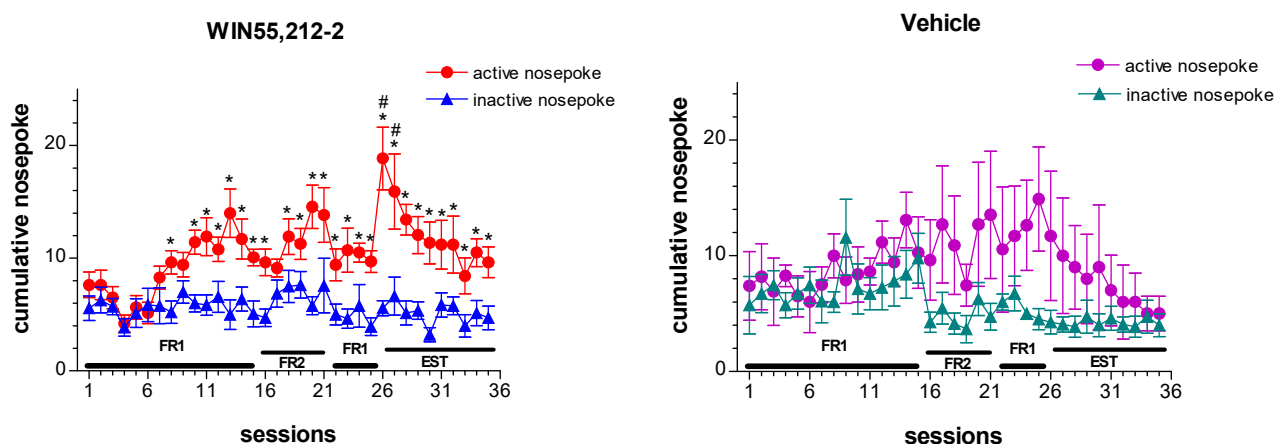
**Tabella 37** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene SIRT2 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPu.

## 5. Risultati WIN55,212-2

### 5.1. Auto-somministrazione di WIN55,212-2

La figura 23 mostra la media del numero di nose-poke cumulativi attivi e inattivi dei ratti allenati ad autosomministrarsi WIN 55,212-2 per sette settimane consecutive (Fig.dx) o soluzione fisiologica (Fig.sn). L'analisi statistica ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore nose-poke ( $F_{1,26}=42.3$ ;  $p<0.01$ ); sessione ( $F_{34,884}=3.35$ ;  $p<0.01$ ) ed una interazione significativa nose-poke x sessione ( $F_{34,884}=2.2$ ;  $p<0.01$ ). Il test post hoc di tukey rivela che il gruppo sperimentale WIN 55,212-2 ha mostrato un progressivo aumento del numero dei nose-poke attivi rispetto agli inattivi a partire dalla seconda settimana (criterio di discriminazione). L'incremento della schedula operativa (FR-2) ha determinato un lento adeguamento dell'attività comportamentale dei ratti, infatti i ratti mantengono un numero di risposte simile a quello della schedula precedente nelle prime sessioni a FR-2 e solo successivamente essi incrementano la loro risposta. Durante la fase di estinzione (sessioni 26-35), che corrisponde al periodo di astinenza, il WIN 55,212-2 è stato sostituito con soluzione fisiologica (salina 0,9%). Durante tale fase, il comportamento di nosepoking attivo degli animali ha determinato l'infusione in vena di soluzione fisiologica. In questa fase, nelle prime sessioni, il gruppo dei trattati ha mostrato un significativo incremento del numero di nose-poke attivi ad indicare la ricerca del farmaco (craving).

Per quanto riguarda il gruppo controllo, esso ha mostrato una risposta pressoché costante, tuttavia il numero di nose-poke attivi non differiva dagli inattivi in tutte le fasi del protocollo sperimentale. Tale comportamento abituale si è mantenuto stabile nella fase di estinzione, in cui gli animali hanno continuato a ricevere soluzione fisiologica come nelle precedenti fasi del protocollo.



**Figura 23:** Comportamento di autosomministrazione di WIN 55,212-2 o soluzione fisiologica. Risposte cumulative (nose-pokes) durante l'AS di WIN 55,212-2 o soluzione fisiologica (1°-25° sessione) e durante la fase di estinzione (26°-35° sessione). I risultati sono espressi come media  $\pm$  ES dei nose-pokes cumulativi attivi ed inattivi registrati durante ciascuna sessione di AS. \* $p<0.05$  rispetto ai nose-pokes inattivi; # $p<0.05$  rispetto all'ultima sessione di AS con WIN 55,212-2

## 5.2. Espressione dei miRNA in seguito a trattamento con WIN55,212-2

### 5.2.1. Variazioni dell'espressione dei miRNA nella Shell del Nucleo Accumbens

Nel NAc shell dei ratti di controllo, su 736 miRNA analizzati 620 hanno presentato un Ct inferiore a 35 e 82 un Ct superiore (non analizzabili), mentre nel gruppo dei trattati 617 hanno presentato un Ct inferiore a 35 e 93 un Ct superiore (**Tab.38**)

tRange	Distribution of Ct Values	
	controllo	eroina
<25	221	227
25-30	213	207
30-35	186	183
Absent Calls	82	93
Percent Distribution of Ct Values		
<25	31%	32%
25-30	30%	29%
30-35	26%	26%
Absent Calls	12%	13%

**Tabella 38:** Valori di Ct nel NAc shell del gruppo controllo e trattato con WIN55,212-2

Per ogni miRNA è stato normalizzato il valore del Ct ottenuto nel trattato e nel controllo utilizzando i geni Housekeeping presenti in ogni piastra, in seguito è stato calcolato il FC. L'analisi ha evidenziato 95 miRNA modificati di cui 40 sovra regolati con FC superiori a 2 e 55 sotto regolati con FC inferiore a -2 (**Tab.39**)

miRNA	FC	miRNA	FC	miRNA	FC
let-7a-2-3p	2,16	miR-219-5p	3,98	miR-377-5p	-4,36
let-7f-2-3p	2,00	miR-223-3p	-3,18	miR-381-5p	2,30
miR-101a-5p	2,17	miR-223-5p	-2,12	miR-410-3p	2,03
miR-10b-5p	-7,36	miR-224-3p	2,01	miR-429	-17,95
miR-1193-3p	3,39	miR-224-5p	-2,69	miR-450a-3p	-2,10
miR-122-3p	-48,80	miR-23b-5p	-2,48	miR-463-3p	-2,14
miR-122-5p	-28,49	miR-27a-5p	-3,17	miR-466b-2-3p	-2,47
miR-124-5p	3,09	miR-296-3p	-2,04	miR-466b-5p	-8,32
miR-127-5p	2,05	miR-298-3p	2,06	miR-466c-3p	3,00
miR-1-3p	-2,12	miR-299b-3p	2,04	miR-471-3p	2,66
miR-141-3p	-3,77	miR-29b-3p	2,43	miR-483-3p	-5,82
miR-142-5p	2,84	miR-3074	2,33	miR-483-5p	-10,50
miR-152-3p	-2,99	miR-30c-1-3p	-13,11	miR-487b-5p	-2,05
miR-181a-2-3p	-2,39	miR-31a-3p	4,32	miR-499-3p	2,09
miR-182	-6,69	miR-322-5p	-2,42	miR-499-5p	-2,80

miR-183-5p	-12,18	miR-32-5p	2,94	miR-505-5p	-2,02
miR-184	3,68	miR-33-5p	2,10	miR-542-5p	-2,35
miR-186-3p	2,45	miR-337-3p	2,18	miR-544-3p	2,46
miR-188-3p	2,11	miR-341	2,41	miR-547-3p	-2,93
miR-194-3p	-4,28	miR-344a-5p	2,13	miR-653-3p	-2,09
miR-199a-3p	-2,17	miR-34a-3p	2,39	miR-666-3p	2,14
miR-200a-3p	-23,49	miR-34b-5p	-13,32	miR-667-3p	4,43
miR-200a-5p	-9,80	miR-34c-5p	2,61	miR-675-5p	-2,83
miR-200b-3p	-5,76	miR-350	2,81	miR-702-5p	-2,20
miR-200c-3p	-14,63	miR-3544	3,36	miR-741-3p	-2,20
miR-200c-5p	-2,73	miR-3558-3p	-2,42	miR-743a-3p	-2,35
miR-206-3p	-3,49	miR-3562	3,36	miR-743b-5p	2,48
miR-208b-3p	-2,05	miR-3583-5p	-2,81	miR-802-5p	-3,21
miR-214-3p	-5,13	miR-3584-5p	2,01	miR-873-5p	2,92
miR-216b-5p	-3,05	miR-3586-3p	-2,91	miR-878	-2,68
miR-217-5p	2,34	miR-3591	-3,22	miR-96-5p	-2,65
miR-219-1-3p	-2,06	miR-376a-3p	2,50		

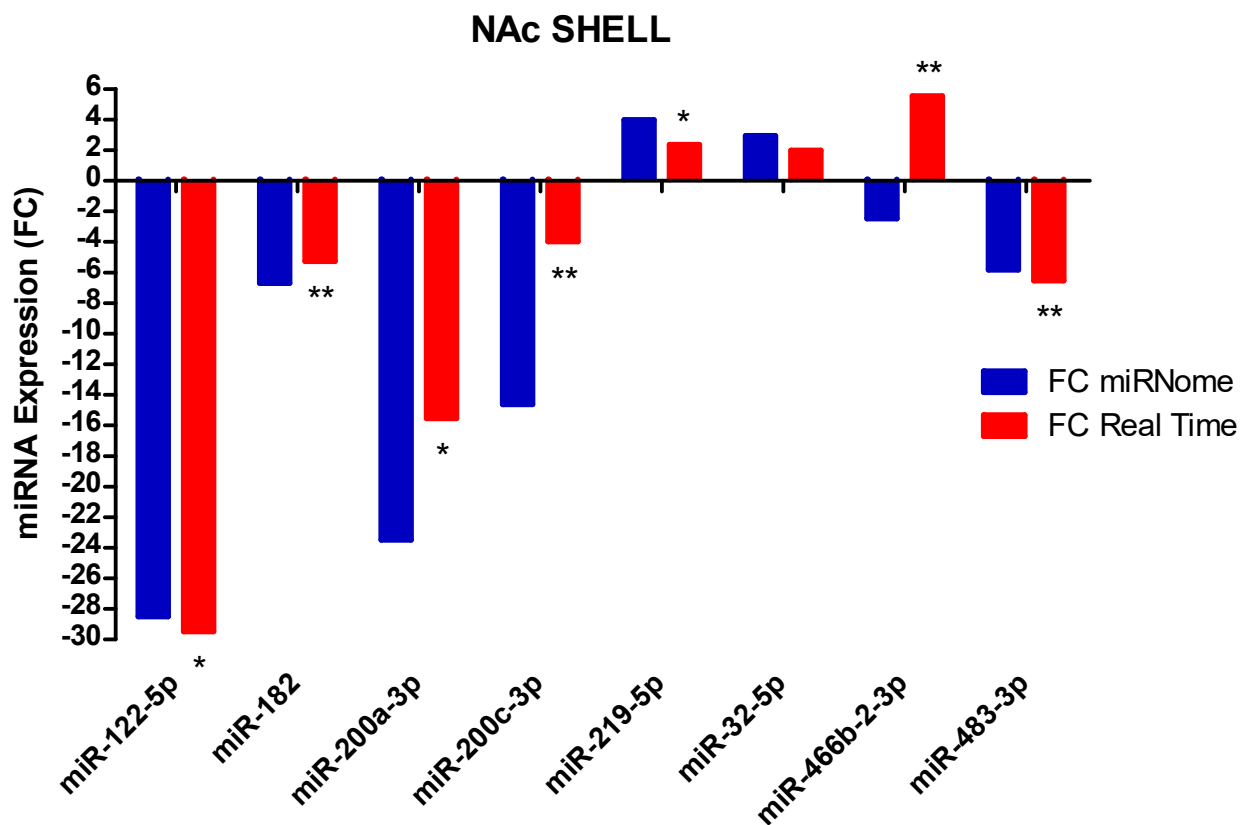
**Tabella 39** : Valori di fold-change per i 95 miRNA modificati.

Successivamente sono stati selezionati 12 miRNA tra quelli trovati modificati nelle 4 aree cerebrali oggetto di analisi (miR-122-3p, miR-122-5p, miR-144-3p, miR-182, miR-200a-3p, miR-200c-3p, miR-219-5p, miR-30c-1-3p, miR-32-5p, miR-34b-5p, miR-466b-2-3p, miR-483-3p). Alcuni di questi erano modificati in una sola delle 4 regioni mentre altri in più di una. In quest'area per 5 miRNA (miR-122-5p, miR-182, miR-200a-3p, miR-200c-3p e miR-483-3p) che erano risultati sotto regolati e per uno che risultava sovra espresso (miR-219-5p) all'analisi del miRNoma è stato possibile confermare il **(Tab.40)**. Al contrario, per il miR-466b-2-3p per il quale si era osservata una sotto regolazione del miRNoma è stata osservata una sovra regolazione con l'analisi in triplicato. Per 4 miRNA (miR-32-5p, miR-34b-5p, miR-30c-1-3p e miR-122-3p) non si ha avuto conferma del risultato ottenuto dall'analisi del miRNoma oppure lo stesso non era statisticamente significativo **(Fig.24)**

SHELL miRNA	FC miRNome	FC Real Time	p value equals
miR-122-3p	-48,80	no data	
miR-122-5p	-28,49	-29,48	0,0226
miR-182	-6,69	-5,26	0,0003
miR-200a-3p	-23,49	-15,53	0,0170
miR-200c-3p	-14,63	-3,98	0,0093
miR-219-5p	3,98	2,34	0,0300
miR-30c-1-3p	-1311,50	-1,70	nc
miR-32-5p	2,94	1,98	ns
miR-34b-5p	-13,32	1,49	nc
miR-466b-2-3p	-2,47	5,54	0,0060
miR-483-3p	-5,82	-6,52	0,0027

**Tabella 40** :Validazione dei risultati tramite Real Time PCR.





**Figura 24:** confronto tra valori di fold change dei miRNA analizzati con miRNome (blu) e validazione in triplicato con Real time (rosso) nel NAc shell. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  rispetto al controllo.

### 5.2.2. Variazione dell'espressione dei miRNA nel Core del Nucleo Accumbens

L'analisi di 736 miRNA del NAc core dei controlli ha evidenziato 615 miRNA con un Ct inferiore a 35 e 88 con un Ct superiore, mentre nei trattati 596 hanno mostrato un Ct inferiore a 35 e 88 un Ct superiore (**tab.41**).

tRange	Distribution of Ct Values	
	controllo	eroina
<25	195	204
25-30	211	202
30-35	209	190
Absent Calls	88	88
Percent Distribution of Ct Values		
<25	28%	30%
25-30	30%	30%
30-35	30%	28%
Absent Calls	13%	13%

**Tabella 41:** Valori di Ct nel NAc core del gruppo controllo e trattato con WIN55,212-2

Per ogni miRNA è stato normalizzato il valore del Ct ottenuto sia nel trattato che nel controllo utilizzando i geni Housekeeping presenti in ogni piastra e in seguito è stato calcolato il FC. Dall'analisi 96 miRNA sono risultati altamente modificati, 13 sovra regolati con FC superiori a 2 e 83 sotto regolati con FC inferiore a -2 (**Tab.42**)

miRNA	FC	miRNA	FC	miRNA	FC
let-7e-5p	20,66	miR-219-5p	-3,35	miR-3596a	-4,29
let-7i-3p	-2,02	miR-222-5p	-4,87	miR-3596b	-2,46
miR-101a-3p	-2,20	miR-23a-5p	-3,92	miR-375-3p	2,91
miR-103-1-5p	-2,44	miR-24-2-5p	-2,16	miR-375-5p	-2,05
miR-103-2-5p	-2,03	miR-27a-5p	4,76	miR-376a-3p	-2,47
miR-122-3p	-40,80	miR-291a-3p	-4,24	miR-376c-3p	-2,57
miR-1224	-2,10	miR-293-3p	-2,50	miR-383-3p	-2,87
miR-122-5p	-52,39	miR-295-3p	2,07	miR-463-3p	2,10
miR-125b-5p	43,47	miR-299b-3p	-2,05	miR-463-5p	-4,46
miR-128-1-5p	-2,09	miR-29b-3p	-2,41	miR-466b-2-3p	-5,34
miR-128-2-5p	-2,14	miR-3074	-2,18	miR-466b-5p	-3,07
miR-130b-5p	2,57	miR-30b-3p	-2,51	miR-466c-5p	-2,27
miR-141-3p	-6,77	miR-30c-1-3p	-2,03	miR-483-3p	-3,32
miR-141-5p	-3,24	miR-30d-3p	-2,11	miR-483-5p	-6,60
miR-142-3p	-2,74	miR-31a-3p	-2,11	miR-494-5p	-2,61
miR-142-5p	-2,07	miR-32-5p	-5,87	miR-497-3p	-4,17
miR-144-3p	-5,66	miR-327	-2,07	miR-511-3p	-2,04
miR-146a-3p	-2,64	miR-328a-5p	-4,02	miR-598-5p	2,48
miR-147	-4,94	miR-328b-3p	-3,97	miR-615	-2,95
miR-148b-5p	-2,49	miR-33-5p	-2,32	miR-652-5p	-2,97
miR-183-5p	3,37	miR-343	-3,33	miR-673-5p	-4,41
miR-184	-2,36	miR-34a-3p	-2,00	miR-675-5p	-2,52
miR-188-3p	-2,76	miR-34b-3p	3,01	miR-702-5p	-2,26
miR-194-3p	-4,85	miR-3543	-4,06	miR-708-3p	-2,06
miR-199a-5p	-3,14	miR-3546	-2,09	miR-743b-5p	-2,86
miR-19a-5p	-2,56	miR-3575	-2,52	miR-760-3p	-2,79
miR-19b-1-5p	-2,69	miR-3583-3p	-2,01	miR-760-5p	-4,23
miR-200a-5p	-2,33	miR-3584-5p	-2,27	miR-802-5p	-4,91
miR-203a-5p	-2,77	miR-3586-3p	-2,25	miR-871-5p	-3,27
miR-210-3p	413,23	miR-3589	-3,87	miR-875	-2,65
miR-210-5p	-2,92	miR-3593-3p	-2,57	miR-96-3p	-3,36
miR-21-3p	-4,97	miR-3594-3p	2,00	miR-9b-5p	2,69

**Tabella 42:** livelli di espressione dei miRNA nel NAc core rappresentato come fold-change (FC).

Tra i 12 miRNA selezionati per la convalida per 7 (miR-122-3p, miR-122-5p, miR-144-3p, miR-219-5p, miR-30c-1-3p, miR-32-5p e miR-466b-2-3p) è stato possibile confermare la sotto regolazione osservata sul miRNoma(**Tab.43**), mentre per 3 miRNA (miR-125b-5p, miR-210-3p e miR-483-3p) i dati ottenuti del miRNoma non sono stati confermati tramite l'analisi eseguita con Real Time PCR (**Fig.25**).

CORE miRNA	FC miRNome	FC Real Time	p value equals
miR-122-3p	-40,80	-14,95	0,0452
miR-122-5p	-52,39	-76,23	0,0327
miR-125b-5p	43,47	-1,13	nc
miR-144-3p	-5,66	-2,54	0,0279
miR-210-3p	413,23	-1,42	nc
miR-219-5p	-3,35	-2,17	0,0082
miR-30c-1-3p	-2,03	-2,63	0,0244
miR-32-5p	-5,87	-3,30	0,0056
miR-466b-2-3p	-5,34	-2,01	0,0301
miR-483-3p	-3,32	1,76	nc

Tabella 43 :Validazione dei risultati tramite Real Time PCR.

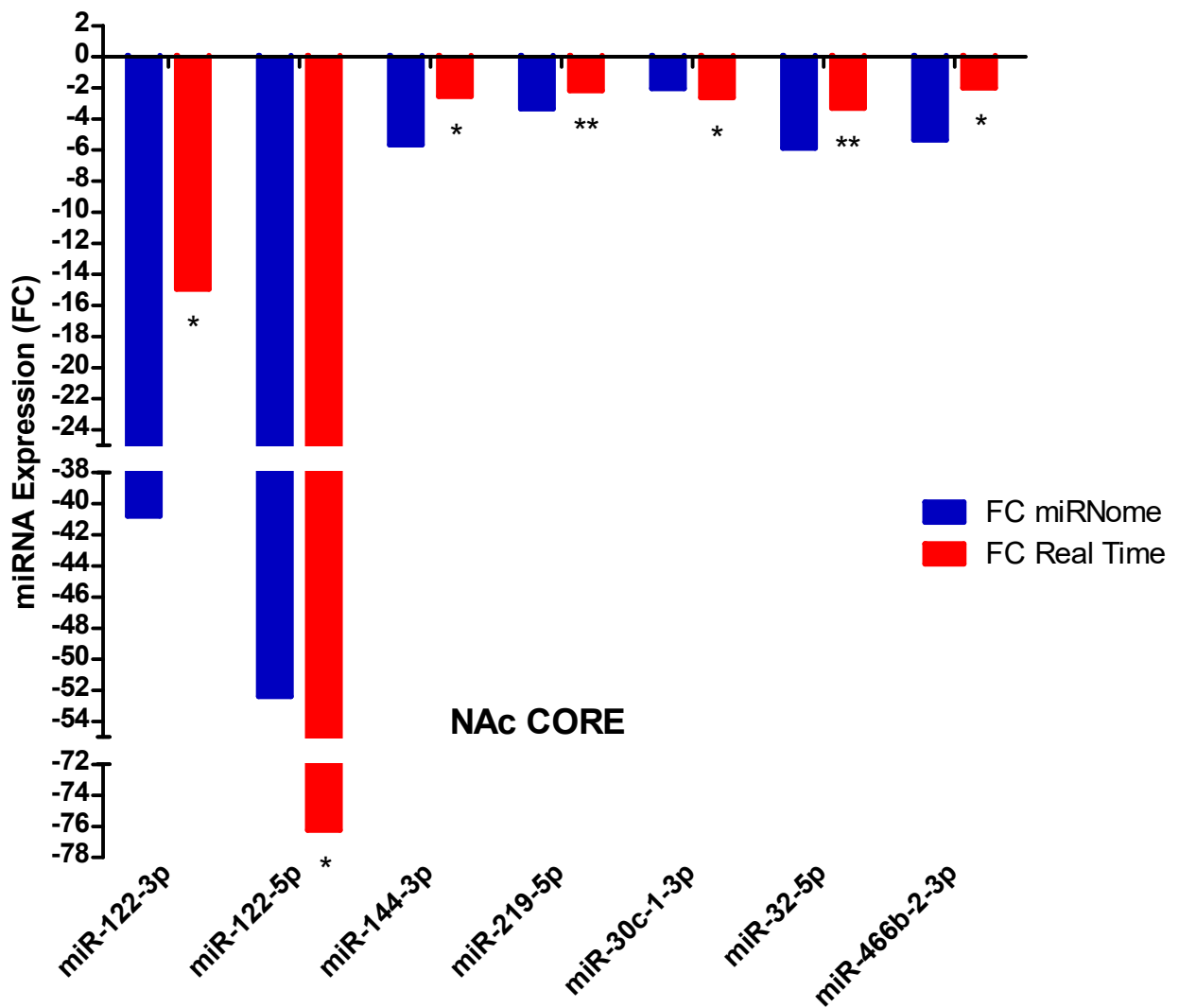


Figura 25 :Confronto tra valori di fold change dei miRNA analizzati con miRNome (blu) e validazione in triplicato con Real time (rosso) nel NAc core. \* p<0.05 rispetto al controllo.

### 5.2.3. Variazione dell'espressione dei miRNA in Corteccia Prefrontale

Nella Corteccia Prefrontale dei ratti di controllo su 736 miRNA analizzati 617 hanno presentato un Ct inferiore a 35 e 77 un Ct superiore(non analizzabili), mentre nei trattati 557 hanno presentato un Ct inferiore a 35 e 82 un Ct superiore (Tab.44).

tRange	Distribution of Ct Values	
	controllo	eroina
<25	222	151
25-30	210	200
30-35	185	206
Absent Calls	77	82
Percent Distribution of Ct Values		
<25	32%	24%
25-30	30%	31%
30-35	27%	32%
Absent Calls	11%	13%

**Tabella 44:** Valori di Ct nella corteccia prefrontale del gruppo controllo e trattato con WIN55,212-2

Per ogni miRNA è stato normalizzato il valore del Ct ottenuto sia nel trattato che nel controllo utilizzando i geni Housekeeping presenti in ogni piastra e in seguito è stato calcolato il FC. Tale analisi ha evidenziato 53 miRNA altamente modificati di cui 26 sovra regolati con FC superiori a 2 e 27 sotto regolati con una sotto regolazione inferiore a -2 (Tab.45)

miRNA	FC	miRNA	FC	miRNA	FC
let-7b-3p	-2,31	miR-216b-5p	3,47	miR-3596a	-2,18
miR-1193-5p	6,81	miR-291a-3p	3,41	miR-3596b	-3,35
miR-122-5p	-3,40	miR-295-3p	6,52	miR-376c-3p	-3,26
miR-124-5p	-2,99	miR-295-5p	3,58	miR-410-5p	-2,53
miR-128-1-5p	-3,86	miR-3065-3p	2,40	miR-483-3p	-2,56
miR-133a-5p	2,72	miR-325-3p	-4,02	miR-501-3p	2,01
miR-137-5p	-19,74	miR-328a-5p	-2,71	miR-511-3p	-2,75
miR-148b-5p	-3,58	miR-331-5p	2,56	miR-511-5p	2,68
miR-151-3p	-2,03	miR-33-5p	-2,11	miR-547-3p	2,10
miR-181b-2-3p	2,40	miR-338-5p	-2,31	miR-547-5p	2,90
miR-18a-3p	-2,08	miR-343	3,52	miR-615	-2,73
miR-193-5p	-3,04	miR-3547	-2,19	miR-673-5p	-2,38
miR-196b-5p	4,30	miR-3550	-2,40	miR-678	2,75
miR-200a-3p	-2,47	miR-3559-3p	4,95	miR-764-5p	2,15
miR-20a-3p	-2,61	miR-3564	4,62	miR-873-3p	3,62
miR-21-3p	2,06	miR-3570	8,07	miR-875	-2,25

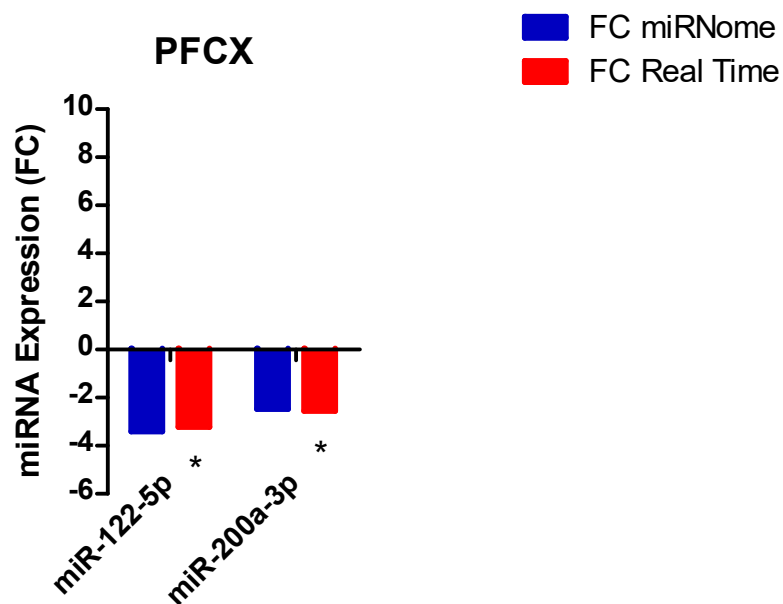
miR-215	2,30	miR-3591	3,44	miR-92a-1-5p	2,12
miR-216a-5p	-4,75	miR-3593-3p	2,67		

**Tabella 45:** livelli di espressione dei miRNA nella Corteccia Prefrontale rappresentato come fold-change.

In corteccia prefrontale tra i 12 miRNA analizzati per la conferma con Real Time PCR (**Tab.46**) (miR-122-3p, miR-122-5p, miR-144-3p, miR-182, miR-200a-3p, miR-200c-3p, miR-219-5p, miR-30c-1-3p, miR-32-5p, miR-34b-5p, miR-466b-2-3p, miR-483-3p) 3 risultavano modificati all'analisi del miRNoma, tutti e tre sotto regolati (miR-122-5p, miR-200a-3p e miR-483-3p). Solo per miR-122-5p e miR-200a-3p ma non per miR-483-3p son state confermate le modificazioni osservate con la prima analisi (**fig.26**).

PFCX miRNA	Fc miRNome	FC Real Time	p value equals
miR-122-5p	-3,4	-3,22	0,0307
miR-200a-3p	-2,47	-2,56	0,0462
miR-483-3p	-2,56	no data	

**Tabella 46:** Validazione dei risultati tramite Real Time PCR.



**Figura 26:** confronto tra valori di fold change dei miRNA analizzati con miRNome (blu) e validazione in triplicato con Real time (rosso) nella PFCX. \*  $p < 0.05$  rispetto al controllo.

#### 5.2.4. Variazione dell'espressione dei miRNA in Caudato Putamen

Nel Caudato Putamen su 736 miRNA analizzati, i controlli hanno mostrato 621 miRNA con un Ct inferiore a 35 e 82 con un Ct superiore, mentre nei trattati 612 hanno mostrato un Ct inferiore a 35 e 92 un Ct superiore (**Tab.47**)

tRange	Distribution of Ct Values	
	controllo	eroina
<25	236	238
25-30	202	203
30-35	183	171
Absent Calls	82	92
Percent Distribution of Ct Values		
<25	34%	34%
25-30	29%	29%
30-35	26%	24%
Absent Calls	12%	13%

**Tabella 47:** Valori di Ct nel CPU del gruppo controllo e trattato con WIN55,212-2

Per ogni miRNA è stato normalizzato il valore del Ct ottenuto sia nel trattato che nel controllo utilizzando i geni Housekeeping presenti in ogni piastra e in seguito è stato calcolato il FC. Dall'analisi 110 miRNA sono risultati altamente modificati, 11 sovra regolati con un FC superiori a 2 e 99 sotto regolati un FC inferiore a -2 (**Tab.48**).

miRNA	FC	miRNA	FC	miRNA	FC
let-7a-2-3p	-41,75	miR-23b-5p	-2,14	miR-410-5p	-46,90
let-7c-1-3p	-27,41	miR-26a-3p	-34,84	miR-412-5p	-30,18
miR-103-2-5p	-2,19	miR-291a-5p	-2,08	miR-431	2,54
miR-105	-2,61	miR-293-3p	-21,63	miR-433-5p	-25,45
miR-107-5p	-28,91	miR-295-3p	-2,26	miR-434-5p	-23,03
miR-1193-5p	-3,03	miR-298-3p	-45,40	miR-463-5p	-35,62
miR-122-5p	-2,56	miR-3065-3p	-54,94	miR-465-5p	-2,07
miR-1249	-41,89	miR-3065-5p	-18,55	miR-471-3p	3,02
miR-128-1-5p	-3,48	miR-3074	2,08	miR-483-5p	-97,59
miR-129-2-3p	-25,15	miR-3120	3,30	miR-487b-5p	-24,08
miR-130b-5p	-16,96	miR-31a-3p	-2,64	miR-493-5p	-33,96
miR-133a-5p	-28,12	miR-326-5p	-37,16	miR-499-3p	2,53
miR-134-3p	-26,51	miR-328a-5p	-32,96	miR-501-3p	-111,48
miR-135b-3p	-4,70	miR-328b-3p	-2,78	miR-501-5p	-2,35
miR-135b-5p	-25,38	miR-34b-5p	2,34	miR-503-3p	-21,94
miR-137-5p	-40,66	miR-34c-3p	-2,17	miR-504	-2,23
miR-141-3p	-2,46	miR-3543	-3,08	miR-511-3p	-2,07
miR-143-5p	-28,46	miR-3547	-2,33	miR-511-5p	-2,49
miR-145-3p	-25,01	miR-3557-3p	-21,73	miR-547-3p	-3,00
miR-150-3p	-42,27	miR-3559-3p	-29,91	miR-582-3p	-25,14
miR-16-3p	-19,73	miR-3560	-26,59	miR-598-5p	-2,09
miR-181a-2-3p	-26,29	miR-3561-3p	-23,47	miR-615	3,83
miR-181b-2-3p	2,45	miR-3583-3p	-60,95	miR-632	-39,80

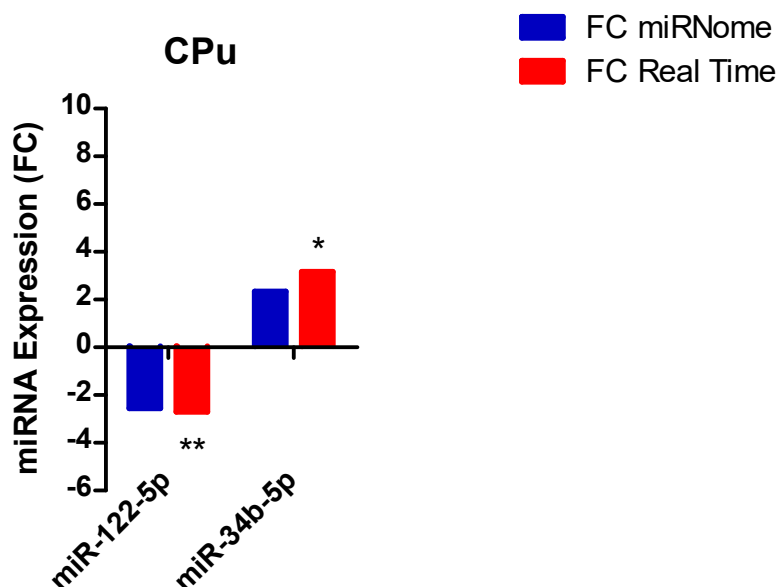
miR-183-3p	-2,38	miR-3583-5p	-7,32	miR-652-5p	-40,52
miR-184	-3,99	miR-3584-5p	-84,78	miR-664-1-5p	-37,99
miR-190a-3p	-19,60	miR-3586-3p	-82,63	miR-672-3p	-24,62
miR-1949	-23,62	miR-3588	-103,30	miR-702-5p	-23,23
miR-195-3p	-2,55	miR-3589	-3,70	miR-743a-5p	-33,89
miR-196b-5p	-3,64	miR-3591	-4,07	miR-743b-5p	-3,00
miR-202-3p	-22,59	miR-3593-5p	-15,15	miR-764-3p	-29,64
miR-203a-5p	-39,55	miR-3596a	-2,57	miR-770-3p	-41,12
miR-207	-2,00	miR-3596b	-21,69	miR-874-5p	-35,40
miR-208b-3p	-2,12	miR-362-3p	-23,58	miR-876	2,72
miR-214-3p	-2,56	miR-370-5p	-23,93	miR-93-3p	-19,73
miR-217-5p	3,92	miR-375-3p	-3,35	miR-96-3p	-2,06
miR-221-5p	-32,37	miR-376c-5p	-23,63	miR-9b-5p	2,49
miR-224-3p	-73,70	miR-380-3p	-21,73		

**Tabella 48:** livelli di espressione dei miRNA nello Striato rappresentato come fold-change (FC).

Sono stati selezionati 12 miRNA per la convalida (miR-122-3p, miR-122-5p, miR-144-3p, miR-182, miR-200a-3p, miR-200c-3p, miR-219-5p, miR-30c-1-3p, miR-32-5p, miR-34b-5p, miR-466b-2-3p, miR-483-3p), di questi 1, il miR-122-5p risultava sotto regolato e 1 miR-34b-5p sovra regolato all'analisi del miRNoma(**Tab.49**). Per entrambi è stato possibile confermare tale modifica attraverso l'analisi con Real Time. (**Fig.27**)

CPU miRNA	FC miRNome	FC Real Time	p value equals
miR-122-5p	-2,56	-2,70	0,0042
miR-34b-5p	2,34	3,17	0,0342

**Tabella 49:** Validazione dei risultati tramite Real Time PCR.

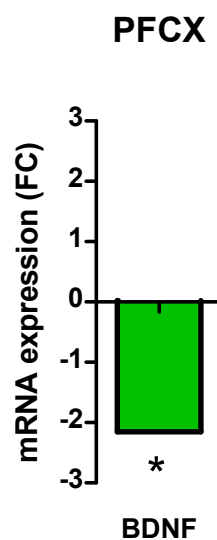


**Figura 27 :** confronto tra valori di fold change dei miRNA analizzati con miRNome (blu) e validazione in triplicato con Real time (rosso) nello Striato. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  rispetto al controllo.

### 5.3. Analisi della variazione di espressione genica indotta da AS di WIN55,212-2

Lo step successivo ha riguardato la scelta dei geni dei quali analizzare il trascritto (BDNF, CCKBR, CLOCK, CREB, DRD3, MeCP2, NOS1, NOS2, OPRM1, SIRT1 e SIRT2). Tale selezione è stata fatta sulla base dei dati presenti in letteratura, scegliendo quei geni notoriamente implicati nei processi coinvolti nella somministrazione di sostanze d'abuso ma che avessero allo stesso tempo delle correlazioni con alcuni dei miRNA trovati modificati.

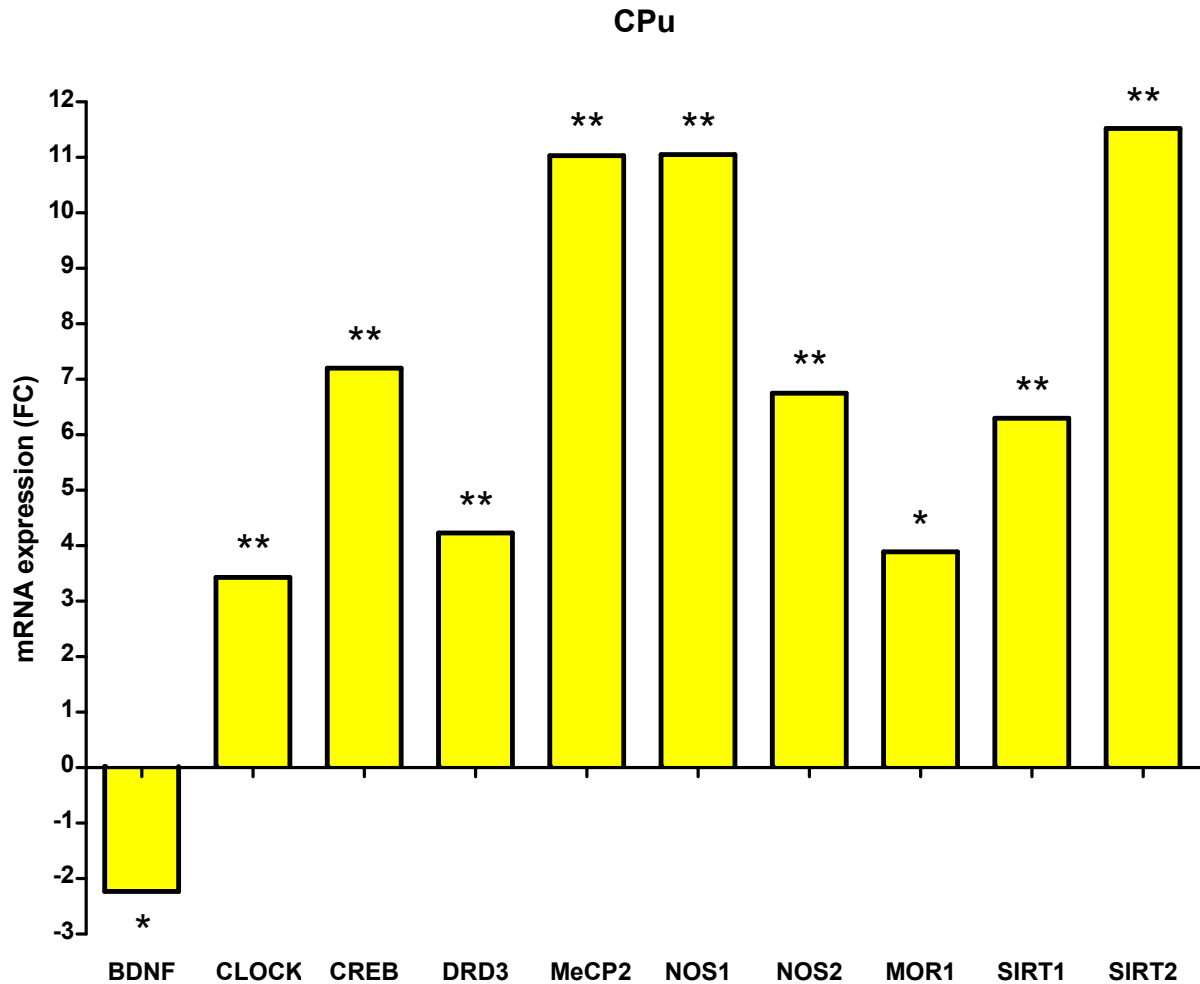
Al fine di validare i risultati di espressione genica l'RNA è stato retro-trascritto in cDNA e successivamente analizzato tramite RT-PCR. La figura 28 mostra le variazioni d'espressione (esprese come valore di fold-change) degli mRNA analizzati dei ratti trattati con WIN 55,212-2 rispetto ai controlli. Tra tutti gli 11 geni analizzati, nel core, è stata osservata una variazione dell'espressione di BDNF (FC=2.16), ma il dato non è statisticamente significativo ( $p=0.0803$ ). Nessuna variazione è stata osservata nella shell. Nella Corteccia Prefrontale solo BDNF ha mostrato variazione di espressione (FC=-2.15,  $p=0.0419$ ) (Fig.28).



**Figura28:** Variazione di espressione (espresso come valore di fold-change) del mRNA del gene BDNF in PFCX. \* $p<0.05$  rispetto al controllo.

Nel Caudato Putamen è stata osservata una variazione dell'espressione dell'mRNA di 10 geni su 11 con una sovra regolazione (valore di FC superiore a 2) per 9 di essi: CREB (FC=7.20,  $p=0.0007$ ); CLOCK (FC=3.44,  $p=0.0014$ ); DRD3 (FC=4.23,  $p=0.0017$ ); NOS2 (FC=6.75,  $p=0.0021$ ); SIRT2 (FC=11.53,  $p=0.0009$ ); NOS1 (FC=11.05,  $p=0.0032$ ); MECP2 (FC=11.03,  $p=0.0010$ ); SIRT1 (FC=6.30,  $p=0.0002$ ); MOR1 (FC=3.89,  $p=0.0130$ ), e una sotto regolazione (valore di FC inferiore a -2) per il solo gene BDNF (FC=-2.27,  $p=0.0141$ ), nessuna variazione è stata osservata per CCKBR (Fig.29)





**Figura 29:** Variazioni di espressione (espresse come valore di fold-change) degli mRNA dei geni target trovati modificati in Caudato Putamen. \* $p < 0.05$  rispetto al controllo. \*\* $p < 0.01$ .

Come si può osservare nel grafico le variazioni di espressione sono evidenti nello Striato e questo sta ad indicare che la somministrazione di WIN 55,212-2 ha prodotto delle modificazioni significative sull'espressione genica in questa specifica area cerebrale. Per quanto riguarda le altre tre aree analizzate, non sono state riscontrate variazioni significative se non per BDNF in PFCX e NAc Core. Se da una parte le evidenti modifiche osservate a livello striatale rappresentano una chiara prova dell'azione di WIN 55,212-2 in quest'area cerebrale, dall'altra la mancata significatività nella variazione di espressione del mRNA di tali geni a livello delle altre regioni non fornisce informazioni sufficienti a spiegare se i miRNA che sono stati trovati modificati in quest'area abbiano più o meno influenzato l'espressione degli stessi geni. Infatti, i miRNA potrebbero semplicemente aver agito bloccando la traduzione di questi mRNA con una riduzione dell'espressione proteica, attraverso quel meccanismo che prevede il blocco del macchinario traduzionale piuttosto che la degradazione dell'mRNA stesso. Infatti tale meccanismo, come ampiamente descritto in precedenza, rappresenta il funzionamento principale con cui agiscono i miRNA nelle cellule animali, a causa di una non perfetta complementarità tra

miRNA e mRNA. Per verificare questa possibilità sarebbe necessaria una valutazione dell'espressione proteica di tali geni attraverso la metodica del Western Blot.

## 5.4. Analisi computazionale per i miRNA modificati da AS di WIN55,212-2

Anche in questo caso, come fatto in precedenza per l'eroina, sono stati utilizzati i risultati ottenuti dall'analisi computazionale effettuata tramite il database miRWalk 2.0 per gli 11 geni oggetto del nostro studio (BDNF, CCKBR, CLOCK, CREB, DRD3, MeCP2, NOS1, NOS2, OPRM1, SIRT1 e SIRT2). Dopo aver messo in evidenza un elevato numero di miRNA predetti per ogni gene analizzato, sono stati comparati questi risultati con quelli ottenuti dall'analisi dell'intero miRNoma delle aree cerebrali dei ratti trattati con WIN55,212-2. Siamo così stati in grado di stilare delle tabelle dalle quali è facile evincere, per ognuna delle 4 aree cerebrali analizzate, quali miRNA possano effettivamente aver esercitato la loro azione modulatrice sugli mRNA dei geni presi in esame nel nostro studio. In oltre, avendo analizzato le regioni 3'UTR, 5'UTR e CDS, per ogni singolo gene, si possono indicare con maggiore precisione in che posizione del trascritto tali miRNA possano legarsi. Il database miRWalk 2.0, permette di integrare i risultati ottenuti grazie al suo algoritmo con quelli provenienti da altri dieci diversi database (selezionabili dall'utente). Quelli scelti per la nostra analisi sono stati tre, miRWalk, miRanda e TargetScan. Tra i miRNA predetti dal motore di ricerca sono stati presi in considerazione solo quelli che sono risultati predetti da tutti e tre i database in modo tale da ridurre i falsi positivi e restringere il campo di analisi.

### 5.4.1. BDNF

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 143 miRNA in 3'UTR. Tra questi 19 miRNA in NAc shell, 21 in NAc core, 7 in PFCX e 24 in CPU (19 comuni a più di una regione) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma (Tab.50a e 50b).

miRNA BDNF	3'UTR	Tabella 50a			
let-7a-1-3p	miR-150-3p	miR-210-5p	miR-322-5p	miR-3592	miR-509-5p
let-7b-3p	miR-15b-5p	miR-21-3p	miR-32-3p	miR-3595	miR-511-5p
let-7c-2-3p	miR-16-5p	miR-216a-3p	miR-328a-3p	miR-3596c	miR-532-5p
let-7f-1-3p	miR-17-2-3p	miR-216a-5p	miR-328b-3p	miR-3596d	miR-543-5p
let-7i-3p	miR-182	miR-216b-3p	miR-330-3p	miR-363-5p	miR-547-3p
miR-101b-5p	miR-184	miR-218a-5p	miR-33-3p	miR-370-3p	miR-551b-5p
miR-103-3p	miR-1843-5p	miR-26a-5p	miR-336-5p	miR-376b-5p	miR-568
miR-107-3p	miR-185-5p	miR-26b-5p	miR-337-3p	miR-376c-5p	miR-582-5p
miR-1199-5p	miR-186-5p	miR-27a-3p	miR-344i	miR-377-3p	miR-632
miR-125a-5p	miR-190a-5p	miR-27a-5p	miR-34a-5p	miR-382-3p	miR-6328
miR-125b-5p	miR-190b-5p	miR-27b-3p	miR-34b-3p	miR-382-5p	miR-6331

miR-126b	miR-1912-3p	miR-28-5p	miR-34b-5p	miR-383-3p	miR-653-5p
miR-127-5p	miR-1912-5p	miR-298-3p	miR-34c-3p	miR-411-3p	miR-664-3p
miR-128-3p	miR-191a-3p	miR-3065-3p	miR-34c-5p	miR-425-5p	miR-665
miR-129-1-3p	miR-191a-5p	miR-3065-5p	miR-351-5p	miR-449a-5p	miR-672-3p
miR-129-2-3p	miR-191b	miR-3085	miR-3541	miR-449c-5p	miR-673-5p
miR-129-5p	miR-194-3p	miR-30a-3p	miR-3548	miR-463-5p	miR-708-5p
miR-1306-5p	miR-195-5p	miR-30b-3p	miR-3551-3p	miR-466b-2-3p	miR-711
miR-130a-5p	miR-196a-3p	miR-30d-3p	miR-3559-5p	miR-466c-3p	miR-7a-1-3p
miR-130b-5p	miR-202-5p	miR-30e-3p	miR-3564	miR-487b-5p	miR-872-3p
miR-133b-5p	miR-203a-3p	miR-3120	miR-3566	miR-490-5p	miR-880-5p
miR-1-3p	miR-203a-5p	miR-31a-3p	miR-3573-3p	miR-495	miR-98-3p
miR-140-3p	miR-206-3p	miR-31b	miR-3583-5p	miR-497-3p	miR-9b-5p
miR-146b-3p	miR-207	miR-320-3p	miR-3584-5p	miR-497-5p	

Tabella 50b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-130b-5p			x	x
miR-184		x	x	x
miR-194-3p		x	x	
miR-203a-5p			x	x
miR-21-3p	x		x	
miR-27a-5p		x	x	
miR-298-3p		x		x
miR-31a-3p		x	x	x
miR-328b-3p			x	x
miR-34b-5p		x		x
miR-3583-5p		x		x
miR-3584-5p		x	x	x
miR-463-5p			x	x
miR-466b-2-3p		x	x	
miR-487b-5p		x		x
miR-511-5p	x			x
miR-547-3p	x	x		x
miR-673-5p	x		x	
miR-9b-5p			x	x

**Tabella 50a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene BDNF complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR sono stati predetti per BDNF 25 miRNA e di questi 2 in NAc shell, 1 in NAc core, 2 in PFCX e 2 in CPU sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma(**Tab.51**).

miRNA BDNF	5'UTR	Tabella 51	
miR-1188-5p	miR-212-5p	miR-344g	miR-702-3p
miR-1193-3p	miR-222-5p	miR-3473	miR-7a-5p
miR-18a-3p	miR-24-3p	miR-3586-5p	miR-7b
miR-190a-3p	miR-3099	miR-3590-3p	miR-872-5p

miR-201-5p	miR-331-5p	miR-370-5p
miR-204-5p	miR-339-5p	miR-381-5p
miR-211-5p	miR-344b-5p	miR-409a-5p

**Tabella51:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene BDNF complementari alla regione 5'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU.

Nella regione CDS sono stati predetti 33 miRNA per BDNF tra i quali 4 in NAc shell, 3 in NAc core, 2 in PFCX e 8 in CPU (2 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma(**Tab.52a e 52b**).

miRNA BDNF	CDS	Tabella 52a	
let-7c-1-3p	miR-18a-3p	miR-3572	miR-6327
miR-103-1-5p	miR-200b-3p	miR-376a-3p	miR-673-3p
miR-103-2-5p	miR-200c-3p	miR-376b-3p	miR-764-3p
miR-107-5p	miR-205	miR-429	miR-764-5p
miR-1188-3p	miR-20b-3p	miR-466b-1-3p	miR-874-3p
miR-124-3p	miR-298-5p	miR-493-5p	miR-93-3p
miR-129-5p	miR-3557-3p	miR-543-5p	
miR-137-3p	miR-3557-5p	miR-6216	
miR-17-1-3p	miR-3561-3p	miR-6321	

Tabella 52b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-103-2-5p			x	x
miR-376a-3p		x	x	

**Tabella 52a,b :** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene BDNF complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 5.4.2. CCKBR

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 43 miRNA in 3'UTR. Tra questi 7 miRNA in NAc shell, 3 in NAc core, 1 in PFCX e 9 in CPU (4 comuni a più di una regione) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma(**Tab.53a e 53b**).

miRNA CCKBR	3'UTR	Tabella 53a	
miR-124-5p	miR-17-2-3p	miR-3569	miR-488-3p
miR-129-1-3p	miR-191a-3p	miR-3584-5p	miR-501-5p
miR-129-2-3p	miR-201-3p	miR-361-5p	miR-505-5p
miR-129-5p	miR-202-5p	miR-365-5p	miR-544-3p
miR-130a-3p	miR-224-5p	miR-376a-5p	miR-582-3p
miR-130b-3p	miR-29b-1-5p	miR-376b-5p	miR-592
miR-130b-5p	miR-301a-3p	miR-376c-5p	miR-632
miR-135b-3p	miR-301b-3p	miR-380-5p	miR-6326
miR-148b-3p	miR-30a-3p	miR-412-3p	miR-6330

miR-150-5p	miR-30d-3p	miR-466d	miR-665
miR-152-3p	miR-30e-3p	miR-471-3p	

Tabella 53b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-124-5p	x	x		
miR-130b-5p			x	x
miR-3584-5p		x	x	x
miR-471-3p		x		x

**Tabella 53a e 53b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene CCKBR complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in Nac shell, blu in Nac core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR è stato predetto per CCKBR solo 1 miRNA (miR-1199-3p) il quale non risultava modificato in nessuna area alla prima analisi del miRNoma.

Nella regione CDS sono stati predetti 73 miRNA per CCKBR tra i quali 7 in Nac shell, 10 in Nac core, 3 in PFCX e 14 in CPU (7 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (Tab.54a e 54b).

miRNA CCKBR	CDS	Tabella 54a	
let-7a-5p	miR-16-5p	miR-322-5p	miR-652-3p
let-7b-5p	miR-181a-1-3p	miR-34b-3p	miR-653-5p
let-7c-5p	miR-181b-1-3p	miR-34c-3p	miR-665
let-7d-5p	miR-181c-3p	miR-351-5p	miR-666-5p
let-7e-5p	miR-1839-5p	miR-3557-3p	miR-667-5p
let-7f-5p	miR-1843-5p	miR-3583-5p	miR-671
let-7i-5p	miR-193-3p	miR-3594-5p	miR-672-3p
miR-103-1-5p	miR-195-5p	miR-377-5p	miR-672-5p
miR-103-2-5p	miR-199a-5p	miR-383-3p	miR-673-5p
miR-103-3p	miR-214-3p	miR-411-5p	miR-758-5p
miR-107-3p	miR-217-5p	miR-425-3p	miR-761
miR-107-5p	miR-222-5p	miR-455-3p	miR-770-5p
miR-122-5p	miR-24-3p	miR-455-5p	miR-871-3p
miR-125a-5p	miR-291a-5p	miR-465-5p	miR-874-5p
miR-125b-5p	miR-296-5p	miR-485-5p	miR-92a-1-5p
miR-134-3p	miR-29b-2-5p	miR-487b-5p	miR-98-5p
miR-143-3p	miR-300-3p	miR-497-5p	
miR-153-5p	miR-3072	miR-6315	
miR-15b-5p	miR-3085	miR-6321	

Tabella 54b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-103-2-5p			x	x
miR-122-5p	x	x	x	x
miR-214-3p		x		x
miR-217-5p		x		x
miR-3583-5p		x		x

miR-487b-5p		x		x
miR-673-5p	x		x	

**Tabella 54a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene CCKBR complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

### 5.4.3. CLOCK

Per l'mRNA codificato da questo gene non sono stati predetti miRNA in 3'UTR e 5'UTR.

Nella regione CDS sono stati predetti 120 miRNA per CLOCK tra i quali 11 in NAc shell, 13 in NAc core, 10 in PFCX e 19 in CPU (13 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (Tab.55a e 55b).

miRNA CLOCK	CDS	Tabella 55a		
let-7a-2-3p	miR-153-5p	miR-3085	miR-3575	miR-628
let-7d-3p	miR-17-5p	miR-30a-5p	miR-3584-5p	miR-6316
miR-101a-3p	miR-181a-2-3p	miR-30b-5p	miR-3585-5p	miR-632
miR-101b-3p	miR-1912-3p	miR-30c-5p	miR-3588	miR-6322
miR-105	miR-1912-5p	miR-30d-5p	miR-370-3p	miR-6323
miR-106b-5p	miR-194-3p	miR-30e-5p	miR-376b-5p	miR-6329
miR-1188-5p	miR-203b-3p	miR-320-3p	miR-376c-5p	miR-664-1-5p
miR-1193-5p	miR-204-3p	miR-322-3p	miR-382-5p	miR-664-2-5p
miR-125a-3p	miR-206-3p	miR-326-3p	miR-383-5p	miR-675-5p
miR-129-1-3p	miR-20a-5p	miR-330-5p	miR-384-5p	miR-678
miR-129-2-3p	miR-20b-5p	miR-335	miR-411-5p	miR-759
miR-129-5p	miR-214-3p	miR-338-3p	miR-421-3p	miR-761
miR-1298	miR-216a-3p	miR-340-3p	miR-425-3p	miR-764-3p
miR-1306-3p	miR-216a-5p	miR-343	miR-433-3p	miR-764-5p
miR-130a-5p	miR-219a-1-3p	miR-344a-3p	miR-448-3p	miR-802-3p
miR-133c	miR-219a-5p	miR-344b-5p	miR-455-3p	miR-874-5p
miR-134-5p	miR-22-5p	miR-344g	miR-466d	miR-878
miR-138-5p	miR-26a-3p	miR-345-5p	miR-483-3p	miR-881-3p
miR-139-5p	miR-26a-5p	miR-351-3p	miR-495	miR-883-5p
miR-1-3p	miR-26b-5p	miR-3543	miR-511-5p	miR-93-3p
miR-141-5p	miR-291a-3p	miR-3561-5p	miR-532-5p	miR-93-5p
miR-143-5p	miR-295-3p	miR-3568	miR-540-5p	miR-96-5p
miR-146a-3p	miR-29a-5p	miR-3573-3p	miR-544-3p	miR-9a-5p
miR-148b-5p	miR-3075	miR-3574	miR-551b-5p	miR-9b-3p

Tabella 55b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-1193-5p	x			x
miR-148b-5p	x		x	

miR-181a-2-3p		x		x
miR-194-3p		x	x	
miR-214-3p		x		x
miR-291a-3p	x		x	
miR-295-3p	x		x	x
miR-343	x		x	
miR-3543			x	x
miR-3584-5p		x	x	x
miR-483-3p	x	x	x	
miR-511-5p	x			x
miR-675-5p		x	x	

**Tabella 55a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene CLOCK complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 5.4.4. CREB

Per l'mRNA codificato da questo gene è stato predetto solo 1 miRNA in 3'UTR (miR-455-3p) il quale non risultava modificato in nessuna area alla prima analisi del miRNoma.

In 5'UTR è stato predetto un solo miRNA per CREB (miR-150-3p) che risultava in CPU nella prima analisi del miRNoma.

Nella regione CDS sono stati predetti 73 miRNA per CREB tra i quali 12 in NAc shell, 12 in NAc core, 6 in PFCX e 15 in CPU (13 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (**Tab.56a e 56b**).

miRNA CREB	CDS	Tabella 56a	
miR-103-1-5p	miR-203b-3p	miR-3548	miR-6316
miR-103-2-5p	miR-20a-3p	miR-3568	miR-6319
miR-103-3p	miR-212-5p	miR-3575	miR-6326
miR-105	miR-214-3p	miR-3583-3p	miR-6327
miR-107-3p	miR-216a-3p	miR-3593-5p	miR-664-1-5p
miR-107-5p	miR-218b	miR-362-5p	miR-664-2-5p
miR-10b-5p	miR-224-3p	miR-378a-3p	miR-667-5p
miR-1193-5p	miR-22-5p	miR-410-5p	miR-702-5p
miR-122-3p	miR-26b-3p	miR-448-3p	miR-761
miR-130b-5p	miR-291a-3p	miR-490-5p	miR-7a-5p
miR-137-3p	miR-294	miR-493-5p	miR-7b
miR-146a-3p	miR-29a-5p	miR-494-5p	miR-872-5p
miR-15b-5p	miR-322-5p	miR-496-5p	miR-873-3p
miR-16-5p	miR-324-3p	miR-497-5p	miR-876
miR-17-2-3p	miR-331-3p	miR-499-3p	miR-935
miR-191a-3p	miR-33-3p	miR-500-5p	miR-96-5p
miR-194-3p	miR-33-5p	miR-509-5p	
miR-195-5p	miR-346	miR-544-3p	
miR-196c-3p	miR-3544	miR-6314	

Tabella 56b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-103-2-5p			x	x
miR-1193-5p	x			x
miR-122-3p		x	x	
miR-130b-5p			x	x
miR-194-3p		x	x	
miR-214-3p		x		x
miR-224-3p		x		x
miR-291a-3p	x		x	
miR-33-5p	x	x	x	
miR-3583-3p			x	x
miR-410-5p	x			x
miR-499-3p		x		x
miR-702-5p		x	x	x

**Tabella 56a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene CREB complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 5.4.5. DRD3

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 3 miRNA in 3'UTR. Tra questi 1 in PFCX e 2 in CPU (1 comune alle due aree) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma(**Tab.57a e 57b**).

miRNA DRD3	3'UTR	Tabella 57a
miR-1193-5p	miR-207	miR-6318

Tabella 57b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-1193-5p	x			x

**Tabella 57a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene DRD3 complementari alla regione 3'UTR; in giallo i miRNA modificati in CPU, verde in PFCX, viola miRNA comuni alle due regioni.

In 5'UTR sono stati predetti per DRD3 11 miRNA e di questi 2 in NAc shell, 1 in NAc core e 1 in CPU (1 comune a più aree) sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma(**Tab.58a e 58b**).

miRNA DRD3	5'UTR	Tabella 58a
miR-134-3p	miR-344a	miR-3559-5p miR-6334
miR-299a-3p	miR-344a-5p	miR-384-3p miR-743b-3p
miR-299b-3p	miR-3542	miR-484



Tabella 58b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-299a-3p		x	x	

**Tabella 58a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene DRD3 complementari alla regione 5'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

Nella regione CDS sono stati predetti 82 miRNA per DRD3 tra i quali 10 in NAc shell, 11 in NAc core, 6 in PFCX e 15 in CPU (10 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (Tab.59a e 59b).

miRNA DRD3	CDS	Tabella 59a	
miR-100-3p	miR-26b-3p	miR-34a-5p	miR-6326
miR-1188-5p	miR-28-5p	miR-34b-5p	miR-6334
miR-125a-3p	miR-296-3p	miR-34c-5p	miR-666-3p
miR-1306-5p	miR-296-5p	miR-3551-3p	miR-672-3p
miR-136-5p	miR-300-5p	miR-3552	miR-673-5p
miR-15b-5p	miR-3065-3p	miR-3557-3p	miR-708-5p
miR-1-5p	miR-3068-5p	miR-3559-3p	miR-742-3p
miR-16-5p	miR-3085	miR-3561-3p	miR-7578
miR-183-5p	miR-30b-3p	miR-3590-3p	miR-758-5p
miR-194-3p	miR-3120	miR-383-3p	miR-760-3p
miR-1949	miR-322-5p	miR-449a-5p	miR-760-5p
miR-195-5p	miR-323-5p	miR-449c-5p	miR-761
miR-196a-5p	miR-325-3p	miR-484	miR-7a-5p
miR-196b-5p	miR-326-3p	miR-485-5p	miR-7b
miR-196c-5p	miR-327	miR-489-3p	miR-874-5p
miR-203b-3p	miR-328a-3p	miR-490-3p	miR-878
miR-206-5p	miR-328b-3p	miR-497-5p	miR-92a-2-5p
miR-214-3p	miR-330-5p	miR-615	miR-93-3p
miR-216a-3p	miR-343	miR-6314	miR-9a-3p
miR-221-5p	miR-344a	miR-6323	
miR-24-3p	miR-344a-5p	miR-6324	

Tabella 59b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-183-5p		x	x	
miR-194-3p		x	x	
miR-196b-5p	x			x
miR-214-3p		x		x
miR-328b-3p			x	x
miR-343	x		x	
miR-34b-5p		x		x
miR-3559-3p	x			x
miR-615	x		x	x
miR-673-5p	x		x	

**Tabella 59a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene DRD3 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

## 5.4.6. MeCP2

Per l'mRNA codificato da questo gene non sono stati predetti miRNA in 3'UTR.

In 5'UTR sono stati predetti per MeCP2 22 miRNA e di questi 2 in NAc shell, 1 in NAc core e 4 in CPU (1 comune a più aree) sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma (**Tab.60a e 60b**).

miRNA MeCP2	5'UTR	Tabella 60a	
miR-10b-5p	miR-186-5p	miR-336-3p	miR-674-3p
miR-1249	miR-203b-5p	miR-351-5p	miR-872-5p
miR-125a-5p	miR-205	miR-3574	miR-879-5p
miR-125b-5p	miR-221-5p	miR-377-3p	miR-9b-3p
miR-145-3p	miR-330-5p	miR-6318	
miR-181a-2-3p	miR-335	miR-673-3p	

Tabella 60b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-181a-2-3p		X		X

**Tabella 60a,b:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MeCP2 complementari alla regione 5'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

Nella regione CDS sono stati predetti 139 miRNA per MeCP2 tra i quali 16 in NAc shell, 23 in NAc core, 10 in PFCX e 19 in CPU (14 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (**Tab.61a e 61b**).

miRNA MeCP2	CDS	Tabella 61a			
let-7i-3p	miR-155-5p	miR-29a-3p	miR-3577	miR-489-3p	miR-674-5p
miR-10a-5p	miR-181a-1-3p	miR-29b-3p	miR-361-3p	miR-494-5p	miR-678
miR-1188-5p	miR-181b-2-3p	miR-29c-3p	miR-362-5p	miR-496-5p	miR-711
miR-1193-3p	miR-181c-3p	miR-300-5p	miR-363-3p	miR-500-5p	miR-759
miR-1193-5p	miR-184	miR-30a-3p	miR-363-5p	miR-501-5p	miR-760-5p
miR-1199-3p	miR-185-3p	miR-30b-3p	miR-365-5p	miR-503-5p	miR-764-3p
miR-1199-5p	miR-186-3p	miR-30d-3p	miR-370-3p	miR-509-5p	miR-770-5p
miR-1224	miR-18a-5p	miR-30e-3p	miR-370-5p	miR-511-3p	miR-7a-5p
miR-124-3p	miR-191a-5p	miR-32-5p	miR-375-5p	miR-532-3p	miR-7b
miR-127-5p	miR-192-3p	miR-326-3p	miR-377-5p	miR-540-5p	miR-871-3p
miR-128-1-5p	miR-193-5p	miR-326-5p	miR-378a-3p	miR-544-3p	miR-874-5p
miR-128-2-5p	miR-194-3p	miR-330-5p	miR-380-5p	miR-582-5p	miR-878
miR-130b-5p	miR-19b-1-5p	miR-331-3p	miR-383-5p	miR-615	miR-879-5p
miR-133a-5p	miR-19b-2-5p	miR-337-3p	miR-409b	miR-6314	miR-92a-1-5p
miR-133c	miR-203a-3p	miR-340-3p	miR-410-5p	miR-6317	miR-92a-2-5p
miR-134-5p	miR-208a-5p	miR-344a	miR-412-5p	miR-6318	miR-92a-3p
miR-135b-3p	miR-208b-5p	miR-344a-5p	miR-423-5p	miR-6324	miR-92b-3p
miR-136-3p	miR-210-5p	miR-344b-5p	miR-434-3p	miR-6326	miR-92b-5p
miR-138-5p	miR-22-3p	miR-344g	miR-463-5p	miR-6333	miR-93-3p

miR-140-3p	miR-24-3p	miR-345-5p	miR-466c-5p	miR-6334
miR-144-3p	miR-25-3p	miR-346	miR-483-3p	miR-653-3p
miR-145-5p	miR-27a-3p	miR-3552	miR-483-5p	miR-666-3p
miR-151-5p	miR-27b-3p	miR-3557-5p	miR-484	miR-667-5p
miR-153-5p	miR-298-5p	miR-3573-5p	miR-485-5p	miR-672-5p

Tabella 61b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-1193-5p	x			x
miR-128-1-5p	x		x	x
miR-130b-5p			x	x
miR-133a-5p	x			x
miR-184		x	x	x
miR-194-3p		x	x	
miR-29b-3p		x	x	
miR-32-5p		x	x	
miR-410-5p	x			x
miR-463-5p			x	x
miR-483-3p	x	x	x	
miR-483-5p		x	x	x
miR-511-3p	x		x	x
miR-615	x		x	x

**Tabella 61a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MeCP2 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 5.4.7.NOS1

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 7 miRNA in 3'UTR. Tra questi 1 miRNA in NAc shell, 1 in NAc core, 1 in PFCX e 3 in CPU (1 comune a più di una regione) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma(**Tab.62a e 62b**).

miRNA NOS1	3'UTR	Tabella 62a	
miR-1199-3p	miR-326-5p	miR-3562	miR-466d
miR-1249	miR-328a-5p	miR-3574	

Tabella 62b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-328a-5p	x		x	x

**Tabella 62a,b**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS1 complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR sono stati predetti per NOS1 4 miRNA e di questi 2 in NAc shell sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma(**Tab.63**).

miRNA NOS1	5'UTR	Tabella 63	
miR-31a-5p	miR-335	miR-3544	miR-873-5p

**Tabella 63:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS1 complementari alla regione 5'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell.

Nella regione CDS sono stati predetti 222 miRNA per NOS1 tra i quali 19 in NAc shell, 29 in NAc core, 16 in PFCX e 34 in CPU (22 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (Tab.64a e 64b).

miRNA NOS1	CDS	Tabella 64a			
let-7a-2-3p	miR-141-5p	miR-21-3p	miR-338-3p	miR-378a-3p	miR-6320
let-7a-5p	miR-143-3p	miR-214-5p	miR-340-3p	miR-378b	miR-6321
let-7b-5p	miR-143-5p	miR-216b-5p	miR-342-3p	miR-380-3p	miR-6323
let-7c-5p	miR-145-3p	miR-218a-1-3p	miR-342-5p	miR-382-5p	miR-6327
let-7d-5p	miR-146a-3p	miR-218b	miR-343	miR-409b	miR-6328
let-7e-5p	miR-146a-5p	miR-219a-5p	miR-345-5p	miR-410-5p	miR-6331
let-7f-2-3p	miR-146b-5p	miR-219b	miR-349	miR-412-3p	miR-6333
let-7f-5p	miR-147	miR-23a-3p	miR-351-5p	miR-421-5p	miR-664-1-5p
let-7i-5p	miR-15b-5p	miR-23a-5p	miR-352	miR-423-3p	miR-664-2-5p
miR-103-1-5p	miR-1-5p	miR-23b-3p	miR-3541	miR-423-5p	miR-664-3p
miR-103-2-5p	miR-16-5p	miR-25-5p	miR-3543	miR-425-5p	miR-665
miR-103-3p	miR-181a-1-3p	miR-27a-3p	miR-3549	miR-449c-3p	miR-666-3p
miR-107-3p	miR-181a-2-3p	miR-27b-3p	miR-3550	miR-466c-5p	miR-667-5p
miR-107-5p	miR-181c-3p	miR-28-5p	miR-3551-3p	miR-483-3p	miR-668
miR-1224	miR-1839-5p	miR-296-5p	miR-3551-5p	miR-485-5p	miR-671
miR-124-3p	miR-185-3p	miR-299a-3p	miR-3552	miR-490-5p	miR-672-3p
miR-1249	miR-186-3p	miR-299b-3p	miR-3557-3p	miR-493-5p	miR-672-5p
miR-125a-5p	miR-18a-5p	miR-29a-3p	miR-3561-5p	miR-494-5p	miR-674-3p
miR-125b-5p	miR-190a-3p	miR-29b-3p	miR-3569	miR-496-5p	miR-674-5p
miR-128-3p	miR-192-3p	miR-29c-3p	miR-3573-5p	miR-497-5p	miR-678
miR-129-5p	miR-193-5p	miR-300-3p	miR-3574	miR-499-3p	miR-708-5p
miR-1306-5p	miR-195-5p	miR-300-5p	miR-3575	miR-503-5p	miR-759
miR-130b-5p	miR-196a-5p	miR-3065-3p	miR-3576	miR-505-5p	miR-760-5p
miR-132-5p	miR-196b-3p	miR-3072	miR-3580-5p	miR-509-5p	miR-770-3p
miR-133a-3p	miR-196b-5p	miR-3085	miR-3584-5p	miR-511-3p	miR-7a-5p
miR-133a-5p	miR-196c-5p	miR-30c-1-3p	miR-3587	miR-532-3p	miR-7b
miR-133b-3p	miR-199a-3p	miR-30c-2-3p	miR-3589	miR-539-5p	miR-873-3p
miR-133c	miR-199a-5p	miR-3120	miR-3590-5p	miR-540-3p	miR-873-5p
miR-134-3p	miR-200a-3p	miR-320-5p	miR-3591	miR-544-5p	miR-879-5p
miR-135a-5p	miR-201-3p	miR-322-5p	miR-3593-5p	miR-547-5p	miR-880-5p
miR-135b-5p	miR-203b-3p	miR-323-5p	miR-3594-5p	miR-598-3p	miR-883-3p
miR-136-5p	miR-203b-5p	miR-326-3p	miR-361-3p	miR-615	miR-883-5p
miR-138-1-3p	miR-204-3p	miR-326-5p	miR-365-3p	miR-628	miR-93-3p
miR-138-5p	miR-204-5p	miR-327	miR-369-5p	miR-6314	miR-98-5p
miR-139-3p	miR-206-5p	miR-330-5p	miR-370-3p	miR-6316	miR-9a-5p

miR-140-3p	miR-211-5p	miR-331-3p	miR-375-3p	miR-6318	miR-9b-3p
miR-141-3p	miR-212-5p	miR-336-3p	miR-377-5p	miR-6319	

Tabella 64b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-103-2-5p			x	x
miR-130b-5p			x	x
miR-133a-5p	x			x
miR-141-3p		x	x	x
miR-181a-2-3p		x		x
miR-196b-5p	x			x
miR-200a-3p	x	x		
miR-21-3p	x		x	
miR-216b-5p	x	x		
miR-299a-3p		x	x	
miR-30c-1-3p		x	x	
miR-343	x		x	
miR-3543			x	x
miR-3584-5p		x	x	x
miR-3589			x	x
miR-3591	x	x		x
miR-375-3p			x	x
miR-410-5p	x			x
miR-483-3p	x	x	x	
miR-499-3p		x		x
miR-511-3p	x		x	x
miR-615	x		x	x

**Tabella 64a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS1 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPu, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 5.4.8. NOS2

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 6 miRNA in 3'UTR. Tra questi 1 miRNA in NAc shell e 1 in PFCX sono risultati modificati all'analisi del miRNoma(**Tab.65**).

miRNA NOS2	3'UTR	Tabella 65
miR-143-3p	miR-185-5p	miR-3570
miR-153-5p	miR-199a-3p	miR-877

**Tabella 65**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS2 complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, verde in PFCX.

In 5'UTR sono stati predetti per NOS2 5 miRNA e di questi 1 in NAc core è risultato modificato nella prima analisi del miRNoma(**Tab.66**).

miRNA NOS2	5'UTR	Tabella 66
miR-218a-5p	miR-3561-5p	miR-497-3p
miR-26b-3p	miR-3580-3p	

**Tabella66:** miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS2 complementari alla regione 5'UTR; in blu i miRNA modificati in NAc core.

Nella regione CDS sono stati predetti 141 miRNA per NOS2 tra i quali 18 in NAc shell, 23 in NAc core, 16 in PFCX e 24 in CPU (17 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma(**Tab.67a e 67b**).

miRNA NOS2	CDS	Tabella 67a			
miR-103-1-5p	miR-140-3p	miR-22-3p	miR-330-3p	miR-421-5p	miR-665
miR-103-2-5p	miR-141-5p	miR-23a-3p	miR-330-5p	miR-423-5p	miR-666-3p
miR-105	miR-143-5p	miR-23b-3p	miR-331-5p	miR-429	miR-672-3p
miR-107-5p	miR-154-5p	miR-23b-5p	miR-33-3p	miR-433-3p	miR-674-3p
miR-10b-3p	miR-185-3p	miR-28-5p	miR-33-5p	miR-466c-5p	miR-675-3p
miR-1188-3p	miR-188-5p	miR-291a-3p	miR-346	miR-466d	miR-675-5p
miR-1193-3p	miR-18a-3p	miR-295-3p	miR-352	miR-471-5p	miR-678
miR-122-3p	miR-1912-3p	miR-299a-3p	miR-3556a	miR-485-5p	miR-708-5p
miR-124-3p	miR-193-5p	miR-299b-3p	miR-3562	miR-504	miR-711
miR-125a-3p	miR-199a-3p	miR-300-5p	miR-3573-5p	miR-505-5p	miR-7578
miR-126a-3p	miR-199a-5p	miR-301a-5p	miR-3580-5p	miR-541-5p	miR-758-3p
miR-128-3p	miR-200b-3p	miR-301b-5p	miR-3584-5p	miR-542-3p	miR-759
miR-129-5p	miR-200c-3p	miR-3065-3p	miR-3590-3p	miR-543-3p	miR-760-3p
miR-1306-5p	miR-203b-5p	miR-3068-5p	miR-3590-5p	miR-544-3p	miR-761
miR-130b-5p	miR-204-3p	miR-30b-3p	miR-3593-5p	miR-544-5p	miR-770-3p
miR-132-5p	miR-206-5p	miR-320-5p	miR-3594-3p	miR-547-5p	miR-873-5p
miR-133a-5p	miR-20a-3p	miR-323-5p	miR-3594-5p	miR-615	miR-876
miR-133b-5p	miR-210-3p	miR-325-3p	miR-361-3p	miR-6215	miR-883-5p
miR-133c	miR-210-5p	miR-326-3p	miR-369-3p	miR-6314	miR-92a-1-5p
miR-134-3p	miR-21-3p	miR-326-5p	miR-370-5p	miR-6318	miR-93-3p
miR-135a-5p	miR-214-3p	miR-327	miR-374-3p	miR-6323	miR-9b-3p
miR-135b-5p	miR-216b-5p	miR-328a-3p	miR-378a-3p	miR-6326	
miR-136-5p	miR-218a-5p	miR-328a-5p	miR-383-5p	miR-6327	
miR-138-2-3p	miR-219b	miR-328b-3p	miR-409a-3p	miR-6333	

Tabella 67b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-103-2-5p			x	x
miR-122-3p		x	x	
miR-130b-5p			x	x
miR-133a-5p	x			x
miR-21-3p	x		x	
miR-214-3p		x		x
miR-216b-5p	x	x		

miR-23b-5p		x		x
miR-291a-3p	x		x	
miR-295-3p	x		x	x
miR-299a-3p		x	x	
miR-328a-5p	x		x	x
miR-328b-3p			x	x
miR-33-5p	x	x	x	
miR-3584-5p		x	x	x
miR-615	x		x	x
miR-675-5p		x	x	

**Tabella 67a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene NOS2 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPu, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 4.5.9. MOR1

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 92 miRNA in 3'UTR. Tra questi 11 miRNA in NAc shell, 11 in NAc core, 5 in PFCX e 16 in CPu (9 comuni a più di una regione) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma (Tab.68a e 68b).

miRNA MOR 1	3'UTR	Tabella 68a	
let-7a-5p	miR-187-5p	miR-329-3p	miR-501-5p
let-7b-5p	miR-188-3p	miR-336-3p	miR-505-3p
let-7c-5p	miR-188-5p	miR-342-3p	miR-532-3p
let-7d-5p	miR-1912-5p	miR-344a	miR-539-5p
let-7e-5p	miR-203b-5p	miR-344a-5p	miR-540-3p
let-7f-5p	miR-204-5p	miR-34b-3p	miR-540-5p
let-7i-5p	miR-20b-3p	miR-34c-3p	miR-544-3p
miR-1188-5p	miR-211-5p	miR-350	miR-632
miR-122-5p	miR-214-3p	miR-3542	miR-6323
miR-124-5p	miR-216b-3p	miR-3551-3p	miR-6334
miR-1306-5p	miR-216b-5p	miR-3553	miR-653-3p
miR-134-5p	miR-218a-2-3p	miR-3557-3p	miR-708-3p
miR-139-5p	miR-218a-5p	miR-3557-5p	miR-741-5p
miR-140-3p	miR-219a-2-3p	miR-3560	miR-742-5p
miR-141-5p	miR-29b-2-5p	miR-3569	miR-743a-5p
miR-143-5p	miR-29b-2-5p	miR-3573-3p	miR-743b-5p
miR-151-3p	miR-300-5p	miR-3589	miR-759
miR-152-5p	miR-3068-3p	miR-362-3p	miR-761
miR-153-5p	miR-3068-5p	miR-369-3p	miR-7a-2-3p
miR-1-5p	miR-30a-3p	miR-376c-3p	miR-871-5p
miR-17-1-3p	miR-30d-3p	miR-484	miR-877
miR-181a-2-3p	miR-30e-3p	miR-488-5p	miR-881-5p
miR-181b-2-3p	miR-3120	miR-493-5p	miR-98-5p

Tabella 68b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-122-5p	x	x	x	x
miR-124-5p	x	x		
miR-181a-2-3p		x		x
miR-188-3p		x	x	
miR-214-3p		x		x
miR-216b-5p	x	x		
miR-3589			x	x
miR-376c-3p	x		x	
miR-743b-5p		x	x	x

**Tabella 68a,b**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MOR1 complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR sono stati predetti per MOR1 12 miRNA e di questi 2 in NAc core, 2 in PFCX e 1 in CPU (1 comune a più aree) sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma (**Tab.69 e 69b**).

miRNA MOR 1	5'UTR	Tabella 69a	
miR-185-3p	miR-22-3p	miR-3580-3p	miR-6328
miR-18a-3p	miR-23a-5p	miR-3580-5p	miR-673-5p
miR-207	miR-3072	miR-370-3p	miR-880-5p

Tabella 69b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-673-5p	x		x	

**Tabella 69a,b**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MOR1 complementari alla regione 5'UTR; in blu i miRNA modificati in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

Nella regione CDS sono stati predetti 80 miRNA per MOR1 tra i quali 13 in NAc shell, 12 in NAc core, 5 in PFCX e 15 in CPU (13 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (**Tab.70a e 70b**).

miRNA MOR 1	CDS	Tabella 70a	
miR-105	miR-203a-3p	miR-323-3p	miR-451-3p
miR-10b-3p	miR-218a-2-3p	miR-328a-3p	miR-466c-3p
miR-1188-3p	miR-22-5p	miR-328b-3p	miR-487b-5p
miR-1224	miR-23a-3p	miR-330-3p	miR-488-3p
miR-128-3p	miR-23b-3p	miR-336-3p	miR-490-5p
miR-133c	miR-291a-3p	miR-346	miR-505-5p
miR-138-5p	miR-2985	miR-34a-5p	miR-544-3p
miR-145-3p	miR-298-5p	miR-34b-5p	miR-615
miR-145-5p	miR-29a-3p	miR-34c-5p	miR-6320
miR-153-5p	miR-29b-2-5p	miR-3551-3p	miR-6331
miR-1-5p	miR-29b-3p	miR-3556a	miR-664-1-5p
miR-186-3p	miR-29c-3p	miR-3559-3p	miR-664-2-5p
miR-193-3p	miR-29c-5p	miR-3561-3p	miR-665
miR-196a-5p	miR-3065-3p	miR-3568	miR-667-5p



miR-196b-5p	miR-3068-5p	miR-3577	miR-672-3p
miR-196c-5p	miR-3085	miR-3589	miR-672-5p
miR-19b-1-5p	miR-30b-3p	miR-3594-5p	miR-675-5p
miR-19b-2-5p	miR-30c-1-3p	miR-377-5p	miR-743b-3p
miR-200a-5p	miR-30c-2-3p	miR-449a-5p	miR-743b-5p
miR-200b-5p	miR-3120	miR-449c-5p	miR-92a-1-5p

2 o più aree	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-196b-5p	x			x
miR-200a-5p		x	x	
miR-291a-3p	x		x	
miR-29b-3p		x	x	
miR-30c-1-3p		x	x	
miR-328b-3p			x	x
miR-34b-5p		x		x
miR-3559-3p	x			x
miR-3589			x	x
miR-487b-5p		x		x
miR-615	x		x	x
miR-675-5p		x	x	
miR-743b-5p		x	x	x

**Tabella 70a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene MOR1 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

#### 5.4.10. SIRT1

Per l'mRNA codificato da questo gene sono stati predetti 103 miRNA in 3'UTR. Tra questi 12 miRNA in NAc shell, 9 in NAc core, 7 in PFCX e 11 in CPU (10 comuni a più di una regione) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma (Tab.71a e 71b).

miRNA SIRT1	3'UTR	Tabella 71a	
let-7c-1-3p	miR-200a-3p	miR-30d-5p	miR-466b-2-3p
miR-1188-3p	miR-200b-3p	miR-30e-5p	miR-488-3p
miR-1188-5p	miR-200c-3p	miR-31b	miR-494-3p
miR-125b-2-3p	miR-201-3p	miR-320-5p	miR-499-5p
miR-128-3p	miR-203b-3p	miR-323-3p	miR-539-3p
miR-132-3p	miR-204-5p	miR-328a-5p	miR-540-3p
miR-135a-3p	miR-208a-5p	miR-32-3p	miR-543-3p
miR-135a-5p	miR-208b-5p	miR-338-5p	miR-544-3p
miR-135b-5p	miR-20a-3p	miR-3542	miR-544-5p
miR-138-5p	miR-20b-3p	miR-3557-5p	miR-6215
miR-140-3p	miR-211-5p	miR-3560	miR-6216

miR-141-3p	miR-212-3p	miR-3564	miR-628
miR-150-5p	miR-21-3p	miR-3570	miR-6315
miR-153-5p	miR-217-5p	miR-3583-3p	miR-6317
miR-154-3p	miR-22-3p	miR-3590-3p	miR-6322
miR-17-1-3p	miR-23a-3p	miR-3595	miR-6325
miR-181a-5p	miR-23b-3p	miR-361-5p	miR-653-5p
miR-181b-5p	miR-27a-3p	miR-369-3p	miR-664-3p
miR-181c-5p	miR-27b-3p	miR-380-5p	miR-743a-5p
miR-181d-5p	miR-290	miR-381-3p	miR-743b-5p
miR-1843-5p	miR-292-5p	miR-384-5p	miR-802-5p
miR-188-5p	miR-293-5p	miR-421-3p	miR-871-5p
miR-190a-3p	miR-298-3p	miR-429	miR-881-3p
miR-190b-3p	miR-30a-5p	miR-448-3p	miR-881-5p
miR-192-3p	miR-30b-5p	miR-455-3p	miR-9a-5p
miR-199a-5p	miR-30c-5p	miR-466b-1-3p	

Tabella 71b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-141-3p		x	x	x
miR-200a-3p	x	x		
miR-21-3p	x		x	
miR-217-5p		x		x
miR-298-3p		x		x
miR-328a-5p	x		x	x
miR-3583-3p			x	x
miR-466b-2-3p		x	x	
miR-743b-5p		x	x	x
miR-802-5p		x	x	

**Tabella 71a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene SIRT1 complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR non sono stati predetti miRNA per SIRT1.

Nella regione CDS sono stati predetti 104 miRNA per SIRT1 tra i quali 12 in NAc shell, 18 in NAc core, 11 in PFCX e 20 in CPU (14 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma(**Tab.72a e 72b**).

miRNA SIRT1	CDS	Tabella 72a	
let-7a-2-3p	miR-296-5p	miR-3559-3p	miR-6324
miR-1193-3p	miR-298-5p	miR-3568	miR-6325
miR-1199-3p	miR-29a-3p	miR-3570	miR-6331
miR-125a-3p	miR-29a-5p	miR-3587	miR-652-3p
miR-129-5p	miR-29b-3p	miR-3589	miR-664-1-5p
miR-132-5p	miR-29c-3p	miR-3594-5p	miR-664-2-5p
miR-135b-5p	miR-300-5p	miR-370-3p	miR-672-5p
miR-145-3p	miR-3065-3p	miR-370-5p	miR-673-5p

miR-146a-3p	miR-3065-5p	miR-375-3p	miR-708-3p
miR-148b-5p	miR-30a-3p	miR-377-5p	miR-741-3p
miR-150-3p	miR-30c-1-3p	miR-379-3p	miR-742-3p
miR-152-5p	miR-30c-2-3p	miR-383-3p	miR-7578
miR-153-5p	miR-30d-3p	miR-411-3p	miR-758-3p
miR-155-5p	miR-30e-3p	miR-425-5p	miR-770-3p
miR-188-3p	miR-3120	miR-433-3p	miR-7a-1-3p
miR-193-5p	miR-31a-5p	miR-449c-3p	miR-7a-2-3p
miR-200c-5p	miR-326-5p	miR-450a-5p	miR-802-3p
miR-203a-5p	miR-327	miR-451-3p	miR-872-3p
miR-210-5p	miR-328a-5p	miR-455-5p	miR-873-5p
miR-216b-5p	miR-329-5p	miR-489-3p	miR-875
miR-218a-1-3p	miR-331-5p	miR-501-5p	miR-877
miR-219a-2-3p	miR-337-3p	miR-503-5p	miR-878
miR-22-5p	miR-337-5p	miR-544-3p	miR-883-5p
miR-26b-3p	miR-338-3p	miR-547-5p	miR-92a-2-5p
miR-294	miR-351-3p	miR-6320	miR-96-3p
miR-295-3p	miR-3557-3p	miR-6322	miR-9a-5p

Tabella 72b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-148b-5p	x		x	
miR-188-3p		x	x	
miR-203a-5p			x	x
miR-216b-5p	x	x		
miR-295-3p	x		x	x
miR-29b-3p		x	x	
miR-30c-1-3p		x	x	
miR-328a-5p	x		x	x
miR-3559-3p	x			x
miR-3589			x	x
miR-375-3p			x	x
miR-673-5p	x		x	
miR-875	x		x	
miR-96-3p			x	x

**Tabella 72a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene SIRT1 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in Nac shell, blu in Nac core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

### 5.4.11. SIRT2

Per l'mRNA codificato da SIRT2 sono stati predetti 36 miRNA in 3'UTR. Di questi 3 in NAc shell, 3 in NAc core, 1 in PFCX e 11 in CPU (4 comuni a più aree) sono risultati modificati all'analisi del miRNoma (**Tab.73a e 73b**).

miRNA SIRT2	3'UTR	Tabella 73a	
miR-103-1-5p	miR-221-5p	miR-3584-5p	miR-539-5p
miR-103-2-5p	miR-296-5p	miR-376a-5p	miR-540-5p
miR-107-5p	miR-29b-2-5p	miR-449c-3p	miR-6215
miR-1199-5p	miR-3085	miR-466d	miR-664-1-5p
miR-134-3p	miR-30c-2-3p	miR-487b-5p	miR-664-2-5p
miR-140-5p	miR-326-3p	miR-504	miR-702-3p
miR-181d-3p	miR-330-5p	miR-505-5p	miR-711
miR-204-3p	miR-342-3p	miR-511-5p	miR-764-3p
miR-216a-3p	miR-3549	miR-532-5p	miR-874-5p

Tabella 73b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-103-2-5p			x	x
miR-3584-5p		x	x	x
miR-487b-5p		x		x
miR-511-5p	x			x

**Tabella 73a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene SIRT2 complementari alla regione 3'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

In 5'UTR sono stati predetti per SIRT2 24 miRNA e di questi 6 in NAc shell, 5 in NAc core, 1 in PFCX e 3 in CPU (5 comuni a più aree) sono risultati modificati nella prima analisi del miRNoma (**Tab.74a e 74b**).

miRNA SIRT2	5'UTR	Tabella 74a	
miR-125a-3p	miR-206-3p	miR-3564	miR-6318
miR-128-3p	miR-216a-3p	miR-463-5p	miR-6333
miR-135a-3p	miR-27a-3p	miR-466b-5p	miR-7578
miR-1-3p	miR-27b-3p	miR-485-5p	miR-760-5p
miR-181a-2-3p	miR-30c-1-3p	miR-490-5p	miR-883-5p
miR-194-3p	miR-329-5p	miR-540-3p	miR-93-3p

Tabella 74b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-181a-2-3p		x		x
miR-194-3p		x	x	
miR-30c-1-3p		x	x	
miR-463-5p			x	x
miR-466b-5p		x	x	

**Tabella 74a,b**: miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene SIRT2 complementari alla regione 5'UTR; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

Nella regione CDS sono stati predetti 56 miRNA per SIRT2 tra i quali 4 in NAc shell, 5 in NAc core, 2 in PFCX e 10 in CPU (5 comuni a più aree) presentavano modifiche di espressione all'analisi del miRNoma (Tab.75a e 75b).

miRNA SIRT2	CDS	Tabella 75 a	
miR-128-3p	miR-18a-5p	miR-326-3p	miR-532-3p
miR-130a-5p	miR-195-3p	miR-330-5p	miR-540-5p
miR-130b-5p	miR-195-5p	miR-337-3p	miR-541-5p
miR-133a-3p	miR-196b-3p	miR-342-3p	miR-544-5p
miR-133b-3p	miR-203b-3p	miR-343	miR-6325
miR-139-3p	miR-207	miR-349	miR-6332
miR-145-3p	miR-212-5p	miR-3552	miR-665
miR-146a-3p	miR-214-3p	miR-3557-3p	miR-668
miR-150-5p	miR-217-5p	miR-3557-5p	miR-679
miR-152-5p	miR-219a-1-3p	miR-3593-5p	miR-759
miR-153-3p	miR-294	miR-466c-5p	miR-761
miR-15b-5p	miR-3075	miR-497-5p	miR-770-3p
miR-16-5p	miR-320-5p	miR-503-5p	miR-92a-2-5p
miR-185-3p	miR-322-5p	miR-511-3p	miR-9a-5p

Tabella 75b	PFCX	SHELL	CORE	CPU
miR-130b-5p			x	x
miR-214-3p		x		x
miR-217-5p		x		x
miR-343	x		x	
miR-511-3p	x		x	x

**Tabella 75a,b** : miRNA predetti tramite miRWalk 2.0 per il gene SIRT2 complementari alla regione CDS; in rosso i miRNA modificati in NAc shell, blu in NAc core, verde in PFCX, giallo in CPU, viola miRNA comuni a più di una regione.

## 6. Discussione e conclusioni

Le modificazioni indotte dall'auto-somministrazione di sostanze d'abuso come l'eroina e i cannabinoidi possono coinvolgere l'azione dei miRNA a diversi livelli. Infatti esistono due tipi di risposta adattativa sotto il controllo regolatorio dei miRNA: la regolazione diretta della sintesi proteica che ha un ruolo cruciale nella plasticità sinaptica (Smalheiser and Lugli, 2009, Pietrzykowski, 2010), e l'interazione dei miRNA con i fattori di trascrizione che probabilmente modula modificazioni neuroplastiche di più lunga durata a livello di tutta la cellula. È perciò chiaro che i meccanismi a cascata o a feed-back che vanno ad instaurarsi siano piuttosto complessi. Emblematico è il caso che riguarda la famiglia delle ERK/MAPK, una classe di enzimi di trasduzione del segnale attivati da recettori di membrana e stress di tipo chimico o fisico (Chang and Karin, 2001). Il segnale delle MAPK/ERK regola l'espressione dei miRNA locali attraverso la formazione del complesso di fosforilazione di miRNA (Paroo et al., 2009), fornendo un meccanismo comune attraverso il quale un segnale extracellulare può essere rapidamente convertito in una risposta mediata dai miRNA.

I dati ottenuti dalle diverse analisi effettuate in questo lavoro ci hanno permesso di mettere in evidenza delle correlazioni tra i miRNA trovati modificati in seguito all'auto-somministrazione cronica e contingente di eroina e WIN55,212-2 e alcuni tra i possibili target di questi stessi miRNA. In particolare, incrociando i risultati ottenuti dall'analisi computazionale di predizione dei target e quelli ottenuti dall'analisi dell'espressione dei miRNA e degli RNA messaggeri codificati dai geni presi in esame nel nostro studio, siamo stati in grado di mettere in evidenza alcuni miRNA collegandoli ai loro targets. In aggiunta, nello studio effettuato con l'eroina, si è proceduto all'analisi di espressione della sintesi proteica allo scopo di verificare se le interazioni tra miRNA e messaggero, ipotizzate grazie alle suddette analisi, trovassero un riscontro diretto in quello che è il fine ultimo dell'espressione di un gene, ossia il prodotto proteico.

Di seguito andremo a discutere uno per volta i risultati ottenuti per ognuno dei geni analizzati, cercando di mettere in evidenza alcuni tra i potenziali miRNA regolatori di ciascuno di essi. Per fare questo sono stati presi in considerazione solamente i miRNA per i quali, dopo aver effettuato una convalida del risultato ottenuto dall'analisi dell'intero miRNoma attraverso un'analisi in triplicato effettuata in Real Time PCR, si è osservata una variazione di espressione statisticamente significativa. Per tutti gli altri miRNA, i cui livelli sono stati modificati dal trattamento con eroina o WIN55,212-2, ma per i quali non si è ancora proceduto alla conferma con una seconda analisi saranno necessarie ulteriori indagini sperimentali. Quindi, incrociando i risultati ottenuti dalle analisi biochimiche e quelli emersi dall'analisi computazionale di predizione dei target, siamo stati in grado di filtrare un circoscritto numero di miRNA che potrebbero rappresentare i nuovi target nello studio dei meccanismi neuroplastici che stanno alla base dei processi di sviluppo delle dipendenze.

## BDNF

Il BDNF è un importante modulatore della plasticità sinaptica che regola i comportamenti di ricompensa e di dipendenza (Lobo et al., 2010). Questa neurotrofina interagisce con il macchinario traduzionale regolando gli mRNA a livello dendritico e induce cambiamenti nelle strutture sinaptiche e nelle spine dendritiche attraverso meccanismi differenti (Acheson et al., 1995, Huang and Reichardt, 2001). Il BDNF può inoltre indurre la trascrizione dei loci dei geni che contengono i miRNA (Remenyi et al., 2010) e interagire direttamente con i miRNA maturi (Schratt et al., 2006). Dati gli effetti sulla traduzione locale, la morfologia dendritica e sui miRNA, alterazioni di BDNF in risposta a somministrazione di sostanze d'abuso potrebbero profondamente influenzare la struttura e la composizione sinaptica. Alcuni studi hanno messo in evidenza variazione di espressione dei messaggeri di diversi geni, tra cui BDNF in corteccia prefrontale mediale (mPFC), in seguito a test di esposizione a stimoli correlati alla assunzione di eroina, durante il primo e quattordicesimo giorno di astinenza, in ratti precedentemente allenati ad autosomministrarsi la sostanza (Kuntz-Melcavage et al., 2009). Diversi studi hanno messo in evidenza come l'attivazione del segnale BDNF-TrkB nel NAc potenzia il craving (ossia il desiderio di assumere la sostanza), la risposta condizionata agli stimoli associati alla cocaina, e la gratificazione indotta da questa sostanza (Grimm et al., 2001, Graham et al., 2007, Bahi et al., 2008, Ghitza et al., 2010). In mPFC l'attivazione del segnale BDNF-TrkB inibisce la ricompensa da cocaina, come anche la ricerca della sostanza indotta dalla ripresentazione degli stimoli associati ad essa o da "priming" con la cocaina stessa (Berglind et al., 2007, McGinty et al., 2010, Sadri-Vakili et al., 2010).

Tra i miRNA modificati in seguito al trattamento con eroina il miR-532-5p è presente tra quelli che sono stati predetti come probabili modulatori di BDNF per la presenza di complementarità sul 3'UTR. miR-532-5p (FC=2,90; p=0,0075) risulta sovra espresso in NAc core dove, pur non essendoci modifiche dei livelli del messaggero, la proteina BDNF è risultata sotto regolata. Inoltre questa proteina è sotto espressa rispettivamente in NAc shell, PFCX e CPu. In NAc shell e CPu è stata osservata anche una riduzione del corrispondente mRNA. In questo caso, miR-532-5p potrebbe essere il responsabile, attraverso un blocco della traduzione del messaggero (la cui espressione non risulta modificata in quest'area) della riduzione dei livelli proteici di BDNF in NAc core.

Nello studio con WIN55,212-2 è possibile osservare che tra i miRNA predetti per BDNF ben 4 presentano delle variazioni statisticamente significative. Il miR-182, predetto per la regione 3'UTR di BDNF, si trova sotto espresso in NAc shell (FC=-5,26, p=0,0003). Altro miRNA che ha mostrato una sotto regolazione in quest'area cerebrale è miR-200c-3p (FC=-3,98, p=0,0093) predetto per la regione CDS. Nel NAc core troviamo un altro miRNA sotto regolato, il miR-466b-2-3p (FC=-2,01, p=0,0301), predetto ancora per la regione 3'UTR. L'ultimo è il miR-34b-5p (FC=3,17, p=0,0342), anch'esso predetto per la regione 3'UTR di BDNF, ma che, a differenza dei primi tre, risulta sovra regolato a livello del CPu. Mentre nelle due sub regioni del nucleo accumbens non si è osservata nessuna modifica di espressione per l'mRNA di BDNF, in

caudato putamen si ha una sotto regolazione (FC=-2,23, p=0.0141). In questo caso l'aumentata espressione di miR-34b-5p potrebbe essere la causa della diminuzione del messaggero di BDNF per effetto di una parziale degradazione dello stesso. Diversamente, la ridotta espressione dei tre miRNA sopracitati nelle due regioni del nucleo accumbens potrebbe produrre un aumento della proteina BDNF in questa regione, come avviene in seguito a somministrazione di altre sostanze d'abuso (Grimm et al., 2003), dovuta a una riduzione del controllo inibitorio a livello post trascrizionale. Per verificare tale ipotesi sarà necessario effettuare l'analisi dell'espressione proteica come già fatto per lo studio sull'eroina.

## **CCKBR**

Per CCKBR tre miRNA tra quelli predetti sono risultati modificati in seguito ad AS di eroina. miR-199a-5p predetto per la regione CDS è stato trovato sotto regolato in NAc core (FC=-2,26; p=0,0153) e sovra regolato in CPu (FC=3,03; p=0,0153). Due miRNA predetti per il 3'UTR di questo messaggero sono miR-301a-3p (FC=2,24; p=0,0045) sovra regolato in NAc core e miR-130a-3p sovra regolato (FC=2,67; p=0,0293) in CPu. In queste due aree cerebrali non è stata osservata nessuna variazione per il messaggero, che invece risulta sotto regolato in NAc shell. Tuttavia il western blot ha evidenziato un deciso aumento della proteina in NAc core. In questo caso possiamo mettere in evidenza come alla riduzione dei livelli di miR-199a-5p in NAc core corrisponda un'aumentata espressione della proteina CCKBR.

Molto interessante è il risultato ottenuto per il gene CCKBR nello studio con WIN55,212-2, per il quale spicca il miR-122-5p, predetto per la regione CDS, che è risultato sotto espresso in tutte e 4 le aree cerebrali analizzate, PFCX (FC=-3,22, p=0,0307), NAc shell (FC=-29,48, p=0,0226), NAc core (FC=-76,23, p=0,0327) e CPu (FC=-2,70, p=0,0042). Benché non si osservi nessuna variazione dei livelli del messaggero di CCKBR, la spiccata sotto regolazione di questo miRNA, in particolare al livello del nucleo accumbens, potrebbe risultare in un effetto opposto sull'espressione di questo recettore in queste aree cerebrali e fornire le basi per nuovi studi sul suo coinvolgimento nella dipendenza da cannabinoidi. Sono presenti in letteratura evidenze sull'interazione tra endocannabinoidi, recettori CB1, colecistochinina e recettore CCKBR (o CCK2) in malattie psichiatriche correlate alla paura come PTSD (Chhatwal et al., 2009; Bowers and Ressler 2015). È stata osservata anche una comorbidità tra PTSD e dipendenza da cannabinoidi (Cornelius et al., 2010; Agosti et al., 2002; Kessler et al., 1995), evidenziando un effetto positivo dei cannabinoidi nel trattamento di alcuni sintomi di questa patologia (Fraser, 2009).

## **CLOCK**

CLOCK è un attivatore trascrizionale che fa parte di un gruppo di geni (clock genes) deputati al controllo del ritmo circadiano, dal quale dipendono tutta una serie di funzioni fisiologiche. La proteina CLOCK interagendo con altre proteine codificate da diversi "geni clock" (Per, Bmal1 e Cry per esempio) controlla



tutta una serie di processi di trascrizione e traduzione attraverso la regolazione di meccanismi a feedback (Ko and Takahashi, 2006). Importantissimo è il loro coinvolgimento col sistema di neurotrasmissione, infatti è stato visto che il rilascio di dopamina, glutammato e GABA nel nucleo accumbens è controllato dal ritmo circadiano (Castaneda et al., 2004), e dalla capacità di CLOCK di regolare l'attività della tirosina idrossilasi (McClung et al., 2005). È stato osservato che l'assunzione di sostanze d'abuso può essere influenzata dal ritmo circadiano, o che la stessa assunzione possa modificarne il ritmo (Abarca et al., 2002, Spanagel et al., 2005a, Spanagel et al., 2005b). Questa reciproca influenza tra la somministrazione di sostanze d'abuso ed il ritmo circadiano può essere spiegata dalla presenza di questi geni e miRNA potrebbero spiegare un'azione regolatoria sull'assunzione di sostanze attraverso la modulazione dell'espressione delle proteine deputate al controllo dell'orologio interno.

Lo studio con l'eroina ha messo in evidenza due miRNA che potrebbero regolare l'espressione di CLOCK attraverso un'interazione sulla regione CDS. Uno è miR-138-5p la cui espressione risulta aumentata dopo trattamento con eroina in PFCX (FC=1,84; p=0,0402) e NAc core (FC=5,91; p=0,0005), l'altro è miR-532-5p, predetto già come potenziale regolatore di BDNF, ma che in quel caso presentava complementarità di sequenza per la regione 3'UTR e che abbiamo visto essere aumentato in NAc core. Il messaggero di questo gene non risulta modificato in nessuna delle 4 aree analizzate mentre la proteina risulta leggermente sotto regolata in NAc core e CPU. Abbiamo quindi, nel NAc core, una correlazione tra due miRNA sovra espressi che potrebbero aver sotto regolato la proteina CLOCK predetta come loro potenziale target.

Tra tutti i miRNA per cui il gene CLOCK è stato predetto come possibile target, uno nel nostro studio con WIN55,212-2 risulta sotto regolato in NAc shell. Si tratta del miR-483-3p (FC=-6,52, p=0,0027) il quale presenta affinità per la regione CDS di questo gene. L'espressione del RNA messaggero codificato da questo gene non risulta modificato in quest'area cerebrale, ulteriori analisi saranno necessarie allo scopo di verificare se è presente un effetto sulla proteina.

Diverse sono le evidenze presenti in letteratura che sostengono il coinvolgimento di questo gene nei processi di assunzione di sostanze d'abuso. Ratti KO per il CLOCK mostrano un aumento nella ricompensa da cocaina e dell'eccitabilità dei neuroni dopaminergici del mesencefalo (McClung et al., 2005, Roybal et al., 2007).

## **CREB**

Molte sostanze d'abuso alterano la trascrizione genica attraverso la modulazione di fattori di trascrizione, condizione che può contribuire al potenziale di abuso e a fattori come dipendenza e astinenza. La proteina legante l'elemento cAMP responsivo (CREB) è quello di cui si meglio si conosce il meccanismo tra questi fattori di trascrizione. Infatti l'effetto finale di molti neurotrasmettitori, sia che agiscano su recettori accoppiati a proteine G (dopamina, adenosina, GABA, glutammato) o canali ionici permeabili al calcio

(glutammato), e diversi fattori di crescita come BDNF, hanno come effetto finale quello di modulare la fosforilazione del CREB, che in questo stato può attivare la trascrizione genica.

Tra i miRNA modificati dal trattamento con eroina nessuno risulta presente tra quelli che sono stati predetti per il CREB. L'analisi dell'espressione del messaggero ha mostrato un aumento in CPU dove la proteina risulta invece sotto regolata, accompagnata da una leggera riduzione dei livelli proteici anche in NAc core. L'analisi dell'espressione proteica di CREB fosforilato ha fornito invece risultati completamente diversi, con una forte sotto regolazione in NAc core, una leggera sotto regolazione in NAc shell, PFCX e CPU.

L'autosomministrazione di WIN55,212-2 ha prodotto la sotto regolazione di miR-122-3p (FC=-14,95, p=0,0452) in NAc core tra i miRNA predetti aventi CREB come target, nella sua regione CDS. In questo caso si sono osservati aumentati livelli di espressione di questo mRNA in CPU.

Il fatto che in questo caso non sia stato possibile mettere in risalto alcuna correlazione tra miRNA e CREB è probabilmente dovuto al fatto che i miRNA per cui è stata effettuata una conferma in triplicato tramite Real Time, e quindi utilizzabili per l'incrocio con i risultati di predizione, sono veramente molto pochi semmai a confronto con l'elevatissimo numero di miRNA la cui espressione è stata trovata modificata nella prima fase all'analisi del miRNoma. Saranno quindi necessarie ulteriori analisi sugli altri miRNA per poter avere un quadro completo di tutte le possibili interazioni.

Sono numerose in letteratura le evidenze che mostrano correlazioni tra CREB e miRNA in particolare per quanto riguarda gli effetti della cocaina (Vo et al., 2005, Graham et al., 2007, Rajasethupathy et al., 2009) e viste le note correlazioni del CREB con l'azione di differenti sostanze d'abuso non è difficile prevedere un coinvolgimento dei miRNA anche nei processi di sviluppo della dipendenza di altre droghe. Infatti, l'induzione di CREB nel NAc riduce gli effetti gratificanti di cocaina e oppioidi (Carlezon et al., 1998, Barrot et al., 2002) e analisi in seguito ad astinenza, spontanea o indotta, hanno mostrato forti alterazioni nell'espressione nucleare di p-CREB per diverse sostanze d'abuso quali alcol (Pandey et al., 2001a, Pandey et al., 2003), morfina (Guitart et al., 1992, Chartoff et al., 2003), amfetamina (Hsieh et al., 2002), metamfetamina (McDaid et al., 2006), MDMA (Martínez-Turrillas et al., 2006), cocaina (Kuo et al., 2007), e nicotina (Pandey et al., 2001b, Brunzell et al., 2003, Pluzarev and Pandey, 2004). L'esposizione a  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC) aumenta il p-CREB in PFCX e ippocampo (Rubino et al., 2007). A conferma di quello osservato nel nostro studio con eroina, solo in pochi di questi lavori si può notare una corrispondenza tra l'espressione di p-CREB e l'espressione di CREB. Questo perché il cambiamento di espressione di CREB coinvolge la trascrizione genica, modificazioni post-trascrizionali e post-traduzionali, mentre le variazioni dei livelli di p-CREB sono imputabili solamente all'azione delle proteine chinasi.

### **DRD3**

Il recettore D<sub>3</sub> per la dopamina fa parte della famiglia dei recettori D<sub>2</sub> e fu identificato per la prima volta nel 1990 (Sokoloff et al., 1990). Diversamente da DRD1 e DRD2, che sono ampiamente localizzati in tutte quelle

aree cerebrali dove sono presenti terminazioni dopaminergiche, la localizzazione di DRD3 è circoscritta alle parti più ventrali del complesso striatale (NAc) e altre aree del sistema limbico (Sokoloff et al., 1990, Bouthenet et al., 1991). Questi recettori sono espressi, anche se in misura minore, in PFCX e striato dorsale di primati non umani (Morissette et al., 1998) e umani (Suzuki et al., 1998), mentre lo striato dorsale dei roditori ne è quasi completamente sprovvisto. In accordo con l'espressione di questi recettori sui neuroni dopaminergici (Diaz et al., 2000), diverse evidenze suggeriscono che siano implicati nella modulazione del meccanismo di rilascio della DA dal momento che topi KO per DRD3 mostrano dei livelli maggiori di DA extracellulare rispetto ai WT, mentre i livelli tissutali non cambiano (Koeltzow et al., 1998, Joseph et al., 2002). Il DRD3 è l'unico tra i recettori dopaminergici, la cui espressione è regolata, nel NAc, dal BDNF (Levesque et al., 1995, Guillin et al., 2004, Le Foll et al., 2005a), inoltre alcuni autori hanno osservato come i livelli dei messaggeri di BDNF e DRD3 aumentino in seguito a somministrazione di varie sostanze d'abuso, suggerendo che la via BDNF-DRD3 possa essere implicata nei processi di dipendenza (Le Foll et al., 2002, Neisewander et al., 2004, Le Foll et al., 2005a, Graham et al., 2007). Infatti il blocco di questo recettore è stato messo in relazione alla dipendenza da alcol (Vengeliene et al., 2006, Heidbreder et al., 2007), nicotina (Andreoli et al., 2003, Le Foll et al., 2005b, Pak et al., 2006), oppioidi (Ashby et al., 2003, Francès et al., 2004, Vazquez et al., 2007) e psicostimolanti (Pilla et al., 1999, Le Foll et al., 2002, Di Ciano et al., 2003, Cervo et al., 2005, Xi et al., 2006, Cervo et al., 2007).

Nel nostro studio nessun miRNA per cui sia stata trovata una variazione statisticamente significativa in seguito ad auto-somministrazione cronica di eroina si trova tra quelli predetti per questo gene. Il messaggero di DRD3 è risultato sotto regolato nel NAc core. In questo caso non è stato possibile effettuare l'analisi proteica a causa di problemi durante la fase di estrazione, che quindi dovrà essere ripetuta in studi futuri.

Nel caso dell'esperimento con WIN55,212-2, per DRD3, solamente uno tra quelli predetti è presente tra i miRNA modificati nel nostro studio. Si tratta di miR-34b-5p che abbiamo già visto essere sovra espresso in CPU perché predetto come miRNA regolatore anche di BDNF. Mentre nel primo caso miR-34b-5p era stato predetto per la regione 3'UTR dell'mRNA di BDNF, in questo caso il miRNA presenta complementarietà per una sequenza presente nella regione CDS di DRD3. Anche l'mRNA di DRD3 risulta sovra espresso nella stessa regione cerebrale.

In questo caso non abbiamo nessuna corrispondenza che possa farci pensare ad un meccanismo diretto di controllo del miRNA sul messaggero. Come detto in precedenza saranno necessari ulteriori esperimenti per confermare un numero maggiore di miRNA tra quelli per i quali è stata osservata una variazione durante la prima analisi dell'intero miRNoma. Sono infatti presenti in letteratura evidenze della correlazione tra DRD3 e miRNA nei processi di dipendenza da cocaina (Chandrasekar and Dreyer, 2009, 2011).

## MeCP2

MeCP2 fa parte di una classe di proteine in grado di legarsi ai domini metilati del DNA nelle isole CpG e agire da repressori trascrizionali (Kim et al., 2009). Ci sono diverse correlazioni tra metilazione del DNA e dipendenze. L'auto-somministrazione di cocaina aumenta l'espressione di MeCP2 in Nac (Host et al., 2011) e striato dorsale (Cassel et al., 2006) e l'inibizione di MeCP2 attraverso lentivirus nello striato dorsale, ma non nel NAc, provoca in condizioni di accesso prolungato una riduzione dell'assunzione della droga (Im et al., 2010). Ancora è stato visto come MeCP2 sia coinvolto nelle risposte comportamentali indotte dall'amfetamina (Deng et al., 2010). Sono due i possibili meccanismi che potrebbero spiegare l'azione di MeCP2 nel processo di ricompensa. Primo, una riduzione di MeCP2 previene l'aumento di densità delle spine dendritiche nel NAc, mentre aumenta il numero delle sinapsi GABAergiche. A questo si aggiunge un aumento della fosforilazione di MeCP2, specificamente negli interneuroni GABA del NAc, che regola positivamente l'attività trascrizionale (Deng et al., 2010). Un secondomodello suggerisce che MeCP2 reprima la trascrizione di specifici miRNA, inducendo una disinibizione dell'espressione di BDNF (Im et al., 2010), che è anche un bersaglio di CREB. Ricordiamo che BDNF, come discusso in precedenza, sembra avere un'azione che induce l'assunzione di alcune sostanze d'abuso. È stato anche osservato che l'esposizione a sostanze psicostimolanti riduce l'interazione di MeCP2 sul promoter IV di BDNF in mPFC (Sadri-Vakili et al., 2010). Quello che affiora da questi studi è che MeCP2 possa giocare un ruolo chiave in quello che è il meccanismo regolatorio svolto dai miRNA nel processo di sviluppo della dipendenza, in particolare attraverso un'interazione col segnale di BDNF.

In seguito ad auto-somministrazione cronica di eroina il miR-138-5p è risultato sovra regolato in PFCX e NAc core. Questo miRNA, anche in questo caso come per CLOCK, è stato predetto per la regione CDS. Il messaggero di MeCP2 è risultato modificato solo a livello del NAc core risultando sotto regolato. In questa regione l'espressione della corrispondente proteina è fortemente sotto regolata mentre è stata osservata solo una lieve sovra regolazione nel CPU e una moderata sotto regolazione nel NAc shell. Anche in questo caso si può osservare buona una corrispondenza tra la regolazione del miRNA e quella del target predetto. Infatti alla marcata sovra regolazione miR-138-5p in NAc core corrisponde una forte riduzione della proteina MeCP2 in quest'area. Visto che MeCP2 agisce come soppressore della trascrizione genica, il risultato di una riduzione dei suoi livelli potrebbe riflettersi, in questo caso, in un'attivazione della trascrizione.

Per quanto riguarda gli effetti dell'auto-somministrazione di WIN55,212-2, il miR-32-5p è tra i miRNA predetti per MeCP2 e risulta sotto regolato ( $FC = -3,30$ ,  $p = 0,0056$ ) nel nostro studio a livello del core del nucleo accumbens. Presenta complementarità per una sequenza presente a livello della regione CDS di questo mRNA. Il messaggero di MeCP2 risulta sovra regolato nel CPU.

## NOS1

La nitrossido sintetasi (NOS) è l'enzima deputato alla sintesi di monossido d'azoto (NO) e NOS1 rappresenta l'isoforma di questo enzima espressa a livello neuronale. Alcune evidenze supportano l'ipotesi che il NO possa essere coinvolto nella dipendenza fisica da oppioidi. Per iniziare, è stato dimostrato come gli inibitori di NOS riducano alcuni sintomi dell'astinenza da oppiacei come la morfina (Adams et al., 1993, Kimes et al., 1993, Majeed et al., 1994, Vaupel et al., 1995, Dambisya and Lee, 1996, Hall et al., 1996, Leza et al., 1996), suggerendo come il NO possa fungere da modulatore della sindrome d'astinenza da oppiacei e ipotizzando che gli inibitori di NOS possano essere degli utili coadiuvanti nel suo trattamento (Vaupel et al., 1997). È stato anche mostrato come questi inibitori possano prevenire o ridurre la tolleranza agli oppiacei come la morfina (Majeed et al., 1994, Highfield and Grant, 1998).

Recettori CB1, di cui WIN55,212.2 è un agonista, e NOS sono stati messi in stretta correlazione nello striato (Fusco et al., 2004). Per esempio, nei neuroni spinosi medi dello striato i recettori CB1 sono localizzati su almeno un terzo dei neuroni che esprimono NOS1 (Azad et al., 2001, Fusco et al., 2004). Alcuni studi hanno messo in evidenza come la stimolazione dei recettori CB1 induca la sintesi di NO (Stefano et al., 1997, Prevot et al., 1998). Inoltre l'azione di WIN55,212-2 è stata correlata anche ad una riduzione della fosforilazione di NOS1 attraverso un meccanismo di inibizione dell'attività di PKA (Kim et al., 2006). Uno studio di Carney e colleghi su cellule N18TG2 ha messo in evidenza come agonisti cannabinoidi, tra cui WIN55,212-2, stimolino la produzione di NO e questa sia parzialmente o completamente bloccata dalla rimonabant, un antagonista dei recettori CB1 (Carney et al., 2009).

Altri autori hanno messo in evidenza l'efficacia degli inibitori di NOS nel ridurre l'assunzione (Rezvani et al., 1995, Lallemand and De Witte, 1997, Uzbay et al., 1998) e gli effetti dell'astinenza da alcol (Adams et al., 1995, Uzbay and Kayaalp, 1995), nella riduzione dello sviluppo di sensibilizzazione agli effetti di stimolazione motoria (Pudiak and Bozarth, 1993, Stewart et al., 1994, Ohno and Watanabe, 1995) o di iperattività motoria (Stewart et al., 1994, Kim and Park, 1995, Przegaliński and Filip, 1996, Itzhak, 1997) indotta da amfetamina e cocaina e di riduzione della sensibilizzazione alla nicotina (Shim et al., 2002, Jain et al., 2008). È stato anche osservato che la nicotina aumenta i livelli di NO in numerose regioni cerebrali (Pogun et al., 2000, Weruaga et al., 2002).

Per quanto riguarda lo studio con eroina il miR-138-5p è stato già descritto tra quelli predetti per CLOCK e MeCP2, e visto essere sovra regolato in PFCX e NAc core. Anche nel caso di NOS1 questo miRNA presenta una regione *seed* complementare ad una sequenza presente sulla CDS. miR-199a-5p è anch'esso predetto per la CDS di questo messaggero, così come lo era per CCKBR. Questo miRNA ricordiamo essere sotto regolato in NAc core e sovra regolato in CPU. L'espressione dell'mRNA di NOS1 risulta ridotta nel NAc core ma non nelle altre regioni analizzate, mentre la relativa proteina risulta moderatamente sotto espressa in quest'area cerebrale e leggermente sotto regolata in CPU. In questo caso sono presenti due miRNA che potrebbero agire come regolatori di NOS1 e sui quali il trattamento con eroina ha avuto un effetto opposto,

uno infatti risulta sotto regolato mentre l'altro è stato sovra regolato. L'entità della modifica osservata su questi due miRNA è però differente, infatti miR-138-5p mostra una sovra espressione (FC=5,91) di natura maggiore rispetto alla sotto espressione osservata per miR-199a-5p (FC=-2,26). In accordo con queste osservazioni la proteina NOS1 risulta sotto regolata in NAc, come se l'effetto inibitorio di miR-138-5p avesse la meglio sulla disinibizione risultante dalla riduzione di miR-199a-5p. In compenso i livelli di miR-199a-5p risultano aumentati in CPu (FC=3,03) riflettendosi in una leggera riduzione della proteina di NOS1 in quest'area.

Per quanto riguarda l'esperimento con WIN55,212-2, sono tre i miRNA predetti per la regione CDS di questo messaggero la cui espressione è risultata modificata in seguito al trattamento. Il miR-483-3p, che risulta sotto regolato a livello del NAcshell, già descritto come possibile modulatore di CLOCK. Il miR-200a-3p risulta sotto regolato a livello della PFCX (FC=-2,56, p= 0,0462) e del NAc shell (FC=-15,53, p= 0,0170). L'ultimo è miR-30c-1-3p (FC=-2,63, p= 0,0244) che risulta sotto regolato nel NAc core. In nessuna di queste tre aree è possibile osservare una modifica di espressione dell'mRNA di NOS1 che invece risulta decisamente sovra regolato in CPu. Per poter rivelare l'eventuale effetto regolatorio di questi 3 miRNA sul loro target sarà necessario, come primo passo, effettuare l'analisi dell'espressione proteica di quest'ultimo. In secondo luogo delle analisi di conferma per altri miRNA, tra i tantissimi che sono risultati modificati con la prima analisi di questo studio, potranno fornire informazioni utili per scoprire degli altri candidati regolatori di NOS1.

## **NOS2**

Questo gene codifica per una seconda isoforma dell'enzima nitrossido sintetasi, NOS2 o anche inducibile (iNOS) è espresso principalmente nelle cellule gliali e immunitarie.

È stata osservata un'aumentata espressione di iNOS nel locus coeruleus del cervello di soggetti morti per overdose da eroina (Dyuzen and Lamash, 2009).

Tra i miRNA modificati dall'esposizione cronica all'eroina solo uno rientra tra quelli predetti per questo gene, miR-199a-5p che risulta predetto anche per la CDS di NOS2 oltre che per quella di CCKBR e NOS1. Ricordiamo che questo miRNA risulta sotto espresso in NAc core e sovra espresso in CPu. Il messaggero di NOS2 non risulta modificato in nessuna area cerebrale mentre non sono presenti i dati relativi alla proteina. Non abbiamo in questo caso dati sufficienti per ipotizzare una correlazione tra miRNA e target.

Nello studio con WIN55,212-2 miR-200c-3p, che abbiamo visto essere sotto regolato in NAc shell, oltre ad essere predetto come miRNA regolatore per BDNF, lo è anche per NOS2 ed anche in questo caso la predizione riguarda la CDS dell'mRNA. Discorso analogo per miR-122-3p, sotto regolato in NAc core, predetto per NOS2 oltre che per CREB, sempre per la regione CDS. In questo caso il messaggero risulta regolato positivamente solo in CPu. Come per l'esperimento con eroina, anche in questo caso i dati a disposizione risultano insufficienti per poter ipotizzare una modulazione dei miRNA su questo gene. Per

verificare se la sotto regolazione dei due miRNA nelle due sub regioni del NAc possa riflettersi in un aumento dell'espressione di questo enzima in queste aree cerebrali saranno necessarie ulteriori indagini atte a valutare l'espressione proteica.

## **MOR1**

L'attività di MOR è regolata a diversi livelli, con in risalto il ruolo di MeCP2 nella regolazione dell'espressione di questo gene (Hwang et al., 2007, 2009). Si ha un controllo della sua attività anche a livello trascrizionale (Wei and Loh, 2002, Law et al., 2004), post-trascrizionale (Pan et al., 2001, Choi et al., 2006, Kim et al., 2008), traduzionale (Song et al., 2007, Song et al., 2009) e infine a livello proteico attraverso fosforilazione e desensitizzazione (Arden et al., 1995, El Kouhen et al., 2001).

L'attivazione di MOR nel NAc gioca un ruolo fondamentale nell'auto-somministrazione di eroina (Vaccarino et al., 1985, Koob, 1992) e la somministrazione sistemica degli antagonisti di MOR naloxone e naltrexone ha dimostrato il ruolo di questo recettore nella ricaduta, indotta da esposizione a stimoli associati alla sostanza, per alcol, amfetamina e nicotina (Liu and Weiss, 2002, Burattini et al., 2006, Liu et al., 2009). Nel NAc, ma non in mPFC o CPu, i livelli dell'mRNA di MOR si riducono nel primo giorno di astinenza da eroina in un modello di auto-somministrazione cronica, per poi tornare ai livelli basali nei giorni successivi (Theberge et al., 2012). È invece stato osservato un incremento dei livelli del messaggero di MOR nel NAc e striato dorsale 12 ore dopo la cessazione di somministrazione ripetuta non contingente a dosi crescenti di morfina (Zhou et al., 2006). In ogni caso queste discrepanze non stupiscono dal momento che numerose sono le evidenze a sostegno dell'ipotesi che la somministrazione contingente produca effetti neuro adattativi differenti da quella non contingente (Jacobs et al., 2005, Lecca et al., 2007, Kuntz et al., 2008). Inoltre l'effetto dell'esposizione a sostanze oppioidi sull'espressione di MOR dipende dalle dosi dell'agonista oppioide utilizzato e dal tipo di somministrazione, che rappresenta molto probabilmente la causa della discordanza dei dati sull'argomento presenti in letteratura (Brodsky et al., 1995, Buzas et al., 1996, Castelli et al., 1997, Sehba et al., 1997, Duttaroy and Yoburn, 2000).

Anche in questo caso, tra i miRNA modificati dalla somministrazione di eroina, il miR-138-5p risulta predetto per la CDS di MOR1 (abbiamo già visto essere predetto per CLOCK, MeCP2 e NOS1). Mentre non si è osservata nessuna modificazione a livello post-trascrizionale per questo gene, sono presenti modificazioni dell'espressione proteica, le quali sembrano essere in accordo con le variazioni di espressione di miR-138-5p. Infatti alla leggera sovra regolazione di questo miRNA in PFCX corrisponde una blanda riduzione dei livelli del recettore, mentre alla più marcata sovra espressione del miRNA nel NAc core coincide una forte sotto regolazione di questa proteina recettoriale.

Abbiamo visto che in seguito all'auto-somministrazione cronica di WIN55,212-2 il miR-122-5p risulta sotto regolato in tutte e 4 le aree cerebrali analizzate e predetto come possibile regolatore di CCKBR nella regione CDS. Questo miRNA altamente sotto regolato in particolar modo nel nucleo accumbens è predetto

anche per MOR1, ma in questo caso per la regione 3'UTR. Altri due miRNA, tra quelli trovati modificati nel nostro studio, sono stati predetti per MOR1 nella regione CDS. Il miR-30c-1-3p che abbiamo visto essere predetto anche per NOS1, e sotto regolato in NAc core e miR-34b-5p predetto anche per la regione CDS di DRD3 e per la regione 3'UTR di BDNF che risulta sovra regolato nel caudato putamen dei ratti trattati con WIN55,212-2. Questi miRNA potrebbero giocare un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione di questo recettore in seguito ad esposizione a sostanze cannabinoidi. Diverse evidenze infatti dimostrano una stretta interazione tra sistema cannabinoide e sistema oppioide (Fattore et al., 2005, Vigano et al., 2005, Robledo et al., 2008, Trigo et al., 2010). Sono stati osservati cambiamenti dell'espressione o dell'attività del recettore CB1 in linee mutanti per i recettori oppioidi mu e delta. Nei cervelli KO per il recettore mu non sono state osservate variazioni di espressione di CB1 ma è stata riscontrata una riduzione di efficacia dell'agonista CB1 WIN55,212-2 in particolare nel CPu (Berrendero et al., 2003).

## **SIRT1**

Le sirtuine, (silent information regulator of transcription o SIRT) sono classificate come istone-deacetilasi NAD-dipendenti di classe III, le quali oltre alla deacetilazione degli istoni deacetilano anche altre proteine cellulari come tubulina, p53 e NFkB (Denu, 2005). Svolgono quindi un ruolo nei meccanismi di regolazione epigenetica e sono state associate a modificazioni indotte da sostanze d'abuso. Studi sulle alterazioni della cromatina dopo somministrazione cronica di cocaina, ma non dopo somministrazione acuta, hanno rivelato, nel NAc, una sovra regolazione di SIRT1 e SIRT2. In oltre l'inibizione farmacologica delle sirtuine riduce la CPP e l'auto-somministrazione di cocaina, dove invece l'attivazione produce un aumento della risposta di ricompensa allo psicostimolante (Renthal et al., 2009). L'induzione di SIRT1 e SIRT2, caratterizzata da un aumento dei livelli dei corrispettivi mRNA nel NAc, è associata ad un aumento dell'acetilazione di H3 e del legame di  $\Delta$ FosB sul promoter dei due geni, suggerendo che le sirtuine siano dei target di  $\Delta$ FosB che aumentano in seguito a somministrazione cronica di cocaina. Il fatto che i substrati delle sirtuine non siano solo gli istoni ma si trovino anche a livello citosolico, suggerisce che il ruolo di queste deacetilasi in risposta alla somministrazione di sostanze d'abuso possa esplicarsi in modi diversi. Per esempio è stato osservato come SIRT1 sia necessario per la normale attivazione di ERK (Li et al., 2008).

Il nostro studio mostra che tra i miRNA modificati dalla somministrazione cronica con eroina due sono presenti tra quelli predetti come potenziali regolatori di SIRT1 per la sua regione 3'UTR. Sono entrambi miRNA che abbiamo visto essere ripetutamente predetti per mRNA di altri geni anche se nei casi precedenti si trattava della corrispettiva CDS. Tra questi il miR-138-5p che si trova sovra espresso in PFCX e NAc core e il miR-199a-5p i cui livelli risultano ridotti in NAc core e aumentati in CPu. In questo studio i livelli del messaggero di SIRT1 non risultano modificati in nessuna delle quattro aree, mentre l'espressione proteica risulta fortemente ridotta in CPu e solo lievemente in PFCX. Anche qui possiamo notare una certa correlazione in CPu dove all'aumento di espressione di miR-199a-5p corrisponde una marcata sotto



regolazione della proteina e in PFCX dove al lieve aumento di miR-138-5p coincide una leggera sotto espressione della proteina. Nessuna variazione dei livelli della proteina sono osservabili in NAc core, dove entrambi i miRNA sopraccitati risultano modificati, ma con effetti opposti. Ci troviamo di fronte ad una situazione analoga a quella descritta per NOS1, ma mentre in quel caso abbiamo ipotizzato che la riduzione dei livelli della proteina in NAc potesse essere il risultato della diversa entità con cui l'eroina aveva modificato l'espressione dei due miRNA, non possiamo ipotizzare lo stesso meccanismo in questo caso. Qui infatti i livelli della proteina codificata da SIRT1 non risultano modificati, questo potrebbe indicare che altri fattori, come altri miRNA, partecipino all'ottenimento dell'effetto finale osservato. Per questo motivo sarà utile completare le analisi di conferma anche di tutti gli altri miRNA la cui espressione è risultata modificata all'analisi del miRNoma e per cui non si è ancora proceduto ad una convalida. Infatti sono presenti in letteratura evidenze sulla modulazione delle sirtuine da parte di miRNA. Per esempio è stato visto come SIRT1 sia in grado di modulare la plasticità sinaptica e la formazione della memoria attraverso un meccanismo mediato dal miRNA-134(Gao et al., 2010).

Perquanto concerne lo studio di AS cronica di WIN55,212-2, per SIRT1 sono stati predetti 4 diversi miRNA tra quelli la cui espressione è stata modificata dal trattamento. Tutti quanti sono stati predetti anche per altri geni presenti in questo studio. Il miR-200a-3p, la cui espressione è sotto regolata in PFCX e NAc shell, è già stato predetto per NOS1, ma mentre in quel caso la predizione interessava la regione CDS, in questo caso la sequenza interessata si trova su 3'UTR. Analogamente il miR-200c-3p, sotto regolato in NAc shell, predetto per la regione CDS di BDNF e NOS2, nel caso di SIRT1 viene predetto per 3'UTR. Il miR-466b-2-3p, sotto regolato in NAc core, viene predetto per la regione 3'UTR di SIRT1 come già in precedenza per BDNF. Per ultimo il miR-30c-1-3p, sotto regolato in NAc core, è stato predetto per la regione CDS oltre che di NOS1 e MOR1 anche di SIRT1 e per la regione 5'UTR di SIRT2. L'analisi effettuata per valutare i livelli di espressione del messaggero di SIRT1 hanno rivelato un incremento solamente in CPU. Come possiamo osservare l'effetto del trattamento sui livelli dei miRNA sembra essere esercitato principalmente a livello del NAc, con due miRNA sotto regolati in core e due sotto regolati in shell. Anche in questo caso, per verificare se la sotto espressione di questi miRNA possa aver prodotto un aumento dei livelli proteici di SIRT1 in queste regioni cerebrali, sarà necessaria l'analisi dell'espressione proteica come fatto nello studio con l'eroina.

## **SIRT2**

Il miR-532-5p, la cui espressione è stata incrementata in NAc core in seguito al trattamento cronico con eroina, è presente tra i miRNA predetti per SIRT2. Come nei casi precedentemente analizzati di BDNF e CLOCK, miR-532-5p presenta affinità per la regione 3'UTR del messaggero di SIRT2. Mentre in nessuna regione si osserva variazione dei livelli dell'mRNA trascritto da questo gene, si può osservare una moderata riduzione dell'espressione della relativa proteina nel NAc core. La riduzione dei livelli di questa proteina in

NAc core coincide con la concomitante sovra regolazione di miR-532-5p nella stessa area cerebrale suggerendo il possibile ruolo di questo miRNA nella regolazione post-trascrizionale di SIRT2.

Come già detto, l'auto-somministrazione cronica di WIN55,212-2 ha indotto la riduzione di espressione del solo miR-30c-1-3p in NAc core, il quale è stato predetto per la regione 5'UTR di SIRT2. In questo studio il trascritto di SIRT2 risulta sovra regolato solo nel CPU.

Per confermare la bontà dei risultati ottenuti saranno necessarie ulteriori indagini atte a confermare con un maggiore grado di certezza le correlazioni tra miRNA e relativi target che sono state ipotizzate in questa tesi. Il primo passo sarà quello di effettuare l'analisi dell'espressione proteica anche nello studio con WIN55,212-2 come fatto in quello con eroina allo scopo di poter mettere in luce se le variazioni di espressione osservate per i miRNA abbiano portato ad alterazioni osservabili sul proteoma. In oltre sarà utile effettuare degli studi più approfonditi per rivelare la vera natura di queste interazioni. Per esempio inducendo la stimolazione o la soppressione della sintesi di un determinato miRNA, oppure inoculando oligonucleotidi antisenso che ne inibiscano l'attività, è possibile confermare se un determinato miRNA esplicava la sua azione direttamente o indirettamente sui relativi bersagli. Ancora, molto importante, sarà proseguire con esperimenti mirati a confermare tutte quelle variazioni di espressione dei miRNA osservate con la prima analisi e non ancora convalidate con un'analisi in triplicato.

Un passo successivo sarà quello di verificare le variazioni di espressione dei miRNA non soltanto al termine dei 15 giorni di astinenza ma anche durante le altre fasi di sviluppo della dipendenza, come la fase di acquisizione, la fase di assunzione compulsiva e quella immediatamente successiva alla sospensione della somministrazione del farmaco, in modo tale da avere un quadro maggiormente esaustivo sul ruolo dei miRNA durante tutte le tappe del processo di sviluppo del fenomeno della dipendenza. Ancora, sarebbe utile valutare l'effetto sull'espressione dei miRNA dell'esposizione a stimoli correlati alla sostanza in animali precedentemente trattati cronicamente con la stessa e utilizzare un paradigma di "self/yoked-administration" per valutare le differenze della somministrazione non contingente di questi farmaci rispetto a quella contingente.

I risultati di questo esperimento pongono quindi le basi per studi successivi che possano confermare il ruolo di questi miRNA nei processi di dipendenza e fornire una piattaforma di studio per l'individuazione di futuri bersagli terapeutici per il trattamento delle dipendenze da sostanze cannabinoidi e oppiacei.

## 7. Bibliografia

- Abarca C, Albrecht U, Spanagel R (2002) Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:9026-9030.
- Abrahante JE, Daul AL, Li M, Volk ML, Tennessen JM, Miller EA, Rougvie AE (2003) The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Developmental cell* 4:625-637.
- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1995) A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death.
- Adams ML, Kalicki JM, Meyer ER, Cicero TJ (1993) Inhibition of the morphine withdrawal syndrome by a nitric oxide synthase inhibitor, N G-nitro-L-arginine methyl ester. *Life sciences* 52:PL245-PL249.
- Adams ML, Sewing BN, Chen J, Meyer ER, Cicero TJ (1995) Nitric Oxide-Related Agents Alter Alcohol Withdrawal in Male Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19:195-199.
- Allis C, Jenuwein T, Reinberg D (2007) *Epigenetics*. Edited by Caparros ML. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in neurobiology* 58:315-348.
- Andreoli M, Tessari M, Pilla M, Valerio E, Hagan JJ, Heidbreder CA (2003) Selective antagonism at dopamine D3 receptors prevents nicotine-triggered relapse to nicotine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* 28:1272-1280.
- Aravin A, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 5:337 - 350.
- Arden JR, Segredo V, Wang Z, Lameh J, Sadée W (1995) Phosphorylation and Agonist-Specific Intracellular Trafficking of an Epitope-Tagged  $\mu$ -Opioid Receptor Expressed in HEK 293 Cells. *Journal of neurochemistry* 65:1636-1645.
- Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ (2006) Blockade of cannabinoid CB 1 receptors alters contextual learning and memory. *European journal of pharmacology* 539:177-183.
- Artalejo CR, Elhamdani A, Palfrey HC (2002) Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin-and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:6358-6363.
- Ashby CR, Paul M, Gardner EL, Heidbreder CA, Hagan JJ (2003) Acute administration of the selective D3 receptor antagonist SB-277011A blocks the acquisition and expression of the conditioned place preference response to heroin in male rats. *Synapse* 48:154-156.
- Azad SC, Marsicano G, Eberlein I, Putzke J, Zieglgänsberger W, Spanagel R, Lutz B (2001) Differential role of the nitric oxide pathway on  $\Delta^9$ -THC-induced central nervous system effects in the mouse. *European Journal of Neuroscience* 13:561-568.

- Bahi A, Boyer F, Dreyer J-L (2008) Role of accumbens BDNF and TrkB in cocaine-induced psychomotor sensitization, conditioned-place preference, and reinstatement in rats. *Psychopharmacology* 199:169-182.
- Bahi A, Dreyer J-L (2013) Striatal modulation of BDNF expression using microRNA124a-expressing lentiviral vectors impairs ethanol-induced conditioned-place preference and voluntary alcohol consumption. *European Journal of Neuroscience* 38:2328-2337.
- Balleine BW, O'Doherty JP (2010) Human and rodent homologies in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* 35:48-69.
- Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, Storm DR, Neve RL, Yin JC (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:11435-11440.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116:281-297.
- Berglind WJ, See RE, Fuchs RA, Ghee SM, Whitfield TW, Miller SW, McGinty JF (2007) A BDNF infusion into the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking in rats. *European Journal of Neuroscience* 26:757-766.
- Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, Dopamine, and the Molecular Mechanisms of Memory. *Neuron* 25:515-532.
- Berrendero F, Mendizábal V, Murtra P, Kieffer BL, Maldonado R (2003) Cannabinoid receptor and WIN 55 212-2-stimulated [35S]-GTPγS binding in the brain of mu-, delta-and kappa-opioid receptor knockout mice. *European Journal of Neuroscience* 18:2197-2202.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews* 28:309-369.
- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C (2008) The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Research* 36:D149-D153.
- Beveridge NJ, Gardiner E, Carroll AP, Tooney PA, Cairns MJ (2010) Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol Psychiatry* 15:1176-1189.
- Beveridge NJ, Tooney PA, Carroll AP, Gardiner E, Bowden N, Scott RJ, Tran N, Dedova I, Cairns MJ (2008) Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia. *Human Molecular Genetics* 17:1156-1168.
- Bouthenet M-L, Souil E, Martres M-P, Sokoloff P, Giros B, Schwartz J-C (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain research* 564:203-219.
- Brodsky M, Elliott K, Hynansky A, Inturrisi CE (1995) CNS levels of mu opioid receptor (MOR-1) mRNA during chronic treatment with morphine or naltrexone. *Brain research bulletin* 38:135-141.

- Brunzell DH, Mineur YS, Neve RL, Picciotto MR (2009) Nucleus accumbens CREB activity is necessary for nicotine conditioned place preference. *Neuropsychopharmacology* 34:1993-2001.
- Brunzell DH, Russell DS, Picciotto MR (2003) In vivo nicotine treatment regulates mesocorticolimbic CREB and ERK signaling in C57Bl/6J mice. *Journal of neurochemistry* 84:1431-1441.
- Burattini C, Gill T, Aicardi G, Janak P (2006) The ethanol self-administration context as a reinstatement cue: acute effects of naltrexone. *Neuroscience* 139:877-887.
- Buzas B, Rosenberger J, Cox BM (1996) Mu and delta opioid receptor gene expression after chronic treatment with opioid agonist. *Neuroreport* 7:1505-1508.
- Camí J, Farré M (2003) Drug Addiction. *New England Journal of Medicine* 349:975-986.
- Carlezon WA, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* 282:2272-2275.
- Carney ST, Lloyd ML, MacKinnon SE, Newton DC, Jones JD, Howlett AC, Norford DC (2009) Cannabinoid regulation of nitric oxide synthase I (nNOS) in neuronal cells. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 4:338-349.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich J-B, Aunis D, Zwiller J (2006) Fluoxetine and Cocaine Induce the Epigenetic Factors MeCP2 and MBD1 in Adult Rat Brain. *Molecular Pharmacology* 70:487-492.
- Castaneda TR, Prado BM, Prieto D, Mora F (2004) Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *Journal of pineal research* 36:177-185.
- Castelli MP, Melis M, Mamei M, Fadda P, Diaz G, Gessa GL (1997) Chronic morphine and naltrexone fail to modify  $\mu$ -opioid receptor mRNA levels in the rat brain. *Molecular brain research* 45:149-153.
- Cervo L, Burbassi S, Colovic M, Caccia S (2005) Selective antagonist at D 3 receptors, but not non-selective partial agonists, influences the expression of cocaine-induced conditioned place preference in free-feeding rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 82:727-734.
- Cervo L, Cocco A, Petrella C, Heidbreder CA (2007) Selective antagonism at dopamine D 3 receptors attenuates cocaine-seeking behaviour in the rat. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 10:167-181.
- Chan K, Brodsky M, Davis T, Franklin S, Inturrisi CE, Yoburn BC (1995) The effect of the irreversible  $\mu$ -opioid receptor antagonist clocinnamox on morphine potency, receptor binding and receptor mRNA. *European Journal of Pharmacology* 287:135-143.
- Chandrasekar V, Dreyer J-L (2009) microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate Cocaine-induced Plasticity. *Molecular and Cellular Neuroscience* 42:350-362.

- Chandrasekar V, Dreyer J-L (2011) Regulation of MiR-124, Let-7d, and MiR-181a in the Accumbens Affects the Expression, Extinction, and Reinstatement of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference. *Neuropsychopharmacology* 36:1149-1164.
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.
- Chartoff EH, Papadopoulou M, Konradi C, Carlezon WA (2003) Dopamine-dependent increases in phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) during precipitated morphine withdrawal in primary cultures of rat striatum. *Journal of neurochemistry* 87:107-118.
- Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004) MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science* 303:83-86.
- Chen J, Paredes W, Li J, Smith D, Lowinson J, Gardner EL (1990)  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology* 102:156-162.
- Chen J, Paredes W, Lowinson JH, Gardner EL (1991) Strain-specific facilitation of dopamine efflux by  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol in the nucleus accumbens of rat: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience letters* 129:136-140.
- Chen K, Kandel DB, Davies M (1997) Relationships between frequency and quantity of marijuana use and last year proxy dependence among adolescents and adults in the United States. *Drug and alcohol dependence* 46:53-67.
- Choi HS, Kim CS, Hwang CK, Song KY, Wang W, Qiu Y, Law P-Y, Wei L-N, Loh HH (2006) The opioid ligand binding of human  $\mu$ -opioid receptor is modulated by novel splice variants of the receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 343:1132-1140.
- Correa F, Mestre L, Molina-Holgado E, Arevalo-Martin 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 reviews in medicinal chemistry* 5:671-675.
- Coutureau E, Killcross S (2003) Inactivation of the infralimbic prefrontal cortex reinstates goal-directed responding in overtrained rats. *Behavioural brain research* 146:167-174.
- Coutureau E, Marchand AR, Di Scala G (2009) Goal-directed responding is sensitive to lesions to the prelimbic cortex or basolateral nucleus of the amygdala but not to their disconnection. *Behavioral neuroscience* 123:443.
- Dambisya YM, Lee TL (1996) Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice. *British journal of pharmacology* 117:914-918.
- de Oliveira Alvares L, Genro BP, Breda RV, Pedroso MF, Da Costa JC, Quilfeldt JA (2006) AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain research* 1075:60-67.

- de Velasco EMF, Law PY, Rodríguez RE (2009) Mu Opioid Receptor from the Zebrafish Exhibits Functional Characteristics as Those of Mammalian Mu Opioid Receptor. *Zebrafish* 6:259-268.
- Debiec J, LeDoux JE, Nader K (2002) Cellular and Systems Reconsolidation in the Hippocampus. *Neuron* 36:527-538.
- Deng JV, Rodriguiz RM, Hutchinson AN, Kim I-H, Wetsel WC, West AE (2010) MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nat Neurosci* 13:1128-1136.
- Denu JM (2005) The Sir2 family of protein deacetylases. *Current opinion in chemical biology* 9:431-440.
- Di Chiara G (1998) A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *Journal of psychopharmacology* 12:54-67.
- Di Chiara G (1999) Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *European journal of pharmacology* 375:13-30.
- Di Chiara G (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behavioural Brain Research* 137:75-114.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 47:227-241.
- Di Ciano P, Underwood RJ, Hagan JJ, Everitt BJ (2003) Attenuation of cue-controlled cocaine-seeking by a selective D<sub>3</sub> dopamine receptor antagonist SB-277011-A. *Neuropsychopharmacology*.
- Di Marzo V (1998) 2-Arachidonoyl-glycerol as an "endocannabinoid": limelight for a formerly neglected metabolite. *Biochemistry Biokhimiia* 63:13-21.
- Diana M, Tepper J (2002) Electrophysiological pharmacology of mesencephalic dopaminergic neurons. In: *Dopamine in the CNS II*, pp 1-61: Springer.
- Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz J-C, Sokoloff P (2000) Dopamine D<sub>3</sub> receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *The Journal of Neuroscience* 20:8677-8684.
- Dolganiuc A, Petrasek J, Kodys K, Catalano D, Mandrekar P, Velayudham A, Szabo G (2009) MicroRNA Expression Profile in Lieber-DeCarli Diet-Induced Alcoholic and Methionine Choline Deficient Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Models in Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 33:1704-1710.
- Dreyer J-L (2010) New insights into the roles of microRNAs in drug addiction and neuroplasticity. *Genome Med* 2:92.
- Duttaroy A, Yoburn BC (2000) In vivo regulation of  $\mu$ -opioid receptor density and gene expression in CXBK and outbred Swiss Webster mice. *Synapse* 37:118-124.

- Dweep H, Sticht C, Kharkar A, Pandey P, Gretz N (2013) Parallel Analysis of mRNA and microRNA Microarray Profiles to Explore Functional Regulatory Patterns in Polycystic Kidney Disease: Using PKD/Mhm Rat Model. *PLoS ONE* 8:e53780.
- Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N (2011) miRWalk – Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *Journal of Biomedical Informatics* 44:839-847.
- Dyuzen I, Lamash N (2009) Histo-and immunocytochemical detection of inducible NOS and TNF- $\alpha$  in the locus coeruleus of human opiate addicts. *Journal of chemical neuroanatomy* 37:65-70.
- Eguchi M (2004) Recent advances in selective opioid receptor agonists and antagonists. *Medicinal Research Reviews* 24:182-212.
- Eipper-Mains JE, Kiraly DD, Palakodeti D, Mains RE, Eipper BA, Graveley BR (2011) microRNA-Seq reveals cocaine-regulated expression of striatal microRNAs. *RNA* 17:1529-1543.
- El Kouhen R, Burd AL, Erickson-Herbrandson LJ, Chang C-Y, Law P-Y, Loh HH (2001) Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail differentially regulates  $\mu$ -opioid receptor internalization. *Journal of Biological Chemistry* 276:12774-12780.
- Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, Dean NM, Freier SM, Bennett CF, Lollo B, Griffey R (2004) MicroRNA-143 Regulates Adipocyte Differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 279:52361-52365.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs [mdash] microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-269.
- Fattore L, Deiana S, Spano SM, Cossu G, Fadda P, Scherma M, Fratta W (2005) Endocannabinoid system and opioid addiction: behavioural aspects. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 81:343-359.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9:102-114.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature* 391:806-811.
- Francès H, Le Foll B, Diaz J, Smirnova M, Sokoloff P (2004) Role of DRD3 in morphine-induced conditioned place preference using *drd3*-knockout mice. *Neuroreport* 15:2245-2249.
- French ED, Dillon K, Wu X (1997) Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* 8:649-652.
- Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002)  $\beta$ -Secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 59:1381-1389.
- Fusco F, Martorana A, Giampa C, De March Z, Farini D, D'Angelo V, Sancesario G, Bernardi G (2004) Immunolocalization of CB1 receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse* 53:159-167.



- Gaidatzis D, van Nimwegen E, Hausser J, Zavolan M (2007) Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics* 8:69.
- Gao J, Wang W-Y, Mao Y-W, Gräff J, Guan J-S, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC, Tsai L-H (2010) A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466:1105-1109.
- Gasbarri A, Pompili A, Packard MG, Tomaz C (2014) Habit learning and memory in mammals: Behavioral and neural characteristics. *Neurobiology of learning and memory* 114:198-208.
- Ghitza UE, Zhai H, Wu P, Airavaara M, Shaham Y, Lu L (2010) Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: a review. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35:157-171.
- Gifford A, Gardner E, Ashby Jr CR (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.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *American Journal of Psychiatry*.
- Graham DL, Edwards S, Bachtell RK, DiLeone RJ, Rios M, Self DW (2007) Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nature neuroscience* 10:1029-1037.
- Grimm JW, Hope BT, Wise RA, Shaham Y (2001) Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* 412:141-142.
- Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su T-P, Shaham Y (2003) Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *The Journal of neuroscience* 23:742-747.
- Guillin O, Griffon N, Diaz J, Le Foll B, Bezard E, Gross C, Lammers C, Stark H, Carroll P, Schwartz J-C (2004) Brain-derived neurotrophic factor and the plasticity of the mesolimbic dopamine pathway. *International review of neurobiology* 425-444.
- Guindon J, De Léan A, Beaulieu P (2006) Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain* 121:85-93.
- Guitart X, Thompson MA, Mirante CK, Greenberg ME, Nestler EJ (1992) Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Journal of neurochemistry* 58:1168-1171.
- Haig D (2004) The (dual) origin of epigenetics. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 69, pp 67-70: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hall S, Milne B, Jhamandas K (1996) Nitric oxide synthase inhibitors attenuate acute and chronic morphine withdrawal response in the rat locus coeruleus: an in vivo voltammetric study. *Brain research* 739:182-191.

- Hammell M, Long D, Zhang L, Lee A, Carmack CS, Han M, Ding Y, Ambros V (2008) mirWIP: microRNA target prediction based on microRNA-containing ribonucleoprotein-enriched transcripts. *Nat Meth* 5:813-819.
- He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5:522-531.
- He Y, Yang C, Kirkmire CM, Wang ZJ (2010) Regulation of Opioid Tolerance by let-7 Family MicroRNA Targeting the  $\mu$  Opioid Receptor. *The Journal of Neuroscience* 30:10251-10258.
- Hébert SS, De Strooper B (2009) Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences* 32:199-206.
- Hébert SS, Horré K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahtaroglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B (2008) Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/ $\beta$ -secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:6415-6420.
- Heidbreder CA, Andreoli M, Marcon C, Hutcheson DM, Gardner EL, Ashby CR (2007) PRECLINICAL STUDY: Evidence for the role of dopamine D3 receptors in oral operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol-seeking behavior in mice. *Addiction biology* 12:35-50.
- Heidbreder CA, Gardner EL, Xi Z-X, Thanos PK, Mugnaini M, Hagan JJ, Ashby CR (2005) The role of central dopamine D 3 receptors in drug addiction: a review of pharmacological evidence. *Brain Research Reviews* 49:77-105.
- Highfield D, Grant S (1998) Ng-nitro-L-arginine, an NOS inhibitor, reduces tolerance to morphine in the rat locus coeruleus. *Synapse* 29:233-239.
- Hofacker IL (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Research* 31:3429-3431.
- Hollander JA, Im H-I, Amelio AL, Kocerha J, Bali P, Lu Q, Willoughby D, Wahlestedt C, Conkright MD, Kenny PJ (2010) Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signaling. *Nature* 466:197-202.
- Hollingsworth EB, McNeal ET, Burton JL, Williams RJ, Daly JW, Creveling CR (1985) Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosomes preparation from guinea pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-generating systems, receptors, and enzymes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 5:2240-2253.
- Holsinger R, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G (2002) Increased expression of the amyloid precursor  $\beta$ -secretase in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 51:783-786.
- Holt CE, Bullock SL (2009) Subcellular mRNA Localization in Animal Cells and Why It Matters. *Science* 326:1212-1216.
- Host L, Dietrich J-B, Carouge D, Aunis D, Zwiller J (2011) Cocaine self-administration alters the expression of chromatin-remodelling proteins; modulation by histone deacetylase inhibition. *Journal of psychopharmacology* 25:222-229.

- Hsieh HC, Li HY, Lin MY, Chiou YF, Lin SY, Wong CH, Chen JC (2002) Spatial and temporal profile of haloperidol-induced immediate-early gene expression and phosphoCREB binding in the dorsal and ventral striatum of amphetamine-sensitized rats. *Synapse* 45:230-244.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* 24:677.
- Huang W, Li MD (2009) Nicotine modulates expression of miR-140\*, which targets the 3'-untranslated region of dynamin 1 gene (Dnm1). *International Journal of Neuropsychopharmacology* 12:537-546.
- Huang W, Ma JZ, Payne TJ, Beuten J, Dupont RT, Li MD (2008) Significant association of DRD1 with nicotine dependence. *Human genetics* 123:133-140.
- Hwang CK, Song KY, Kim CS, Choi HS, Guo XH, Law PY, Wei LN, Loh HH (2007) Evidence of endogenous mu opioid receptor regulation by epigenetic control of the promoters. *Molecular and cellular biology* 27:4720-4736.
- Hwang CK, Song KY, Kim CS, Choi HS, Guo XH, Law PY, Wei LN, Loh HH (2009) Epigenetic programming of mu-opioid receptor gene in mouse brain is regulated by MeCP2 and Brg1 chromatin remodelling factor. *Journal of cellular and molecular medicine* 13:3591-3615.
- Hwang CK, Wagley Y, Law PY, Wei LN, Loh HH (2012) MicroRNAs in opioid pharmacology. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 7:808-819.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annual review of neuroscience* 29:565-598.
- Idris AI, van't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, Ralston SH (2005) Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nature medicine* 11:774-779.
- Im H-I, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ (2010) MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* 13:1120-1127.
- Itzhak Y (1997) Modulation of cocaine-and methamphetamine-induced behavioral sensitization by inhibition of brain nitric oxide synthase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282:521-527.
- Jacobs E, Smit A, Vries T, Schoffelmeer A (2005) Long-Term Gene Expression in the Nucleus Accumbens Following Heroin Administration is Subregion-Specific and Depends on the Nature of Drug Administration. *Addiction biology* 10:91-100.
- Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.*
- Jain R, Mukherjee K, Mohan D (2008) Effects of nitric oxide synthase inhibitors in attenuating nicotine withdrawal in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 88:473-480.

- Jambhekar A, DeRisi JL (2007) Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA* 13:625-642.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the Histone Code. *Science* 293:1074-1080.
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2004) Human MicroRNA Targets. *PLoS Biol* 2:e363.
- Joseph J, Wang Y-M, Miles P, Budygin E, Picetti R, Gainetdinov R, Caron M, Wightman R (2002) Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D<sub>3</sub> receptors. *Neuroscience* 112:39-49.
- Jung E-J, Santarpia L, Kim J, Esteva FJ, Moretti E, Buzdar AU, Di Leo A, Le X-F, Bast RC, Park S-T, Pusztai L, Calin GA (2012) Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer* 118:2603-2614.
- Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR (2003) Self-administration of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology* 169:135-140.
- Kauer JA, Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8:844-858.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209-216.
- Kim CS, Hwang CK, Song KY, Choi HS, Kim do K, Law PY, Wei LN, Loh HH (2008) Novel function of neuron-restrictive silencer factor (NRSF) for posttranscriptional regulation. *Biochimica et biophysica acta* 1783:1835-1846.
- Kim H-S, Park W-K (1995) Nitric oxide mediation of cocaine-induced dopaminergic behaviors: ambulation-accelerating activity, reverse tolerance and conditioned place preference in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275:551-557.
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A (2007) A MicroRNA Feedback Circuit in Midbrain Dopamine Neurons. *Science* 317:1220-1224.
- Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S (2009) Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 66:596-612.
- Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA (2006) Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol* 69:691-696.
- Kimes AS, Vaupel DB, London ED (1993) Attenuation of some signs of opioid withdrawal by inhibitors of nitric oxide synthase. *Psychopharmacology* 112:521-524.
- Kislauskis EH, Singer RH (1992) Determinants of mRNA localization. *Current Opinion in Cell Biology* 4:975-978.
- Ko CH, Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics* 15:R271-R277.
- Kocerha J, Kauppinen S, Wahlestedt C (2009) microRNAs in CNS Disorders. *Neuromol Med* 11:162-172.

- Koeltzow TE, Xu M, Cooper DC, Hu X-T, Tonegawa S, Wolf ME, White FJ (1998) Alterations in dopamine release but not dopamine autoreceptor function in dopamine D3 receptor mutant mice. *The Journal of neuroscience* 18:2231-2238.
- Koob GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in pharmacological sciences* 13:177-184.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52-58.
- Koob GF, Le Moal M (2001) Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97-129.
- Krichevsky AM, King KS, DONAHUE CP, KHRAPKO K, KOSIK KS (2003) A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 9:1274-1281.
- Kuntz-Melcavage KL, Brucklacher RM, Grigson PS, Freeman WM, Vrana KE (2009) Gene expression changes following extinction testing in a heroin behavioral incubation model. *BMC neuroscience* 10:95.
- Kuntz KL, Patel KM, Grigson PS, Freeman WM, Vrana KE (2008) Heroin self-administration: II. CNS gene expression following withdrawal and cue-induced drug-seeking behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90:349-356.
- Kuo Y-M, Liang KC, Chen H-H, Cherng CG, Lee H-T, Lin Y, Huang A-M, Liao R-M, Yu L (2007) Cocaine-but not methamphetamine-associated memory requires de novo protein synthesis. *Neurobiology of learning and memory* 87:93-100.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853 - 858.
- Lallemand F, De Witte P (1997) L-NNA decreases cortical vascularization, alcohol preference and withdrawal in alcoholic rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 58:753-761.
- Lau N, Lim L, Weinstein E, Bartel D (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858 - 862.
- Law P, Loh H, Wei L-N (2004) Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. *Neuropharmacology* 47:300-311.
- Le Foll B, Diaz J, Sokoloff P (2005a) A single cocaine exposure increases BDNF and D3 receptor expression: implications for drug-conditioning. *Neuroreport* 16:175-178.
- Le Foll B, Francès H, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P (2002) Role of the dopamine D3 receptor in reactivity to cocaine-associated cues in mice. *European Journal of Neuroscience* 15:2016-2026.
- Le Foll B, Sokoloff P, Stark H, Goldberg SR (2005b) Dopamine D3 receptor ligands block nicotine-induced conditioned place preferences through a mechanism that does not involve discriminative-stimulus or antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology* 30:720-730.

- Lecca D, Cacciapaglia F, Valentini V, Di Chiara G (2006) Monitoring extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens shell and core during acquisition and maintenance of intravenous WIN 55,212-2 self-administration. *Psychopharmacology* 188:63-74.
- Lecca D, Valentini V, Cacciapaglia F, Acquas E, Di Chiara G (2007) Reciprocal effects of response contingent and noncontingent intravenous heroin on in vivo nucleus accumbens shell versus core dopamine in the rat: a repeated sampling microdialysis study. *Psychopharmacology* 194:103-116.
- Lee R, Feinbaum R, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843 - 854.
- Lee RC, Ambros V (2001) An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:862-864.
- Levesque D, Martres M-P, Diaz J, Griffon N, Lammers CH, Sokoloff P, Schwartz J-C (1995) A paradoxical regulation of the dopamine D3 receptor expression suggests the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:1719-1723.
- Lewis B, Burge C, Bartel D (2005a) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15 - 20.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005b) Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* 120:15-20.
- Lewohl JM, Nunez YO, Dodd PR, Tiwari GR, Harris RA, Mayfield RD (2011) Up-Regulation of MicroRNAs in Brain of Human Alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35:1928-1937.
- Leza J-C, Lizasoain I, Cuellar B, Moro MA, Lorenzo P (1996) Correlation between brain nitric oxide synthase activity and opiate withdrawal. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 353:349-354.
- Li J, Li J, Liu X, Qin S, Guan Y, Liu Y, Cheng Y, Chen X, Li W, Wang S (2013a) MicroRNA expression profile and functional analysis reveal that miR-382 is a critical novel gene of alcohol addiction. *EMBO molecular medicine* 5:1402-1414.
- Li J, Li J, Liu X, Qin S, Guan Y, Liu Y, Cheng Y, Chen X, Li W, Wang S, Xiong M, Kuzhikandathil EV, Ye JH, Zhang C (2013b) MicroRNA expression profile and functional analysis reveal that miR-382 is a critical novel gene of alcohol addiction.
- Li MD, van der Vaart AD (2011) MicroRNAs in addiction: adaptation's middlemen? *Molecular psychiatry* 16:1159-1168.
- Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD (2008) SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell metabolism* 8:38-48.
- Lim L, Lau N, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter J, Castle J, Bartel D, Linsley P, Johnson J (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769 - 773.

- Lin S-Y, Johnson SM, Abraham M, Vella MC, Pasquinelli A, Gamberi C, Gottlieb E, Slack FJ (2003) The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Developmental cell* 4:639-650.
- Liu X, Palmatier MI, Caggiula AR, Sved AF, Donny EC, Gharib M, Booth S (2009) Naltrexone attenuation of conditioned but not primary reinforcement of nicotine in rats. *Psychopharmacology* 202:589-598.
- Liu X, Weiss F (2002) Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms. *The Journal of neuroscience* 22:7856-7861.
- Lobo MK, Covington HE, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, Damez-Werno D, Dietz DM, Zaman S, Koo JW, Kennedy PJ (2010) Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science* 330:385-390.
- Lu Z, Xu J, Xu M, Pasternak GW, Pan YX (2014) Morphine regulates expression of mu-opioid receptor MOR-1A, an intron-retention carboxyl terminal splice variant of the mu-opioid receptor (OPRM1) gene via miR-103/miR-107. *Mol Pharmacol* 85:368-380.
- Lukiw WJ (2007) Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* 18:297-300.
- Lüscher C, Malenka RC (2011) Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69:650-663.
- Majeed N, Przewłocka B, Machelska H, Przewłocki R (1994) Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *Neuropharmacology* 33:189-192.
- Martellotta M, Cossu G, Fattore L, Gessa G, Fratta W (1998) Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in drug-naive mice. *Neuroscience* 85:327-330.
- Martin G, Puig S, Pietrzykowski A, Zadek P, Emery P, Treistman S (2004) Restricted cellular localization of a specific BK-channel subtype controls ethanol sensitivity in the nucleus accumbens. In: *ALCOHOLISM-CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH*, vol. 28, pp 61A-61A: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS 530 WALNUT ST, PHILADELPHIA, PA 19106-3621 USA.
- Martin KC, Ephrussi A (2009) mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension. *Cell* 136:719-730.
- Martínez-Turrillas R, Moyano S, Del Río J, Frechilla D (2006) Differential effects of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. *Neuroscience letters* 402:126-130.
- Mayford M, Bach ME, Huang Y-Y, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER (1996) Control of Memory Formation Through Regulated Expression of a CaMKII Transgene. *Science* 274:1678-1683.

- McClung CA, Sidiropoulou K, Vitaterna M, Takahashi JS, White FJ, Cooper DC, Nestler EJ (2005) Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9377-9381.
- McDaid J, Graham MP, Napier TC (2006) Methamphetamine-induced sensitization differentially alters pCREB and  $\Delta$ FosB throughout the limbic circuit of the mammalian brain. *Molecular pharmacology* 70:2064-2074.
- McGinty JF, Whitfield TW, Jr., Berglind WJ (2010) Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain research* 1314:183-193.
- Meer EJ, Wang DO, Kim S, Barr I, Guo F, Martin KC (2012) Identification of a cis-acting element that localizes mRNA to synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:4639-4644.
- Melis M, Spiga S, Diana M (2005) The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int Rev Neurobiol* 63.
- Mellios N, Huang H-S, Grigorenko A, Rogaev E, Akbarian S (2008) A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Human molecular genetics* 17:3030-3042.
- Mikics E, Dombi T, Barsvári B, Varga B, Ledent C, Freund TF, Haller J (2006) The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. *Behavioural pharmacology* 17:223-230.
- Moreau MP, Bruse SE, David-Rus R, Buyske S, Brzustowicz LM (2011) Altered MicroRNA Expression Profiles in Postmortem Brain Samples from Individuals with Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Biological Psychiatry* 69:188-193.
- Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet P, Bédard PJ, Di Paolo T, Lévesque D (1998) Associative and limbic regions of monkey striatum express high levels of dopamine D3 receptors: effects of MPTP and dopamine agonist replacement therapies. *European Journal of Neuroscience* 10:2565-2573.
- Neisewander JL, Fuchs RA, Tran-Nguyen LT, Weber SM, Coffey GP, Joyce JN (2004) Increases in dopamine D3 receptor binding in rats receiving a cocaine challenge at various time points after cocaine self-administration: implications for cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* 29:1479-1487.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8:1445-1449.
- Nestler EJ (2014) Epigenetic Mechanisms of Drug Addiction. *Neuropharmacology* 76:10.1016/j.neuropharm.2013.1004.1004.
- Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and Cellular Basis of Addiction. *Science* 278:58-63.
- Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C (2007) Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *The Lancet* 369:1047-1053.



- Ohno M, Watanabe S (1995) Nitric oxide synthase inhibitors block behavioral sensitization to methamphetamine in mice. *European journal of pharmacology* 275:39-44.
- Ostlund SB, Balleine BW (2009) On habits and addiction: An associative analysis of compulsive drug seeking. *Drug discovery today: Disease models* 5:235-245.
- Pak AC, Ashby CR, Heidbreder CA, Pilla M, Gilbert J, Xi Z-X, Gardner EL (2006) The selective dopamine D 3 receptor antagonist SB-277011A reduces nicotine-enhanced brain reward and nicotine-paired environmental cue functions. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 9:585-602.
- Pan YX, Xu J, Mahurter L, Bolan E, Xu M, Pasternak GW (2001) Generation of the mu opioid receptor (MOR-1) protein by three new splice variants of the Oprm gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:14084-14089.
- Pandey SC, Roy A, Mittal N (2001a) Effects of chronic ethanol intake and its withdrawal on the expression and phosphorylation of the CREB gene transcription factor in rat cortex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 296:857-868.
- Pandey SC, Roy A, Xu T, Mittal N (2001b) Effects of protracted nicotine exposure and withdrawal on the expression and phosphorylation of the CREB gene transcription factor in rat brain. *Journal of neurochemistry* 77:943-952.
- Pandey SC, Roy A, Zhang H (2003) The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 27:396-409.
- Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q (2009) Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139:112-122.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86-89.
- Perio A, Rinaldi-Carmona M, Maruani J, Barth F, Le Fur G, Soubrié P (1996) Central mediation of the cannabinoid cue: activity of a selective CB1 antagonist, SR 141716A. *Behavioural Pharmacology* 7:65-71.
- Perkins DO, Jeffries CD, Jarskog LF, Thomson JM, Woods K, Newman MA, Parker JS, Jin J, Hammond SM (2007) microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome biology* 8:R27.
- Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ (2009) Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning & Memory* 16:279-288.

- Pietrzykowski AZ (2010) The Role of microRNAs in Drug Addiction: A Big Lesson from Tiny Molecules. In: International Review of Neurobiology, vol. Volume 91 (Matthew, T. R. and David, M. L., eds), pp 1-24: Academic Press.
- Pietrzykowski AZ, Friesen RM, Martin GE, Puig SI, Nowak CL, Wynne PM, Siegelmann HT, Treistman SN (2008) Post-transcriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol. *Neuron* 59:274-287.
- Pilla M, Perachon S, Sautel F, Garrido F, Mann A, Wermuth CG, Schwartz J-C, Everitt BJ, Sokoloff P (1999) Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. *Nature* 400:371-375.
- Pluzarev O, Pandey SC (2004) Modulation of CREB expression and phosphorylation in the rat nucleus accumbens during nicotine exposure and withdrawal. *Journal of neuroscience research* 77:884-891.
- Pogun S, Demirgoren S, Taskiran D, Kanit L, Yilmaz O, Koylu EO, Balkan B, London ED (2000) Nicotine modulates nitric oxide in rat brain. *European Neuropsychopharmacology* 10:463-472.
- Pontieri F, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:12304-12308.
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G (1996) Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs.
- Porrino LJ, Lyons D, Smith HR, Daunais JB, Nader MA (2004) Cocaine self-administration produces a progressive involvement of limbic, association, and sensorimotor striatal domains. *The Journal of neuroscience* 24:3554-3562.
- Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M (2004) A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432:226-230.
- Prevot V, Rialas CM, Croix D, Salzet M, Dupouy J-P, Poulain P, Beauvillain J-C, Stefano GB (1998) Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation. *Brain research* 790:236-244.
- Przegaliński E, Filip M (1996) Nitric oxide (NO) pathway and locomotor hyperactivity towards dopaminomimetics in rats. *Polish journal of pharmacology* 49:291-298.
- Pudlak CM, Bozarth MA (1993) L-NAME and MK-801 attenuate sensitization to the locomotor-stimulating effect of cocaine. *Life sciences* 53:1517-1524.
- Pulvirenti L, Diana M (2001) Drug dependence as a disorder of neural plasticity: focus on dopamine and glutamate. *Reviews in the Neurosciences* 12:141-158.

- Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, Betel D, Puthanveetil SV, Russo JJ, Sander C, Tuschl T, Kandel E (2009) Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron* 63:803-817.
- Reinhart B, Slack F, Basson M, Pasquinelli A, Bettinger J, Rougvie A, Horvitz H, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901 - 906.
- Remenyi J, Hunter CJ, Cole C, Ando H, Impey S, Monk CE, Martin KJ, Barton GJ, Hutvagner G, Arthur JSC (2010) Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins. *Biochemical Journal* 428:281-291.
- Renthal W, Kumar A, Xiao G, Wilkinson M, Covington HE, Maze I, Sikder D, Robison AJ, LaPlant Q, Dietz DM, Russo SJ, Vialou V, Chakravarty S, Kodadek TJ, Stack A, Kabbaj M, Nestler EJ (2009) Genome Wide Analysis of Chromatin Regulation by Cocaine Reveals a Novel Role for Sirtuins. *Neuron* 62:335-348.
- Rezvani AH, Grady D, Peek A, Pucilowski O (1995) Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates alcohol consumption in two strains of alcohol-preferring rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 50:265-270.
- Robinson TE, Berridge KC (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96:103-114.
- Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47:33-46.
- Robledo P, Berrendero F, Ozaita A, Maldonado R (2008) Advances in the field of cannabinoid--opioid cross-talk. *Addiction biology* 13:213-224.
- Roybal K, Theobald D, Graham A, DiNieri JA, Russo SJ, Krishnan V, Chakravarty S, Peevey J, Oehrlein N, Birnbaum S (2007) Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:6406-6411.
- Rubino T, Sala M, Vigano D, Braidà D, Castiglioni C, Limonta V, Guidali C, Realini N, Parolaro D (2007) Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in rats. *Neuropsychopharmacology* 32:2036-2045.
- Saal S, Harvey SJ (2009) MicroRNAs and the kidney: coming of age. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 18:317-323.
- Saba R, Störchel PH, Aksoy-Aksel A, Kepura F, Lippi G, Plant TD, Schrott GM (2012) Dopamine-regulated microRNA MiR-181a controls GluA2 surface expression in hippocampal neurons. *Molecular and cellular biology* 32:619-632.
- Sadri-Vakili G, Kumaresan V, Schmidt HD, Famous KR, Chawla P, Vassoler FM, Overland RP, Xia E, Bass CE, Terwilliger EF, Pierce RC, Cha JH (2010) Cocaine-induced chromatin remodeling increases brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat medial prefrontal cortex, which alters the

- reinforcing efficacy of cocaine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:11735-11744.
- Santarelli DM, Beveridge NJ, Tooney PA, Cairns MJ (2011) Upregulation of Dicer and MicroRNA Expression in the Dorsolateral Prefrontal Cortex Brodmann Area 46 in Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 69:180-187.
- Schaefer A, Im H-I, Venø MT, Fowler CD, Min A, Intrator A, Kjems J, Kenny PJ, O'Carroll D, Greengard P (2010) Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction. *The Journal of experimental medicine* 207:1843-1851.
- Schoenbaum G, Stalnaker TA, Shaham Y (2007) A role for BDNF in cocaine reward and relapse. *Nature neuroscience* 10:935-936.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439:283-289.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.
- Sehba F, Duttaroy A, Shah S, Chen B, Carroll J, Yoburn BC (1997) In vivo homologous regulation of  $\mu$ -opioid receptor gene expression in the mouse. *European journal of pharmacology* 339:33-41.
- Shim I, Kim H-T, Kim Y-H, Chun B-G, Hahm D-H, Lee EH, Kim SE, Lee H-J (2002) Role of nitric oxide synthase inhibitors and NMDA receptor antagonist in nicotine-induced behavioral sensitization in the rat. *European journal of pharmacology* 443:119-124.
- Shipston MJ (2001) Alternative splicing of potassium channels: a dynamic switch of cellular excitability. *Trends in cell biology* 11:353-358.
- Smalheiser NR, Lugli G (2009) microRNA regulation of synaptic plasticity. *Neuromol Med* 11:133-140.
- Smith WB, Aakalu G, Schuman EM (2001) Local protein synthesis in neurons. *Curr Biol* 11:R901-903.
- Sokoloff P, Giros B, Martres M-P, Bouthenet M-L, Schwartz J-C (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics.
- Song KY, Choi HS, Hwang CK, Kim CS, Law P-Y, Wei L-N, Loh HH (2009) Differential use of an in-frame translation initiation codon regulates human mu opioid receptor (OPRM1). *Cellular and molecular life sciences* 66:2933-2942.
- Song KY, Hwang CK, Kim CS, Choi HS, Law PY, Wei LN, Loh HH (2007) Translational repression of mouse mu opioid receptor expression via leaky scanning. *Nucleic Acids Res* 35:1501-1513.
- Spanagel R, Pendyala G, Abarca C, Zghoul T, Sanchis-Segura C, Magnone MC, Lascorz J, Depner M, Holzberg D, Soyka M (2005a) The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nature medicine* 11:35-42.
- Spanagel R, Rosenwasser AM, Schumann G, Sarkar DK (2005b) Alcohol consumption and the body's biological clock. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 29:1550-1557.

- Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM (2005) Animal MicroRNAs Confer Robustness to Gene Expression and Have a Significant Impact on 3'UTR Evolution. *Cell* 123:1133-1146.
- Stefano GB, Salzet B, Rialas CM, Pope M, Kustka A, Neenan K, Pryor S, Salzet M (1997) Morphine-and anandamide-stimulated nitric oxide production inhibits presynaptic dopamine release. *Brain research* 763:63-68.
- Stewart J, Deschamps S-E, Amir S (1994) Inhibition of nitric oxide synthase does not block the development of sensitization to the behavioral activating effects of amphetamine. *Brain research* 641:141-144.
- Suzuki M, Hurd YL, Sokoloff P, Schwartz J-C, Sedvall G (1998) D 3 dopamine receptor mRNA is widely expressed in the human brain. *Brain research* 779:58-74.
- Suzuki MM, Bird A (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9:465-476.
- Tanda G, Munzar P, Goldberg SR (2000) Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nature neuroscience* 3:1073-1074.
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common  $\mu$ 1 opioid receptor mechanism. *Science* 276:2048-2050.
- Tapocik JD, Barbier E, Flanigan M, Solomon M, Pincus A, Pilling A, Sun H, Schank JR, King C, Heilig M (2014) microRNA-206 in Rat Medial Prefrontal Cortex Regulates BDNF Expression and Alcohol Drinking. *The Journal of Neuroscience* 34:4581-4588.
- Tapocik JD, Solomon M, Flanigan M, Meinhardt M, Barbier E, Schank J, Schwandt M, Sommer WH, Heilig M (2013) Coordinated dysregulation of mRNAs and microRNAs in the rat medial prefrontal cortex following a history of alcohol dependence. *The pharmacogenomics journal* 13:286-296.
- Theberge FR, Pickens CL, Goldart E, Fanous S, Hope BT, Liu QR, Shaham Y (2012) Association of time-dependent changes in mu opioid receptor mRNA, but not BDNF, TrkB, or MeCP2 mRNA and protein expression in the rat nucleus accumbens with incubation of heroin craving. *Psychopharmacology* 224:559-571.
- Tobon KE, Catuzzi JE, Cote SR, Sonaie A, Kuzhikandathil EV (2015) Post-transcriptional regulation of dopamine D1 receptor expression in caudate-putamen of cocaine-sensitized mice. *The European journal of neuroscience* 42:1849-1857.
- Tobón KE, Chang D, Kuzhikandathil EV (2012) MicroRNA 142-3p mediates post-transcriptional regulation of D1 dopamine receptor expression. *PLoS One* 7:e49288.
- Ton JMNC, Gerhardt GA, Friedemann M, Etgen AM, Rose GM, Sharpless NS, Gardner EL (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 research* 451:59-68.
- Tricomi E, Balleine BW, O'Doherty JP (2009) A specific role for posterior dorsolateral striatum in human habit learning. *European Journal of Neuroscience* 29:2225-2232.

- Trigo JM, Martin-Garcia E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R (2010) The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug and alcohol dependence* 108:183-194.
- Urduingio RG, Fernández AF, Lopez-Nieva P, Rossi S, Huertas D, Kulis M, Liu C-G, Croce CM, Calin GA, Esteller M (2010) Disrupted microRNA expression caused by Mecp2 loss in a mouse model of Rett syndrome. *Epigenetics* 5:656-663.
- Uzbay IT, Grewal JS, Wallis CJ, Dungan LF, Lal H (1998) Nitric oxide synthase inhibition attenuates saccharin or ethanol reinforced responding in Long-Evans rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 22:1411-1423.
- Uzbay IT, Kayaalp SO (1995) A modified liquid diet of chronic ethanol administration: validation by ethanol withdrawal syndrome in rats. *Pharmacological Research* 31:37-42.
- Vaccarino FJ, Bloom FE, Koob GF (1985) Blockade of nucleus accumbens opiate receptors attenuates intravenous heroin reward in the rat. *Psychopharmacology* 86:37-42.
- van der Stelt M, Di Marzo V (2005) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromol Med* 7:37-50.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329-332.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* 318:1931-1934.
- Vaupel DB, Kimes AS, London ED (1995) Comparison of 7-nitroindazole with other nitric oxide synthase inhibitors as attenuators of opioid withdrawal. *Psychopharmacology* 118:361-368.
- Vaupel DB, Kimes AS, London ED (1997) Further in vivo studies on attenuating morphine withdrawal: isoform-selective nitric oxide synthase inhibitors differ in efficacy. *European journal of pharmacology* 324:11-20.
- Vazquez V, Weiss S, Giros B, Martres M-P, Daugé V (2007) Maternal deprivation and handling modify the effect of the dopamine D3 receptor agonist, BP 897 on morphine-conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology* 193:475-486.
- Vengeliene V, Leonardi-Essmann F, Perreau-Lenz S, Gebicke-Haerter P, Drescher K, Gross G, Spanagel R (2006) The dopamine D3 receptor plays an essential role in alcohol-seeking and relapse. *The FASEB journal* 20:2223-2233.
- Vigano D, Rubino T, Parolaro D (2005) Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 81:360-368.
- Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S (2005) A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:16426-16431.

- Volkow ND, Chang L, Wang G-J, Fowler JS, Ding Y-S, Sedler M, Logan J, Franceschi D, Gatley J, Hitzemann R (2001) Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *American Journal of Psychiatry* 158:2015-2021.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, Dewey SL, Wolf AP (1993) Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* 14:169-177.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Swanson JM (2004) Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. *Mol Psychiatry* 9:557-569.
- Volkow ND, Hitzemann R, Wang GJ, Fowler JS, Wolf AP, Dewey SL, Handlesman L (1992) Long-Term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers. *Synapse* 11:184-190.
- Volkow ND, Wang G-J, Begleiter H, Porjesz B, Fowler JS, Telang F, Wong C, Ma Y, Logan J, Goldstein R (2006) High levels of dopamine D2 receptors in unaffected members of alcoholic families: possible protective factors. *Archives of general psychiatry* 63:999-1008.
- Volkow ND, Wang G-J, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C (2007) Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *The Journal of neuroscience* 27:12700-12706.
- Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Baler RD (2013) Obesity and addiction: neurobiological overlaps. *Obesity reviews* 14:2-18.
- Wang H, Dey SK, Maccarrone M (2006) Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocrine reviews* 27:427-448.
- Wei L-N, Loh HH (2002) Regulation of opioid receptor expression. *Current opinion in pharmacology* 2:69-75.
- Weruaga E, Balkan B, Koylu EO, Pogun S, Alonso JR (2002) Effects of chronic nicotine administration on nitric oxide synthase expression and activity in rat brain. *Journal of neuroscience research* 67:689-697.
- White FJ (1996) Synaptic regulation of mesocorticolimbic dopamine neurons. *Annual review of neuroscience* 19:405-436.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-862.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11:228-234.
- Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5:483-494.
- Wu H, Tao J, Chen PJ, Shahab A, Ge W, Hart RP, Ruan X, Ruan Y, Sun YE (2010a) Genome-wide analysis reveals methyl-CpG-binding protein 2-dependent regulation of microRNAs in a mouse model of Rett syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:18161-18166.

- Wu Q, Hwang CK, Zheng H, Wagley Y, Lin H-Y, Kim DK, Law P-Y, Loh HH, Wei L-N (2013) MicroRNA 339 down-regulates  $\mu$ -opioid receptor at the post-transcriptional level in response to opioid treatment. *The FASEB Journal* 27:522-535.
- Wu Q, Zhang L, Law P-Y, Wei L-N, Loh HH (2009) Long-Term Morphine Treatment Decreases the Association of  $\mu$ -Opioid Receptor (MOR1) mRNA with Polysomes through miRNA23b. *Molecular Pharmacology* 75:744-750.
- Wu WKK, Lee CW, Cho CH, Fan D, Wu K, Yu J, Sung JY (2010b) MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game. *Oncogene* 29:5761-5771.
- Xi Z-X, Newman AH, Gilbert JG, Pak AC, Peng X-Q, Ashby CR, Gitajn L, Gardner EL (2006) The novel dopamine D3 receptor antagonist NGB 2904 inhibits cocaine's rewarding effects and cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats. *Neuropsychopharmacology* 31:1393-1405.
- Xi Z-X, Stein EA (1998) Nucleus accumbens dopamine release modulation by mesolimbic GABA A receptors—an in vivo electrochemical study. *Brain research* 798:156-165.
- Xi Z-X, Stein EA (1999) Baclofen inhibits heroin self-administration behavior and mesolimbic dopamine release. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290:1369-1374.
- Xing B, Kong H, Meng X, Wei S, Xu M, Li S (2010) Dopamine D 1 but not D 3 receptor is critical for spatial learning and related signaling in the hippocampus. *Neuroscience* 169:1511-1519.
- Xu Q, Huang W, Payne TJ, Ma JZ, Li MD (2009) Detection of genetic association and a functional polymorphism of dynamin 1 gene with nicotine dependence in European and African Americans. *Neuropsychopharmacology* 34:1351-1359.
- Yang Y, Chaerkady R, Beer MA, Mendell JT, Pandey A (2009) Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach. *PROTEOMICS* 9:1374-1384.
- Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience* 7:464-476.
- Yin HH, Ostlund SB, Knowlton BJ, Balleine BW (2005) The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *European Journal of Neuroscience* 22:513-523.
- Zheng H, Zeng Y, Chu J, Kam AY, Loh HH, Law P-Y (2010) Modulations of NeuroD Activity Contribute to the Differential Effects of Morphine and Fentanyl on Dendritic Spine Stability. *The Journal of Neuroscience* 30:8102-8110.
- Zhou Y, Bendor J, Hofmann L, Randesi M, Ho A, Kreek MJ (2006) Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. *The Journal of endocrinology* 191:137-145.



## **9. Ringraziamenti**

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Tossicologia dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2014/2015 - XXVIII 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 I.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".