



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN TOSSICOLOGIA

Farmacologia e Farmacoterapia delle Tossicodipendenze

Ciclo XXVIII

**Studio degli effetti della pre-esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC
nell'autosomministrazione di eroina, in età adulta, in un modello
animale di maggiore (ratti Lewis) e minore (ratti Fischer 344)
predisposizione all'abuso.**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

Bio/14-FARMACOLOGIA

Presentata da: Dott. Andrea Scifo

Coordinatore Dottorato Prof. Gaetano Di Chiara

Tutor Dott. Daniele Lecca

Esame finale: Anno Accademico 2014 – 2015

INDICE

	Pagina
<i>Prefazione</i>	1
INTRODUZIONE	4
1. La dipendenza o <i>addiction</i>	5
1.1 Epidemiologia e incidenza	5
1.2 La gratificazione indotta dalle sostanze d'abuso	6
1.3 I fattori di vulnerabilità	7
2. La <i>Cannabis</i>	9
2.1 Incidenza	9
2.2 Il sistema endocannabinoide (eCB)	10
3.1 L'eroina	14
3.1 Incidenza	15
3.2 Il sistema degli oppioidi endogeni	16
4. La Gateway Hypothesis (GH)	18
4.1 L'adolescenza e la vulnerabilità alle sostanze d'abuso	19
4.2 Il supporto degli studi pre-clinici	21
5. Studio dei farmaci d'abuso: i modelli sperimentali	23
5.1 Acquisizione di un protocollo di <i>Self-Administration</i> (SA)	24
5.2 Lewis e Fischer 344: un modello animale di vulnerabilità genetica	25
SCOPO DELLA RICERCA	29
MATERIALI E METODI	32
Animali	33
Farmaci	33
Procedura sperimentale	34
Il paradigma della <i>Self-Administration</i> (SA)	35
Protocollo di acquisizione del comportamento operante	38
Protocolli di autosomministrazione	38
Analisi statistica dei dati	41
RISULTATI	43
Esperimento I e II	45
Esperimento II	50
Esperimento III	59
DISCUSSIONE	68
CONCLUSIONI	77
BIBLIOGRAFIA	79

Prefazione

Al giorno d'oggi una percentuale sempre maggiore di adolescenti utilizza a scopo voluttuario sostanze psicoattive illecite. L'adolescenza è un periodo della vita caratterizzato dalla ricerca dell'eccesso e dal desiderio di provare nuove sensazioni che, molto spesso, si ripercuotono nella sperimentazione di emozioni forti e rischiose, in particolare comportamenti illeciti e/o proibiti.

Tra questi, l'uso di sostanze e di farmaci ad azione psicotropa, soprattutto nei momenti di socializzazione e di divertimento, è oramai diventata una pratica ampiamente diffusa. In questi contesti, l'associazione di più sostanze o *poliabuso* (alcool, tabacco, stimolanti), incrementano il rischio di gravi conseguenze per lo stato di salute del soggetto inducendo nei casi più gravi, all'overdose e alla morte. Tra questi, i *binges* di alcool e psicostimolanti ai quali gli adolescenti si sottopongono continuamente durante il fine settimana, evidenziano una tendenza, sempre più diffusa, alla ricerca di una condizione di totale alterazione e/o perdita dello stato di coscienza. La progressiva riduzione dell'età di sperimentazione (<15 anni), come riportato da recenti indagini epidemiologiche, aggrava un problema sociale intensamente radicato nella società contemporanea.

Talvolta l'uso ricreativo di tali sostanze viene supportato e incoraggiato attraverso alcuni mezzi di comunicazione di massa (dalla musica al mondo virtuale) e nei *social network*, delineando un quadro sociale caratterizzato da una totale mancanza di informazione sugli effetti a lungo termine, dei danni fisici e comportamentali che l'uso massiccio e continuo di queste sostanze è in grado di provocare.

Sebbene negli ultimi anni sia stato registrato un incremento delle tipologie delle sostanze d'abuso di derivazione sintetica (il mefedrone, l'MDPV, 25I-NBOMe, metoxetamina, etc), la *Cannabis*, sottoforma di marijuana e hashish, rappresenta la sostanza illecita maggiormente utilizzata nella fascia di età compresa tra i 16 e i 24 anni. Nell'ultimo decennio, in virtù della sua classificazione come "droga leggera", se paragonata a sostanze ad alto potenziale d'abuso, come la cocaina o l'eroina, il dibattito circa la legalizzazione dell'uso e della detenzione della *Cannabis* e dei suoi derivati è sempre più acceso e di stretta attualità, soprattutto in relazione all'aumentata richiesta per fini terapeutici.

Infatti, se da un lato l'incremento del titolo dei principi attivi presenti nei nuovi *cultivar*, ottenuti attraverso specifici incroci (*skunk*: 25% in Δ^9 -THC; *haze*: 22%; *Ice-O-Lator*: 50% *budder*: 90%), impediscono di poter ancora considerare la *Cannabis* come "droga leggera",

si assiste ad un aumento della domanda di derivati cannabinoidi, a scopo curativo, da parte di pazienti affetti da specifiche patologie.

Oggi, attraverso la ricerca, è stato scientificamente provato il potenziale terapeutico dei cannabinoidi come antiemetici associati alla chemioterapia, anticonvulsivanti, analgesici utili nel trattamento del dolore cronico di malattie neurodegenerative (sclerosi multipla, dolore neuropatico e tumori).

Tuttavia gli effetti psicoattivi dovuti al loro potenziale d'abuso, lo sviluppo di tolleranza e l'associazione al rischio di sviluppo di psicosi e di dipendenza, a causa dell'utilizzo a lungo termine per scopi ricreazionali e voluttuari, condizionano il dibattito circa l'approvazione della *Cannabis* per uso terapeutico.

In Italia, solamente a partire dal 2013, sono state consentite le preparazioni di formulazioni galeniche a base di *Cannabis* (varietà *sativa* o *indica*), nelle farmacie del territorio, e l'acquisto a scopo terapeutico esclusivamente sotto controllo medico dietro presentazione di ricetta "bianca" non ripetibile (L. 94/1998; D.M. 09/2015).

Sulla spinta dell'onda di quanto recentemente accaduto in diversi Paesi Europei e in alcuni Stati dell'America del Nord, le forze politiche italiane hanno elaborato, attraverso una proposta di legge, attualmente ancora da discutere in Parlamento, una strategia legislativa determinata a legalizzare la detenzione, la coltivazione e l'uso di marijuana entro determinati limiti e condizioni.

In base a queste premesse, risulta di rilevante importanza considerare le possibili conseguenze di una diffusione capillare della *Cannabis* legale nella popolazione, comprendente anche i soggetti maggiormente vulnerabili agli effetti gratificanti del principio attivo Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC).

Il Δ^9 -THC, accanto all'azione stimolatrice delle aree cerebrali della gratificazione e della ricompensa, svolge un importante ruolo nello sviluppo delle sinapsi e nella plasticità neuronale in determinate aree coinvolte nella sfera cognitiva e motoria. È stato dimostrato, attraverso studi longitudinali, che la somministrazione di cannabinoidi esogeni determina l'alterazione di tali meccanismi inducendo effetti a lungo termine, come la perdita della motivazione e delle fiducia nei propri mezzi, il deficit dell'attenzione, la difficoltà nell'apprendimento e nello svolgimento di funzioni esecutive, fino allo sviluppo di disturbi psichiatrici, quali psicosi (schizofrenia) e lo sviluppo di dipendenza.

Pertanto, se si prende in considerazione l'inizio precoce del consumo della *Cannabis* e la particolare dinamica evolutiva del cervello di un soggetto adolescente, l'uso assiduo e

continuo di derivati della *Cannabis* contenenti alte percentuali di Δ^9 -THC rischia di diventare un fattore responsabile di profonde alterazioni degli equilibri neuro-modulatori tipici del normale sviluppo cerebrale in pubertà e in adolescenza, in una percentuale sempre maggiore di soggetti.

La differenza temporale dei processi di riorganizzazione sinaptica e neuronale, che avvengono nell'individuo dalla preadolescenza (12-13 anni) sino ai 20 anni, tra le aree della corteccia prefrontale (PFCX), deputata al controllo decisionale, e le aree del sistema limbico, a cui sono attribuite funzioni emotive e motivazionali, potrebbe spiegare la tendenza degli adolescenti a trasgredire e a cercare il rischio, e a sperimentare le sostanze d'abuso, nonostante la consapevolezza degli effetti deleteri.

Nel 1975, la teoria della *Gateway Hypothesis* postulata da Denise Kandel ha focalizzato l'attenzione sul possibile effetto "ponte" a carico dei cannabinoidi tra l'uso di "droghe leggere" all'abuso di eroina e cocaina. Numerosi studi della ricerca farmacologica di base, studi clinici ed evidenze epidemiologiche hanno supportato l'esistenza di una relazione causale diretta tra l'uso adolescenziale di marijuana ed il successivo consumo di eroina in età adulta, associate allo sviluppo di psicosi, deficit cognitivi, sindromi ansiose e depressive, oltre allo sviluppo di sindromi di abuso e di dipendenza.

Tuttavia, la vulnerabilità individuale, associata ai fattori ambientali, è alla base delle alterazioni comportamentali che determinano il passaggio dall'uso ricreazionale all'abuso (uso incontrollato o compulsivo) di una sostanza psicoattiva, e l'evoluzione ad una condizione di dipendenza fisica e psichica dagli effetti della stessa.

Per questi motivi, appare necessario chiarire quali sono i meccanismi e i fattori responsabili della vulnerabilità alle sostanze d'abuso allo scopo di poter comprendere il rischio della possibilità di un'ampia diffusione legale dei derivati cannabinoidi, sui giovani di oggi e gli adulti di domani.

INTRODUZIONE

1. La dipendenza o *addiction*

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce la dipendenza da sostanze d'abuso, come un disturbo di natura psichica e fisica, nel quale l'uso continuato di sostanze psicoattive determina l'insorgenza di una serie di alterazioni e comportamenti finalizzate alla ricerca compulsiva e al consumo della stessa.

Le sostanze psicotrope, vengono definite tali in quanto provocano euforia ed una sensazione di piacere più o meno intensa, agendo come un surrogato degli stimoli gratificanti naturali in quanto capaci di agire sulle aree del sistema limbico. Occorre fare una distinzione tra l'abuso e la dipendenza da farmaci d'abuso.

Infatti, la condizione di *abuso* è caratterizzata da una modalità di uso continuo e/o compulsivo della sostanza, ma che il soggetto riesce ancora a gestire, a differenza dello stadio successivo di dipendenza in cui si ha la perdita completa del controllo e che rappresenta la forma più grave, associata alle manifestazioni comportamentali, fisiche e psicologiche.

La stessa definizione viene riproposta dall'*American Psychiatric Association* (APA) all'interno del Manuale Diagnostico Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-V) che identifica i criteri diagnostici della dipendenza, tra i quali la tolleranza e l'astinenza. La tolleranza, ovvero la necessità di incrementare la dose di farmaco assunto al fine di mantenere inalterato l'effetto gratificante, a causa dell'adattamento dei circuiti neuronali alle azioni della sostanza (dipendenza fisica). D'altra parte, l'astinenza è caratterizzata dall'insorgenza degli effetti collaterali (sostanza-specifici), in seguito all'interruzione dell'assunzione del farmaco, accompagnata da forte *craving* e da un comportamento compulsivo di ricerca (*seeking*) nonostante la consapevolezza degli effetti negativi sulla salute e di tipo socio-economico e relazionale (American Psychiatric Association, 2013).

1.1 Epidemiologia e incidenza

I dati comunicati dal rapporto annuale dell'Ufficio delle Nazioni Unite che si occupa delle problematiche inerenti la droga e il crimine ad essa correlati (*United Nation Office on Drug and Crime*, UNODC) riferiscono che nel mondo, durante lo scorso anno, sono circa 300 milioni gli individui che almeno una volta hanno utilizzato una sostanza d'abuso.

Nel 2013, il 7% della popolazione mondiale, compresa tra 15-64 anni, ed almeno un quarto della popolazione europea (circa 80 milioni di adulti), ha consumato farmaci d'abuso

principalmente appartenenti alle categorie dei cannabinoidi, oppioidi e psicostimolanti (cocaina, amfetaminosimili, etc) nell'ultimo anno (UNODC, 2014).

Sebbene le stime della produzione e la richiesta sul mercato dell'eroina rimangano sempre a livelli elevati, desta un particolare preoccupazione l'incremento dell'abuso di nuove sostanze psicoattive quali la *Cannabis* e i cannabinoidi di sintesi, gli psicostimolanti e i prodotti medicinali (EMCDDA, 2014).

1.2 La gratificazione indotta dalle sostanze d'abuso

Le sostanze d'abuso inducono un insieme di sensazioni fisiche ed emotive che, mimando le proprietà incentive tipiche degli stimoli gratificanti naturali, vengono riconosciute come piacere. La percezione del piacere, dovuta alla stimolazione dell'area del sistema limbico, determina nell'individuo un comportamento motivato atto a ricercare e ripetere la stessa sensazione gratificante. Il farmaco assume una valenza positiva (rinforzo primario) nell'individuo che mette in atto una serie di comportamenti aventi come fine unico l'assunzione del farmaco stesso. Il Nucleus Accumbens (NAc) rappresenta l'area limbica maggiormente coinvolta nei processi di rinforzo e nell'apprendimento incentivo (figura 1).

I farmaci d'abuso, così come gli stimoli gratificanti naturali inducono la stimolazione dopaminergica e il rilascio di dopamina nel NAc, in particolare nella porzione medio-ventrale, la shell (implicata nella percezione della gratificazione) (Heimer et al., 1991; Bassareo e Di Chiara, 1997; Di Chiara, 1998, 1999, 2002) e nella porzione dorso-laterale, il core (regola l'espressione motoria del comportamento motivato) (Di Chiara et al., 1993; Pontieri et al., 1995).

L'apprendimento incentivo (*incentive learning*) è invece una funzione adattativa, nel quale, in seguito a condizionamento classico o pavloviano, la percezione e l'effetto di uno stimolo gratificante (naturale o farmacologico) viene associato a stimoli neutri.

Inoltre, la continua stimolazione dei neuroni dopaminergici e il conseguente rilascio di dopamina nelle aree del NAc ad opera dei farmaci, a differenza di quanto avviene con gli stimoli gratificanti naturali, non va incontro al fenomeno dell'*habituation* (Bassareo and Di Chiara, 2007). Pertanto, a causa della continua stimolazione, i neuroni presenti in queste aree, dotati di una particolare responsività, sono inducono un abnorme processo di rafforzamento, secondo il quale gli stimoli neutri condizionati al rinforzo primario, acquisiscono proprietà motivazionali divenendo rinforzi secondari predittivi della sostanza stessa (Robinson and Berridge, 1993; Di Chiara, 1998).

La dipendenza, può essere quindi considerata come un disturbo comportamentale della percezione del piacere, in cui il soggetto focalizza le sue energie nella ricerca compulsiva e nel consumo incontrollato di una sostanza d'abuso.

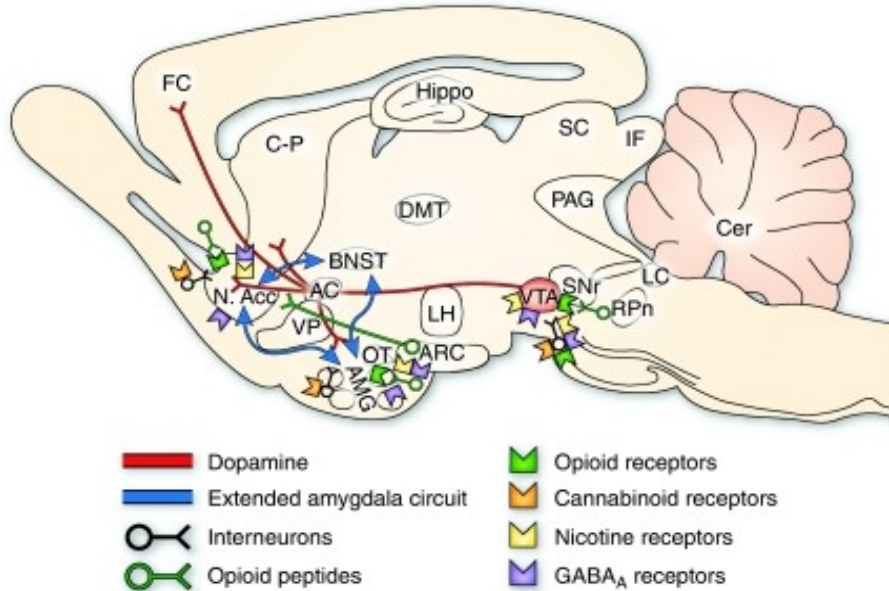


Figura 1. Sezione sagittale del cervello del ratto nella quale sono raffigurati i sistemi recettoriali e le vie neurotrasmettitoriali implicate nella percezione della gratificazione indotta dalle sostanze d'abuso (Koob and Volkow, 2010).

1.3 I fattori di vulnerabilità

L'interazione con una o più sostanze d'abuso non comporta l'immediato sviluppo della dipendenza: infatti, solo una percentuale di coloro che utilizzano i farmaci d'abuso a scopo voluttuario sarà soggetto al passaggio dall'uso compulsivo all'*addiction*.

Lo sviluppo di una dipendenza cronica dipende dalla concomitanza di alcuni determinati fattori, quali la sostanza abusata, i fattori ambientali, genetici e individuali.

In primo luogo le variabili inerenti alla sostanza comprendono le sue proprietà di rinforzo o valore motivazionale: maggiore è il potenziale di abuso maggiore è la possibilità che si inneschino nell'individuo quei comportamenti e le attività finalizzate alla continua ricerca e assunzione della sostanza stessa. La variabile sostanza acquisisce importanza correlabile ai fattori individuali, ovvero quelli relativi all'utilizzatore che comprendono: la percezione individuale dello stimolo, la tolleranza innata e/o lo sviluppo di tolleranza agli effetti della sostanza, la capacità di metabolizzazione del farmaco e la propensione comportamentale al rischio. Tuttavia, la predisposizione individuale e il *background* genetico contribuiscono in

maniera determinante ad incrementare il rischio di sperimentazione di sostanze d'abuso facilitando, secondo alcuni studi condotti su una popolazione di gemelli, la possibilità di sviluppare un fenotipo vulnerabile verso la progressione ai disturbi comportamentali correlati all'*addiction* (Agrawal et al., 2004; Prince vanLeeuwen et al., 2011; Vanyukov et al., 2012).

Sebbene il potenziale d'abuso della sostanza e la componente genetica dell'individuo svolgano un ruolo fondamentale nei diversi stadi che portano progressivamente alla dipendenza, i fattori ambientali (famiglia, rapporti sociali e accessibilità alla sostanze) sono in grado di condizionare l'individuo facilitando la possibilità di conoscere o entrare in contatto con le sostanze d'abuso (Tsuang et al., 2001; Kendler et al., 2000, 2003; Verweij et al., 2010). L'ambiente sociale, familiare e lo spirito di emulazione dei modelli del proprio gruppo possono condurre dall'uso occasionale di una sostanza d'abuso alla ricerca e all'uso di altre sostanze. Generalmente una personalità antisociale, caratterizzata dallo scarso controllo inibitorio e un carattere impulsivo con la tendenza ad assumere atteggiamenti rischiosi, identificano un soggetto con una maggiore propensione e vulnerabilità nella ricerca di stimoli nuovi e talvolta illeciti (*sensation seekers*) (Arnett, 1996; Zuckerman and Kuhlman, 2000; Wagner, 2001).

L'adolescenza è una fase della vita di ogni individuo che rappresenta un fattore di vulnerabilità alle sostanze d'abuso, racchiudendo gran parte delle caratteristiche che individuano i *sensation seekers*.

La differenza temporale nello sviluppo tra le aree corticali, deputate al controllo razionale, e il sistema limbico, implicato nella percezione del piacere, determina la scarsa comprensione del rischio inerente a determinate esperienze e le conseguenze che ne possono derivare, incrementando la propensione alla sperimentazione di esperienze emotivamente forti e, molto spesso, al limite della legalità (l'uso di sostanze psicotrope, la guida ad alta velocità, etc). L'abuso di sostanze psicotrope, in un soggetto adolescente, nel quale si osserva un'intensa attività di sviluppo neuronale nelle diverse aree cerebrali, potrebbe determinare modificazioni a lungo termine che, in età adulta, si ripercuotono in disturbi dell'apprendimento, della personalità e della percezione emotiva.

Sebbene i disturbi psicopatologici (quali stati d'ansia, depressione e psicosi) siano spesso associati a un fenotipo propenso all'uso di sostanze psicoattive, non sempre possono essere considerati fattori predisponenti poiché, molto spesso, sono condizioni secondarie all'uso continuo di sostanze d'abuso.

2. La Cannabis

La *Cannabis Sativa* è una pianta dioica conosciuta e utilizzata dall'uomo da oltre quattromila anni, sia per l'estrazione di fibre tessili sia a scopo curativo e ricreazionale.

Le infiorescenze della pianta femminile costituiscono la droga, contenente il titolo più elevato di principi attivi (cannabinoidi). Dal fitocomplesso è possibile estrarre circa sessanta tipi diversi di cannabinoidi responsabili dell'attività psicoattiva: i più espressi sono il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), il cannabigerolo (CBG), il cannabicromene (CBC) e il cannabidiolo (CBD) e il cannabinolo (CBN).

Le sostanze illecite ricavate dalla pianta sono rappresentate dalla marijuana (foglie e infiorescenze; titolo Δ^9 -THC: 5-12%), l'hashish (resina; titolo Δ^9 -THC: 4-20%) e l'olio (titolo Δ^9 -THC: 30%) e vengono consumate prevalentemente attraverso il fumo di sigarette, spesso associate al tabacco.

In questo modo, l'effetto del fumo può essere percepito in pochi istanti, a causa dell'elevata superficie polmonare e persiste anche per alcune ore in base al titolo del principio attivo contenuto nella sostanza e alle caratteristiche individuali dell'utilizzatore.

La somministrazione può avvenire anche per via orale e, raramente, per via endovenosa, a causa dell'alto grado di lipofilità del Δ^9 -THC che impone un'opportuna veicolazione. Tuttavia, queste vie di somministrazione garantiscono un'elevata biodisponibilità della sostanza e una maggiore durata dell'effetto.

Il Δ^9 -THC si lega al recettore CB1, presenti nel sistema nervoso centrale, attraverso il quale media gli effetti gratificanti ed euforizzanti: in seguito all'assunzione gli effetti principali sono l'euforia, il rilassamento e l'alterazione della percezione spazio-temporale. L'uso continuato comporta effetti avversi quali deficit dell'attenzione e alterazione della memoria a breve termine, a causa dell'azione sui gangli della base e sull'ippocampo.

Analogamente ad altre sostanze d'abuso, anche la *Cannabis* induce uno stato di dipendenza caratterizzato da sindrome di astinenza (disturbi del tono dell'umore, ansia, irritabilità, aggressività, insonnia e psicosi) (Lichtman and Martin, 2005; Budney and Hughes, 2006).

2.1 Incidenza

La *Cannabis* è la sostanza psicoattiva maggiormente utilizzata a livello mondiale. Sulla base delle statistiche più recenti si stima che sia stata consumata almeno una volta nella vita da 220 milioni di soggetti di età compresa tra i 16 e 64 anni (UNODC, 2014). Gli Stati

Uniti d'America, il Canada, l'Australia e l'Europa rappresentano le realtà mondiali nelle quali la prevalenza del consumo di *Cannabis* e derivati è stata stimata tra il 35-58%, nella fascia di età a rischio (SAMHSA, 2007). Sul mercato europeo, il consumo annuale di *Cannabis*, presente sottoforma di foglie (marijuana) e resina (hashish), si aggira intorno alle 2.000 tonnellate. In Europa sono 74 milioni (circa il 22% della popolazione) di adulti, di età compresa tra 15-64 anni, ad aver consumato cannabinoidi almeno una volta nella loro vita e 18 milioni (5%) nell'ultimo anno: tra questi sono 15 milioni (12%) i consumatori compresi nella fascia di età 15-34 anni mentre 8.5 milioni (14%) al di sotto dei 24 anni (EMCDDA, 2014).

I giovani adulti sono tra i maggiori consumatori di marijuana e la percentuale aumenta se si considera che tra i ragazzi (15-16 anni), uno su quattro ha già consumato una sostanza d'abuso illecita (ESPAD, 2011). Il 24% dichiara di aver consumato *Cannabis* almeno una volta nella vita, il 20% nell'ultimo anno e il 12% di averla consumata nel mese precedente all'indagine. In Italia la prevalenza del consumo si attesta al 21% della popolazione compresa tra i 15-19 anni, al 12° posto nella classifica fra i paesi europei al cui vertice sono presenti la Repubblica Ceca (42%) e la Francia (39%) (EMCDDA, 2013). I modelli di consumo della *Cannabis*, generalmente assunta inalandone il fumo, variano dal consumo occasionale o abituale e, solo in piccola parte, un consumo intensivo con dosi elevate (< 1% dei consumatori).

2.2 Il sistema endocannabinoide (eCB)

La *Cannabis Sativa* è una pianta erbacea, originaria dell'Asia, le cui infiorescenze secernono una resina contenente sostanze terpenofenoliche, farmacologicamente attive nel nostro organismo, chiamate cannabinoidi (Ameri, 1999). L'attività psicotropa di queste sostanze è mediata da un sistema endogeno costituito da recettori specifici (*Cannabinoid Receptor*, CB), proteine di trasporto e un sistema enzimatico e metabolico, denominato sistema dei cannabinoidi endogeni (o endocannabinoide, eCB) (Piomelli et al., 1998; Di Marzo et al., 2004; Lu and Mackie, 2015).

Il sistema eCB comprende anche una serie di composti lipidici, i cannabinoidi endogeni, in grado legarsi ai recettori CB, mimando gli effetti del Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) (Gaoni and Mechoulam, 1964).

Per questi motivi si differenziano gli endocannabinoidi, ovvero i ligandi endogeni prodotti nel nostro organismo, dai fitocannabinoidi, ossia tutti quelle sostanze che compongono il fitocomplesso della Canapa.

Il primo recettore del sistema endocannabinoide ad essere stato clonato e successivamente isolato è stato il recettore CB1 (CB1R) (Matsuda et al., 1990; Devane et al., 1992). In seguito, è stato identificato anche il recettore CB2 (CB2R) come ulteriore mediatore dell'attività farmacologica dei ligandi eCB (Munro et al., 1993; Griffin et al., 2000). Entrambi i recettori appartengono alla superfamiglia dei recettori proteici di membrana accoppiati alle proteine G, precisamente alla subunità proteica $G_{i/o}$ (Howlett et al., 2002). Pertanto, l'attivazione recettoriale determina: *i*) l'inibizione dell'enzima adenilato ciclasi, con conseguente riduzione della produzione di AMPciclico; *ii*) la chiusura dei canali al Ca^{++} voltaggio-dipendenti (canali di tipo N e P/Q) e la contemporanea apertura dei canali di rettificazione per il K^+ (iperpolarizzazione della membrana) (Mackie, 1995; Twitchell et al., 1997). La stimolazione di questi recettori comporta l'attivazione di diverse proteinchinasi (MAP, PKB PI3K) che modulano la funzionalità della sinapsi, la trascrizione genica e la motilità cellulare (Howlett et al., 2002).

Il recettore CB1 è prevalentemente espresso nel Sistema Nervoso Centrale (SNC): è stato localizzato a livello della corteccia, nei gangli della base, nell'ippocampo e nel cervelletto (Herkenam et al., 1990, 1991; Matsuda et al., 1993; Mackie, 2005) ed è coinvolto nei processi che mediano il controllo dei movimenti, l'equilibrio, l'apprendimento, la memoria e la percezione del dolore (Ameri, 1999).

Attraverso studi di *binding* recettoriale si è potuta osservare una maggiore densità di recettori CB1: *i*) nei gangli della base (nucleo caudato, putamen, substantia nigra, globus pallidus, etc) e nel cervelletto, destinati al controllo della coordinazione motoria, dell'equilibrio e del movimento (Compton et al., 1991; Martin et al., 1991, 1998; Petwee, 1993); *ii*) nell'ippocampo e nella corteccia, dimostrando il coinvolgimento dei cannabinoidi nei processi di apprendimento e memoria (Harkenham et al., 1990; Scallet, 1991); *iii*) nel Nucleus Accumbens (NAc), dove mediano la percezione della gratificazione (French, 1997); *iv*) nel midollo spinale e nella sostanza grigia periacqueduttale, le aree coinvolte nella percezione del dolore (Tsou et al., 1998).

Tuttavia una bassa concentrazione di CB1R è stata ritrovata in alcuni organi periferici (milza e cuore), nell'apparato riproduttivo (utero, ovaio e testicoli), nella prostata, nella

ghiandola surrenale e nelle terminazioni nervose simpatiche sulle quali mediano effetti inibitori (Galiegue et al., 1995; Ishac et al., 1996).

Diversamente il recettore CB2 è stato localizzato prevalentemente nei tessuti e nelle cellule del sistema immunitario (linfociti B, linfociti T, monociti), nella milza, nelle tonsille (Munro et al., 1993; Galiegue et al., 1995; Schatz et al., 1997) anche se recenti studi hanno dimostrato la presenza di basse concentrazioni nelle cellule gliali e nella microglia del SNC (Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006). La localizzazione di questi recettori indica che il CB2R, attraverso il rilascio di citochine e la regolazione della risposta immunitaria, è il principale mediatore dell'azione immunosoppressiva tipica dei cannabinoidi (Galiegue et al., 1995; Condie et al., 1996).

In seguito all'identificazione dei recettori, sono stati isolati i composti lipidici o ligandi endogeni del sistema eCB: l'anandamide (AEA) e il 2-arachidonilglicerolo (2-AG) (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Entrambi i composti, seppur dotati di vie metaboliche di sintesi e degradazione differenti, originano dallo stesso precursore, localizzato nella membrana cellulare, l'acido arachidonico (AA) (Pacher et al., 2006). A differenza degli altri neurotrasmettitori, generalmente prodotti e immagazzinati nelle vescicole sinaptiche, la sintesi e il rilascio di 2-AG e AEA avvengono come risposta ad uno stimolo specifico. Infatti, l'AEA viene prodotta, in seguito all'ingresso di Ca^{++} nella membrana (dovuta alla stimolazione del neurone ad opera di altri neurotrasmettitori), per mezzo di reazioni enzimatiche catalizzate dall'N-acetiltransferasi: a partire dall'AA e l'etanolamina, si forma l'N-arachidonilfosfatidiletanolamina che diventa AEA in seguito alla reazione con la fosfolipasi D (Cadas et al., 1997). La sintesi del 2-AG, anch'essa Ca^{++} -dipendente, avviene attraverso due vie biosintetiche, utilizzando come substrato i fosfolipidi di membrana, catalizzate dalla fosfolipasi C e l'enzima diacilglicerololipasi (Bisogno et al., 1998).

L'anandamide possiede una maggiore affinità verso i recettori CB2, rispetto al 2-AG che possiede un alto grado di affinità sia per CB1R sia per CB2R (Slipetz et al., 1995; Gonsiorek et al., 2000; Luk et al., 2004). Entrambi i composti sono rapidamente idrolizzati attraverso gli enzimi monoacilglicerolo-lipasi e le idrolasi degli acidi grassi (FAAH), ad acido arachidonico e glicerolo (Di Marzo et al., 1994; Cravatt et al., 1996).

Il sistema endocannabinoide è strettamente coinvolto con i processi di gratificazione e di *decision making*, attraverso una stretta relazione con i circuiti mesolimbici sui quali determina effetti eccitatori o inibitori (Salamone and Correa, 2002; Schultz, 2010; Melis

and Pistis, 2012). La stimolazione dei recettori CB1 nel NAc determina un aumento del rilascio di DA nel circuito mesolimbico incrementando la motivazione al consumo di una sostanza d'abuso (Tanda et al., 1997; Svizenska et al., 2008). Inoltre, l'azione inibitoria dei recettori presinaptici sui neuroni GABAergici e glutammatergici che proiettano nell'area ventrale del tegmento (VTA) determina un'inibizione retrograda, risultante nell'ulteriore attivazione delle vie della gratificazione (Maldonado et al., 2006).

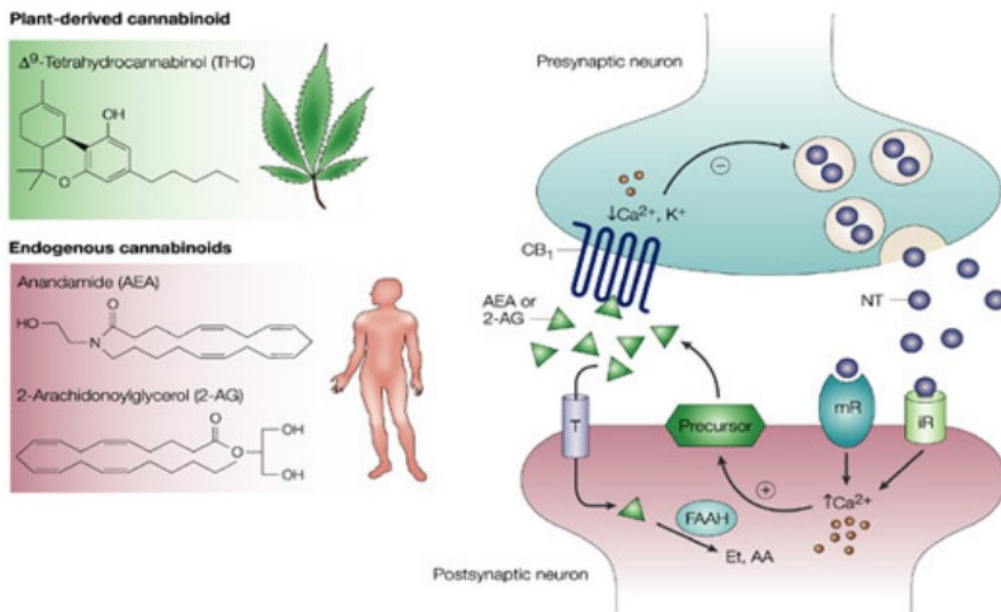


Figura 2. Rappresentazione schematica della sinapsi del sistema degli endocannabinoidi (eCB). Sono raffigurate le formule di struttura dei principali ligandi endogeni (anandamide e 2-arachidonilglicerolo) ed esogeni (Δ^9 -tetraidrocannabinolo) dei recettori CB (Guzman, 2003).

3. L'eroina

La 3,6-diacetilmorfina o eroina, è un composto chimico derivato dalla morfina caratterizzato da un elevato potenziale d'abuso: la dipendenza da eroina o da oppiacei rappresenta uno dei più importanti problemi socio-sanitari del nostro tempo (Volkow and Li, 2005). Negli anni Novanta, sono stati frequenti i casi di morte per overdose dovuti al grado di purezza dell'eroina venduta illecitamente e, attualmente è la sostanza principale per la quale, in Europa, i tossicodipendenti chiedono di entrare in terapia (EMCDDA, 2014).

L'eroina si presenta come una polvere fine o granulare e, in base al grado di purezza, di colore bianco, bruno o rossastro: ha un'azione farmacologica molto simile alla morfina (della quale può essere considerato il pro-farmaco) anche se caratterizzata da una maggiore lipofilia.

Tra i tossicodipendenti, la somministrazione di questa sostanza avviene principalmente per via inalatoria (*sniffing* o fumo) e tramite iniezione per via endovenosa. Solo una piccola percentuale di soggetti la assume per via sottocutanea.

Gli effetti dell'eroina, a livello del SNC, insorgono rapidamente a causa della lipofilia della molecola che, oltrepassando la barriera ematoencefalica (BEE), determina un'intensa sensazione di euforia (*rush*). Inoltre, la sua metabolizzazione per doppia deacetilazione, nella BEE, comporta la formazione di due composti (prima la 6-monoacetilmorfina e, in seguito, la morfina) ancora attivi sui recettori μ degli oppioidi endogeni, che contribuiscono a prolungare nel tempo l'effetto dell'eroina.

Tra gli effetti si possono riscontrare: sedazione, nausea, vomito, secchezza delle fauci, analgesia, miosi, bradicardia, depressione respiratoria, ipotensione ortostatica.

L'effetto gratificante determinato dall'eroina e gli oppiacei in genere è dovuto al legame con i recettori μ per gli oppioidi endogeni presenti nelle aree della gratificazione, in particolare del circuito mesolimbico, l'area ventrale del tegmento (VTA) e il Nucleus Accumbens (NAc). La somministrazione di oppiacei, negli animali da esperimento, comporta un aumento preferenziale del rilascio di dopamina (DA) nel NAc shell, evidenziato in seguito a trattamenti sia in acuto che cronico (Lecca et al., 2007; Cadoni and Di Chiara, 2007).

Il rilascio di DA in queste aree è dovuto ad un'azione indiretta e disinibitoria mediata dai recettori μ (Tanda et al., 1997): l'effetto inibitorio dovuto alla stimolazione di questi recettori presenti sugli interneuroni GABAergici, regolatori negativi del tono dei neuroni

DAergici, causa un aumento dose-dipendente della DA nella shell del NAc, producendo uno stimolo gratificante percepito come piacevole (Di Chiara and Imperato, 1988; Johnson and North, 1992; Pontieri et al., 1995). L'uso cronico di oppiacei, e nello specifico di eroina, determina in breve tempo l'instaurarsi di una condizione di tolleranza agli effetti della dose somministrata. Il soggetto instaura una serie di comportamenti guidati dal desiderio compulsivo (*craving*) di somministrarsi un'altra dose sempre più spesso (a causa dei sintomi dell'astinenza) e in maggiore quantità.

Il fenomeno della tolleranza è dovuto a una perdita della sensibilità dei recettori oppioidi a causa della riduzione dell'attivazione della cascata di trasduzione del segnale dell'AMPciclico dovuta all'iper-espressione dei geni codificanti per tale sistema, governata dall'effetto a lungo termine degli oppioidi stessi (Nestler, 1992; Liu and Anand, 2001; Maher et al., 2001). Pertanto è necessario aumentare la dose di farmaco al fine di innescare il meccanismo disinibitorio alla base dell'effetto gratificante. Da qui, le basi della condizione di dipendenza fisica e psichica, tipica del tossicodipendente eroinomane.

La crisi d'astinenza determina una sintomatologia negativa caratterizzata da uno stato di ansia, dolori diffusi, insonnia e diarrea, costipazione, calo della libido, dismenorrea nelle donne e perdita di peso e forte *craving*.

3.1 Incidenza

Dai dati pubblicati nel *World Drug Report* si evince che i consumatori di oppiacei, tra cui eroina e analgesici oppiacei (buprenorfina, metadone e fentanil), nel mondo sono stati stimati in circa 30-38 milioni di individui (UNODC, 2014). Di questi sono circa 20 milioni i consumatori abituali di eroina ed oppio. Sebbene la prevalenza media mondiale sia stata calcolata in circa lo 0.7%, in aumento rispetto ai dati precedenti, in Australia e nel nord dell'America (soprattutto negli Stati Uniti d'America) sono stati stimati valore di prevalenza in costante aumento, superiori al 4% (figura 3). Tramite l'ultima relazione pubblicata, l'Osservatorio Europeo delle Droghe e Tossicodipendenze (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA), l'abuso di eroina e di oppiacei, generalmente assunti per inalazione o per via parenterale, è stato indicato come il responsabile maggiore della mortalità e morbilità dovuto al consumo di sostanze psicoattive in Europa.

Nonostante il calo generale dei consumi di eroina nei paesi europei, in relazione ai picchi di consumo degli anni '70 e '90, la prevalenza annuale della dipendenza da oppiacei è stata

stimata in circa lo 0.4% della popolazione, equivalente a 1.5 milioni di individui (EMCDDA, 2014).

In Italia, i consumatori problematici di eroina sono quantificati in un massimo di 8 casi su 1000 abitanti, per un totale di poco più di 300 mila soggetti (0.75% della popolazione) compresi tra i 15-64 anni. Per quanto riguarda la popolazione più giovane (15-16 anni) la prevalenza del consumo di eroina è stata quantificata nel 2% della popolazione, 0.24% nell'ultimo anno, tra i più elevati se confrontati con il resto degli Stati Membri dell'Unione Europea (l'Italia risulta al 5° posto) (EMCDDA, 2013).

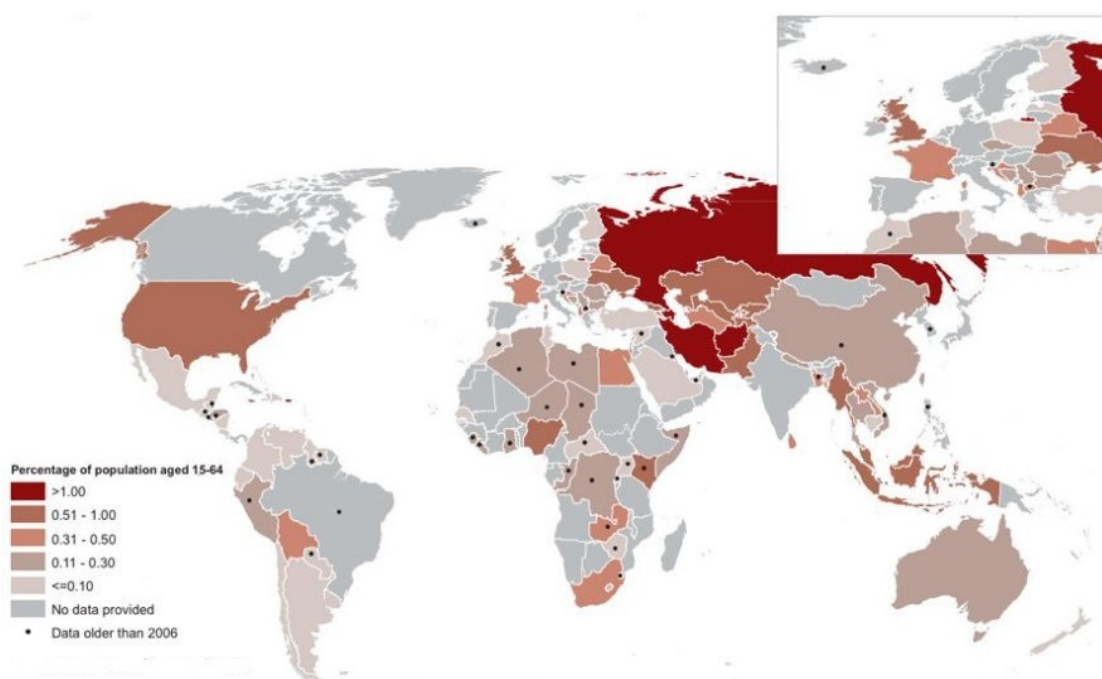


Figura 3. Rappresentazione della prevalenza mondiale dell'uso di eroina ed oppio (UNODC, 2012).

3.2 Il sistema degli oppioidi endogeni

Con il termine oppiacei si intendono una serie di composti derivati dall'oppio, naturali o di semisintesi in grado di interagire farmacologicamente con alcuni recettori presenti nel nostro organismo. Dall'oppio (ottenuto mediante l'incisione delle capsule del *Papaver Somniferum*) si estraggono, in seguito a raccolta, essiccazione e lavorazione del succo lattiginoso, prodotti naturali quali la morfina, la codeina, la tebaina o, per mezzo di reazioni chimiche, l'eroina e altri derivati.

Essi sono in grado di legare i recettori del sistema degli oppioidi endogeni. Gli oppioidi endogeni sono neurotrasmettitori polipeptidici, scoperti nel 1975 da Huges *et al.*, raggruppati in quattro famiglie principali: encefaline, dinorfine, endorfine e orfanine (Akil *et al.*, 1998). Tali neurotrasmettitori modulano diverse funzioni nel nostro organismo: la risposta nocicettiva agli stimoli dolorosi, la regolazione della motilità gastrointestinale, l'omeostasi della temperatura corporea, la risposta e l'elaborazione delle esperienze gratificanti, attraverso la modulazione dell'apprendimento e della memoria (Zöllner and Stein, 2007; Bodnar, 2014).

I recettori mediante i quali gli oppioidi endogeni, e gli oppiacei, esercitano la loro azione sono raggruppati in quattro tipologie differenti: MOP (μ), DOP (δ), KOP (κ), N/OFQ della nocicettina/orfanina (Martin *et al.*, 1976; Chang and Cuatrecasas, 1979; Kieffer, 1995), tutti appartenenti alla famiglia dei recettori di membrana associati alle proteine G, caratterizzati dalla subunità G_i/G_0 (Childers 1993).

L'attivazione della subunità proteica, causata dal legame dell'agonista sul sito recettoriale, determina l'inibizione della cascata di trasduzione del segnale dell'adenilatociclastasi, con conseguente riduzione della produzione di AMPciclico e riduzione dell'attivazione della proteinchinasi-C (PKC).

La stimolazione di questi recettori determina la riduzione del rilascio di neurotrasmettitori, a livello presinaptico, a causa dell'inibizione dei canali al Ca^{++} voltaggio-dipendenti (canali di tipo N) e l'iperpolarizzazione della membrana del neurone postsinaptico dovuta all'attivazione dei canali al K^+ e la contemporanea inibizione dei canali al Ca^{++} di tipo L (*long lasting*). Il legame dell'agonista recettoriale ai recettori del sistema degli oppioidi endogeni determina una complessiva inibizione della trasmissione neuronale.

I recettori per gli oppioidi endogeni sono distribuiti in tutte le aree cerebrali ma, in particolare, sono presenti nelle aree corticali, nel sistema limbico e nel tronco encefalico. Studi di *binding* recettoriale hanno localizzato le aree in cui un sottotipo è maggiormente presente rispetto all'altro: i μ sono maggiormente espressi nell'amigdala, nel talamo e nel mesencefalo; i κ nel tubercolo olfattorio e nel corpo striato; i δ nella corteccia e nella regione dell'amigdala (Le Merrer *et al.*, 2009).

Ogni recettore presenta una differente affinità per i ligandi endogeni. Infatti, se i recettori μ e δ sono maggiormente affini alle β -endorfine e alle encefaline, i recettori κ sono il sito di legame preferenziale delle dinorfine (Manosur *et al.*, 1995).

4. La Gateway Hypothesis (GH)

Nel 1975, Denise Kandel ha proposto la cosiddetta "teoria del passaggio" o "Gateway Hypothesis" (GH), secondo la quale l'uso ricreazionale o l'abuso di alcune sostanze psicotrope durante il periodo adolescenziale predispone l'individuo all'uso, in età adulta, di altre sostanze illecite ad alto potenziale d'abuso, incrementando la vulnerabilità dell'individuo agli effetti gratificanti della sostanza (Kandel, 1975, 2002, 2003; Kandel and Yamaguchi and Chen, 1992).

Attraverso studi di coorte condotti su studenti liceali, è stato suggerito che l'uso di *Cannabis* rivesta un ruolo fondamentale e intermedio nella transizione dall'uso di sostanze ormai legalizzate (tabacco e alcool) all'abuso di sostanze illecite (eroina, cocaina, amfetamine, LSD) (Kandel et al., 2006; Chadwick et al., 2013).

L'azione "ponte" della *Cannabis* è sostenuta da alcune caratteristiche intrinseche della sostanza, alla base dell'effetto Gateway: *i*) l'azione psicoattiva; *ii*) la percezione come rinforzo positivo in modo tale da stimolare il desiderio di ricerca e assunzione anche di altre sostanze; *iii*) la reperibilità sul mercato della droga, (spesso è stata la sostanza di primo utilizzo in un soggetto tossicodipendente); *iv*) la percezione come possibile stimolo gratificante ancora prima del suo primo utilizzo.

Negli Stati Uniti, solo il 7% degli adolescenti ha usato eroina o cocaina senza aver mai fumato marijuana a fronte dell'84% della stessa popolazione che, dopo aver usato *Cannabis*, ha sperimentato altre sostanze illecite (Kandel et al., 1986). Inoltre, è stato dimostrato che solo meno dell'1% degli utilizzatori di eroina o cocaina non hanno mai usato marijuana o hashish in precedenza (Fergusson and Horwood, 2000).

Le teorie di Kandel sono state sviluppate e supportate in letteratura da studi prospettici longitudinali, come quello condotto da Fergusson *et al.* (2006) in una popolazione composta da 1265 bambini della Nuova Zelanda.

Dopo 25 anni di osservazione, lo studio dimostrò che, nell'86% dei casi l'uso di *Cannabis* precede l'uso di sostanze d'abuso illecite, in particolar modo nei soggetti che ne hanno fatto un uso continuo nel periodo adolescenziale: la correlazione diminuisce all'aumentare dell'età di inizio.

Negli stessi anni, studi condotti su gemelli, mono- ed eterozigoti, discordanti per l'uso precoce di *Cannabis* in adolescenza (primo utilizzo: < 17 anni) hanno dimostrato che il rischio di sviluppare una dipendenza da sostanze d'abuso, quali eroina e cocaina, era fino a

cinque volte maggiore rispetto al proprio gemello che non aveva mai fatto uso di marijuana in adolescenza (Lynskey et al., 2003, 2006). Da questi studi sono state sviluppate diverse teorie, relativi a fattori ambientali e biochimici, in grado di dare una spiegazione alla base dell'ipotesi *Gateway*. In generale gli utilizzatori di marijuana hanno la possibilità, attraverso il mercato della droga (fattore ambientale), con il quale possiedono un contatto frequente, di accedere, procurarsi e sperimentare altre sostanze d'abuso (cocaina ed eroina). Secondo Fergusson *et al.*, l'uso della *Cannabis* viene percepito come un'esperienza gratificante e positiva che il soggetto generalizza e prova a ripetere sperimentando anche altre sostanze illecite (Fergusson et al., 2002, 2006).

Infine, è stata sviluppata la "teoria della sensibilità", secondo la quale l'effetto farmacologico della marijuana rende gli individui maggiormente sensibili all'effetto di altre sostanze d'abuso, ponendo l'attenzione sulle possibili modificazioni neuronali (fattore biochimico) alla base della *Gateway Hypothesis* (Schenk et al., 2002).

4.1 L'adolescenza e la vulnerabilità alle sostanze d'abuso

La vulnerabilità individuale è uno dei fattori principali che determina lo sviluppo della dipendenza. Una delle fasi critiche e di maggiore vulnerabilità agli effetti delle sostanze d'abuso è l'adolescenza (Chambers et al., 2003). Al giorno d'oggi, il consumo di *Cannabis* e sostanze d'abuso tra gli adolescenti o i giovani adulti (16-24 anni) è particolarmente diffuso, e rappresenta una problematica sociale di rilevante importanza.

L'adolescenza è definita come il periodo della vita di ogni individuo che ha inizio con la fase della pubertà, caratterizzata da cambiamenti biologici, comportamentali, psicologici e sociali, che culmina con l'arresto dell'accrescimento somatico e l'acquisizione di un ruolo nella società adulta (Spear, 2000; Dahl, 2004; Forbhes and Dahl, 2010).

Tra tutti questi cambiamenti che caratterizzano questa fase della vita, di fondamentale importanza sono l'evoluzione della percezione delle emozioni e del controllo comportamentale, che costituiscono un punto chiave nello sviluppo della personalità dell'individuo.

L'adolescenza è caratterizzata da comportamenti di ricerca e sperimentazione di nuove sensazioni strettamente correlate a comportamenti impulsivi e di attitudine al rischio (Weissman et al., 1999; Spear, 2000), quali il consumo di marijuana e la sperimentazione di sostanze d'abuso (Arnett and Balle-Jensen, 1993; Jacobus et al., 2012).

La ricerca di sensazioni gratificanti associate ad un'alta percezione di rischio, rappresenta per l'adolescente uno stimolo allettante e talmente intenso da influenzare le sue scelte comportamentali a scapito della riflessione sulle eventuali conseguenze negative (Martin et al., 2002). Durante l'adolescenza, il cervello incorre in un'intensa fase di sviluppo neuronale delle varie aree ed è particolarmente sensibile agli stimoli sia interni (attività ormonale) sia esterni, come l'effetto delle sostanze psicoattive (Spear, 2000). La ricerca del piacere, la curiosità e la sperimentazione di nuove sensazioni sono dovute all'aumento dell'attività nelle aree limbiche cerebrali (la corteccia orbitofrontale, lo striato, ecc) coinvolte nella percezione della ricompensa e nella processazione delle emozioni (Dahl, 2004) anch'esse in fase di sviluppo, parallelamente alla corteccia prefrontale (PFCX), che regola il controllo cognitivo-comportamentale. L'incremento della trasmissione DAergica nella via mesocorticale è di fondamentale importanza nella modulazione dei comportamenti impulsivi, nella percezione del rischio in relazione alla salienza emotiva dell'esperienza (Doremus-Fitzwater et al., 2010; Spear, 2010). In accordo con quanto osservato, il modello "*dual process*" postula che la mancata percezione del rischio deriva da uno sviluppo asincrono delle aree mesocorticali, che inizia dalla pubertà, e il controllo razionale (area corticale), che raggiunge il suo sviluppo intorno ai venti anni (Steinberg et al., 2008; Geier e Luna, 2009; Casey and Jones, 2010; Somerville et al., 2010).

Un soggetto adolescente è maggiormente vulnerabile, rispetto a un adulto sia per la differente percezione degli effetti gratificanti delle sostanze psicotrope sia per la ridotta percezione degli effetti negativi durante l'astinenza (Adriani et al., 2002; Adriani et al., 2006; Laviola et al. 1999; O'Dell, 2009). Di conseguenza, l'età d'inizio all'uso continuo di sostanze d'abuso assume un ruolo di fondamentale importanza per l'incremento della suscettibilità allo sviluppo della dipendenza (Clark et al., 1998; O'Dell, 2009). L'uso continuo e regolare di *Cannabis* incrementa il rischio di sviluppare dipendenza da altre sostanze d'abuso in età adulta: tale rischio diminuisce se aumenta l'età di primo utilizzo della sostanza (Fergusson et al., 2006). Tuttavia, è stato dimostrato che l'uso continuato e regolare di *Cannabis* in adolescenza si ripercuote anche sull'incremento di crimini, suicidi e deficit cognitivi (Fergusson et al., 2002). Esiste una correlazione diretta tra gli adolescenti che abusano di cannabinoidi e l'abbandono scolastico, la riduzione della performance negli studi e la futura disoccupazione (Lynskey and Hall, 2000). L'uso regolare di marijuana in adolescenza è ormai considerato un fattore di rischio per lo sviluppo di disturbi mentali in età adulta (Hall and Degenhardt, 2009; Rubino et al., 2009,

2015). È interessante osservare che le conseguenze negative sull'apprendimento, la memoria e l'alterazione della percezione emotiva, indotte dai cannabinoidi, si osservano solo su animali adolescenti e non negli adulti (Schneider and Koch, 2003; O'Shea et al., 2004; Realini et al., 2009).

Nel corso della fase adolescenziale, è stato osservato un intenso processo di *pruning*, il rimodellamento delle connessioni sinaptiche che comporta lo sfoltimento e l'eliminazione delle sinapsi neuronali scarsamente utilizzate (Crews et al., 2007). La somministrazione di cannabinoidi esogeni comporterebbe effetti avversi nei processi di rimodellamento della sostanza bianca e del *pruning* sinaptico che interferirebbe negativamente sullo sviluppo morfologico cerebrale (Bossong and Niesink, 2010; Solowij et al., 2011; Batalla et al., 2013). Evidenze scientifiche dimostrano che il sistema degli endocannabinoidi endogeni è coinvolto nello sviluppo e neuronale (neurogenesi, plasticità sinaptica) attraverso l'attività dei ligandi endogeni sui recettori specifici dall'età embrionale (Harkany et al., 2008). L'iperstimolazione di questo sistema, causato dall'assunzione di *Cannabis*, negli adolescenti comporta una possibile alterazione dei processi di maturazione cerebrale in alcune aree, con conseguenze a lungo termine di rilevante importanza (Galve-Roperh et al., 2009; Downer and Campbell, 2010).

Studi di *brain imaging* hanno dimostrato una riduzione del volume cerebrale, dell'ippocampo e dell'amigdala (Wilson et al., 2000; Ashtari et al., 2011; McQueeney et al., 2011), asimmetria della struttura ippocampale (Medina et al., 2007) ed alterazioni dello spessore della corteccia prefrontale (Lopez-Larson et al., 2011) nei soggetti adolescenti in seguito all'uso continuo di *Cannabis*. La corteccia prefrontale si dimostra come l'area maggiormente vulnerabile all'uso di cannabinoidi esogeni.

4.2 Il supporto della ricerca pre-clinica

Dall'ipotesi di Schenk et al. (2000) si è sviluppato un filone di ricerca sui modelli animali con l'obiettivo di trovare un riscontro neurobiologico alla *Gateway Hypothesis*.

Numerosi studi hanno dimostrato che il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), somministrato in adolescenza, determina effetti neuromodulatori, con conseguenze a lungo termine che si possono ripercuotere sulla percezione dell'effetto gratificante delle sostanze d'abuso, sullo sviluppo neuronale e di disturbi psichiatrici (Solinas et al., 2004; Ellgren et al., 2007; Fernandez-Espejo et al., 2009; Viveros et al., 2012; Chadwick et al., 2013; Rubino et al., 2015).

Utilizzando diversi paradigmi sperimentali è stato osservato un aumento delle proprietà di rinforzo dell'MDMA (Rodriguez-Arias et al., 2010) e della cocaina (Higuera-Matas et al., 2008) in ratti esposti, durante il periodo adolescenziale, agli agonisti cannabinoidi, WIN-55212-2 e CP55,940.

Applicando il paradigma della *Self-Administration* (SA), è stato dimostrato che il trattamento adolescenziale con Δ^9 -THC, determina l'incremento delle proprietà di rinforzo dell'eroina autosomministrata in età adulta (Ellgren et al., 2007).

Tali risultati sono stati spiegati attraverso le modificazioni a lungo termine nelle aree cerebrali coinvolte nella percezione della gratificazione indotte dalla somministrazione dei cannabinoidi in adolescenza (Pistis et al., 2004; Higuera-Matas et al., 2010). A tal proposito è stato ipotizzato che i cannabinoidi determinano una minore responsività dei neuroni DAergici che proiettano nel VTA, nel cervello dell'adolescente, che si ripercuote nella riduzione della gratificazione agli stimoli naturali e conduce ad una maggiore vulnerabilità all'effetto delle sostanze d'abuso. Questo effetto è dovuto anche all'incremento del segnale inibitorio mediato dalla via di trasduzione recettoriale, causato dal Δ^9 -THC, nelle aree del sistema limbico ed è strettamente associato all'aumento del *reward* da sostanze d'abuso (Ellgren et al., 2007). L'azione della *Cannabis* nell'adolescente comporta modificazioni al sistema degli oppioidi endogeni e in particolare l'incremento dei recettori μ e dell'espressione genica della proencefalina nel NAc (Ellgren et al., 2007; Tomasiwicz et al., 2012).

L'uso di *Cannabis* in adolescenza, inoltre, è stata associata alla possibilità di sviluppare, in età adulta, disturbi d'ansia (Fergusson et al., 2002; Hayatbakhsh et al., 2007), disturbi psichiatrici (Rubino et al., 2015), deficit dell'attenzione e della memoria di lavoro (Schwartz et al., 1989; Ehrenreich et al., 1999) e psicosi (Arseneault et al., 2004).

5. Studio dei farmaci d'abuso: i modelli sperimentali

La ricerca pre-clinica si avvale dei modelli sperimentali per studiare gli effetti gratificanti delle sostanze psicotrope, valutarne il potenziale d'abuso e investigare sui fattori comportamentali, e per indagare sui substrati neurobiologici che sottendono lo sviluppo dell'*addiction*, attraverso il condizionamento passivo e il comportamento operante.

Con il condizionamento passivo gli animali da esperimento sono sottoposti ad una somministrazione non-contingente, per mano dell'operatore, di una sostanza potenzialmente gratificante. La preferenza spaziale condizionata (*Conditioned Place Preference*, CPP) rappresenta un paradigma sperimentale basato su un modello di apprendimento associativo o condizionamento pavloviano, nel quale uno stimolo gratificante o non condizionato (farmaco d'abuso, US) viene associato ad un fattore ambientale (stimolo condizionato o CS). Gli animali vengono sottoposti a ripetute somministrazioni di farmaco o una soluzione di veicolo (fase di condizionamento) rispettivamente in due contesti ambientali simili ma distinguibili per alcune caratteristiche visive e tattili (colore delle pareti, struttura del pavimento), ed eventualmente uditive. In seguito ad alcuni giorni di trattamento, durante il test finale si distingue l'effetto gratificante di una sostanza se l'animale trascorre più tempo nel contesto nel quale ha ricevuto la somministrazione della sostanza d'abuso e non in quello nel quale è stato trattato con il veicolo (Fenu et al., 2006; Tzschentke, 2007), per effetto dell'associazione degli effetti gratificanti del farmaco all'ambiente in cui l'ha ricevuto.

Viceversa, nel condizionamento attivo è il comportamento attivo e volontario, eseguito dall'animale da esperimento a determinare la somministrazione di un farmaco d'abuso (risposta contingente). Nel modello sperimentale della *Self-Administration* (SA) gli animali, in determinate condizioni sperimentali, associano stimoli neutri (uditivi, visivi e tattili) alla disponibilità della sostanza nella gabbia e compiono un lavoro per ottenerla, attraverso un lavoro di *lever pressing* (pressione di una leva) o *nose poking* (attivazione di fotocellule) motivato dal desiderio di assumerla (Di Chiara, 1998). L'associazione tra gli stimoli condizionati (CS) e le proprietà di rinforzo della sostanza (US) genera l'apprendimento del comportamento operante, che l'animale ripete in virtù del valore motivazionale rappresentato dalla sostanza. La SA rappresenta un valido paradigma sperimentale capace di mimare nell'animale le fasi del consumo (i comportamenti di uso abituale, compulsivo e di abuso di farmaci), la fase di astinenza e di ricaduta tipiche

dell'*addiction* nell'uomo (Gardner, 2000; O'Brien and Gardner, 2005). Numerosi studi hanno dimostrato che la gran parte delle sostanze che determinano dipendenza nell'uomo, agiscono da rinforzi positivi e sostengono il comportamento operante di SA nell'animale da esperimento (Spealman and Goldberg, 1978).

5.1 L'acquisizione di un protocollo di *Self-Administration* (SA)

Come descritto in precedenza, l'animale per ricevere la ricompensa (farmaco) deve emettere un'adeguata risposta di lavoro (*lever pressing* o *nose poking*).

Nella prima fase, detta di acquisizione del comportamento operante, l'animale impara a distinguere gli stimoli predittivi alla sostanza d'abuso e a compiere un determinato lavoro, regolato da protocolli comportamentali, adeguatamente progettati dallo sperimentatore sulla base del comportamento che si vuole studiare e/o del fenomeno che si vuole riprodurre. La leva o il nose poke attivo diventano stimoli condizionati (CS) al rinforzo farmacologico (US).

La sostanza in esame possiede un effetto gratificante se induce nell'animale un comportamento motivato che lo porta ad eseguire un compito più o meno complesso per assumerla. In questo modo è stato ottenuto un modello animale che mima la condizione di assunzione di un farmaco nell'uomo. Generalmente, in questa fase vengono utilizzati protocolli di autosomministrazione a rapporto fisso (*Fixed Ratio*, FR). La FR-*n* rappresenta una schedula operativa relativamente semplice nella quale l'animale dovrà portare a termine un numero *n* di risposte per ottenere il rinforzo farmacologico. In questo modo è possibile studiare le proprietà di rinforzo della sostanza in esame, o riprodurre un comportamento di uso abitudinario nell'animale da esperimento.

Attraverso protocolli operativi più complessi è possibile studiare le proprietà motivazionali di una sostanza d'abuso e di riprodurre il comportamento di uso compulsivo di sostanze d'abuso, tipico dell'uomo. A questo scopo sono utilizzate le schedule operative a rapporto progressivo (*Progressive Ratio*, PR), caratterizzate dall'incremento progressivo ed esponenziale, all'interno della stessa sessione di SA, del numero di risposte necessarie ad ottenere una dose di farmaco (Roberts and Richardson 1992; Markou et al., 1993; Stafford et al., 1998; Grasing et al., 2003). L'animale è disposto a lavorare fino a quando il numero di risposte richieste supera il valore motivazionale determinato dal farmaco, arrivando al cosiddetto *breaking point*, definito come il valore dell'ultimo requisito o risposta comportamentale soddisfatta dal comportamento operante dell'animale (Hodos, 1961).

Infine, la fase di estinzione del comportamento di autosomministrazione prevede l'eliminazione della ricompensa in presenza o meno degli stimoli ad essa condizionati presenti nella *Skinner box*. In questo modo è possibile valutare se i risultati ottenuti in presenza del farmaco fossero strettamente correlabili alle proprietà di rinforzo, o semplicemente ad un comportamento abituale o strumentale acquisito indipendentemente dalle proprietà di rinforzo del farmaco (Millan et al., 2011). Nelle prime sessioni di estinzione si riproduce uno stato di astinenza, che nell'uomo normalmente determina la ricaduta (*relapse*) ai fattori ambientali associati all'assunzione della sostanza, e che, nell'animale da esperimento può essere indotto dalla riesposizione dell'animale agli stimoli condizionati alla sostanza (*cues*) o alla sua somministrazione (*priming*) (Justinova et al., 2009).

Attraverso altre modifiche ai protocolli di somministrazione (intervalli fissi, intervalli variabili, esposizione prolungata, etc), la SA fornisce un valido strumento per riprodurre e studiare le diverse fasi relative all'abuso e che sottendono allo sviluppo della dipendenza (Koob and Volkow, 2010).

5.2 I Lewis e Fischer 344: un modello animale di vulnerabilità genetica

La possibilità che un individuo sviluppi una condizione di dipendenza da una sostanza d'abuso è strettamente correlata a fattori di tipo ambientale, individuali e genetici.

Tra questi la componente genetica svolge un ruolo fondamentale nel determinare la vulnerabilità dell'individuo al potenziale d'abuso della sostanza (Crabbe, 2002; Uhl et al., 2002). Per questi motivi, la ricerca si avvale dei modelli genetici animali, ovvero animali da esperimento caratterizzati da un processo patologico in atto (trasmesso geneticamente o indotto) che si manifesta similmente, per uno o più aspetti, attraverso le modificazioni biochimiche e neuroadattative, a quelle caratteristiche della patologia umana. Tra questi sono state selezionate linee di animali caratterizzati dello stesso corredo genetico, detti *inbred*, che permettono di esaminare a fondo quali possono essere i fattori genetici coinvolti nei meccanismi della dipendenza.

A questo scopo, i ratti dei ceppi Lewis (LEW) e Fischer (F344) costituiscono un modello di maggiore e minore vulnerabilità alle proprietà di rinforzo dei farmaci comunemente abusati dall'uomo (Kosten and Ambrosio, 2002).

Attraverso il paradigma della SA è stato osservato che i ratti LEW acquisiscono e si adattano facilmente ai differenti protocolli di autosomministrazione dei farmaci ad azione psicotropa secondo schedule di lavoro FR e PR.

Infatti, in letteratura è stato ampiamente dimostrato che i ratti del ceppo LEW acquisiscono più rapidamente ed assumono maggiori quantità di cocaina (Kosten et al., 2007; Picetti et al., 2010), morfina (Martin et al., 1999; 2003), eroina (Picetti et al., 2012), alcool (Suzuki et al., 1988), nicotina (Brower et al., 2002) rispetto ai ratti del ceppo F344.

Questa differenza viene evidenziata sottoponendo entrambi i ceppi a protocolli sperimentali di SA a rapporto progressivo, quando il lavoro che l'animale deve compiere per ottenere una singola dose di farmaco aumenta esponenzialmente nel corso della stessa sessione (Martin et al., 2003; Garcia-Lecumberri et al., 2011) a prescindere dalla dose somministrata (Garcia-Lecumberri et al., 2011).

I ratti LEW sono considerati il ceppo maggiormente suscettibile, rispetto ai F344, agli effetti gratificanti delle sostanze d'abuso, ad eccezione dell'amfetamina (Sthör et al., 1998), come dimostrato attraverso studi di CPP e sull'attività motoria (Guitart et al., 1992; Kosten et al., 1994; Cadoni et al., 2015).

Il ceppo LEW, in base alle caratteristiche di maggiore sensibilità agli effetti dei farmaci ad azione psicotropa e al consumo compulsivo mostrato negli esperimenti di SA, può essere candidato come modello animale sul quale basare gli studi per comprendere meglio i meccanismi che stanno alla base di tutte le fasi della dipendenza nell'uomo. Infatti, è stato dimostrato che i ratti LEW sono in grado di mimare il comportamento compulsivo (*drug escalation*) tipico dell'individuo umano tossicodipendente, se sottoposti a protocolli di SA di lunga durata (> 18h) sia con la cocaina sia con l'eroina (Picetti et al., 2010, 2012).

La diversa sensibilità alle proprietà di rinforzo dei farmaci d'abuso riscontrata tra LEW e F344 può essere spiegata dall'esistenza di differenze biochimiche e neuromodulatorie, nei diversi sistemi neurotrasmettitoriali implicati nel circuito della gratificazione.

In questo contesto, un ruolo di fondamentale importanza è determinato dalla trasmissione DAergica e il circuito mesolimbico, strettamente implicati nei processi di elaborazione degli stimoli gratificanti e nella modulazione della risposta comportamentale nei paradigmi sperimentali di tipo operante (Salamone et al., 2003). Infatti, sono numerose le differenze riscontrate nei due ceppi; i ratti LEW esprimono una minore densità di recettori D₂ e D₃ nel Nucleus Accumbens e nello striato, se paragonati ai F344 (Flores et al., 1998). La ridotta espressione di questi recettori nel NAc e nel VTA può essere correlata allo sviluppo di

comportamenti impulsivi, caratteristiche del ceppo LEW (Martin et al., 1999, 2003; Garcia-Lecumberri et al., 2011), correlabili alla vulnerabilità alle sostanze d'abuso (Huskinson et al., 2012; Hamilton et al., 2014).

Inoltre, nel NAc, i livelli del trasportatore di membrana (DAT) e dei metaboliti basali extracellulari della DA sono risultati essere inferiori nei LEW rispetto ai F344 (Camp et al., 1994; Strecker et al., 1996; Flores et al., 1998), i quali d'altra parte esprimono alti livelli dell'enzima tirosina idrossilasi (TH) (Beitner-Johnson et al., 1991; Kosten, 1997). Oltre alle differenze biochimiche, il sistema mesolimbico dei due ceppi è caratterizzato da una diversa responsività dei neuroni DAergici. Infatti, gli studi di microdialisi cerebrale hanno evidenziato una risposta preferenziale del rilascio di DA nella shell del NAc dei ratti LEW in seguito alla somministrazione dei più comuni farmaci abusati dall'uomo (morfina, cocaina, amfetamina, nicotina e Δ^9 -THC) (Cadoni and Di Chiara, 2007; Cadoni et al., 2009, 2015). Oltre al sistema DAergico, il sistema degli oppioidi endogeni svolge un ruolo di primaria importanza nella percezione degli stimoli gratificanti e nello sviluppo della dipendenza da farmaci. Tra i due ceppi sono state evidenziate ulteriori differenze, sia in condizioni basali sia dopo trattamento cronico, che potrebbero essere correlate alla diversa sensibilità dei F344 e LEW nei confronti delle diverse sostanze d'abuso (Guitart et al., 1992, 1993; Haile et al., 2001; Sanchez-Cardoso et al., 2007, 2009; Gerrits et al., 2003; Garcia-Lecumberri et al., 2011). Studi di *binding* recettoriale hanno dimostrato che il tono basale degli oppioidi endogeni del ceppo LEW è inferiore rispetto ai F344: sono stati riscontrati livelli significativamente più bassi di encefaline, dinorfine e mRNA delle proencefaline nelle aree mesolimbiche (NAc, VTA e Substantia Nigra) (Nylander et al., 1995; Martin et al., 1999). I ratti LEW presentano un livello basale dei recettori μ per gli oppioidi endogeni, mediatore degli effetti gratificanti degli oppiacei, inferiore rispetto ai F344 (Sanchez-Cardoso et al., 2007). Tuttavia, in seguito a trattamento cronico con morfina, i recettori μ presenti nel VTA dei ratti LEW subiscono un fenomeno di *up regulation*: la maggiore inibizione dei neuroni GABAergici in quest'area determina un maggior rilascio di DA. Questi dati sono in accordo con quanto osservato nell'uomo da Drakenberg *et al.* (2006), secondo il quale il 90% dei soggetti che abusano di eroina presentano, oltre ad un polimorfismo dei recettori μ , una *down regulation* dei geni codificanti per le proencefaline e preprodinorfine, precursori dei principali oppioidi endogeni prodotti nel nostro organismo.

Da ulteriori studi è stata dimostrata, tra i ratti LEW e F344, una differente attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene (HPA), area coinvolta nei processi dell'*addiction*, in risposta agli stimoli stressanti (Kosten and Ambrosio, 2002). Nel ceppo LEW si osserva l'iporesponsività dell'HPA, associata ad una ridotta risposta adattativa di ACTH e corticosteroidi, in risposta agli stimoli infiammatori e stressogeni (Sternberg et al., 1989; Dhabhar et al., 1993; Kosten and Ambrosio, 2002) rispetto al ceppo F344.

La secrezione di glucocorticoidi viene considerata come un fattore determinante nella vulnerabilità e nella risposta comportamentale agli effetti dei farmaci d'abuso, in particolare di eroina e oppiacei (Deroche et al., 1992; Koob 2010; Vinson and Brennan, 2013). Pertanto, la differenza di attivazione del sistema HPA gioca un ruolo fondamentale ed è strettamente correlata con la maggiore o minore suscettibilità agli effetti gratificanti delle sostanze d'abuso evidenziate nei due ceppi (Kosten and Ambrosio, 2002).

Infine, si è ipotizzata una differente sensibilità tra i due ceppi del sistema endocannabinoide, in particolare agli effetti gratificanti del Δ^9 -THC (Chen *et al.*, 1991; Lepore *et al.*, 1996; Cadoni *et al.*, 2015). Nell'ippocampo, nel globo pallido e nel NAc, i ratti LEW sono caratterizzati da una bassa densità recettoriale CB1 a fronte di un'elevata espressione dei recettori CB2 (Rivera et al., 2013), rispetto ai F344, i quali però presentano alti livelli di anandamide nelle stesse aree (Coria et al., 2014): ciò consente di fornire una spiegazione dello stato d'ansia che caratterizza questo ceppo rispetto ai LEW (Busquets-Garcia et al., 2011).

SCOPO DELLA RICERCA

Sulla base di queste premesse, lo scopo della mia attività di ricerca è stato quello di valutare gli effetti a lungo termine della pre-esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC a carico del comportamento di autosomministrazione di eroina, in età adulta, utilizzando i ratti *inbred* Lewis e Fischer 344, un modello genetico rispettivamente di maggiore e minore predisposizione agli effetti gratificanti dei farmaci d'abuso.

Il consumo compulsivo di sostanze d'abuso e l'eventuale progressione verso l'*addiction* sono condizionati da fattori individuali, genetici e ambientali. In particolare, il fattore genetico è di fondamentale importanza per predisporre l'individuo ad uno stato di vulnerabilità agli effetti dei farmaci d'abuso.

Gli adolescenti, tra i maggiori utilizzatori di *Cannabis* e dei suoi derivati, si trovano in una fase della vita caratterizzata da un intenso processo di sviluppo neuronale e sinaptico (*pruning* e neomielinizzazione), e da una forte vulnerabilità agli effetti gratificanti delle sostanze psicotrope. In più, il differente periodo di maturazione tra la corteccia prefrontale, sede dell'organizzazione razionale dei pensieri e degli impulsi, e il sistema limbico, area della percezione della valenza motivazionale e della gratificazione, contribuisce a incrementare la possibilità degli adolescenti ad affrontare esperienze rischiose, come la sperimentazione e l'abuso di sostanze psicoattive.

Nel sistema nervoso centrale dell'adolescente, l'effetto di dosi elevate di Δ^9 -THC induce l'alterazione dei processi neuro-modulatori in cui è coinvolto il sistema endocannabinoide, causando conseguenze a lungo termine che, associate ad un *background* sociale favorevole, potrebbero determinare lo sviluppo di un fenotipo predisposto all'abuso e alla dipendenza.

Attraverso l'uso dei modelli genetici animali, come i ratti *inbred* del ceppo Lewis (LEW) e Fischer 344 (F344), è possibile studiare l'influenza e il contributo del fattore genetico nei meccanismi che inducono all'abuso di farmaci. Applicando il paradigma sperimentale della *Self-Administration* (SA) è stato possibile studiare gli effetti a lungo termine della somministrazione di *Cannabis* in adolescenza, riproducendo nei due ceppi di ratti le diverse fasi di sperimentazione, uso ripetuto, abuso e/o uso compulsivo di eroina che si osservano nell'uomo.

Il progetto sperimentale è stato articolato in tre fasi principali. Tutti gli esperimenti hanno previsto lo stesso schema di trattamento adolescenziale, con la somministrazione passiva di Δ^9 -THC o veicolo, nei ratti due ceppi.

Nella prima fase è stata valutata l'influenza del trattamento adolescenziale con il Δ^9 -THC sulle modificazioni delle proprietà di rinforzo dell'eroina, in età adulta, nel ceppo LEW e F344 utilizzando schedule operative a rapporto fisso (FR). In questo modo, attraverso l'applicazione dei protocolli di autosomministrazione FR (FR-1, FR-3 e FR-5), è stato possibile studiare le proprietà di rinforzo dell'eroina simulando la condizione di uso abituale nell'uomo (**Exp. I**).

In seguito, tramite l'impiego di un protocollo operativo a rapporto progressivo (PR), sono state studiate le variazioni del valore motivazionale dell'eroina, in età adulta, in relazione alla vulnerabilità e allo sforzo massimo che gli animali di ogni gruppo sperimentale hanno dovuto sostenere per autosomministrarsi ogni singola dose di farmaco (**Exp. II**).

Nella terza parte, allo scopo di completare lo studio comportamentale sullo stesso modello genetico, è stato simulato il comportamento di abuso, utilizzando un protocollo di esposizione prolungata (*Long Access*, LA) all'eroina (4 h), caratterizzato da un graduale aumento della dose di eroina (**Exp. III**). In questo modo sono stati studiati gli effetti a lungo termine dell'esposizione in adolescenza al Δ^9 -THC sia sui processi di acquisizione, FR-1 di breve durata (*short access*, 1-h, 0,025 mg/kg) sia in protocollo di abuso da oppiacei (*long access*, 4-h). L'incremento progressivo della dose di eroina somministrata (0.025, 0.050, 0.100 mg/kg) ha consentito di studiare in che modo l'esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC influisca sulla vulnerabilità dell'individuo nel sviluppare un comportamento di uso compulsivo (*drug escalation*) tipico nell'instaurarsi della condizione di dipendenza.

MATERIALI E METODI

Tutte le procedure e gli esperimenti eseguiti per la realizzazione di questo studio sono stati condotti seguendo le linee guida in materia di cura e utilizzo degli animali da esperimento dettate dalla Comunità Economica Europea (2010/63/UE L 276 20/10/2010), recepite e approvate dal Comitato Etico locale dell'Università degli Studi di Cagliari. Gli operatori hanno compiuto ogni sforzo al fine di ridurre la sofferenza e il numero di animali utilizzati in ogni fase sperimentale monitorandone giornalmente lo stato di salute.

Animali

Ratti maschi adolescenti dei ceppi *inbred* Lewis (LEW) e Fischer 344 (F344) (Charles River, Italia), dell'età di 5 settimane, corrispondente al 35° giorno post-natale (*Post-Natal day*, PN) e del peso di 175-200 g sono stati stabulati all'arrivo in gruppi di tre animali per gabbia. I ratti sono stati mantenuti in condizioni ambientali standard di temperatura (23°C) e umidità (60%), con cibo e acqua *ad libitum*, e sottoposti ad un ciclo artificiale luce-buio controllato di 12 ore (luce: dalle 8:00 A.M.; buio: 8:00 P.M.). Solo durante le sessioni di autosomministrazione (*Self-Administration*, SA) i ratti di entrambi i ceppi sono stati sottoposti ad un regime dietetico controllato (LEW: 18-20g; F344: 16-18g) al fine di mantenere costante il peso corporeo. Gli animali sono stati manipolati giornalmente (10 minuti) dagli operatori al fine di favorirne l'ambientamento fino all'inizio delle sessioni chirurgiche. Gli esperimenti di SA sono stati iniziati dieci giorni dopo la chirurgia, per consentire il pieno recupero dello stato di salute degli animali (figura 4).

Farmaci

Il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) è stato fornito dalla *National Institute on Drug of Abuse* (NIDA, Research Triangle Park, NC, USA). Per ottimizzare l'uso del Δ^9 -THC attraverso la via di somministrazione intraperitoneale, durante il trattamento adolescenziale dei ratti (alle dosi di 2, 4, 8 mg/Kg), è stato disciolto in una soluzione salina sterile contenente 0.3% di Tween 80 (3 mg/Kg, i.p.).

L'eroina cloridrato (Macfarlan Smith Limited, Edinburgh, UK), disciolta in soluzione salina sterile (0.9%), è stata utilizzata per tutte le sessioni di SA alla dose di 0.025 mg/Kg (48 μ l/4-s per bolo d'infusione) durante ciascuna sessione degli **Exp.I**, **Exp.II**, e solo nella fase di acquisizione dell'**Exp. III**). Infatti, nell'**Exp.III** sono state effettuate sessioni di SA con dosi crescenti di eroina (0.025, 0.050, 0.100 mg/Kg, 48 μ l/4-s per bolo d'infusione).

L'eroina cloridrato è stata ulteriormente somministrata alla concentrazione di 0.5 mg/Kg (1 ml/kg, s.c.) durante il protocollo di *Reinstatement* del comportamento operante di SA (**Exp.II, Exp.III**).

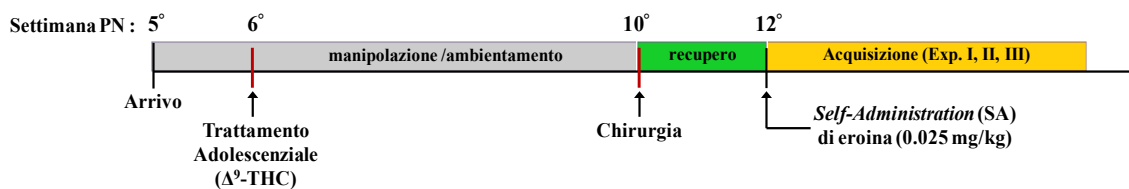


Figura 4. Rappresentazione schematica-temporale della procedura sperimentale utilizzata in questo studio. I ratti, in seguito all'arrivo in stabulario (5° settimana post-natale, PN) sono stati manipolati quotidianamente fino al giorno della chirurgia (10° settimana PN). Dalla 12° settimana PN ha avuto inizio la fase di acquisizione del comportamento di SA di eroina (0.025 mg/kg) sottoposti alla schedula operativa FR-1 (1°-15° sessione).

Protocollo Sperimentale

Il trattamento adolescenziale

Dopo la prima settimana di ambientamento e manipolazione, i ratti ormai adolescenti (38-42° giorno, 6° settimana PN) sono stati suddivisi in modo casuale in quattro gruppi sperimentali e sottoposti al trattamento di sensibilizzazione al Δ^9 -THC. Il paradigma di sensibilizzazione utilizzato, sviluppato in accordo con quanto descritto da Cadoni *et al.* (2001), ha voluto simulare gli effetti indotti dall'assunzione di *Cannabis* in adolescenza.

Il protocollo sperimentale ha previsto il trattamento mediante somministrazione passiva, per via intraperitoneale (i.p.), di due iniezioni giornaliere (09:00 A.M. e 05:00 P.M.) con dosi crescenti di Δ^9 -THC (rispettivamente di 2, 4 e 8 mg/Kg) per tre giorni consecutivi (42°-45° giorno PN). I ratti sottoposti a questo trattamento costituiranno il gruppo dei pretrattati (LEW-THC, F344-THC). Viceversa, agli animali di controllo (LEW-Veh, F344-Veh) è stato iniettato un egual volume di veicolo (0.3% Tween 80 in soluzione salina sterile, 3 mg/Kg, i.p.) secondo lo stesso schema. Il trattamento è avvenuto all'interno dello stabulario: i ratti sono stati presi dall'operatore, iniettati e riposti nella propria *home cage*.

La Chirurgia

Alla decima settimana PN (70-72° giorno, stadio adulto) gli animali sono stati sottoposti alle pratiche chirurgiche: i ratti sono stati anestetizzati con Equisetin (0.97 g pentobarbital, 4.25 g cloralio idrato, 2.1 g MgSO₄, 42.8 ml propilenglicole, 11.5 ml 90% etanolo/100 ml;

5 ml/kg i.p.) e sottoposti all'impianto di un catetere cronico (Medical-grade tubing; Silastic, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA) nella vena giugulare destra.

Il catetere, dopo essere stato inserito e bloccato all'interno della vena, è stato fissato nella regione scapolare, dalla quale fuoriesce con la seconda estremità, per consentire la somministrazione dei farmaci e dell'eroina. Eseguita la chirurgia, i ratti sono stati stabulati singolarmente, nelle stesse condizioni ambientali, con cibo e acqua *ad libitum*, e sottoposti a trattamento farmacologico post-operatorio per dieci giorni, prima di iniziare gli esperimenti di autosomministrazione, per garantire il pieno recupero.

La terapia ha previsto la somministrazione i.v. di 0.1 ml di antidolorifico (Mobic[®], 15 mg/1.5 ml, Boheringer Ingelheim) per quattro giorni, e di 0.1 ml di antibiotico (Baytril[®], 40 mg/ml, Bayer) per 10 giorni, allo scopo di lenire la sofferenza degli animali e di prevenire eventuali infezioni.

Il catetere è stato sciacquato giornalmente con soluzione fisiologica sterile ed eparina (Epsoclar, 25000 U.I./ 5 ml, Hospira Italia s.r.l.) in soluzione fisiologica sterile (250 U/ml, 0.1 ml) per prevenire la formazione di eventuali coaguli e garantire la corretta funzionalità dello stesso.

Il paradigma della *Self-Administration* (SA)

Dalla dodicesima settimana, i ratti dei quattro gruppi sperimentali, in età adulta (84-86°g PN) sono stati allenati ad acquisire un comportamento operante di autosomministrazione endovenosa (*Self-Administration*, SA) di eroina (0,025 mg/Kg, 48µL, per bolo di infusione).

La SA è un paradigma sperimentale utilizzato nell'ambito della ricerca pre-clinica per lo studio delle proprietà gratificanti dei farmaci e i meccanismi alla base dell'apprendimento incentivo. L'animale da esperimento che viene messo nelle condizioni di imparare ad autosomministrarsi un farmaco d'abuso rappresenta un valido modello che riproduce fedelmente i comportamenti di abuso e uso compulsivo di farmaci nell'uomo.

Sulla base di queste premesse, il mio progetto è stato articolato in tre diverse fasi nelle quali, attraverso l'utilizzo di specifiche schedule operative, è stato valutato l'influenza del pretrattamento in adolescenza con il Δ^9 -THC nel modello di vulnerabilità genetica alle sostanze d'abuso LEW e F344, nei diversi aspetti che contraddistinguono il comportamento motivato.

Gli animali dei quattro gruppi sperimentali (LEW-THC, LEW-Veh, F344-THC, F344-Veh) sono stati sottoposti all'autosomministrazione di eroina applicando schedule operative a rapporto fisso (**Exp. I**) e a rapporto progressivo (**Exp. II**), allo scopo di studiare rispettivamente le modificazioni delle proprietà di rinforzo e del valore motivazionale dell'eroina in età adulta.

In seguito, per completare lo studio comportamentale sullo stesso modello genetico, durante la seconda parte dello studio i ratti LEW e F344 esposti secondo lo stesso schema di trattamento al Δ^9 -THC è stato utilizzato un protocollo di esposizione prolungata (*Long Access, LA*) all'eroina, caratterizzato da un graduale aumento della dose di eroina, mirato allo studio degli effetti a lungo termine dell'esposizione in adolescenza al Δ^9 -THC in un protocollo di abuso ed *escalation* di oppiacei (**Exp. III**).

Apparato

Le sessioni sperimentali sono state svolte all'interno di *Skinner Box* (31x26x33cm), situate in specifiche box acusticamente isolate dall'ambiente circostante (Coulbourn Instruments, Allentown, NJ, USA). Una ventola, posta all'interno della box insonorizzata, ha garantito la circolazione di aria, il mantenimento di una temperatura costante e un rumore bianco di fondo. Ognuna delle dodici gabbie utilizzate per gli esperimenti era provvista di due fori, detti nose poke (NP), posti a un'altezza di 2 cm dal pavimento della gabbia, entrambi provvisti di fotocellule attivate dall'inserimento del muso dell'animale. All'interno della gabbia era presente un'ulteriore luce gialla, posta nella parte alta della gabbia, nello stesso pannello dei NP, avente la funzione di stimolo visivo condizionato all'erogazione del farmaco. La differente illuminazione dei NP durante la sessione sperimentale ha costituito lo stimolo discriminativo che il ratto ha dovuto distinguere per autosomministrarsi il farmaco in maniera risposta-contingente, come previsto dai protocolli di acquisizione del comportamento operante nel paradigma della SA. L'illuminazione giallo-verde identificava il NP attivo mentre l'illuminazione rossa caratterizzava il NP inattivo. L'attivazione della fotocellula del NP attivo mediante l'inserimento del muso dell'animale determinava l'attivazione attraverso un sistema computerizzato, di una pompa d'infusione, posta al di fuori della gabbia, che erogava una dose unitaria di farmaco. Viceversa, l'attivazione della fotocellula del NP inattivo è stata registrata dal computer ma era priva di conseguenze sul sistema d'infusione.

La pompa d'infusione contenente la soluzione di eroina, è stata collegata al catetere del ratto per mezzo di un tubo di polietilene (PE) (P.E.-50, Portex Ltd, Kent, UK), opportunamente riempito di soluzione farmacologica, protetto da una molla metallica e connessa ad uno *swivel* (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) posto su di un sostegno mobile al fine di consentire la piena libertà di movimento dell'animale all'interno della *Skinner Box*.

L'attività comportamentale (*nose poking*) dell'animale in entrambi i NP è stata registrata attraverso l'utilizzo di un programma (Graphic State 2 software, Coulbourn Instrument, PA, USA) e successivamente analizzata.

Attraverso il software, il protocollo di ogni sessione di SA è stato programmato in quattro diversi stati (S):

- Fase preparatoria (*Ready State phase*, S1): caratterizzata dall'attivazione (3-sec) della pompa d'infusione allo scopo di riempire il volume morto del catetere cronico con la soluzione di eroina (50 µl);
- Disponibilità del farmaco (*Drug available phase*, S2): gli stimoli discriminativi (NP) indicavano la disponibilità del farmaco e, in base al protocollo sperimentale, il comportamento attivo e volontario del ratto ha determinato il passaggio immediato allo stato successivo;
- Infusione (*Infusion phase*, S3): caratterizzata dall'attivazione della pompa d'infusione (4-sec) che determinava l'erogazione di una dose di farmaco e dalla contemporanea accensione di uno stimolo luminoso (luce gialla), associato all'infusione, prolungata alla fase successiva;
- Intervallo (*Time-Out Phase*, S4): entrambi i NP erano illuminati con luce rossa (durata di 20-sec) e l'attività comportamentale (registrata dal programma) non aveva nessun effetto sul sistema di infusione.

Al termine dello stato S4, il sistema è stato programmato per segnalare la disponibilità dell'eroina (S2) attraverso l'illuminazione dei NP (luce giallo/verde e luce rossa) e lo spegnimento dell'*house light* (luce gialla) associata all'erogazione del farmaco. In base all'attività comportamentale del ratto, il software attivava ciclicamente gli stati S2-S3-S4 per tutta la durata programmata della sessione terminando con lo stato di fine (*Finish State phase*, FIN) caratterizzato dallo spegnimento di tutti gli stimoli.

Protocollo di acquisizione del comportamento operante

Durante fase di acquisizione, identica in tutti e tre gli esperimenti, tutte le sessioni di autosomministrazione di eroina sono state svolte tra le 9:00 A.M e le 5:00 PM in sessioni della durata di un ora (dal lunedì al venerdì, 5 sessioni/settimana). La dose di eroina (0.025 mg/Kg, 48µL) è stata preparata giornalmente in funzione delle variazioni del peso degli animali dei gruppi sperimentali. All'inizio di ogni sessione, il catetere cronico è stato opportunamente perfuso con soluzione fisiologica (0.1 ml, i.v.) allo scopo di verificare l'assenza di eventuali coaguli presenti al suo interno, e successivamente collegato al sistema di infusione del farmaco. Quindi, il ratto è stato posizionato all'interno della *Skinner Box*, e la sessione è stata avviata. In ciascun esperimento, gli animali dei quattro gruppi sperimentali sono stati sottoposti ad una schedula operativa a rapporto fisso, *Fixed Ratio-1* (FR-1) attraverso la quale ogni NP attivo emesso dai ratti ha determinato l'infusione di un volume unitario di eroina (1°-15° sessione). Al termine della sessione, gli animali sono stati tolti dalla gabbia e, dopo il trattamento antibiotico, il catetere è stato riempito con soluzione fisiologica eparinizzata (250 UI/ml).

Il criterio di acquisizione del comportamento operante, in questa fase, è stato definito come l'aumento significativo dei NP attivi rispetto a quelli inattivi in almeno tre sessioni consecutive, con una variazione inferiore al 10%. Gli animali che hanno soddisfatto questo criterio sono passati alla fase successiva.

Protocolli di autosomministrazione

- **Exp. I (studio delle modificazioni delle proprietà di rinforzo dell'eroina):** In seguito alla fase di acquisizione (1°-15° sessione), i ratti dei quattro gruppi sperimentali sono stati sottoposti all'incremento del protocollo di autosomministrazione, da FR-1 a FR-3 (16°-22° sessione) e infine a FR-5 (23°-29° sessione). In questa fase, i ratti sono stati allenati ad aumentare il lavoro necessario per ricevere una singola dose di farmaco. Il programma di rinforzo FR-3 ha previsto un aumento del rapporto dei NP attivi consecutivi per ottenere una singola infusione (3 NP: 1 infusione) ulteriormente incrementato con il protocollo FR-5 (5 NP: 1 infusione).

Dalla 30° sessione gli animali sono stati sottoposti alla fase di estinzione del comportamento operante (30°-40° sessione), durante le quali il comportamento di nose poking ha determinato l'infusione in vena di soluzione fisiologica sterile. Le sessioni di

estinzione sono state condotte in presenza degli stessi stimoli visivi condizionati al rinforzo farmacologico (figura 5).

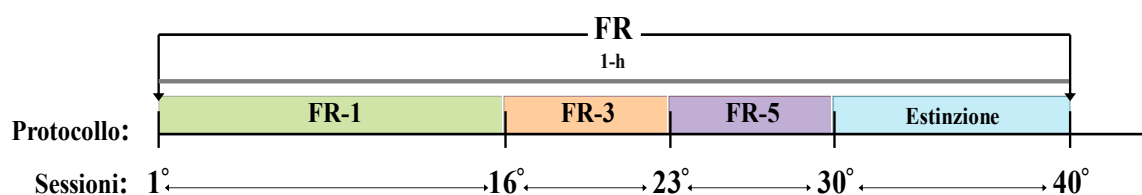


Figura 5. Rappresentazione schematica delle schedule operative utilizzate nel corso dell'**Exp. I**.

- **Exp. II (studio delle modificazioni del valore motivazionale dell'eroina):** dopo la fase di acquisizione, i ratti dei quattro gruppi sperimentali sono stati sottoposti all'incremento del protocollo di autosomministrazione, da FR-1 a FR-3 (16°-22° sessione) e a FR-5 (23°-29° sessione), utilizzando la stessa procedura descritta nell'**Exp. I**. Ogni gruppo sperimentale è stato sottoposto ad una schedula a rapporto progressivo (*Progressive Ratio*, PR), caratterizzata da sessioni della durata di 4-h (30°-43° sessione). La PR, a differenza della FR, rappresenta un programma di rinforzo più complesso nel quale, nell'ambito della stessa sessione di SA, il ratto deve aumentare esponenzialmente l'attività di *nose poking* necessaria all'ottenimento di una singola dose di eroina, secondo una sequenza programmata (Roberts and Richardson, 1992; Grasing et al., 2003). Le schedule operative a rapporto progressivo, applicate al paradigma della SA caratterizzato dalla somministrazione attiva e volontaria (risposta-contingente), sono un valido strumento per lo studio della capacità di rinforzo dei farmaci d'abuso, attraverso lo studio dell'attività comportamentale massimale o punto di rottura (*Breaking Point*, BP), che il ratto sostiene in relazione alla gratificazione ottenuta dal rinforzo farmacologico (Markou et al., 1993; Stafford et al., 1998). Il BP viene definito come il valore dell'ultimo requisito di risposta, soddisfatto dall'attività di *nose poking* dall'animale, per ottenere l'ultima ricompensa farmacologica, oltre il quale il numero di risposte richieste è superiore al valore motivazionale determinato dal farmaco (punto di rottura) (Hodos, 1961). In questo studio è stata utilizzata la schedula operativa PR₃₋₄, in accordo con quanto descritto da Roberts e Richardson (1992), generalmente utilizzata in letteratura per valutare le proprietà di rinforzo di oppiacei e psicostimolanti (Shaham e Stewart, 1994; Martin et al., 1999; Solinas et al., 2004; Ellgren et al., 2007), nella quale l'attività comportamentale necessaria

per ricevere una singola infusione di eroina è stata programmata in base alla sequenza: 1,2,4,6,9,12,15,20,25,32, 40,50,62,77,95,118, ... Durante ciascuna sessione di SA in PR₃₋₄ è stato misurato il BP corrispondente.

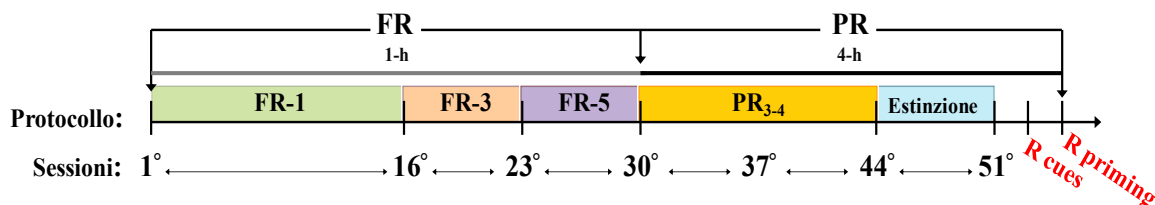


Figura 6. Rappresentazione schematica delle schedule operative utilizzate nel corso dell'Exp. II.

Dalla 44° sessione ha avuto inizio la fase di Estinzione del comportamento di autosomministrazione di eroina, condotta con lo stesso protocollo (PR₃₋₄) ma in assenza degli stimoli visivi (illuminati di rosso) e del rinforzo farmacologico (44°-51° sessione). Infine, il protocollo sperimentale ha previsto il *Reinstatement* del comportamento di SA, articolato in due sessioni condotte ad un giorno di distanza, della durata di 4-h utilizzando la stessa schedula operativa (PR₃₋₄). Nella prima sessione il comportamento di SA è stato indotto dalla presentazione degli stimoli visivi (*cues*) condizionati all'eroina, mentre, nella seconda sessione il *Reinstatement* è stato indotto tramite un *priming* di eroina (0.5 mg/kg, s.c.) (figura 6).

- **Exp. III (studio del comportamento di abuso dell'eroina):** in seguito alla fase di acquisizione (1-h al giorno, 6 sessioni/settimana, FR-1) ha avuto inizio il protocollo sperimentale di accesso prolungato (*Long Access*, LA,4-h) all'eroina inizialmente alla stessa dose di 0.025 mg/Kg, 48µL per bolo di infusione), sempre secondo la schedula operativa a rapporto fisso FR-1 (1 NP : 1 infusione, 16°-22° sessione) (figura 7).

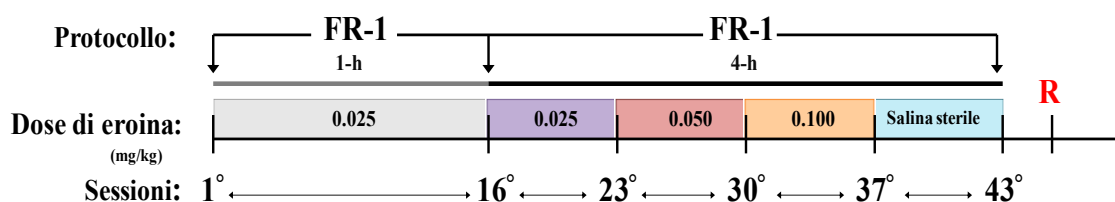


Figura 7. Rappresentazione schematica delle schedule operative utilizzate nel corso dell'Exp. III.

Successivamente, la dose di eroina somministrata è stata progressivamente aumentata: da 0.025 mg/Kg a 0.05 mg/Kg/bolo di infusione (23°-29° sessione), e quindi a 0.100 mg/Kg /bolo di infusione (30°-36° sessione). Dalla 37° sessione, il protocollo sperimentale ha previsto la fase di Estinzione, condotta in assenza degli stimoli visivi (i NP sono stati illuminati di luce rossa), associati al rinforzo farmacologico, e in assenza dell'infusione di eroina (37°-43° sessione). Infine, il *Reinstatement* del comportamento operante di SA di eroina indotto dalla presentazione delle *cues* visive, e, due giorni dopo, dall'iniezione sottocutanea di un *priming* di eroina (0.5 mg/Kg, s.c.).

Analisi Statistica dei Dati

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata eseguita tramite il programma Statistica V. 8 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA).

Self-Administration: i risultati ottenuti durante tutte le sessioni di autosomministrazione di eroina, in tutti gli esperimenti (**Exp.I, Exp.II, Exp.III**) è stata analizzata attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie utilizzando come fattore i *nose-pokes* (attivi vs inattivi) e le *sessioni* come misure ripetute, allo scopo di stabilire se tutti i gruppi sperimentali hanno soddisfatto il criterio di acquisizione del comportamento operante di SA. L'attività di *nose poking* giornaliera fatta registrare dai quattro gruppi sperimentali in tutte le fasi del progetto sperimentale è stata ulteriormente analizzata attraverso l'ANOVA a tre vie utilizzando come fattori il *ceppo* (LEW vs F344), il *pretrattamento* (Δ^9 -THC vs Veh) e le *sessioni* come misure ripetute. L'attività di *nose poking*, in tutte le fasi dei tre esperimenti, è stata espressa come medie \pm ES dei *nose pokes* cumulativi attivi e inattivi (**Exp.I, Exp.II, Exp.III**).

Consumo di eroina: L'*intake* di eroina (mg/Kg) è stato espresso come: *i*) media del consumo giornaliero di eroina somministrata durante tutte le fasi sperimentali; *ii*) media del consumo di eroina in ogni fase sperimentale (**Exp.I, Exp.II, Exp.III**). In entrambi i casi i dati sono stati analizzati con l'analisi della varianza (ANOVA) a tre vie utilizzando i fattori *ceppo* (LEW vs F344), il *pretrattamento* (Δ^9 -THC vs Veh) e l'*intake* giornaliero registrato durante le sessioni come misure ripetute.

Breaking Point (BP): il BP, espresso come valore dell'ultimo requisito di risposta completato, misurato durante la PR₃₋₄(**Exp.II**), è stato analizzato con l'ANOVA a tre vie

utilizzando come fattori il *ceppo* (LEW vs F344), il *pretrattamento* (Δ^9 -THC vs Veh) e le *sessioni* come misure ripetute.

Reinstatement: L'attività di *nose poking*, il consumo di eroina e il BP (solo **Exp.II**) registrati durante le due sessioni di Reinstatement (**Exp.II**, **Exp.III**) sono state analizzate attraverso l'ANOVA a tre vie considerando il *ceppo* (LEW vs F344), il *pretrattamento* (Δ^9 -THC vs Veh) e i *nose pokes* (attivi vs inattivi) come fattori.

Gli effetti significativi sono stati sottoposti al Tukey's HSD o Fischer's LSD post-hoc test, come indicato nella legenda delle figure, allo scopo di valutarne le loro interazioni significative ($p < 0.05$).

RISULTATI

In ciascun esperimento (**Exp. I, II, III**), i ratti del ceppo LEW e F344 sono stati sottoposti al trattamento con dosi crescenti di Δ^9 -THC (2,4,8 mg/kg, due volte al giorno) alla 6° settimana post-natale (PN, 42°-45° giorno), o con veicolo, in accordo con il protocollo descritto da Cadoni *et al.*, (2001) (vedi la sezione **Materiali e Metodi**).

Alla dodicesima settimana PN (84°-86° giorno PN), i ratti dei quattro gruppi sperimentali (LEW-Veh, LEW-THC, F344-Veh, F344-THC) sono stati addestrati ad acquisire un comportamento di *Self-Administration* (SA) di eroina alla dose di 0.025 mg/kg (48 μ L/bolo d'infusione, i.v).

Esperimento I e II

Analisi del comportamento di *Self-administration* (SA) di eroina, in età adulta, utilizzando schedule operative a rapporto fisso (FR-1, FR-3, FR-5).

La fase di acquisizione del comportamento di SA di eroina è stata effettuata utilizzando una schedula operativa FR-1 (1 NP: 1 infusione) per tre settimane (sessioni 1°-15°), durante la quale i ratti del ceppo LEW hanno mostrato una maggiore attività comportamentale rispetto ai ratti F344 a partire dalla seconda settimana di SA.

Tuttavia, dato che la schedula operativa FR-1 costituisce un semplice modello di analisi della frequenza di autosomministrazione di un farmaco (Arnold and Roberts, 1997), nelle sessioni successive, allo scopo di meglio caratterizzare le proprietà di rinforzo dell'eroina, il protocollo sperimentale è stato incrementato a FR-3 (3:1, 16°-22° sessione) e successivamente a FR-5 (5:1, 23°-29° sessione).

I risultati ottenuti negli esperimenti I e II sono stati simili, e, per questo motivo, i valori registrati sono stati uniti e analizzati assieme. Nelle figure 8 e 9, è stato rappresentato il comportamento di *nose poking* cumulativo registrato rispettivamente nei ratti LEW e F344, durante l'applicazione dei protocolli sperimentali di SA a rapporto fisso (FR-1, FR-3 e FR-5). Come rappresentato nella figura 8, i ratti del ceppo LEW hanno acquisito più rapidamente il comportamento operante di SA, rispetto al ceppo F344 (figura 9), ma, il pretrattamento in adolescenza con Δ^9 -THC ha determinato una maggiore capacità di risposta ed una maggiore capacità di adattamento all'incremento della schedula operativa dei ratti LEW-THC adulti rispetto al proprio gruppo di controllo (LEW-Veh) e al gruppo F344-THC. Infatti, l'ANOVA a tre vie applicata all'attività comportamentale registrata giornalmente in ciascun gruppo sperimentale ha mostrato un effetto statisticamente significativo per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,50}=65.59$, $p<0.000001$), *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,50}=9.97$, $p<0.005$), *sessioni* ($F_{28,1400}=93.21$, $p<0.000001$) e in ciascuna delle loro interazioni, compresa *sessione x pretrattamento x ceppo* ($F_{28,1400}=1.70$, $p<0.05$).

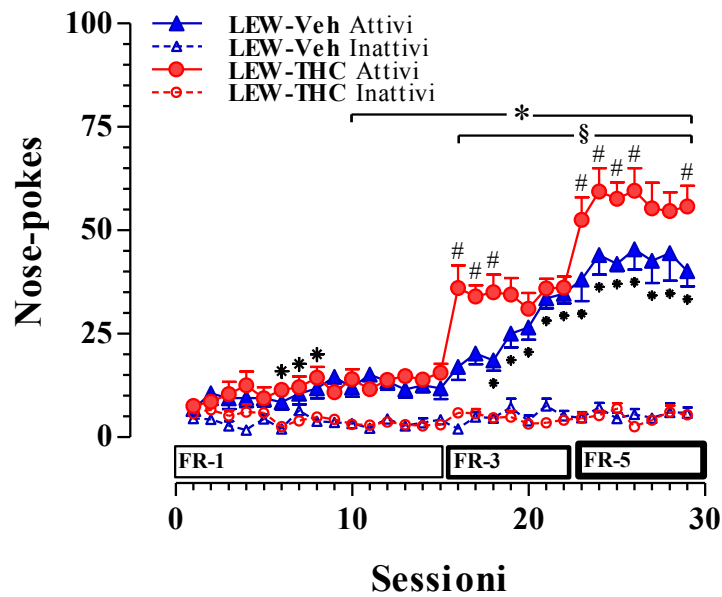


Figura 8. Comportamento di autosomministrazione (SA) di eroina (0.025 mg/Kg), in età adulta, dei ratti del ceppo LEW (THC e Veh) sottoposti a schedule operative a rapporto fisso. Risposte cumulative (*nose pokes* o NP) fatte registrare, durante la SA di eroina (1°-29° sessione), dai ratti LEW-THC (n= 16) e dai rispettivi controlli (LEW-Veh, n= 16) sottoposti alle schedule operative FR-1, FR-3 e FR-5. I risultati sono espressi come media \pm ES dei NP cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti). *: $p < 0.05$ vs NP inattivi; #: $p < 0.05$ vs Veh; §: $p < 0.05$ vs controparte F344. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

L'analisi post-hoc (Tukey's post-hoc test: $p < 0.05$), applicata ai dati inerenti all'attività comportamentale dei ratti LEW-THC e LEW-Veh ha evidenziato la loro maggiore attività di *nose poking* rispetto ai ratti F344, in tutte le schedule operative utilizzate (figura 8).

E' importante osservare che in corrispondenza del cambio di schedula operativa, i ratti LEW pre-esposti in adolescenza al Δ^9 -THC hanno mostrato un più rapido adattamento ai nuovi protocolli di somministrazione rispetto ai controlli. Infatti, nei ratti di controllo (LEW-Veh) l'adattamento ai protocolli FR-3 e FR5 è stato più lento e graduale.

Diversamente da quanto osservato nei ratti LEW, il pretrattamento adolescenziale con il Δ^9 -THC non ha determinato alcuna modificazione delle caratteristiche comportamentali di SA di eroina dei ratti Fischer in età adulta, secondo un protocollo sperimentale a schedule fisse, dato che l'attività dei F344-THC e dei relativi controlli (F344-Veh) è stata sovrapponibile in tutte le fasi sperimentali a FR-1, FR-3 e FR-5 (figura 9).

Inoltre, in accordo con quanto descritto in letteratura, l'attività comportamentale registrata nei ratti del ceppo LEW-Veh è stata sempre maggiore rispetto al corrispondente gruppo dei ratti del ceppo F344-Veh, sia durante la fase di acquisizione in FR-1, sia nelle fasi

successive (FR-3 ed FR-5), confermando la maggiore predisposizione all'acquisizione del comportamento di SA del ceppo LEW rispetto al F344.

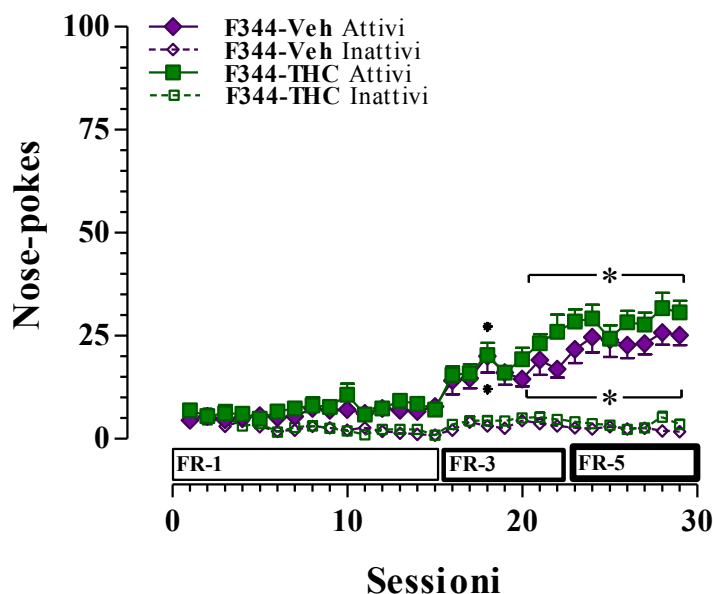


Figura 9. Comportamento di autosomministrazione (SA) di eroina (0.025 mg/Kg), in età adulta, dei ratti del ceppo F344 (THC e Veh) sottoposti a schedule operative a rapporto fisso. Risposte cumulative (*nose pokes*, NP) registrate durante la SA di eroina (1°-29° sessione) dai ratti F344-THC (n= 16) e dai rispettivi controlli (F344-Veh, n= 16), durante le schedule operative FR-1, FR-3 e FR-5. I risultati sono espressi come media \pm ES dei NP cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti). *: $p < 0.05$ vs NP inattivi; #: $p < 0.05$ vs Veh. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

Nell'Esperimento I, in seguito all'ultima sessione di SA condotta secondo il protocollo operativo FR-5, ha avuto inizio la fase di estinzione, durante la quale la soluzione di eroina è stata sostituita con soluzione salina. L'attività di *nose poking* è stata registrata in assenza di rinforzo farmacologico, ma in presenza degli stimoli visivi predittivi l'eroina: l'illuminazione dei NP e l'*house light*, successiva all'attivazione della pompa di infusione.- Nonostante l'assenza del rinforzo farmacologico, le *cues* predittive hanno determinato un incremento significativo dell'attività comportamentale di *seeking* da parte dei ratti di entrambi i ceppi LEW (figura 10A) e F344 (figura 10B) nelle prime due sessioni di estinzione.

Tuttavia, in assenza dell'effetto gratificante dell'eroina, l'attività comportamentale si è ridotta drasticamente tra la 32° e la 40° sessione ($F_{8,352}=31.62$, $p < 0.000001$), indicando chiaramente come l'attività comportamentale registrata fosse correlabile alle proprietà gratificanti dell'eroina e non per effetto di un mero comportamento abitudinario.

L'effetto dell'esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC si traduce nell'incremento del *seeking* esibito dai ratti F344-THC rispetto al proprio gruppo di controllo (THC vs Veh: $F_{1,44}=7.02$, $p<0.005$), nonostante durante le sessioni di AS di eroina non siano state registrate differenze tra i due gruppi, come precedentemente descritto.

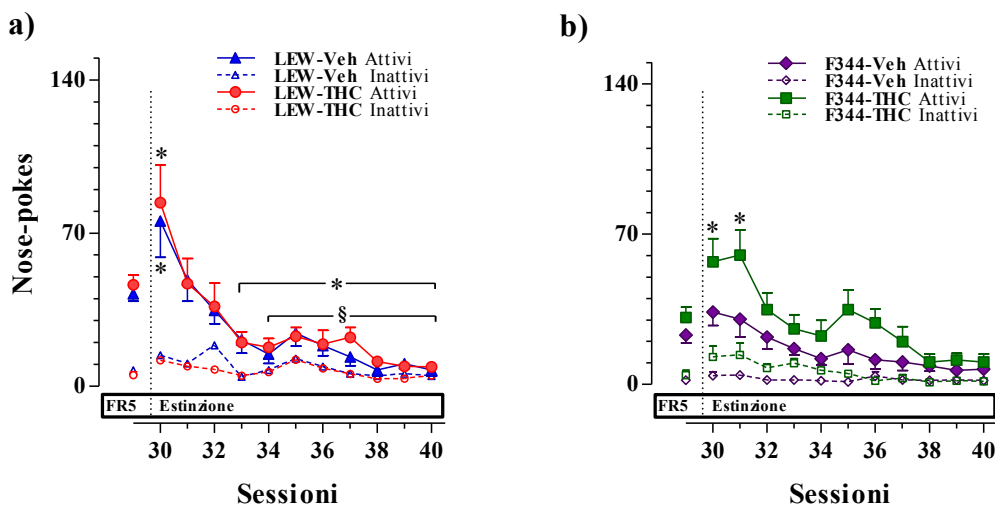


Figura 10. Rappresentazione dell'attività comportamentale dei ratti LEW (THC e Veh, pannello A) e dei ratti F344 (THC e Veh, pannello B) sottoposti al protocollo di estinzione del comportamento operante (FR-5). Risposte cumulative (*nose pokes* o NP) registrate durante la fase di estinzione del comportamento di SA di eroina (30°-40° sessione) dei ratti dei quattro gruppi sperimentali (LEW-THC, n= 7; LEW-Veh, n= 6; F344-THC, n= 7; F344-Veh, n= 8). I risultati sono espressi come media \pm ES dei NP cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti). *: $p<0.05$ vs ultima sessione FR-5 (gruppi THC); §: $p<0.05$ vs ultima sessione FR-5 (gruppi Veh). ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

Analisi del consumo di eroina

Durante ciascuna fase sperimentale di SA di eroina condotta secondo le schedule di lavoro a rapporto fisso FR-1, FR-3 e FR-5, è stato registrato il consumo giornaliero di eroina assunta dai quattro gruppi sperimentali ed espresso come mg/kg/die, sulla base del numero delle infusioni (totale/die) dei singoli boli di eroina (0.025 mg/kg, 48 μ L, i.v.) (figura 11).

L'ANOVA a tre vie, applicata al consumo giornaliero di eroina dei ratti LEW (THC e Veh) e F344 (THC e Veh) secondo i protocolli di SA a rapporto fisso (FR-1, FR-3 e FR-5), ha mostrato un effetto significativo per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,50}=31.62$, $p<0.00001$), *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,50}=7.28$, $p<0.01$), *sessioni* ($F_{28,1400}=10.30$, $p<0.00001$) e nella loro interazione *sessione x ceppo* ($F_{28,1400}=3.49$, $p<0.000001$). Come si osserva dal grafico, figura 11A, i ratti LEW-THC aumentano progressivamente il consumo giornaliero di eroina rispetto al proprio gruppo di controllo, per effetto del più rapido

adattamento dell'attività comportamentale alle nuove condizioni sperimentali indotte dagli incrementi della schedula operativa (FR-1 a FR-3, 16°-22° sessione ; FR-3 a FR-5, 23°-29° sessione).

Infatti, tra i ratti LEW-THC e i rispettivi controlli si osserva una differenza significativa del consumo giornaliero di eroina, dalla 23° alla 29° sessione, suggerendo che l'esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC, in un genotipo predisposto, ha determinato l'incremento delle proprietà gratificanti dell'eroina in età adulta.

Inoltre, per effetto della maggiore attività comportamentale, anche il consumo di eroina dei ratti del ceppo LEW è stata superiore a quanto registrato nel ceppo F344, in accordo con la maggiore e minore propensione dei due ceppi al consumo di sostanze d'abuso. Tra i ratti F344-THC e il proprio gruppo di controllo (F344-Veh) non è stata registrata nessuna differenza nell'*intake* giornaliero di eroina (figura 11B).

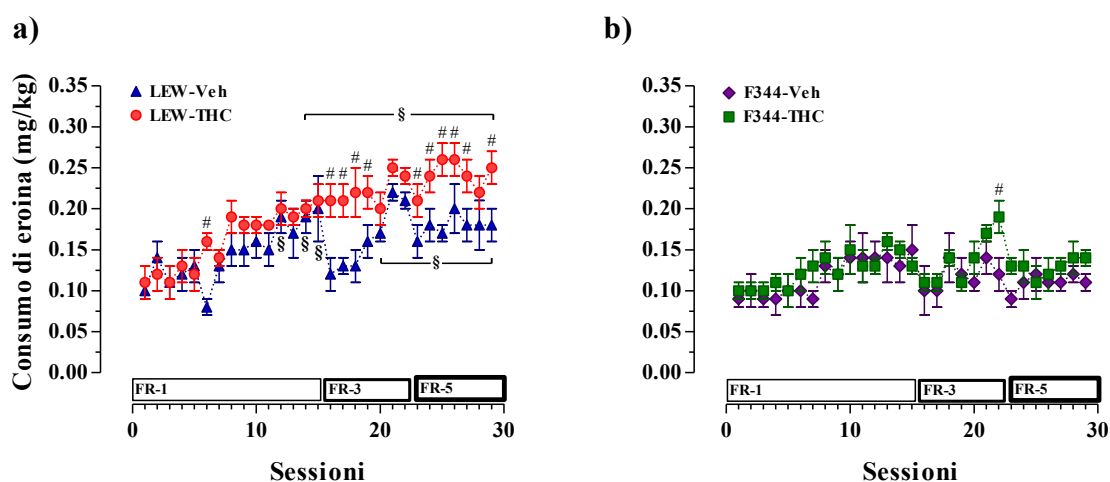


Figura 11. Andamento dell'*intake* quotidiano durante l'autosomministrazione (SA) di eroina (0.025 mg/kg) in età adulta, dei ratti del ceppo LEW (THC e Veh, pannello A) e F344 (THC e Veh, pannello B) sottoposti a schedule operative a rapporto fisso. L'*intake* o consumo di eroina è stato espresso come mg/kg (asse delle ordinate di sinistra) o come numero di infusioni (asse delle ordinate di destra) registrato durante le sessioni (1-h) di SA di eroina (1°-29° sessione) dei ratti LEW-THC (n= 16) e F344-THC (n= 16) e dei rispettivi controlli (LEW-Veh, n= 16; F344-Veh, n= 16), durante le schedule operative FR-1, FR-3 e FR-5. #: p<0.05 vs Veh; §: p <0.05 vs controparte F344. ANOVA seguita da Fischer LSD's post-hoc test.

Esperimento II

Analisi del comportamento di *Self-administration* (SA) di eroina, in età adulta, utilizzando una schedula operativa a rapporto progressivo (PR₃₋₄).

Allo scopo di studiare le possibili modificazioni del valore motivazionale dell'eroina in età adulta, indotte dal trattamento adolescenziale con il Δ^9 -THC, i ratti dei quattro gruppi sperimentali sono stati sottoposti a una schedula di rinforzo a rapporto progressivo (*Progressive Ratio*, PR). Durante ogni sessione i ratti hanno dovuto incrementare esponenzialmente la loro attività comportamentale di *nose poking*, secondo una sequenza di risposte progressiva descritta dal protocollo PR₃₋₄ (vedi **Materiali e Metodi**).

Dalla 29° sessione, l'ultima condotta in FR-5 (dati analizzati nell'**esperimento I**), è stato studiato il comportamento di SA durante la PR₃₋₄, per un totale di 14 sessioni consecutive della durata di 4-h (30°-42° sessione).

Dalla figura 12 si osserva come l'attività comportamentale registrata nei ratti LEW-THC sia stata nettamente maggiore rispetto al veicolo (LEW-Veh) e al gruppo F344-THC.

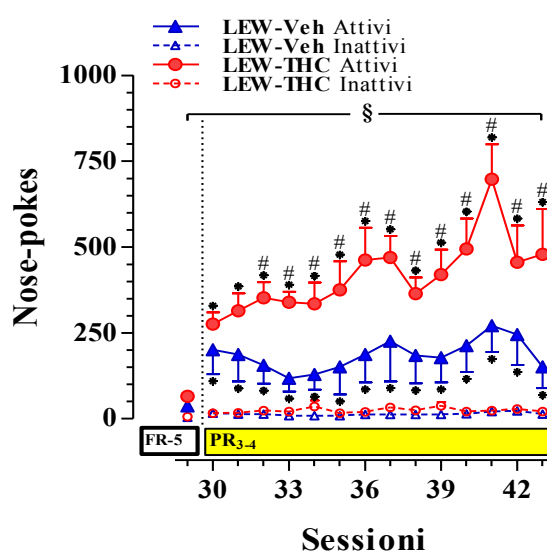


Figura 12. Comportamento di autosomministrazione (SA) di eroina (0.025 mg/kg), in età adulta, dei ratti LEW (THC e Veh) sottoposti ad una schedula operativa a rapporto progressivo (PR₃₋₄). Risposte cumulative (*nose pokes* o NP) registrate durante la SA di eroina (30°-43° sessione) dei ratti LEW-THC (n= 7) e dei rispettivi controlli (LEW-Veh, n=5). I risultati sono espressi come media \pm ES dei NP cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti). *: $p < 0.05$ vs NP inattivi; #: $p < 0.05$ vs Veh; §: $p < 0.05$ vs controparte F344. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

L'ANOVA a tre vie, applicata all'attività giornaliera di *nose poking* fatta registrare dai ratti LEW e F344 durante l'applicazione della PR₃₋₄, ha mostrato un effetto significativo per i

fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,22}=6.28$, $p<0.05$), *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,22}=7.43$, $p<0.05$) e *sessioni* ($F_{13,572}=9.18$, $p<0.000001$).

L'analisi post-hoc (Tukey's post-hoc test, $p<0.05$) ha evidenziato come, durante le sessioni di SA a PR₃₋₄, l'attività comportamentale registrata nei due gruppi del ceppo LEW è stata statisticamente maggiore rispetto a quella registrata durante il protocollo a FR-5, ma l'aumento è stato maggiore nei ratti LEW-THC. Infatti, mentre i veicoli (LEW-Veh) hanno mantenuto l'attività comportamentale pressoché costante durante tutte le sessioni a schedula progressiva, i ratti LEW-THC hanno mostrato un aumento progressivo dell'attività di *nose poking* dalla 30° fino alla 43° sessione rispetto ai controlli (LEW-Veh), e maggiore rispetto ai due gruppi F344. È importante osservare, quindi, come l'esposizione in età adolescenziale al Δ^9 -THC sia stata capace di influenzare il comportamento di SA di eroina anche durante l'impiego di una schedula operativa a rapporto progressivo. Al contrario, come si può osservare nella figura 13, il pretrattamento adolescenziale con il Δ^9 -THC non ha determinato nessun alterazione comportamentale all'interno del ceppo F344, indicato in letteratura come meno vulnerabile agli effetti psicotropi dell'eroina e delle sostanze d'abuso. Infatti, sebbene entrambi i gruppi siano stati in grado di acquisire il protocollo a PR, tra i ratti F344-THC e il rispettivo veicolo non è stata osservata alcuna differenza dell'attività di *nose poking*.

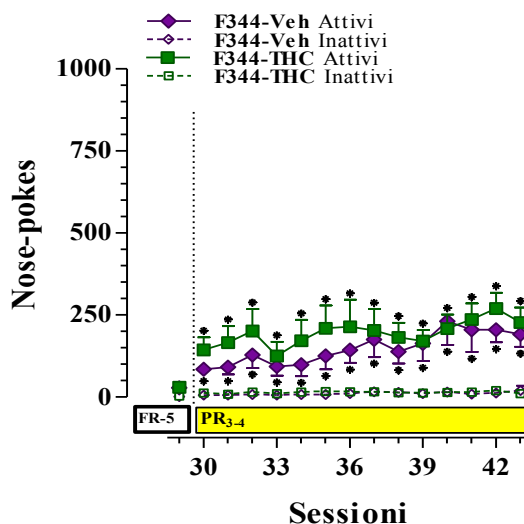


Figura 13. Comportamento di autosomministrazione (SA) di eroina (0.025 mg/kg), in età adulta, dei ratti F344 (THC e Veh) sottoposti ad una schedula operativa a rapporto progressivo (PR₃₋₄). Risposte cumulative (*nose pokes* o NP) registrate durante la SA di eroina (30°-43° sessione) dei ratti F344-THC (n= 8) e dei rispettivi controlli (F344-Veh, n= 6). I risultati sono espressi come media \pm ES dei NP cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti). *: $p<0.05$ vs NP inattivi; #: $p<0.05$ vs Veh. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

Nonostante alcuni Autori abbiano ritenuto il protocollo PR₃₋₄ inadatto per studiare il comportamento di autosomministrazione di oppiacei dei ratti Lewis e Fischer F344 (Grasing et al., 2003), a causa della sua eccessiva rigidità, nelle nostre condizioni sperimentali, al contrario, si è dimostrato un valido strumento per evidenziare le differenze tra i due ceppi e soprattutto gli effetti indotti dal pretrattamento con cannabinoidi in adolescenza, e ha permesso di valutare il valore motivazionale dell'eroina attraverso il paradigma sperimentale della SA, in accordo con Roberts and Richardson (1992).

Contestualmente all'attività di *nose poking*, attraverso il protocollo PR₃₋₄ è stato misurato il valore del *breaking point* per ciascuna sessione a PR. Il "punto di rottura" (*breaking point*, BP) rappresenta la soglia del valore motivazionale del farmaco, raggiunto il quale l'animale non è più disposto a lavorare per ricevere il rinforzo farmacologico. L'analisi della varianza, applicata ai valori di BP registrati giornalmente (dalla 30° alla 43° sessione), ha mostrato un effetto significativo per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,22}=5.10$, $p<0.05$), *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,22}=7.67$, $p<0.05$) e *sessioni* ($F_{13,286}=5.28$, $p<0.000001$).

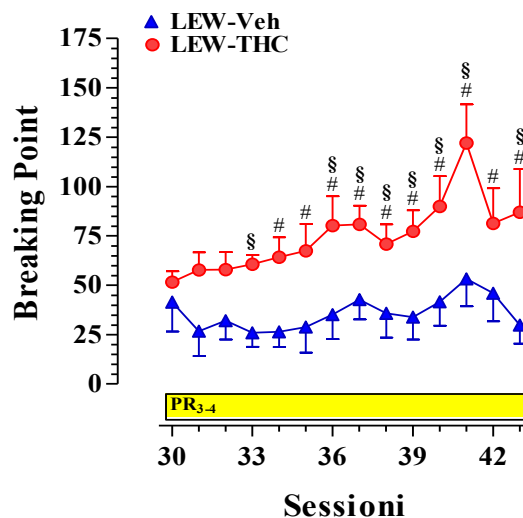


Figura 14. Raffigurazione dei valori di *Breaking Point* (BP) fatti registrare dai ratti LEW (THC e Veh) sottoposti ad una schedula operativa a rapporto progressivo (PR₃₋₄). Risposte cumulative (*breaking point* o BP) fatte registrare durante il protocollo progressivo PR₃₋₄ (30°-43° sessione) dai ratti LEW-THC (n= 7) e dei rispettivi controlli (LEW-Veh, n= 5). I risultati sono espressi come media \pm ES del valore di BP giornaliero (simboli pieni). #: $p<0.05$ vs Veh; §: $p <0.05$ vs controparte F344. ANOVA seguita da Fischer LSD's post-hoc test.

Dall'analisi del grafico di ogni gruppo sperimentale (figura 14 e 15), parallelamente all'aumento dell'attività di *nose poking* col procedere delle sessioni, i ratti LEW-THC hanno progressivamente incrementato anche il valore del BP rispetto sia ai controlli (LEW-

Veh) che alla controparte F344-THC. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i ratti F344 esposti al Δ^9 -THC durante l'adolescenza ed i loro controlli (Fischer LSD's test, $p>0.05$) (figura 15). Questi risultati forniscono l'ulteriore dimostrazione che la somministrazione di Δ^9 -THC in adolescenza è stata in grado di incrementare il valore motivazionale, dell'eroina, solo nel ceppo geneticamente predisposto.

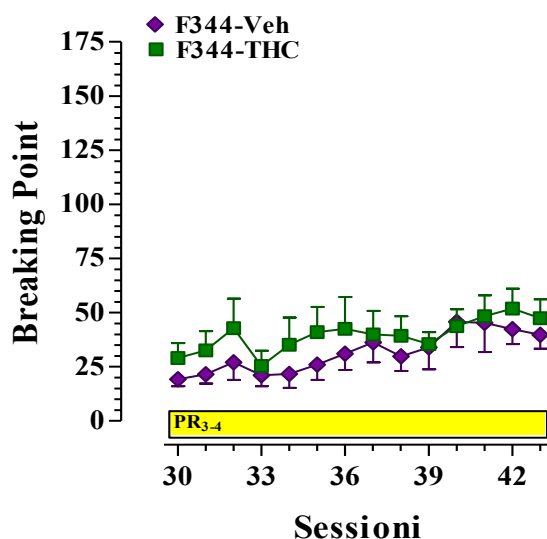


Figura 15. Raffigurazione dei valori di *Breaking Point* (BP) fatti registrare dai ratti F344 (THC e Veh) sottoposti ad una schedula operativa a rapporto progressivo (PR₃₋₄). Risposte cumulative (*breaking point* o BP) fatti registrare durante il protocollo progressivo PR₃₋₄ (30°-43° sessione) dai ratti F344-THC (n= 8) e dai rispettivi controlli (F344-Veh, n= 6). I risultati sono espressi come media \pm ES del valore di BP giornaliero (simboli pieni). #: $p<0.05$ vs Veh. ANOVA seguita da Fischer LSD's post-hoc test.

Allo scopo di verificare se l'attività comportamentale fatta registrare dai quattro gruppi sperimentali nel corso dell'esperimento di SA sia stata guidata dalle proprietà gratificanti dell'eroina, e non da un semplice comportamento abitudinario, è stata programmata l'estinzione del comportamento operante di autosomministrazione.

La fase di estinzione è stata condotta in assenza degli stimoli visivi (l'illuminazione dei NP e l'*house light*) e del rinforzo farmacologico, in sessioni della durata di 4-h (44°-51° sessione) utilizzando il protocollo operativo PR₃₋₄.

In assenza degli stimoli condizionati e delle proprietà gratificanti dell'eroina, come mostrato dai grafici (figura 16A e 16B), si è osservata una rapida riduzione dell'attività comportamentale, a partire dalla 44° sessione, paragonata all'ultimo giorno di SA attiva e risposta-contingente.

L'analisi statistica, ANOVA a quattro vie, applicata ai dati comportamentali registrati in questa fase, rispetto all'ultima sessione di PR₃₋₄, ha mostrato un effetto significativo per i fattori *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,44}=7.02$, $p<0.02$), *nose-pokes* (attivi vs inattivi: $F_{1,44}=54.04$, $p<0.000001$), *sessioni* ($F_{8,352}=31.62$, $p<0.000001$) e nelle loro interazioni.

Nessuna differenza comportamentale è stata riscontrata tra i quattro gruppi sperimentali ($F_{1,44}=3.25$, $p>0.07$), anche se il gruppo sperimentale dei ratti LEW esposti in adolescenza al Δ^9 -THC hanno mostrato una maggiore, seppur non significativa, attività comportamentale.

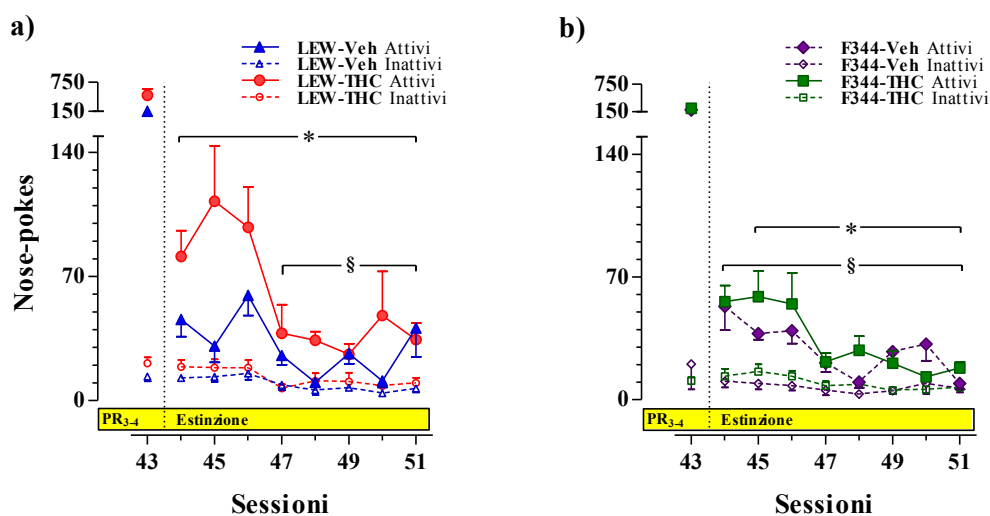


Figura 16. Rappresentazione dell'attività comportamentale dei ratti LEW (THC e Veh, pannello A) e dei ratti F344 (THC e Veh, pannello B) sottoposti al protocollo di estinzione del comportamento operante (PR₃₋₄). Risposte cumulative (*nose pokes* o NP) registrate durante la fase di estinzione del comportamento di SA di eroina (44°-51° sessione) dei ratti dei quattro gruppi sperimentali (LEW-THC, n= 7; LEW-Veh, n= 5; F344-THC, n= 8; F344-Veh, n= 6). I risultati sono espressi come media \pm ES dei NP cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti*: $p<0.05$ vs ultima sessione FR-5 (gruppi THC); §: $p<0.05$ vs ultima sessione FR-5 (gruppi Veh). ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

Durante la fase di estinzione, condotta con il protocollo PR₃₋₄, anche i valori di BP fatti registrare dai quattro gruppi sperimentali (LEW-THC, LEW-Veh, F344-THC e F344-Veh) hanno subito una rapida diminuzione, parallelamente alla riduzione dell'attività di *nose poking*. Infatti, l'analisi statistica non ha evidenziato alcuna differenza comportamentale significativa ($p>0.05$) (dati non mostrati).

Dopo 24-h dall'ultima sessione di estinzione, i ratti LEW (THC e Veh) e F344 (THC e Veh) sono stati sottoposti al *Reinstatement* secondo due modalità sperimentali, articolate in due sessioni, utilizzando il protocollo operativo PR₃₋₄.

Il primo *Reinstatement* è stato indotto attraverso la presentazione degli stimoli condizionati all'eroina (*cues*) e, 48-h dopo, la seconda sessione di *Reinstatement* è stata indotta attraverso il *priming* di eroina (0.5 mg/kg, s.c.). L'analisi dei dati comportamentali, rappresentati nella figura 17, dimostrano che sia la presentazione delle *cues* sia il *priming* di eroina sono state efficaci nell'indurre un'elevata attività di *nose poking* in tutti i gruppi sperimentali.

La riproposizione dei soli stimoli visivi condizionati all'eroina ha indotto in entrambi i ceppi, e in particolare nei LEW-THC, l'attività comportamentale di *nose poking*. L'ANOVA applicata al numero di NP registrati in entrambe le sessioni di *Reinstatement* ha mostrato un effetto significativo per i fattori *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,44}=7.53$, $p<0.01$), *nose-pokes* ($F_{1,44}=34.28$, $p<0.000001$) e nella loro interazione *pretrattamento x nose-pokes* ($F_{1,44}=5.82$, $p<0.05$).

L'attività comportamentale fatta registrare dai LEW-THC è stata significativamente maggiore rispetto al gruppo di controllo (LEW Veh) e al corrispondente gruppo F344-THC. L'effetto gratificante in seguito alla somministrazione del *priming* di eroina si è dimostrata maggiormente efficace nel potenziare l'attività comportamentale di tutti i gruppi sperimentali (figura 17A). L'ANOVA a tre vie, applicata ai dati comportamentali registrati in seguito al *priming* di eroina, ha mostrato differenze significative per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,44}=7.60$, $p<0.001$), *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,44}=8.54$, $p<0.001$) e *nose-pokes* ($F_{1,44}=19.34$, $p<0.0001$). La percezione dell'effetto gratificante dell'eroina ha determinato una maggiore attività comportamentale nei ratti LEW-THC, evidentemente più sensibili all'effetto del farmaco o presumibilmente maggiormente motivati alla sua ricerca, rispetto ai propri veicoli e ai gruppi del ceppo F344. La maggiore attività comportamentale dei ratti LEW-THC durante le sessioni di *Reinstatement* ha comportato anche la registrazione di valori di BP significativamente maggiori rispetto ai valori registrati negli altri gruppi sperimentali.

Infatti, l'ANOVA a due vie applicata ai valori di BP ha rivelato un effetto significativo: *i*) per il fattore *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,22}=7.41$, $p<0.05$) durante la riproposizione delle *cues*; *ii*) per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,22}=5.28$, $p<0.05$) e *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,22}=6.30$, $p<0.05$) in seguito al *priming* di eroina. L'analisi post hoc (Fischer LSD's post hoc-test) ha confermato l'aumento significativo dei valori di BP solo nei gruppi sperimentali del ceppo LEW ma non nel ceppo F344. L'esposizione al Δ^9 -THC in adolescenza si è dimostrato un fattore determinante nella stimolazione di un

comportamento di *seeking*, suggerendo la maggiore vulnerabilità dei ratti del ceppo LEW agli effetti delle sostanze psicotrope.

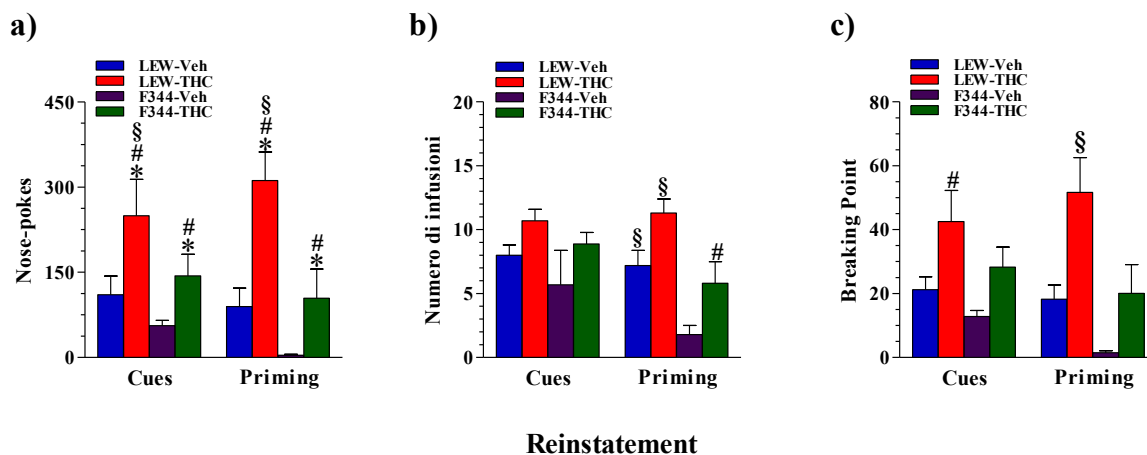


Figura 17. Rappresentazione dell'attività di *nose poking* (pannello A), del consumo di eroina (pannello B) e dei valori di *breaking point* (BP, pannello C) registrati durante le sessioni di Reinstatement. I *nose pokes* cumulativi, il numero di infusioni e i valori di BP sono stati espressi come media \pm ES dei valori registrati durante il *Reinstatement* indotto dalla riproposizione degli stimoli visivi (*cues*) e, due giorni dopo, da un *priming* di eroina (0.5 mg/kg, s.c.) nei ratti dei quattro gruppi sperimentali (LEW-THC, n=7; LEW-Veh, n=5; F344-THC, n=8; F344-Veh, n=6). *: $p < 0.05$ vs NP inattivi; #: $p < 0.05$ vs Veh; §: $p < 0.05$ vs controparte F344. ANOVA seguita da Tukey's o LSD post-hoc test.

Analisi del consumo di eroina

L'ANOVA a tre vie applicata al consumo giornaliero di eroina registrato durante il protocollo progressivo (PR₃₋₄) e nell'ultima sessione di FR-5, ha mostrato significatività per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,22}=4.80$, $p < 0.05$), *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,22}=6.46$, $p < 0.05$), *sessioni* ($F_{14,308}=9.38$, $p < 0.000001$). Come si può osservare nella figura 18, l'incremento esponenziale del consumo di eroina dei ratti LEW-THC è stato maggiore rispetto al proprio gruppo di controllo (LEW-Veh) e alla controparte F344-THC. In questa fase appare evidente l'effetto del pretrattamento adolescenziale come fattore determinante nell'incremento del valore motivazionale della ricompensa in un ceppo, i ratti LEW, geneticamente predisposto al consumo di eroina. Nessuna differenza nel consumo di eroina è stata osservata tra i ratti F344 esposti in adolescenza al Δ^9 -THC e il gruppo di controllo F344-Veh (figura 18B).

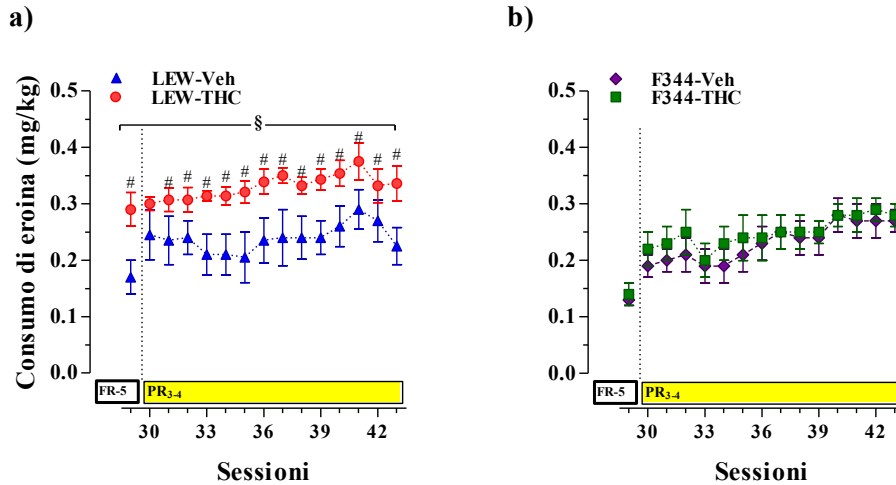


Figura 18. Andamento dell'*intake* quotidiano durante l'autosomministrazione (SA) di eroina (0.025 mg/kg) in età adulta, dei ratti del ceppo LEW (THC e Veh, pannello A) e F344 (THC e Veh, pannello B) sottoposti ad una schedula operativa a rapporto progressivo (PR₃₋₄). L'*intake* o consumo di eroina è stato espresso come mg/kg (asse delle ordinate di sinistra) o come numero di infusioni (asse delle ordinate di destra) registrato durante le sessioni (4-h) di SA di eroina (30°-43° sessione) dei ratti LEW-THC (n= 7) e F344-THC (n= 8) e dei rispettivi controlli (LEW-Veh, n= 5; F344-Veh, n= 6), durante la schedula operative PR₃₋₄. #: p<0.05 vs Veh; §: p <0.05 vs controparte F344. ANOVA seguita da Fischer LSD's post-hoc test.

È interessante osservare, dal grafico rappresentato in figura 18A, che i ratti del ceppo LEW trattati in adolescenza con il Δ^9 -THC hanno registrato un incremento progressivo del consumo medio di eroina, durante tutte le fasi della SA, statisticamente significativo nei confronti dei veicoli LEW-Veh e della controparte F344-THC.

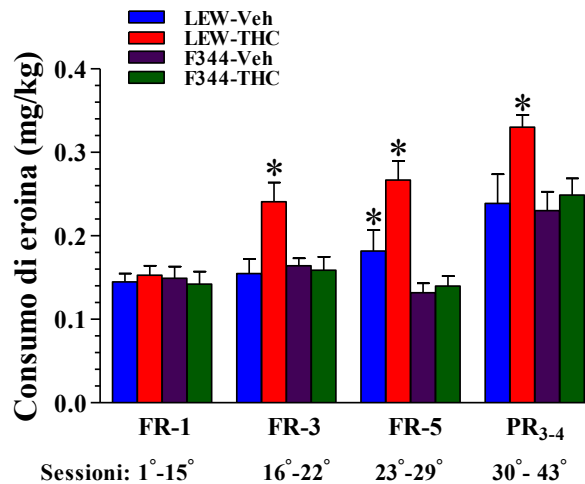


Figura 19. Rappresentazione del consumo medio di eroina(0.025 mg/kg) dei ratti del ceppo LEW (THC e Veh) e F344(THC e Veh) sottoposti alle schedule operative a rapporto fisso (FR-1, FR-3, FR-5) e progressivo (PR₃₋₄). L'*intake* o consumo di eroina è stato espresso come consumo medio (mg/kg), registrato durante ciascun protocollo operativo di SA, dei ratti LEW-THC e F344-THC e dei rispettivi controlli (LEW-Veh, F344-Veh). #: p<0.05 vs Veh; §: p <0.05 vs controparte F344. ANOVA seguita da Fischer LSD's post-hoc test.

L'ANOVA, applicata all'*intake* medio di eroina, registrato durante i protocolli di SA nell'Esperimento II (FR-1, FR-3, FR-5 e PR₃₋₄), ha mostrato un effetto significativo: *i*) per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,22}=12.85$, $p<0.005$), *pretrattamento* (Δ^9 -THC vs Veh $F_{1,22}=8.70$, $p<0.01$), *protocollo* ($F_{3,66}=37.30$, $p<0.000001$); *ii*) nelle loro interazioni *schedula operativa x ceppo* ($F_{3,66}=4.81$, $p<0.005$) e *ceppo x pretrattamento* ($F_{1,22}=6.98$, $p<0.05$). Tuttavia, anche i ratti LEW-Veh hanno mostrato un incremento significativo del loro consumo di eroina, rispetto al gruppo F344-Veh, ma solo quando sono stati sottoposti ad un protocollo di SA impegnativo (FR-5 e PR₃₋₄). Questo dato conferma ulteriormente le evidenze scientifiche inerenti la differente vulnerabilità di base esistente tra i due ceppi. Lo studio del consumo dell'eroina ha evidenziato ulteriormente il ruolo principale del pretrattamento adolescenziale con il Δ^9 -THC come fattore predisponente al comportamento di abuso, in un ceppo geneticamente predisposto, incrementando il valore motivazionale dell'eroina (figura 19).

Esperimento III

Analisi del comportamento di *Self-administration* (SA) di eroina, in età adulta, utilizzando un protocollo di esposizione prolungata (*long access*).

I ratti del ceppo LEW (THC e Veh) e del ceppo F344 (THC e Veh) sono stati sottoposti, attraverso il paradigma sperimentale della *Self-Administration* (SA), ad un protocollo in grado di mimare il comportamento di abuso di oppiacei.

In seguito al trattamento in adolescenza, con Δ^9 -THC o equivalente volume di veicolo (descritto nella sezione **Materiali e Metodi**), i ratti dei quattro gruppi sperimentali sono stati allenati ad acquisire un comportamento operante di SA di eroina (0,025 mg/kg, 48 μ L, per bolo d'infusione), in età adulta, secondo un protocollo operativo FR-1, in sessioni della durata di 1-h.

In seguito alla fase di acquisizione, il protocollo ha previsto l'incremento della durata delle sessioni di SA, passando da 1-h (*short access*) a 4-h (*long access*) giornaliera (16°-22° sessione), mantenendo inalterata la dose di farmaco (0.025 mg/kg, bolo).

Nella fase successiva, è stata data la possibilità agli animali di autosomministrarsi l'eroina a una dose maggiore, rispettivamente 0.050 mg/kg (23°-29° sessione) e 0.100 mg/kg (30°-36° sessione) mantenendo il protocollo di accesso prolungato al farmaco.

In questo modo è stato possibile studiare in che modo l'effetto del pretrattamento adolescenziale con Δ^9 -THC abbia influenzato il comportamento di SA, durante la fase di accesso prolungato (*long access*) quando l'animale ha la possibilità di assumere dosi crescenti di eroina.

L'ANOVA a quattro vie, applicata all'attività comportamentale di *nose poking* registrata nelle diverse fasi dell'esperimento di SA di eroina, ha mostrato un effetto significativo per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,36}=4.11$, $p<0.05$), *nose-pokes* (attivi vs inattivi: $F_{1,36}=152.38$, $p<0.000001$) e *sessioni* ($F_{35,1260}=25.84$, $p<0.000001$). L'analisi post-hoc (Tukey's post-hoc test, $p<0.05$) ha evidenziato le differenze significative dell'attività comportamentale dei ratti LEW-THC rispetto al gruppo di controllo (LEW-Veh) e alla controparte F344-THC.

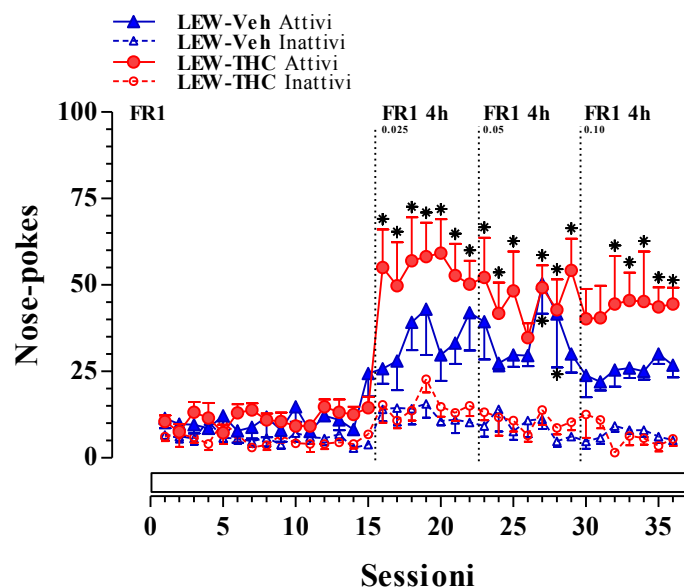


Figura 20. Comportamento di autosomministrazione (SA) di eroina in età adulta, dei ratti del ceppo LEW (THC e Veh) sottoposti ad un protocollo sperimentale di esposizione prolungata. Risposte cumulative (*nose pokes* o NP) registrate durante la SA di eroina dai ratti LEW-THC (n= 6) e dai rispettivi controlli (LEW-Veh, n= 5) durante la fase di acquisizione (FR-1:1°-15° sessione), con accesso ridotto (1-h) e le successive fasi ad accesso prolungato (4-h) con dosi crescenti di eroina: 0.025 mg/kg (16°-22° sessione), 0.05 mg/kg (23°-29°) e 0.1 mg/kg (30°-36°). I risultati sono espressi come media \pm ES dei NP cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti). *: $p < 0.05$ vs NP inattivi; #: $p < 0.05$ vs Veh; §: $p < 0.05$ vs controparte F344. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

Come rappresentato nella figura 20, i ratti del ceppo LEW-THC, pretrattati in adolescenza, mostrano una maggiore e una più rapida acquisizione del comportamento operante di SA in particolare durante le sessioni di LA rispetto al gruppo dei LEW Veh.

L'aumento della dose di eroina, nel corso delle sessioni sperimentali, non ha indotto alcuna riduzione significativa dell'attività comportamentale di *nose poking* nel gruppo LEW-THC, ed è stata sempre maggiore rispetto al gruppo di controllo, in particolare alla dose di eroina più concentrata (0.100 mg/kg, 30°-36° sessione). Viceversa, il gruppo LEW-Veh ha adattato l'attività comportamentale in maniera dose-dipendente, riducendo l'attività di *nose poking* all'aumentare della dose di eroina (23°-36° sessione). Gli effetti indotti dal pretrattamento adolescenziale sul comportamento di SA in età adulta, si osservano solo nel ceppo LEW ma non nel ceppo F344, attraverso una maggiore attività di *nose poking* registrata durante la fase di LA a ciascuna dose di eroina (0.025, 0.500 e 0.100 mg/kg).

Viceversa, tra i gruppi sperimentali del ceppo F344 non è stata riscontrata nessuna differenza comportamentale in nessuna fase dell'esperimento (figura 21).

Sia il gruppo F344-THC sia il gruppo F344-Veh hanno acquisito il comportamento operante di SA di eroina al quale sono stati sottoposti, come indicato dalle differenze significative tra NP attivi e inattivi. Tuttavia, il passaggio alle dosi di eroina maggiormente concentrate, 0.05 mg/kg (23°-29° sessione) e 0.100 mg/kg (30°-36° sessione), ha determinato una netta riduzione dose-dipendente dell'attività comportamentale.

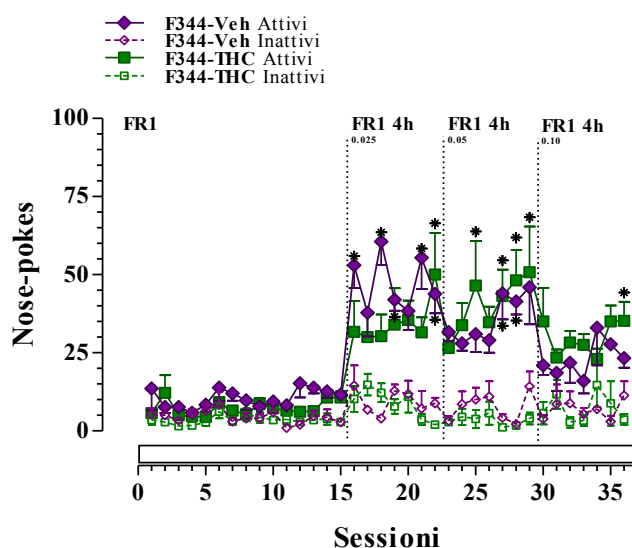


Figura 21. Comportamento di autosomministrazione (SA) di eroina in età adulta, dei ratti del ceppo F344 (THC e Veh) sottoposti ad un protocollo sperimentale di esposizione prolungata. Risposte cumulative (*nose pokes* o NP) registrate durante la SA di eroina dai ratti F344-THC (n= 6) e dai rispettivi controlli (F344-Veh, n= 5) durante la fase di acquisizione (FR-1:1°-15° sessione), con accesso ridotto (1-h) e le successive fasi ad accesso prolungato (4-h) con dosi crescenti di eroina: 0.025 mg/kg (16°-22° sessione), 0.05 mg/kg (23°-29°) e 0.1 mg/kg (30°-36°). I risultati sono espressi come media \pm ES dei NP cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti). *: $p < 0.05$ vs NP inattivi; #: $p < 0.05$ vs Veh. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

In accordo con quanto osservato nell'Exp. I e II, la somministrazione adolescenziale di Δ^9 -THC non è stata in grado di determinare differenze comportamentali nel ceppo F344, un genotipo poco sensibile agli effetti delle sostanze d'abuso.

Lo studio dose-risposta dell'attività di *nose poking* registrata nei quattro gruppi sperimentali alle diverse dosi di eroina (0.025, 0.500, 0.100 mg/kg, figura 22), oltre a sottolineare le differenze esistenti tra i ceppi LEW e F344, enfatizza gli effetti ceppo-correlati del trattamento adolescenziale con Δ^9 -THC sul comportamento di SA di eroina in età adulta. L'analisi statistica ha rivelato un effetto significativo dell'attività comportamentale dei LEW-THC nei confronti del gruppo di controllo e della controparte

F344-THC durante le diverse fasi sperimentali ($F_{3,54}=53.62$, $p<0.000001$), confermata dal Duncan's post hoc test.

Sebbene durante la fase di acquisizione non sia stata riscontrata alcuna differenza significativa, il passaggio all'accesso prolungato all'eroina (da 1-h a 4-h), ha determinato nel gruppo LEW-THC un incremento dell'attività comportamentale che, a parità di dose (0.025 mg/kg), è correlabile non solo al protocollo di LA, ma all'effetto del pretrattamento ($p<0.05$). Il gruppo sperimentale LEW-THC ha adattato l'attività comportamentale all'aumentare della dose di eroina, a differenza degli altri gruppi in cui si osserva una riduzione dose-dipendente dell'attività di *nose poking*, particolarmente evidente nei ratti del ceppo F344 (figura 22).

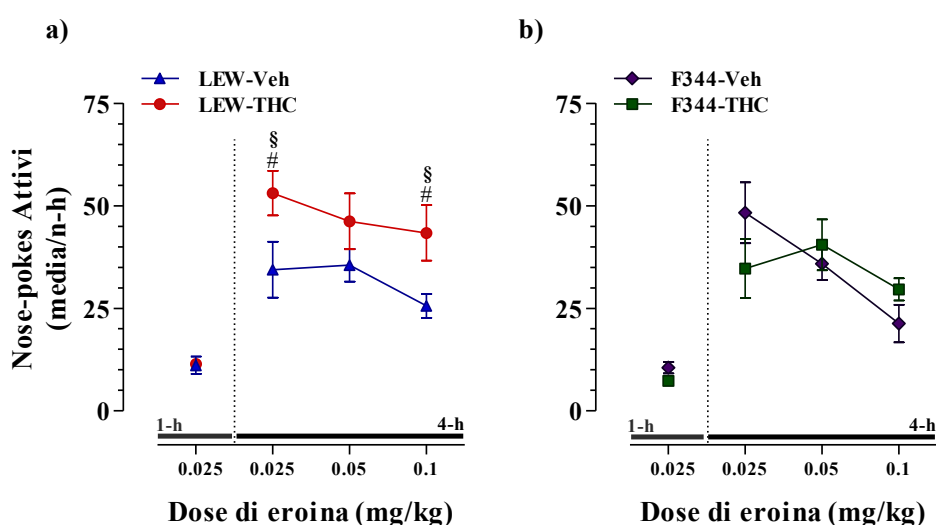


Figura 22. Studio dose-risposta del comportamento di autosomministrazione (SA) di eroina in età adulta, dei ratti del ceppo LEW (THC e Veh, pannello A) e F344 (THC e Veh, pannello B) sottoposti ad un protocollo sperimentale di esposizione prolungata. I risultati sono espressi come media/n-h \pm ES delle risposte cumulative (*nose pokes* o NP) attive registrate durante la SA di eroina dai ratti LEW (THC, n=6; Veh= 5) e F344 (THC, n=6; Veh= 5) nella fase di acquisizione (FR-1:1°-15° sessione), con accesso ridotto (1-h) e le successive fasi ad accesso prolungato (4-h) con dosi crescenti di eroina: 0.025 mg/kg (16°-22° sessione), 0.05 mg/kg (23°-29°) e 0.1 mg/kg (30°-36°). #: $p<0.05$ vs Veh; § : $p<0.05$ vs controparte F344. ANOVA seguita da Duncan's post-hoc test.

In seguito all'ultima sessione di SA di eroina (37° sessione), i ratti sono stati sottoposti alla fase di estinzione del comportamento operante, in assenza degli stimoli visivi (*cues*) condizionati all'eroina (l'illuminazione dei NP e l'*houselight*) e del rinforzo farmacologico. L'ANOVA, applicata all'attività comportamentale registrata durante la fase di estinzione paragonata all'ultima sessione di SA, ha mostrato un effetto significativo per i fattori *nose-*

pokes (attivi vs inattivi: $F_{1,36}=29.12$, $p<0.000005$) *sessioni* ($F_{7,252}=13.21$, $p<0.000001$) e nella loro interazione *sessioni x nose-pokes* ($F_{7,252}=3.85$, $p<0.001$). In questa fase, è stata osservata la riduzione dell'attività comportamentale in tutti i gruppi sperimentali, a dimostrazione che il comportamento di SA registrato nel corso dell'esperimento è stato risposta-contingente alle proprietà gratificanti dell'eroina e non un comportamento abitudinario degli animali (figura 23).

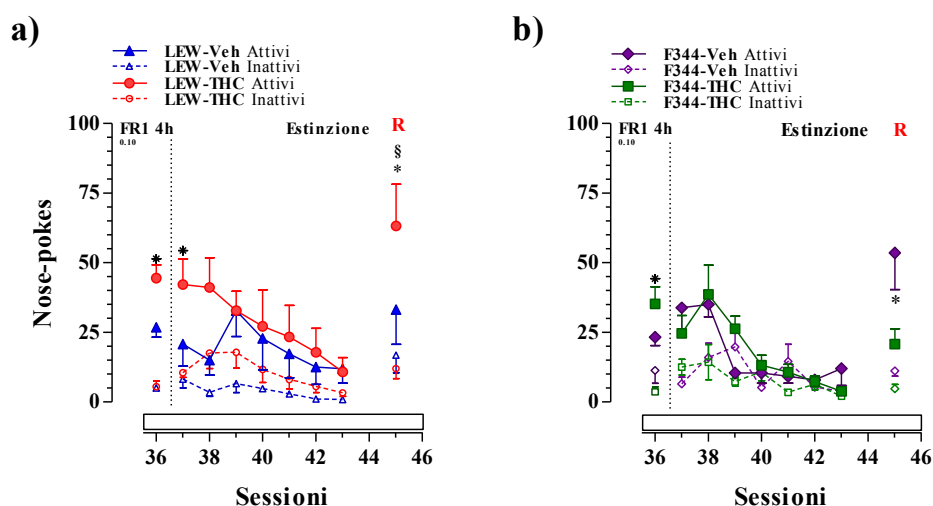


Figura 23. Rappresentazione dell'attività comportamentale dei ratti LEW (THC e Veh, pannello A) e dei ratti F344 (THC e Veh, pannello B) sottoposti al protocollo di estinzione del comportamento operante (FR-1). Risposte cumulative (*nose pokes* o NP) registrate durante la fase di estinzione del comportamento di SA di eroina (37°-43°sessione) dei ratti dei quattro gruppi sperimentali (LEW-THC, n= 6; LEW-Veh, n= 5; F344-THC, n= 6; F344-Veh, n= 5). I risultati sono espressi come media \pm ES dei NP cumulativi attivi (simboli pieni) ed inattivi (simboli vuoti). *: $p<0.05$ vs NP inattivi; #: $p<0.05$ vs Veh; §: $p<0.05$ vs controparte F344. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

Due giorni dopo l'ultima sessione di estinzione, è stata programmata una sessione di *Reinstatement* indotto attraverso l'iniezione di un *priming* di eroina (0.5 mg/kg, s.c.) e condotto nelle stesse gabbie della SA alla presenza degli stimoli condizionati alla disponibilità dell'eroina in gabbia (*cues*).

Il *priming* di eroina ha indotto l'attività di *nose poking* in tutti i gruppi sperimentali ma in particolare nel gruppo LEW-THC (figura 23A). L'ANOVA, applicato all'attività di *nose poking* registrata durante la sessione di *Reinstatement*, ha mostrato un effetto significativo per i fattori *nose-pokes* (attivi vs inattivi: $F_{1,36}=25.05$, $p<0.00005$) e nelle interazioni *ceppo x pretrattamento* ($F_{1,36}=6.53$, $p<0.05$) e *ceppo x pretrattamento x nose-pokes* ($F_{1,36}=5.90$, $p<0.05$). L'analisi post-hoc (Tukey's post hoc test) sottolinea la maggiore attività

comportamentale di ricerca dell'eroina fatta registrare dai LEW-THC rispetto al proprio gruppo di controllo (LEW-Veh) e alla controparte F344-THC.

L'effetto del pretrattamento adolescenziale, in un individuo vulnerabile, determina una maggiore possibilità di ricaduta e l'aumento della sensibilità agli effetti gratificanti dell'eroina.

Analisi consumo di eroina

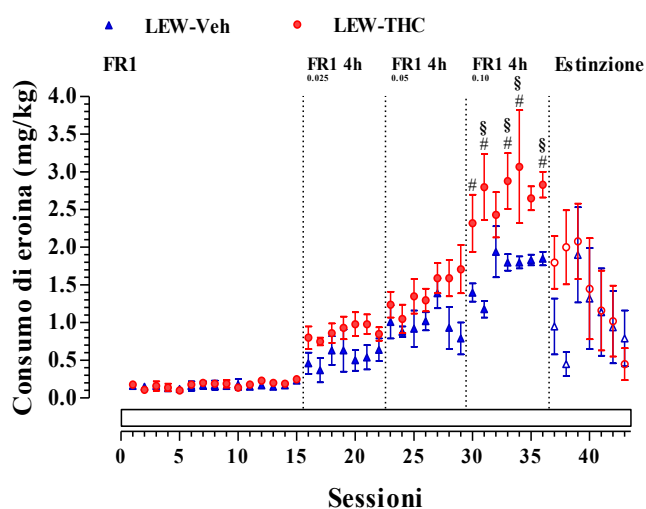


Figura 24. Andamento dell'*intake* quotidiano durante l'autosomministrazione (SA) di eroina, dei ratti del ceppo LEW (THC e Veh) sottoposti ad un protocollo sperimentale di abuso agli oppiacei. L'*intake* o consumo di eroina è stato espresso come mg/kg (asse delle ordinate di sinistra) registrato durante la SA di eroina dai ratti LEW (THC, n= 6; Veh, n= 5) nella fase di acquisizione (FR-1:1°-15° sessione), con accesso ridotto (1-h) e le successive fasi ad accesso prolungato (4-h) con dosi crescenti di eroina: 0.025 mg/kg (16°-22° sessione), 0.05 mg/kg (23°-29°) e 0.1 mg/kg (30°-36°). #: p<0.05 vs Veh; § : p<0.05 vs controparte F344. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

L'ANOVA a tre vie, applicata al consumo giornaliero di eroina durante tutte le fasi sperimentali (*short* e *long access*), ha mostrato un effetto significativo per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,18}=5.53$, $p<0.05$), *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,18}=4.88$, $p<0.05$), *sessioni* ($F_{35,630}=93.98$, $p<0.000001$) ed in gran parte delle loro interazioni tra le quali *ceppo x pretrattamento* ($F_{1,18}=5.95$, $p<0.05$).

L'analisi post-hoc (Tukey's post-hoc test, $p<0.05$) rivela che nel gruppo LEW-THC il consumo di eroina è stato incrementato in maniera dose-dipendente (*drug escalation*) e l'aumento è stato statisticamente significativo rispetto al gruppo LEW-Veh e al gruppo del ceppo F344 (THC).

Sebbene durante la fase di acquisizione non siano state riscontrate differenze nel consumo di eroina tra i due gruppi del ceppo LEW, nelle schedule operative ad accesso prolungato (LA, 4-h) si osserva un aumento progressivo dell'*intake* dei ratti trattati in adolescenza con il Δ^9 -THC, rispetto ai veicoli, statisticamente significativo tra la 30°-36° sessione (dose: 0.100 mg/kg).

Il risultato è di notevole rilevanza poiché dimostra che la somministrazione di cannabinoidi in adolescenza determina lo sviluppo di un fenotipo sensibile agli effetti delle sostanze d'abuso, solo se geneticamente predisposto. Inoltre, i dati ottenuti confermano la validità del protocollo di *long access* come modello comportamentale in grado di riprodurre nell'animale da esperimento il comportamento di uso compulsivo e incontrollato tipico della condizione di abuso dell'uomo.

Durante la fase di estinzione, si osserva la rapida diminuzione del numero d'infusioni di soluzione salina sterile in assenza delle proprietà di rinforzo dell'eroina o della percezione di stimolo gratificante, in entrambi i gruppi sperimentali dei ceppi LEW e F344.

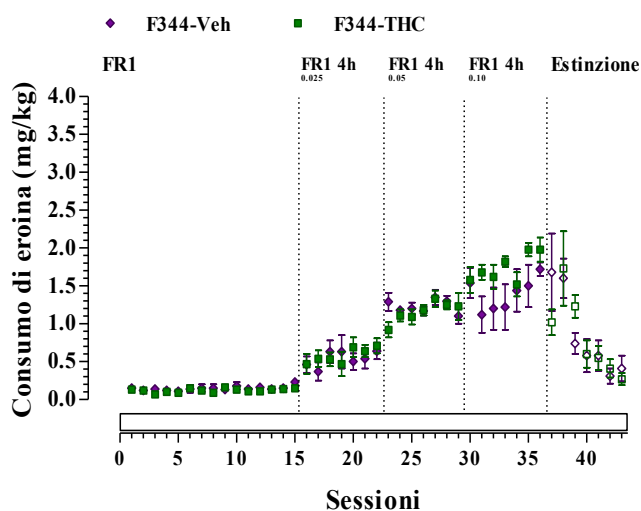


Figura 25. Andamento dell'*intake* quotidiano durante l'autosomministrazione (SA) di eroina, dei ratti del ceppo F344 (THC e Veh) sottoposti ad un protocollo sperimentale di abuso agli oppiacei. L'*intake* o consumo di eroina è stato espresso come mg/kg (asse delle ordinate di sinistra) registrato durante la SA di eroina dai ratti F344 (THC, n= 6; Veh, n= 5) nella fase di acquisizione (FR-1:1°-15° sessione), con accesso ridotto (1-h) e le successive fasi ad accesso prolungato (4-h) con dosi crescenti di eroina: 0.025 mg/kg (16°-22° sessione), 0.05 mg/kg (23°-29°) e 0.1 mg/kg (30°-36°). #: p<0.05 vs Veh. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

Viceversa, il Δ^9 -THC, somministrato in adolescenza, non è stato in grado di indurre differenze comportamentali significative tra i due gruppi sperimentali del ceppo F344 (THC e Veh), notoriamente meno predisposto all'autosomministrazione di sostanze

d'abuso. L'*intake* giornaliero di eroina fatto registrare dal gruppo F344-THC è risultato sovrapponibile a quello del gruppo di controllo (F344-Veh) sia durante la fase di acquisizione in FR-1 (1-h) sia nelle successive fasi ad accesso prolungato (4-h) a ciascuna delle dosi di eroina somministrate. Anche nei gruppi sperimentali del ceppo F344, durante la fase di estinzione, è stata osservata una rapida diminuzione del numero d'infusioni, in assenza del rinforzo farmacologico.

Lo studio dose-risposta del consumo di eroina (figura 26), registrate nei quattro gruppi sperimentali alle diverse dosi previste dal protocollo di SA, mostra come i ratti del ceppo LEW, trattati in adolescenza (Δ^9 -THC), hanno aumentato progressivamente, in maniera dose-dipendente, l'*intake* di eroina durante le diverse sessioni sperimentali, a differenza di quanto è avvenuto nei LEW-Veh e nei gruppi sperimentali del ceppo F344.

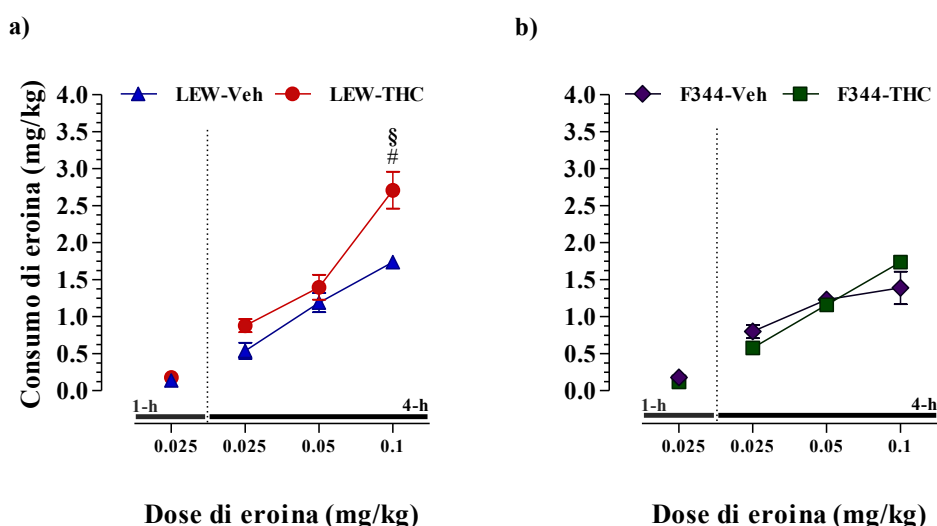


Figura 26. Studio dose-risposta dell'*intake* di eroina dei ratti del ceppo LEW (THC e Veh, pannello A) e F344 (THC e Veh, pannello B) sottoposti ad un protocollo sperimentale di abuso di oppiacei. L'*intake* o consumo di eroina è stato espresso come consumo medio/n-h \pm ES registrato durante la SA di eroina dai ratti LEW (THC, n= 6; Veh, n= 5) e F344 (THC, n= 6; Veh, n= 5) nella fase di acquisizione (FR-1:1^o-15^o sessione, 0.025 mg/kg), con accesso ridotto (1-h) e le successive fasi ad accesso prolungato (4-h) con dosi crescenti di eroina: 0.025 mg/kg (16^o-22^o sessione), 0.05 mg/kg (23^o-29^o) e 0.1 mg/kg (30^o-36^o). #: p<0.05 vs Veh; § : p<0.05 vs controparte F344. ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

L'ANOVA a tre vie, applicata al valore medio del consumo di eroina in ciascuna fase sperimentale, ha mostrato un effetto significativo per i fattori *ceppo* (LEW vs F344: $F_{1,18}=5.60$, $p<0.05$), *pretrattamento* (THC vs Veh: $F_{1,18}=5.34$, $p<0.05$), *schedula*

($F_{3,54}=248.89$, $p<0.000001$) ed in gran parte delle loro interazioni tra le quali *ceppo x pretrattamento* ($F_{1,18}=5.46$, $p<0.05$).

Il passaggio da *short* (1-h) a *long access* (4-h) ha determinato un incremento significativo del consumo di eroina nei ratti del gruppo LEW-THC, rispetto agli altri gruppi sperimentali, maggiormente evidente alla dose più alta, 0.100 mg/kg (Tukey's post-hoc test, $p<0.05$). Nei gruppi sperimentali del ceppo F344, non è stato osservato alcun aumento significativo dose-dipendente dell'eroina e, anche in questo caso, il pretrattamento non ha determinato differenze comportamentali (figura 26B).

Al termine di questo studio, è stato confermato il ruolo ricoperto dalla pre-esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC nella capacità di indurre modificazioni comportamentali (uso compulsivo e incontrollato) solo in un fenotipo predisposto, caratterizzato da una maggiore vulnerabilità alle sostanze d'abuso, rendendolo maggiormente suscettibile agli effetti gratificanti dell'eroina.

DISCUSSIONE

I risultati del mio studio dimostrano chiaramente che l'esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC determina, in un individuo geneticamente predisposto, l'incremento della vulnerabilità agli effetti gratificanti e alle proprietà di rinforzo dell'eroina, in età adulta, predisponendo ad una eventuale progressione verso l'abuso e la dipendenza da oppiacei.

In letteratura, è stato ipotizzato un legame causale tra l'uso adolescenziale di *Cannabis* e l'incidenza della dipendenza da eroina in età adulta nell'uomo (Kandel, 1975; Fergusson et al., 2002, 2006): infatti, oltre l'80% dei soggetti eroinomani adulti ha dichiarato l'uso pregresso di altre sostanze d'abuso, in prevalenza di marijuana o hashish (Kandel et al., 1986).

Diversi studi longitudinali evidenziano la correlazione tra l'uso di *Cannabis* ed il successivo sviluppo di fenomeni di abuso e di dipendenza da eroina in età adulta, con una maggiore incidenza se i cannabinoidi sono stati assunti durante l'adolescenza, e in particolare se l'età d'inizio al consumo è al di sotto dei 16 anni (Fergusson and Horwood, 2000; Lynskey et al., 2003).

Tuttavia, la teoria che definisce la *Cannabis* come una sostanza "ponte" nello sviluppo di una dipendenza in età adulta, non prende in considerazione la predisposizione individuale come fattore in grado di contribuire all'evoluzione dei disordini comportamentali alla base dell'abuso e della dipendenza. Sebbene il *background* sociale ed economico svolga un ruolo fondamentale, la vulnerabilità individuale agli effetti gratificanti delle sostanze d'abuso potrebbe contribuire con un ruolo di primaria importanza (Kendler et al., 2000; Tsuang et al., 2001; Crabbe et al., 2002; Uhl et al., 2002).

In un contesto storico, nel quale la società di oggi sembra indirizzata a legalizzare l'uso e la detenzione dei prodotti derivati dalla *Cannabis*, risulta necessario studiare quali possono essere i rischi e il ruolo della vulnerabilità individuale agli effetti o alle conseguenze a lungo termine indotte dal consumo del Δ^9 -THC, in una popolazione caratterizzata da individui più o meno predisposti all'abuso di sostanze psicoattive.

L'uso del modello genetico animale di maggiore e minore predisposizione al consumo di sostanze psicotrope generalmente abusate dall'uomo, rappresentato rispettivamente dai ratti del ceppo Lewis (LEW) e del ceppo Fischer F344 (F344), ha consentito, in questo studio, la possibilità di analizzare come l'uso di *Cannabis* in adolescenza possa influenzare il consumo e l'abuso di eroina in età adulta, attraverso il paradigma sperimentale della *Self-Administration* (SA).

Il trattamento con il Δ^9 -THC, avvenuto durante la fase adolescenziale (42°-45° PND), ha indotto l'incremento del comportamento di autosomministrazione di eroina nei ratti LEW e F344, in età adulta, in maniera ceppo-correlata.

Infatti, i risultati ottenuti dimostrano che i ratti del ceppo LEW, trattati in adolescenza con il Δ^9 -THC, hanno acquisito più rapidamente un comportamento operante di SA di eroina rispetto al gruppo di controllo (LEW-Veh) e al ceppo F344. Tale comportamento è stato osservato in tutte le fasi dello studio: l'attività di *nose poking* e il consumo giornaliero di eroina sono stati sempre maggiori nei LEW-THC, sia durante l'utilizzo di protocolli di SA a rapporto fisso (**Exp. I**), utili per la valutazione delle proprietà di rinforzo dell'eroina, durante un comportamento di assunzione controllata, ma soprattutto nei protocolli sperimentali a rapporto progressivo (**Exp. II**), maggiormente efficaci per la valutazione della valenza motivazionale dell'eroina, e nei protocolli a *long access* con dosi crescenti di eroina (**Exp. III**), che hanno permesso di valutare la tendenza all'abuso e l'*escalation* del consumo di farmaco.

Al contrario, nel ceppo F344, l'esposizione precoce al Δ^9 -THC non è stata in grado di indurre alcuna differenza comportamentale rispetto al gruppo di controllo.

L'incremento delle proprietà di rinforzo dell'eroina in età adulta dei ratti LEW-THC è stato evidente in occasione dell'incremento della schedula operativa a FR, con il passaggio da FR-1 a FR-3 e, in seguito, a FR-5, durante il quale il pretrattamento con Δ^9 -THC potrebbe aver indotto delle modificazioni neuroadattative alla base delle differenze comportamentali tra i due gruppi (LEW-THC vs LEW-Veh). Tali modificazioni hanno consentito ai LEW-THC un rapido adattamento alle nuove condizioni sperimentali, inteso come maggiore capacità di risposta al fine di mantenere costante il consumo di eroina a differenza dei ratti LEW-Veh, nei quali l'adattamento alle nuove schedule operative ha richiesto più sessioni comportamentali di SA.

Queste differenze sono state evidenziate ed enfatizzate dal protocollo a rapporto progressivo (PR₃₋₄) (Roberts e Richardson, 1992). Infatti, nella seconda parte di questo studio, il trattamento in adolescenza ha indotto un incremento del valore motivazionale dell'eroina, nel ratto adulto, come osservato dalla crescita esponenziale del comportamento di SA di eroina, registrato nel corso della PR₃₋₄, nei ratti LEW-THC e, in particolare, dal raggiungimento di elevati valori di *breaking point*, statisticamente maggiori rispetto a quelli raggiunti dal gruppo di controllo e dai gruppi del ceppo F344. Viceversa, la somministrazione adolescenziale di cannabinoidi nel ceppo F344 non ha determinato

alcuna variazione comportamentale, dimostrando l'importanza della vulnerabilità individuale alle proprietà gratificanti dell'eroina e come fattore predisponente all'uso di sostanze d'abuso.

Le schedule operative a FR sono facilmente acquisite dagli animali da esperimento e rappresentano un utile strumento per determinare qualitativamente il potenziale d'abuso di un farmaco, simulandone un comportamento di uso controllato, ma non consentono di quantificare le effettive proprietà di rinforzo delle sostanze d'abuso. Le proprietà di rinforzo sono definite tali in virtù della capacità di incrementare la probabilità di indurre una determinata risposta (Arnold and Roberts, 1997). I protocolli a PR misurano il valore motivazionale, oltre alle proprietà rinforzo delle sostanze d'abuso, poiché, a causa dell'aumento esponenziale del requisito da soddisfare attraverso una risposta stimolo-contingente, inducono nell'animale da esperimento un comportamento motivato guidato dalla sola valenza dello stimolo (Richardson and Roberts, 1996). Da qui, si definisce il "punto di rottura" (*breaking point*) come la risposta massimale indice del valore motivazionale che il farmaco rappresenta per l'animale (Hodos, 1961).

In accordo con Roberts and Richardson (1992), il protocollo operativo PR₃₋₄, si è dimostrato un valido modello per valutare l'efficacia del rinforzo e lo studio delle proprietà motivazionali degli oppiacei (Stafford et al., 1998), nonostante la letteratura sia stato ritenuto inadatto per studiare il comportamento di autosomministrazione di oppiacei da parte dei ratti Lewis e Fischer F344 a causa della sua eccessiva rigidità (Arnold and Roberts, 1997; Grasing et al., 2003).

La terza parte di questo studio, attraverso l'utilizzo di un protocollo di esposizione prolungata al farmaco, fornisce un'ulteriore evidenza circa il ruolo del consumo di *Cannabis* in età adolescenziale sugli effetti a carico dei circuiti di gratificazione nell'adulto, sottolineando l'importanza della predisposizione individuale, nella formazione di un fenotipo particolarmente vulnerabile al potenziale d'abuso dell'eroina. Infatti, sebbene in tutti i gruppi sperimentali sia stato acquisito il comportamento operante di SA di eroina (FR-1, 1-h, dose 0,025 mg/kg), il passaggio da sessioni brevi (1-h, *short access*) a quelle prolungate (4-h, *long access*) ha determinato un incremento dell'attività *nose poking* risposta-contingente nel gruppo LEW-THC, significativamente maggiore rispetto ai controlli (LEW-Veh) e al ceppo F344, a tutte le dosi utilizzate (0.025, 0.500 e 0.100 mg/kg, 48µL/bolo d'infusione). Il dato più importante è rappresentato dall'*escalation* dei consumi di eroina osservato solo nei ratti del ceppo LEW-THC alla dose più alta (0.100

mg/kg). È stato osservato che solo i ratti del ceppo LEW, durante un protocollo di esposizione prolungata, incrementano il consumo di eroina preferendo la SA di dosi di eroina maggiormente concentrate (Picetti et al., 2012). Viceversa i ratti F344 preferiscono dosi meno concentrate di eroina e mostrano una riduzione dell'attività comportamentale dose-dipendente. In accordo con questo studio, i LEW si dimostrano il ceppo maggiormente suscettibile all'*escalation* del consumo di oppiacei, probabilmente a causa delle differenze dei sistemi neurotrasmettitoriali implicati nella percezione della gratificazione degli oppiacei, intrinseche ai LEW e F344 (Picetti et al., 2010, 2012). Nonostante questo, la somministrazione di Δ^9 -THC contribuisce a rendere maggiormente vulnerabile un genotipo predisposto all'abuso di eroina, come dimostrato dall'analisi dose-risposta dell'attività di *nose poking* e del consumo di eroina.

La fase di estinzione, che ha caratterizzato l'ultima fase del protocollo di SA nei tre esperimenti di questo studio, è stata eseguita sostituendo la soluzione di eroina con soluzione salina sterile (**Exp. I e III**), o in assenza di infusione di farmaci e segnali visivi al farmaco condizionata sotto programma (**Exp. II**). L'estinzione ha determinato la riduzione dell'attività di *nose poking* in tutti i gruppi sperimentali, confermando che l'attività comportamentale osservata è stata indotta e motivata dalla gratificazione relativa all'iniezione di eroina e non da un comportamento abituale dell'animale.

Le sessioni di *Reinstatement* (da *cues* e da *priming*) hanno confermato che l'esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC ha contribuito a rendere maggiormente vulnerabile, sia alle proprietà gratificanti dell'eroina sia agli stimoli predittivi della sostanza stessa, i ratti del ceppo LEW. Infatti, la riproposizione degli stimoli visivi condizionati all'eroina ha indotto una maggiore attività comportamentale (*nose poking* e *breaking point*) nei ratti LEW-THC rispetto agli altri gruppi sperimentali. Tuttavia il *priming* di eroina è stato maggiormente efficace provocando un aumento dell'attività comportamentale di ricerca dell'eroina in particolare nei gruppi sperimentali pretrattati con il Δ^9 -THC, confermando che, nel ceppo geneticamente predisposto (LEW), il pretrattamento induce una maggiore vulnerabilità agli effetti della ricaduta (**Exp. I e II**).

Questi risultati indicano chiaramente che il consumo adolescenziale di *Cannabis*, nei soggetti caratterizzati da un genotipo predisposto, induce delle modificazioni a lungo termine in grado di condizionare il comportamento motivato di ricerca (*seeking*), e di consumo di eroina in età adulta a causa del potenziamento della vulnerabilità intrinseca

agli effetti gratificanti delle sostanze d'abuso e non ad una relazione causale con i fattori ambientali.

In accordo quanto riportato in letteratura, questi dati confermano il trattamento adolescenziale con il principale componente psicoattivo della *Cannabis*, il Δ^9 -THC, influenza le proprietà gratificanti dell'eroina in età adulta (Solinas et al., 2004; Ellgren et al., 2007). Questo effetto potrebbe essere spiegato dalle possibili modificazioni indotte dal Δ^9 -THC che si traducono in un incremento della trasmissione DAergica mesolimbica, a livello della shell e del core del Nucleus Accumbens (NAc), in maniera ceppo-correlata. In seguito alla somministrazione di eroina, si osserva un potenziamento del rilascio di DA nella shell dei ratti LEW, trattati in adolescenza con il Δ^9 -THC, ma non in quella dei F344 (Cadoni et al., 2015). In questo modo, considerata l'implicazione della shell nella percezione della ricompensa associata agli stimoli gratificanti e nell'apprendimento incentivo, è possibile spiegare la maggiore capacità di acquisizione, il maggior consumo e la velocità di adattamento che caratterizza i ratti LEW-THC, sottoposti a protocolli di SA a rapporto progressivo, rispetto al gruppo di controllo e ai ratti del ceppo F344 (Di Chiara, 2002; Bassareo and Di Chiara 2007).

Tuttavia gli studi riportati in letteratura affermano che la pre-esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC induce solamente l'incremento dell'aspetto edonico, e non quello motivazionale del *seeking* dell'eroina (Solinas et al., 2004).

In realtà, i risultati ottenuti in questo studio dimostrano chiaramente che la somministrazione di Δ^9 -THC in adolescenza, in un ceppo maggiormente predisposto alla SA di eroina, determina un incremento delle proprietà di rinforzo e del valore motivazionale dell'eroina in età adulta, come dimostrato dall'incremento esponenziale dell'attività di *nose poking* registrata nei ratti LEW-THC, non riscontrata negli altri gruppi sperimentali, e il raggiungimento di elevati valori di BP incrementati continuamente nel corso di ogni sessione giornaliera condotta in PR₃₋₄. Tuttavia, le discrepanze di questi risultati possono essere spiegate prendendo in considerazione il ceppo (Ellgren et al., 2007) e l'età di trattamento con i cannabinoidi (Solinas et al., 2004) dei ratti utilizzati nei differenti studi (Chen et al., 1991; Deiana et al., 2007). Infatti, nello studio di Solinas *et al.*, (2004) il trattamento adolescenziale su animali *outbred*, come i ratti Sprague-Dawley, non ha permesso di evidenziare alcuna differenza presumibilmente a causa dell'elevata variabilità genetica che caratterizza la popolazione di questo ceppo. Sulla base delle differenze osservate nel proprio studio, Deiana *et al.*, (2007) afferma che le differenze del

genotipo che caratterizzano ogni ceppo di ratto potrebbero essere un fattore discriminante nella maggiore o minore acquisizione di un comportamento di SA delle sostanze psicotrope tipicamente abusate dall'uomo.

L'uso di un modello genetico di vulnerabilità alle sostanze d'abuso, come quello rappresentato dai ratti *inbred* LEW e F344, permette di focalizzare la ricerca in una popolazione di animali caratterizzata da un genotipo omogeneo, studiando le possibili modificazioni indotte dal consumo di sostanze d'abuso e il comportamento di autosomministrazione sulla base delle caratteristiche intrinseche di maggiore o minore predisposizione dell'individuo all'abuso di sostanze psicoattive.

Per quanto concerne l'età, è stato dimostrato che la somministrazione di cannabinoidi in adolescenza ha un impatto notevolmente differente dalla somministrazione in età adulta: le conseguenze inerenti al deficit cognitivo, la perdita della memoria e l'alterazione dell'emotività, nonché della percezione della gratificazione si osservano solo se il trattamento avviene negli adolescenti ma non negli adulti (Scheinder and Koch, 2003; O'Shea et al., 2004; Realini et al., 2011; Lynskey and Hall, 2000).

La somministrazione di cannabinoidi esogeni determina nell'adolescente l'interferenza con i normali processi di maturazione cerebrale, in particolare delle aree corticali (PFCX), determinando la disregolazione della trasmissione GABAergica e glutammatergica, attraverso l'azione sui recettori CB1, innescando il rilascio di glutammato nelle aree corticali causa di un effetto eccitotossico (Bossong and Niesink, 2010).

In questo modo, la somministrazione di *Cannabis* in adolescenza, interferendo con i normali processi di maturazione della PFCX, è la causa dei deficit cognitivi e comportamentali che possono essere alla base dell'insorgenza di patologie comportamentali e disturbi psicotici in età adulta.

I dati ottenuti in questo studio sono in linea con la caratterizzazione del modello di maggiore (LEW) e minore (F344) sensibilità all'autosomministrazione delle sostanze tipicamente abusate nell'uomo (Martin et al., 1999, 2003; Sanchez-Cardoso et al., 2007, 2009; Picetti et al., 2010, 2012; Suzuki et al., 1988; Kosten et al., 1997, 2007; Brower et al., 2002). Il consumo di eroina è stato maggiore per i ratti del ceppo LEW in tutte le fasi dello studio rispetto ai F344, in particolare quando sono stati ai protocolli più rigidi (PR₃₋₄, **Exp. II**) e alla dosi maggiori (0.500 e 0.100 mg/kg, **Exp. III**).

Le differenze esistenti, ampiamente dimostrate, tra i due fenotipi nei diversi sistemi neurotrasmettitoriali (il sistema DAergico, la trasmissione glutammatergica, i sistemi degli

oppioidi e degli endocannabinoidi) sono alla base delle differenze nel comportamento di acquisizione dei protocolli di SA e del maggior consumo di eroina registrato tra i due ceppi (Beiner-Johnson et al., 1991; Guitart et al., 1993; Strecker et al., 1995; Flores et al., 1998; Haile et al., 2001; Cadoni and Di Chiara, 2007; Cadoni et al., 2009).

Nei ratti LEW, il sistema degli oppioidi endogeni, caratterizzato da livelli basali mRNA per le encefaline, nello striato e nel NAc inferiori a quelle misurate nei F344, va incontro, in seguito a SA di oppiacei ad un fenomeno di *down regulation* strutturale (legame al recettore o espressione del gene PENK) e funzionale (Martin et al., 199; Sanchez-Cardoso et al. 2007, 2009).

La sottoregolazione del sistema degli oppioidi endogeni associata ad una maggiore responsività del sistema DAergico nella shell del NAc in seguito alla somministrazione di sostanze d'abuso (Cadoni and Di Chiara, 2007), caratterizzano il ceppo LEW come fenotipo maggiormente vulnerabile alle proprietà di rinforzo dell'eroina come dimostrato dalla differenza comportamentale osservata in questo studio (Duvauchelle et al., 1996; Gerrits et al., 2003).

La differente regolazione del tono degli oppioidi endogeni può essere considerata alla base dell'elevato quantitativo di eroina autosomministrata dai ratti LEW. Recentemente, è stato dimostrato che i ratti del ceppo LEW sono in grado, sottoposti a protocolli di esposizione prolungata all'eroina, di scegliere la dose più concentrata di farmaco qualora ci fosse la possibilità di scelta (Picetti et al., 2012). In accordo con questo studio, la somministrazione adolescenziale di *Cannabis* ha, di fatto, incrementato la vulnerabilità di un fenotipo di *per se* suscettibile alle proprietà di rinforzo dell'eroina come dimostrato dall'*escalation* dell'*intake* di eroina osservato nei LEW-THC.

A tal proposito, dalla letteratura si evince che l'uso adolescenziale di Δ^9 -THC è in grado di alterare il normale sviluppo di alcune aree cerebrali, in particolare quelle del NAc relative alla percezione degli effetti gratificanti (Ellgren et al., 2008), predisponendo l'individuo allo sviluppo di psicosi e schizofrenia (Fergusson et al., 2003; Fernandez-Espejo et al., 2009; Anglin et al., 2012; Chadwick et al., 2013) e alla possibilità di usare altre sostanze illecite (Fergusson and Horwood, 2000; Lynskey et al., 2003; Agrawal et al., 2004).

In seguito a studi di SA, è stato osservato che l'esposizione adolescenziale al Δ^9 -THC determina l'incremento dell'espressione dell'mRNA delle proencefaline (PENK) nel NAc, l'aumento dell'espressione dei recettori μ nell'area ventrale del tegmento (VTA), come possibili substrati molecolari della maggiore sensibilità agli oppiacei in età adulta (Ellgren

et al., 2008). Recentemente, è stato osservato che il Δ^9 -THC, somministrato in adolescenza causa l'*up regulation* dell'mRNA delle proencefaline attraverso la riduzione della metilazione di H3-lysine9 (H3K9), inducendo una modificazione a lungo termine in grado di alterare la produzione di PENK in età adulta (Tomasiewicz et al., 2012).

In accordo con questi autori, le differenze comportamentali indotte dal trattamento con il Δ^9 -THC in adolescenza osservate nel corso di questo studio potrebbero essere dovute all'incremento della suscettibilità alle proprietà di rinforzo dell'eroina causate da una modificazione epigenetica alla base della disregolazione del tono del sistema degli oppioidi endogeni (Spano et al., 2007; Ellgren et al., 2008; Tomasiewicz et al., 2012).

In conclusione, l'esposizione adolescenziale alla *Cannabis*, in soggetti geneticamente vulnerabili (rappresentati dal ceppo LEW), facilita l'abuso e la possibile progressione verso la dipendenza da oppiacei, influenzando la suscettibilità alle proprietà gratificanti e incrementando il valore motivazionale dell'eroina. Tuttavia, se il soggetto non è geneticamente predisposto (il caso del ceppo F344), nessun effetto sulla vulnerabilità individuale viene indotto dal trattamento in adolescenza con il Δ^9 -THC.

L'esposizione alla *Cannabis*, in un modello animale di maggiore (LEW) e minore (F344) propensione alla SA sottoposto a un protocollo di esposizione prolungata comporta, nell'individuo geneticamente vulnerabile, può indurre le alterazioni comportamentali relative ad abuso e/o uso compulsivo e di dipendenza.

Il ceppo LEW rappresenta il genotipo più sensibile agli effetti delle sostanze d'abuso e, in accordo con l'effetto *Gateway*, il *background* genetico risulta un fattore cruciale nel passaggio dall'uso ricreazionale di "droghe leggere" all'uso compulsivo di "droghe pesanti".

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio non si limitano a validare la teoria della *Gateway Hypothesis* (Kandel, 1975) ma pongono la vulnerabilità genetica individuale come fattore determinante nello sviluppo, in seguito all'uso di *Cannabis* in età adolescenziale, di una dipendenza da eroina in età adulta.

Nel mio studio l'impiego di un modello animale dotato di maggiore (ratti LEW) e minore (ratti F344) suscettibilità agli effetti psicotropi delle sostanze d'abuso, ha permesso di eseguire un importante studio pre-clinico che, attraverso lo studio delle differenze comportamentali osservate nel corso degli esperimenti, ha stabilito l'importanza del fattore genetico nella predisposizione individuale all'abuso di eroina.

La ricerca farmacologica, attraverso la possibilità di riprodurre in un modello animale le fasi e i comportamenti di uso continuato e abuso, risulta necessaria al fine di comprendere i meccanismi e le modificazioni neuronali, alla base della vulnerabilità alle sostanze psicotrope e alla dipendenza nell'uomo.

Le evidenze cliniche ed epidemiologiche circa la relazione causale tra la *Cannabis* usata in adolescenza e la dipendenza da eroina in età adulta trovano fondamento in considerazione del *background* genetico e della capacità del Δ^9 -THC di determinare modificazioni a lungo termine predisponenti all'abuso e alla dipendenza da eroina sulla base della vulnerabilità individuale.

BIBLIOGRAFIA

- Adriani W, Macri S, Pacifici R, Laviola G (2002). Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology*. 27(2):212-24.
- Adriani W, Deroche-Gamonet V, Le Moal M, Laviola G, Piazza PV (2006). Preexposure during or following adolescence differently affects nicotine-rewarding properties in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 184(3-4):382-90.
- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Arlington, VA: *American Psychiatric Publishing*.
- Agrawal A, Neale MC, Prescott CA, Kendler KS (2004). A twin study of early cannabis use and subsequent use and abuse/dependence of other illicit drugs. *Psychol Med*. 34(7):1227-37.
- Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S (1998). Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend*. 51(1-2):127-40.
- Ameri A (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*. 58(4):315-48.
- Anglin DM, Corcoran CM, Brown AS, Chen H, Lighty Q, Brook JS, Cohen PR (2012). Early cannabis use and schizotypal personality disorder symptoms from adolescence to middle adulthood. *Schizophr Res*. 137(1-3):45-9.
- Arnett J, Balle-Jensen L (1993). Cultural bases of risk behavior: Danish adolescents. *Child Dev*. 64(6):1842-55.
- Arnett J (1996). Sensation seeking, aggressiveness, and adolescent reckless behavior. *Journal of Personality and Individual Differences*. 20: 693–702.
- Arseneault L, Cannon M, Poulton R, Murray R, Caspi A, Moffitt TE (2002). Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ*. 23;325(7374):1212-3.
- Ashtari M, Avants B, Cyckowski L, Cervellione KL, Roofeh D, Cook P, Gee J, Sevy S, Kumra S (2011). Medial temporal structures and memory functions in adolescents with heavy cannabis use. *J Psychiatr Res*. 45(8):1055-66.
- Bassareo V, Di Chiara G (1997). Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci*. 17(2):851-61.
- Batalla A, Bhattacharyya S, Yücel M, Fusar-Poli P, Crippa JA, Nogué S, Torrens M, Pujol J, Farré M, Martin-Santos R (2013). Structural and functional imaging studies in chronic cannabis users: a systematic review of adolescent and adult findings. *PLoS One*. 8(2):e55821.
- Beitner-Johnson D, Guitart X, Nestler EJ (1991). Dopaminergic brain reward regions of Lewis and Fischer rats display different levels of tyrosine hydroxylase and other morphine- and cocaine-regulated phosphoproteins. *Brain Res*. 561(1):147-50.
- Bisogno T, Katayama K, Melck D, Ueda N, De Petrocellis L, Yamamoto S, Di Marzo V (1998). Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells--implications for cell proliferation and differentiation. *Eur J Biochem*. 254(3):634-42.
- Bodnar RJ (2014). Endogenous opiates and behavior: 2014. *Peptides*. 75:18-70.
- Bosson MG, Niesink RJ (2010). Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia. *Prog Neurobiol*. 92(3):370-85.
- Brower VG, Fu Y, Matta SG, Sharp BM (2002). Rat strain differences in nicotine self-administration using an unlimited access paradigm. *Brain Res*. 15;930(1-2):12-20.
- Budney AJ, Hughes JR (2006). The cannabis withdrawal syndrome. *Curr Opin Psychiatry*. 19(3):233-8.
- Busquets-Garcia A, Puighermanal E, Pastor A, de la Torre R, Maldonado R, Ozaita A (2011). Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry*. 70(5):479-86.
- Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D (1997). Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci*. 17(4):1226-42.

- Cadoni C, Pisanu A, Solinas M, Acquas E, Di Chiara G (2001). Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl)*. 158(3):259-66.
- Cadoni C, Di Chiara G (2007). Differences in dopamine responsiveness to drugs of abuse in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. *J Neurochem*. 103(2):487-99.
- Cadoni C, Muto T, Di Chiara G (2009). Nicotine differentially affects dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. *Neuropharmacology*. 57(5-6):496-501.
- Cadoni C, Simola N, Espa E, Fenu S, Di Chiara G (2015). Strain dependence of adolescent Cannabis influence on heroin reward and mesolimbic dopamine transmission in adult Lewis and Fischer 344 rats. *Addict Biol*. 20(1):132-42.
- Camp DM, Browman KE, Robinson TE (1994). The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in the ventral striatum of Lewis versus Fischer 344 rats. *Brain Res*. 668(1-2):180-93.
- Casey BJ, Jones RM (2010). Neurobiology of the adolescent brain and behavior: implications for substance use disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 49(12):1189-201.
- Chadwick B, Miller ML, Hurd YL (2013). Cannabis Use during Adolescent Development: Susceptibility to Psychiatric Illness. *Front Psychiatry*. 4:129.
- Chambers RA, Potenza MN (2003). Neurodevelopment, impulsivity, and adolescent gambling. *J Gambl Stud*. 19(1):53-84.
- Chang KJ, Cuatrecasas P (1979). Multiple opiate receptors. Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *J Biol Chem*. 254(8):2610-8.
- Chen JP, 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. *Neurosci Lett*. 129(1):136-80.
- Childers SR, Fleming LM, Selley DE, McNutt RW, Chang KJ (1993). BW373U86: a nonpeptidic delta-opioid agonist with novel receptor-G protein-mediated actions in rat brain membranes and neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol*. 44(4):827-34.
- Clark DB, Kirisci L, Tarter RE (1998). Adolescent versus adult onset and the development of substance use disorders in males. *Drug Alcohol Depend*. 49(2):115-21.
- Compton DR, Prescott WR Jr, Martin BR, Siegel C, Gordon PM, Razdan RK (1991). Synthesis and pharmacological evaluation of ether and related analogues of delta 8-, delta 9-, and delta 9,11-tetrahydrocannabinol. *J Med Chem*. 34(11):3310-6.
- Condie R, Herring A, Koh WS, Lee M, Kaminski NE (1996). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2. *J Biol Chem*. 271(22):13175-83.
- Coria SM, Roura-Martínez D, Ucha M, Assis MA, Miguéns M, García-Lecumberri C, Higuera-Matas A, Ambrosio E (2014). Strain differences in the expression of endocannabinoid genes and in cannabinoid receptor binding in the brain of Lewis and Fischer 344 rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 53:15-22.
- Crabbe JC (2002). Genetic contributions to addiction. *Annu Rev Psychol*. 53:435-62.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 384(6604):83-7.
- Crews F, He J, Hodge C (2007). Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav*. 86(2):189-99.
- Dahl RE (2004). Adolescent development and the regulation of behavior and emotion: introduction to part VIII. *Ann N Y Acad Sci*. 1021:294-5.
- Deiana S, Fattore L, Spano MS, Cossu G, Porcu E, Fadda P, Fratta W (2007). Strain and schedule-dependent differences in the acquisition, maintenance and extinction of intravenous cannabinoid self-administration in rats. *Neuropharmacology*. 52(2):646-54.

- Deroche V, Piazza PV, Casolini P, Maccari S, Le Moal M, Simon H (1992). Stress-induced sensitization to amphetamine and morphine psychomotor effects depend on stress-induced corticosterone secretion. *Brain Res.* 598(1-2):343-8.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258(5090):1946-9.
- Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL (1993). Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin levels--a comparison between Sprague-Dawley, Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res.* 616(1-2):89-98.
- Di Chiara G, Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(14):5274-8.
- Di Chiara G, Carboni E, Morelli M, Cozzolino A, Tanda GL, Pinna A, Russi G, Conso S (1993). Stimulation of dopamine transmission in the dorsal caudate nucleus by pargyline as demonstrated by dopamine and acetylcholine microdialysis and Fos immunohistochemistry. *Neuroscience.* 55(2):451-6.
- Di Chiara G (1998). A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J. Psychopharmacol.* 12(1):54-67.
- Di Chiara G (1999). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur. J. Pharmacol.* 30; 375(1-3):13-30.
- Di Chiara G., (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav. Brain Res.* 2;137(1-2):75-114.
- Di Chiara G, Bassareo V (2007). Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol.* 7(1):69-76.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L(2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 3(9):771-84.
- Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2010). Motivational systems in adolescence: possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain Cogn.* 72(1):114-23.
- Downer EJ, Campbell VA (2010). Phytocannabinoids, CNS cells and development: a dead issue? *Drug Alcohol Rev.* 29(1):91-8.
- Drakenberg K, Nikoshkov A, Horváth MC, Fagergren P, Gharibyan A, Saarelainen K, Rahman S, Nylander I, Bakalkin G, Rajs J, Keller E, Hurd YL (2006). Mu opioid receptor A118G polymorphism in association with striatal opioid neuropeptide gene expression in heroin abusers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(20):7883-8.
- Duvauchelle CL, Fleming SM, Kornetsky C (1996). Involvement of delta- and mu-opioid receptors in the potentiation of brain-stimulation reward. *Eur J Pharmacol.* 316(2-3):137-43.
- Ehrenreich H, Rinn T, Kunert HJ, Moeller MR, Poser W, Schilling L, Gigerenzer G, Hoehe MR (1999). Specific attentional dysfunction in adults following early start of cannabis use. *Psychopharmacology (Berl).* 142(3):295-301.
- Ellgren M, Spano SM, Hurd YL (2007). Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology.* 32(3):607-15.
- Ellgren M, Artmann A, Tkalych O, Gupta A, Hansen HS, Hansen SH, Devi LA, Hurd YL (2008). Dynamic changes of the endogenous cannabinoid and opioid mesocorticolimbic systems during adolescence: THC effects. *Eur Neuropsychopharmacol.* 18(11):826-34.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. European Drug Report 2014: Trends and Developments. Lisbon. May 2014
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. European Drug Report 2013: Trends and Developments. Lisbon. May 2013

- Fenu S, Spina L, Rivas E, Longoni R, Di Chiara G (2006). Morphine-conditioned single-trial place preference: role of nucleus accumbens shell dopamine receptors in acquisition, but not expression. *Psychopharmacology (Berl)*. 187(2):143-53.
- Fergusson DM, Horwood LJ (2000). Cannabis use and dependence in a New Zealand birth cohort. *N Z Med J*. 113(1109):156-8.
- Fergusson DM, Horwood LJ, Swain-Campbell N (2002). Cannabis use and psychosocial adjustment in adolescence and young adulthood. *Addiction*. 97(9):1123-35.
- Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ (2006). Cannabis use and other illicit drug use: testing the cannabis gateway hypothesis. *Addiction*. 101(4):556-69.
- Fernandez-Espejo E, Viveros MP, Núñez L, Ellenbroek BA, Rodriguez de Fonseca F (2009). Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 206(4):531-49.
- Flores G, Wood GK, Barbeau D, Quirion R, Srivastava LK (1998). Lewis and Fischer rats: a comparison of dopamine transporter and receptors levels. *Brain Res*. 814(1-2):34-40.
- Forbes EE, Dahl RE (2010). Pubertal development and behavior: hormonal activation of social and motivational tendencies. *Brain Cogn*. 72(1):66-72.
- French ED (1997). delta9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. *Neurosci Lett*. 226(3):159-62.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1954). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86:1646-1647
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 232(1):54-61.
- García-Lecumberri C, Torres I, Martín S, Crespo JA, Miguéns M, Nicanor C, Higuera-Matas A, Ambrosio E (2011). Strain differences in the dose-response relationship for morphine self-administration and impulsive choice between Lewis and Fischer 344 rats. *J Psychopharmacol*. 25(6):783-91.
- Gardner EL (2000). What we have learned about addiction from animal models of drug self-administration. *Am J Addict*. 9(4):285-313.
- Geier C, Luna B (2009). The maturation of incentive processing and cognitive control. *Pharmacol Biochem Behav*. 93 (3), 212-221.
- Gerrits MA, Lesscher HB, van Ree JM (2003). Drug dependence and the endogenous opioid system. *Eur europsychopharmacol*. 13:424-34.
- Galve-Roperh I, Palazuelos J, Aguado T, Guzmán M (2009). The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 259(7):371-82.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 1071(1):10-23.
- Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*. 57(5):1045-50.
- Grasing K, Li N, He S, Parrish C, Delich J, Glowa J (2003). A new progressive ratio schedule for support of morphine self-administration in opiate dependent rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 168:387-96.
- Griffin G, Tao Q, Abood ME (2000). Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 292(3):886-94.
- Guitart X, Beitner-Johnson D, Marby DW, Kosten TA, Nestler EJ (1992). Fischer and Lewis rat strains differ in basal levels of neurofilament proteins and their regulation by chronic morphine in the mesolimbic dopamine system. *Synapse*. 12(3):242-53.
- Guitart X, Kogan JH, Berhow M, Terwilliger RZ, Aghajanian GK, Nestler EJ (1993). Lewis and Fischer rat strains display differences in biochemical, electrophysiological and behavioral parameters: studies

- in the nucleus accumbens and locus coeruleus of drug naive and morphine-treated animals. *Brain Res.* 611:7-17.
- Guzmán M (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* 3(10):745-55.
- Hall W, Degenhardt L (2009). Adverse health effects of non-medical cannabis use. *Lancet.* 374(9698):1383-91.
- Haile CN, Hiroi N, Nestler EJ, Kosten TA (2001). Differential behavioral responses to cocaine are associated with dynamics of mesolimbic dopamine proteins in Lewis and Fischer 344 rats. *Synapse.* 41:179-90.
- Hamilton KR, Potenza MN, Grunberg NE (2014). Lewis rats have greater response impulsivity than Fischer rats. *Addict Behav.* 39(11):1565-72.
- Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J (2008). Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol.* 286(1-2 Suppl 1):S84-90.
- Hayatbakhsh MR, McGee TR, Bor W, Najman JM, Jamrozik K, Mamun AA (2008). Child and adolescent externalizing behavior and cannabis use disorders in early adulthood: an Australian prospective birth cohort study. *Addict Behav.* 33(3):422-38.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience.* 41(1):89-125.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(5):1932-6;
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* 11(2):563-83.
- Higuera-Matas A, Soto-Montenegro ML, del Olmo N, Miguéns M, Torres I, Vaquero JJ, Sánchez J, García-Lecumberri C, Desco M, Ambrosio E (2008). Augmented acquisition of cocaine self-administration and altered brain glucose metabolism in adult female but not male rats exposed to a cannabinoid agonist during adolescence. *Neuropsychopharmacol.* 33(4):806-13.
- Higuera-Matas A, Botreau F, Del Olmo N, Miguéns M, Olías O, Montoya GL, García-Lecumberri C, Ambrosio E (2010). Periadolescent exposure to cannabinoids alters the striatal and hippocampal dopaminergic system in the adult rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol.* 20(12):895-906.
- Hodos W (1961). Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science.* 134(3483):943-4.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54(2):161-202.
- Hughes J (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88(2):295-308.
- Huskinson SL, Krebs CA, Anderson KG (2012). Strain differences in delay discounting between Lewis and Fischer 344 rats at baseline and following acute and chronic administration of d-amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 101(3):403-16.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol.* 118(8):2023-8.
- Jacobus J, Goldenberg D, Wierenga CE, Tolentino NJ, Liu TT, Tapert SF (2012). Altered cerebral blood flow and neurocognitive correlates in adolescent cannabis users. *Psychopharmacology (Berl).* 222(4):675-84.
- Johnson SW, North RA (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci.* 12(2):483-8.
- Justinova Z, Panlilio LV, Goldberg SR (2009). Drug addiction. *Curr Top Behav Neurosci.* 1:309-46.
- Kandel D (1975). Stages in adolescent involvement in drug use. *Science.* 190:912-4.

- Kandel D, Davies M, Karus D, Yamaguchi K (1986). The consequences in young adulthood of adolescent drug involvement. An overview. *Arch Gen Psychiatry*. 43:746-54.
- Kandel DB, Yamaguchi K, Chen K (1992). Stages of progression in drug involvement from adolescence to adulthood: further evidence for the gateway theory. *J Stud Alcohol*. 53(5):447-57.
- Kandel D (2002). Drug policies: improving the quality of the relevant debate. *Addiction*. 97(6):655-7.
- Kandel D (2003). Does marijuana use cause the use of other drugs? *JAMA*. 289:482-3.
- Kandel D, Yamaguchi K, Klein LC (2006). Testing the Gateway Hypothesis. *Addiction*. 101:470-2; 474-6.
- Kendler KS, Karkowski LM, Neale MC, Prescott CA (2000). Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry*. 57:261-9.
- Kendler KS, Prescott CA, Myers J, Neale MC (2003). The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. *Arch Gen Psychiatry*. 60:929-37.
- Kieffer BL (1995). Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell Mol Neurobiol*. 15(6):615-35.
- Koob GF (2010). The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Res*. 1314:3-14.
- Koob GF, Volkow ND (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 35(1):217-38. Erratum in: *Neuropsychopharmacology*. 35(4):1051.
- Kosten TA, Miserendino MJ, Chi S, Nestler EJ (1994). Fischer and Lewis rat strains show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion. *J Pharmacol Exp Ther*. 269(1):137-44.
- Kosten TA, Miserendino MJ, Haile CN, DeCaprio JL, Jatlow PI, Nestler EJ (1997). Acquisition and maintenance of intravenous cocaine self-administration in Lewis and Fischer inbred rat strains. *Brain Res*. 778:418-29.
- Kosten TA, Ambrosio E (2002). HPA axis function and drug addictive behaviors: insights from studies with Lewis and Fischer 344 inbred rats. *Psychoneuroendocrinology*. 27:35-69.
- Kosten TA, Zhang XY, Haile CN (2007). Strain differences in maintenance of cocaine self-administration and their relationship to novelty activity responses. *Behav Neurosci*. 121:380-8.
- Laviola G, Adriani W, Terranova ML, Gerra G (1999). Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci Biobehav Rev*. 23(7):993-1010.
- Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL (2009). Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev*. 89(4):1379-412.
- 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 (Berl)*. 194:103-16.
- Lepore M, Liu X, Savage V, Matalon D, Gardner EL (1996). Genetic differences in delta 9-tetrahydrocannabinol-induced facilitation of brain stimulation reward as measured by a rate-frequency curve-shift electrical brain stimulation paradigm in three different rat strains. *Life Sci*. 58(25):PL365-72.
- Lichtman AH, Martin BR (2005). Cannabinoid tolerance and dependence. *Handb Exp Pharmacol*. 168:691-717.
- Liu JG, Anand KJ (2001). Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev*. 38(1-2):1-19.
- Lopez-Larson MP, Bogorodzki P, Rogowska J, McClade E, King JB, Terry J, Yurgelun-Todd D (2011). Altered prefrontal and insular cortical thickness in adolescent marijuana users. *Behav Brain Res*. 220(1):164-72.

- Lu HC, Mackie K (2015). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry*. S0006-3223(15)00869-0.
- Luk T, Jin W, Zvonok A, Lu D, Lin XZ, Chavkin C, Makriyannis A, Mackie K (2004). Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitizing CB1 cannabinoid receptor agonist. *Br J Pharmacol*. 142(3):495-500.
- Lynskey MT, Heath AC, Bucholz KK, Slutske WS, Madden PA, Nelson EC *et al* (2003). Escalation of drug use in early-onset cannabis users vs co-twin controls. *JAMA*. 289:427-33.
- Lynskey MT, Grant JD, Nelson EC, Bucholz KK, Madden PA, Statham DJ, Martin NG, Heath AC (2006). Duration of cannabis use--a novel phenotype? *Addict Behav*. 31(6):984-94.
- Lynskey M, Hall W (2000). The effects of adolescent cannabis use on educational attainment: a review. *Addiction*. 95(11):1621-30.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*. 15(10):6552-61.
- Mackie K (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. 168:299-325.
- Maher CE, Eisenach JC, Pan HL, Xiao R, Childers SR (2001). Chronic intrathecal morphine administration produces homologous mu receptor/G-protein desensitization specifically in spinal cord. *Brain Res*. 895(1-2):1-8.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*. 29(4):225-32.
- Mansour A, Hoversten MT, Taylor LP, Watson SJ, Akil H (1995). The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Res*. 700(1-2):89-98.
- Markou A, Weiss F, Gold LH, Caine SB, Schulteis G, Koob GF (1993). Animal models of drug craving. *Psychopharmacology (Berl)*. 112(2-3):163-82.
- Martin BN, Compton DR, Thomas BF, Preskott WR, Little PJ (1991). Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav*. 40:471-478
- Martín S, Manzanares J, Corchero J, García-Lecumberri C, Crespo JA, Fuentes JA *et al* (1999). Differential basal proenkephalin gene expression in dorsal striatum and nucleus accumbens, and vulnerability to morphine self-administration in Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res*. 821:350-5.
- Martin CA, Kelly TH, Rayens MK, Brogli BR, Brenzel A, Smith WJ, Omar HA (2002). *Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence*. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 41(12):1495-502;
- Martín S, Lyupina Y, Crespo JA, González B, García-Lecumberri C, Ambrosio E (2003). Genetic differences in NMDA and D1 receptor levels, and operant responding for food and morphine in Lewis and Fischer 344 rats. *Brain Res*. 973:205-13.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346(6284):561-4.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*. 327(4):535-50. P
- McQueeney T, Padula CB, Price J, Medina KL, Logan P, Tapert SF (2011). Gender effects on amygdala morphometry in adolescent marijuana users. *Behav Brain Res*. 224(1):128-34.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, *et al* (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 50(1):83-90.
- Medina KL, Hanson KL, Schweinsburg AD, Cohen-Zion M, Nagel BJ, Tapert SF (2007). Neuropsychological functioning in adolescent marijuana users: subtle deficits detectable after a month of abstinence. *J Int Neuropsychol Soc*. 13(5):807-20.

- Melis M, Pistis M (2012). Hub and switches: endocannabinoid signalling in midbrain dopamine neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367(1607):3276-85.
- Millan EZ, Marchant NJ, McNally GP (2011). Extinction of drug seeking. *Behav Brain Res.* 217:454-62.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365(6441):61-5.
- Nestler EJ (1992). Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci.* 12(7):2439-50.
- Nylander I, Vlaskovska M, Terenius L (1995). Brain dynorphin and enkephalin systems in Fischer and Lewis rats: effects of morphine tolerance and withdrawal. *Brain Res.* 683(1):25-35.
- O'Brien CP, Gardner EL (2005). Critical assessment of how to study addiction and its treatment: human and non-human animal models. *Pharmacol Ther.* 108(1):18-58.
- O'Dell LE (2009). A psychobiological framework of the substrates that mediate nicotine use during adolescence. *Neuropharmacology.* 56 Suppl 1:263-78.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasent L, Uhl GR (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann NY Acad Sci.* 1074:514-36.
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE (2004). Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol.* 18(4):502-8.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 58(3):389-462.
- Pertwee R (1993). The evidence for the existence of cannabinoid receptors. *Gen Pharmacol.* 24(4):811-24.
- Prince van Leeuwen A, Creemers HE, Verhulst FC, Ormel J, Huizink AC (2011). Are adolescents gambling with cannabis use? A longitudinal study of impulsivity measures and adolescent substance use: the TRAILS study. *J Stud Alcohol Drugs.* 72:70-8.
- Picetti R, Ho A, Butelman ER, Kreek MJ (2010). Dose preference and dose escalation in extended-access cocaine self-administration in Fischer and Lewis rats. *Psychopharmacology (Berl).* 211:313-23.
- Picetti R, Caccavo JA, Ho A, Kreek MJ (2012). Dose escalation and dose preference in extended-access heroin self-administration in Lewis and Fischer rats. *Psychopharmacology (Berl).* 220:163-72.
- Piomelli D, Beltramo M, Giuffrida A, Stella N (1998). Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol Dis* 5(6 Pt B):462-73.
- Pistis M, Perra S, Pillolla G, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL (2004). Adolescent exposure to cannabinoids induces long-lasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry.* 56(2):86-94.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995). Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(26):12304-8.
- Realini N, Rubino T, Parolaro D (2009). Neurobiological alterations at adult age triggered by adolescent exposure to cannabinoids. *Pharmacol Res.* 60:132-8.
- Realini N, Vigano' D, Guidali C, Zamberletti E, Rubino T, Parolaro D (2011). Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology.* 60(2-3):235-43.
- Rivera P, Miguéns M, Coria SM, Rubio L, Higuera-Matas A, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, Suárez J, Ambrosio E (2013). Cocaine self-administration differentially modulates the expression of endogenous cannabinoid system-related proteins in the hippocampus of Lewis vs. Fischer 344 rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 16(6):1277-93.
- Roberts DCS, Richardson NR (1992). Self-administration of psychomotor stimulants using progressive ratio schedules of reinforcement. In: Boulton A, Baker G (eds) *Animal models of drug addiction.* Humana Press, New York. 233-269.

- Richardson NR, Roberts DC (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods*. 66(1):1-11.
- Robinson TE, Berridge KC (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*. 18(3):247-91.
- Rodríguez-Arias M, Manzanedo C, Roger-Sánchez C, Do Couto BR, Aguilar MA, Miñarro J (2010). Effect of adolescent exposure to WIN 55212-2 on the acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 34(1):166-71.
- Rubino T, Realini N, Braida D, Guidi S, Capurro V, Viganò D et al (2009). Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus*. 19:763-72.
- Rubino T, Prini P, Piscitelli F, Zamberletti E, Trusel M, Melis M et al (2015). Adolescent exposure to THC in female rats disrupts developmental changes in the prefrontal cortex. *Neurobiol Dis*. 73:60-9.
- Salamone JD, Correa M (2002). Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res*. 137(1-2):3-25.
- Salamone JD, Correa M, Mingote S, Weber SM (2003). Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. *J Pharmacol Exp Ther*. 305(1):1-8.
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration. (2008). Results from the 2007 National Survey on Drug Use and Health: National Findings (Office of Applied Studies, NSDUH Series H-34, DHHS Publication No. SMA 08-4343). Rockville, MD.
- Sánchez-Cardoso P, Higuera-Matas A, Martín S, del Olmo N, Miguéns M, García-Lecumberri C et al (2007). Modulation of the endogenous opioid system after morphine self-administration and during its extinction: a study in Lewis and Fischer 344 rats. *Neuropharmacology*. 52:931-48.
- Sánchez-Cardoso P, Higuera-Matas A, Martín S, Miguéns M, Del Olmo N, García-Lecumberri C et al (2009). Strain differences between Lewis and Fischer 344 rats in the modulation of dopaminergic receptors after morphine self-administration and during extinction. *Neuropharmacology*. 57:8-17.
- Scallet AC (1991). Neurotoxicology of cannabis and THC: a review of chronic exposure studies in animals. *Pharmacol Biochem Behav*. 40(3):671-6.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol*. 142(2):278-87.
- Schenk S (2002). Sensitization as a process underlying the progression of drug use via gateway drugs. In: Kandel DB, ed. *Stages and Pathways of Drug Involvement: Examining the Gateway Hypothesis*, pp. 318–336. New York: Cambridge University Press.
- Schneider M, Koch M (2003). Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology*. 28:1760-9.
- Schultz W (2010). Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav Brain Funct*. 6:24.
- Shaham Y, Stewart J (1994). Exposure to mild stress enhances the reinforcing efficacy of intravenous heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 114(3):523-7.
- Shiflett MW, Balleine BW (2010). At the limbic-motor interface: disconnection of basolateral amygdala from nucleus accumbens core and shell reveals dissociable components of incentive motivation. *Eur J Neurosci*. 32:1735-43.
- Schwartz RH, Gruenewald PJ, Klitzner M, Fedio P (1989). Short-term memory impairment in cannabis-dependent adolescents. *Am J Dis Child*. 143(10):1214-9.
- Slipetz DM, O'Neill GP, Favreau L, Dufresne C, Gallant M, Gareau Y, Guay D, Labelle M, Metters KM (1995). Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol*. 48(2):352-61.

- Solinas M, Panlilio LV, Goldberg SR (2004). Exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) increases subsequent heroin taking but not heroin's reinforcing efficacy: a self-administration study in rats. *Neuropsychopharmacology*. 29:1301-11.
- Solowij N, Yücel M, Respondek C, Whittle S, Lindsay E, Pantelis C, Lubman DI (2011). Cerebellar white-matter changes in cannabis users with and without schizophrenia. *Psychol Med*. 41(11):2349-59.
- Somerville LH, Jones RM, Casey BJ (2010). A time of change: behavioral and neural correlates of adolescent sensitivity to appetitive and aversive environmental cues. *Brain Cogn*. 72(1): 124–133.
- Spano MS, Ellgren M, Wang X, Hurd YL (2007). Prenatal cannabis exposure increases heroin seeking with allostatic changes in limbic enkephalin systems in adulthood. *Biol Psychiatry*. 61(4):554-63.
- Spealman RD, Goldberg SR (1978). Drug self-administration by laboratory animals: control by schedules of reinforcement. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 18:313-39.
- Spear LP (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*. 24:417-63.
- Stafford D, LeSage MG, Glowa JR (1998). Progressive-ratio schedules of drug delivery in the analysis of drug self-administration: a review. *Psychopharmacology (Berl)*. 139:169-84.
- Steinberg L, Albert D, Cauffman E, Banich M, Graham S, Woolard J (2008). Age differences in sensation seeking and impulsivity as indexed by behavior and self-report: evidence for a dual systems model. *Dev Psychol*. 44(6):1764-78.
- Sternberg EM, Young WS 3rd, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold PW, Wilder RL (1989). A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(12):4771-5.
- Stöhr T, Schulte Wermeling D, Weiner I, Feldon J (1998). Rat strain differences in open-field behavior and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 59(4):813-8.
- Strecker RE, Eberle WF, Ashby CR Jr (1995). Extracellular dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens of Fischer and Lewis rats: basal levels and cocaine-induced changes. *Life Sci*. 56:135-41.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 215(1):89-97.
- Suzuki T, George FR, Meisch RA (1988). Differential establishment and maintenance of oral ethanol reinforced behavior in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. *J Pharmacol Exp Ther*. 245:164-70.
- Svízenská I, Dubový P, Sulcová A (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav*. 90(4):501-11.
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*. 276(5321):2048-50.
- Tomasiewicz HC, Jacobs MM, Wilkinson MB, Wilson SP, Nestler EJ, Hurd YL (2012). Proenkephalin mediates the enduring effects of adolescent cannabis exposure associated with adult opiate vulnerability. *Biol Psychiatry*. 72(10):803-10.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 83(2):393-411.
- Tsuang MT, Bar JL, Harley RM, Lyons MJ (2001). The Harvard Twin Study of Substance Abuse: what we have learned. *Harv Rev Psychiatry*. 9:267-79.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 78(1):43-50.

- Tzschentke TM (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.* 12(3-4):227-462.
- Uhl GR, Liu QR, Naiman D (2002). Substance abuse vulnerability loci: converging genome scanning data. *Trends Genet.* 18(8):420-5.
- United Nations Office on Drugs and Crime (2014) World Drug Report 2014. UNODC, Vienna.
- Vanyukov MM, Tarter RE, Kirillova GP, Kirisci L, Reynolds MD, Kreek MJ *et al* (2012). Common liability to addiction and "gateway hypothesis": theoretical, empirical and evolutionary perspective. *Drug Alcohol Depend.* 123 Suppl 1:3-17.
- Verweij KJ, Zietsch BP, Lynskey MT, Medland SE, Neale MC, Martin NG *et al* (2010). Genetic and environmental influences on cannabis use initiation and problematic use: a meta-analysis of twin studies. *Addiction.* 105:417-30.
- Vinson GP, Brennan CH (2013). Addiction and the adrenal cortex. *Endocr Connect.*[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23825159.
- Viveros MP, Llorente R, Suarez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, de Fonseca FR (2012). The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications. *J Psychopharmacol.* 26(1):164-76.
- Wagner MK (2001). Behavioral characteristics related to substance abuse and risk-taking, sensation-seeking, anxiety sensitivity, and self-reinforcement. *Addict Behav.* 26(1):115-20.
- Weissman MM, Wolk S, Wickramaratne P, Goldstein RB, Adams P, Greenwald S, Ryan ND, Dahl RE, Steinberg D (1999). Children with prepubertal-onset major depressive disorder and anxiety grown up. *Arch Gen Psychiatry.* 56(9):794-801.
- Wilson W, Mathew R, Turkington T, Hawk T, Coleman RE, Provenzale J (2000). Brain morphological changes and early marijuana use: a magnetic resonance and positron emission tomography study. *J Addict Dis.* 19(1):1-22.
- Zöllner C, Stein C (2007). Opioids. *Handb Exp Pharmacol.* 177:31-63.
- Zuckerman M, Kuhlman DM (2000). Personality and risk-taking: common biosocial factors. *J Pers.* 68(6):999-1029.