



Università degli Studi di Cagliari

## **DOTTORATO DI RICERCA**

Corso di dottorato in Neuroscienze

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche

**Ciclo XXVI**

### **TITOLO TESI**

**Possibili differenze sesso-specifiche nella vulnerabilità alle sostanze d'abuso in età adulta dopo esposizione al  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo durante l'adolescenza**

BIO/14-FARMACOLOGIA

Presentata da:	Christian Dessì
Coordinatore Dottorato:	Prof. Walter Fratta
Tutor/Relatore:	Prof.ssa Paola Fadda

**Esame finale anno accademico 2012 – 2013**

# Indice

<b>Prefazione</b>	<b>Pag. 4</b>
<b>Introduzione</b>	<b>Pag. 6</b>
La dipendenza dalle Sostanze d'abuso	<b>Pag. 8</b>
Incidenza	<b>Pag. 9</b>
Nicotina e sistema colinergico	<b>Pag. 12</b>
Eroina e sistema oppioide	<b>Pag. 14</b>
Cannabis e sistema endocannabinoide	<b>Pag. 17</b>
La vulnerabilità al consumo e alla dipendenza dalle sostanze d'abuso	<b>Pag. 22</b>
Differenze di genere e influenze ormonali	<b>Pag. 22</b>
Meccanismi neurobiologici della dipendenza da sostanze d'abuso	<b>Pag. 26</b>
La via corticomesolimbica	<b>Pag. 27</b>
Interazioni neuro trasmettitoriali nel circuito della gratificazione	<b>Pag. 31</b>
Modelli sperimentali del comportamento di abuso verso le sostanze	<b>Pag. 34</b>
Gateway Hypothesis	<b>Pag. 37</b>
Adolescenza e sviluppo cerebrale	<b>Pag. 39</b>
Cannabis e adolescenza	<b>Pag. 41</b>
Studi clinici ed epidemiologia	<b>Pag. 43</b>
Evidenze precliniche della teoria del passaggio	<b>Pag. 46</b>
<b>Scopo della ricerca</b>	<b>Pag. 49</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>Pag. 50</b>
Animali	<b>Pag. 50</b>
Sostanze	<b>Pag. 51</b>
Trattamento cronico in adolescenza	<b>Pag. 51</b>
Chirurgia	<b>Pag. 52</b>
Autosomministrazione endovenosa (IVSA)	<b>Pag. 53</b>
a. Apparato	<b>Pag. 53</b>
b. Procedura sperimentale	<b>Pag. 55</b>
c. Acquisizione e mantenimento	<b>Pag. 56</b>
Statistica	<b>Pag. 57</b>
<b>Risultati</b>	<b>Pag. 58</b>
1. Effetto del trattamento cronico in adolescenza sul comportamento di autosomministrazione nei ratti maschi adulti	<b>Pag. 58</b>
a. Autosomministrazione di nicotina	<b>Pag. 58</b>
b. Autosomministrazione di eroina	<b>Pag. 62</b>
c. Autosomministrazione di WIN 55,212-2	<b>Pag. 67</b>
2. Effetto del trattamento cronico in adolescenza sul comportamento di autosomministrazione nei ratti femmina adulti	<b>Pag. 71</b>
a. Autosomministrazione di nicotina	<b>Pag. 71</b>
a. Autosomministrazione di eroina	<b>Pag. 75</b>
b. Autosomministrazione di WIN 55,212-2	<b>Pag. 79</b>

<b>Discussione</b>	<b>Pag. 83</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>Pag. 96</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>Pag. 97</b>

# Prefazione

Le Nazioni Democratiche, pur evidenziando numerose contraddizioni e ipocrisie, investono una parte rilevante dell'intervento sociale e sanitario nelle problematiche derivanti dall'uso, l'abuso e la dipendenza da sostanze stupefacenti e nelle dipendenze comportamentali, cercando di esportare questa lotta per la salute della popolazione e dello stato sociale attraverso politiche nazionali e per mezzo di organizzazioni mondiali.

Sempre più frequentemente comportamenti di abuso e dipendenza che si sviluppano in relazione all'utilizzo di sostanze come eroina, *Cannabis*, nicotina, etc., o in altri ambiti, come quello alimentare, della sessualità o dello svago si originano quotidianamente nella società e sono sempre meno isolati o riconducibili a specifiche categorie di persone, genere ed età. La dipendenza da sostanze sembra generata e sostenuta da diversi fattori, tra i quali la genetica, il sesso, la risposta individuale della persona alla droga nonché da condizionamenti ambientali che, spesso, ne anticipano l'uso nei soggetti più giovani e vulnerabili.

In questi ultimi anni l'ONU, l'Unione Europea e numerosi centri di ricerca internazionali, hanno più volte segnalato la comparsa sul mercato illecito, di nuove sostanze psicoattive (NSP) di origine sintetica con caratteristiche farmacologiche e tossicologiche particolarmente pericolose e la cui assunzione sfugge ai consueti controlli per la carenza di standard analitici di riferimento, di conoscenze tecnico-scientifiche e di rapporti clinici. Numerosi sono i casi di intossicazione riportati dai media e le cronache concernenti le cosiddette droghe da stupro. L'inizio dell'utilizzo delle sostanze psicoattive si sta spostando sempre più verso una popolazione giovane, spesso alle prese con la prima adolescenza, ancora povera di esperienze sociali e nel pieno sviluppo fisico e cerebrale; la relativa semplicità nel reperire queste nuove sostanze da *internet* nel più completo

anonimato e i comportamenti mutati per la tendenza al poliabuso, ovvero all'abuso di più sostanze, determinano spesso la sovrapposizione, con il tempo, alla dipendenza da fumo, all'utilizzo di alcol e alle tradizionali sostanze d'abuso tra cui *Cannabis*, eroina e cocaina. In questo senso assume così ancora più importanza la futura ricerca scientifica nel determinare i meccanismi neurobiologici alla base delle classiche dipendenze da sostanze d'abuso in relazione all'età, al sesso ed all'ambiente. Esemplificativo è considerato il caso della *Cannabis*, spesso veicolata dai media come non pericolosa ed invece in grado di far avvicinare maggiormente gli adolescenti e gli individui più vulnerabili al mondo delle sostanze stupefacenti, un mondo che spesso sconfinava nell'illegalità, oltre che nella compromissione della propria salute e dei rapporti sociali. La *Cannabis* è una delle maggiori sostanze responsabili dell'alterazione delle capacità di apprendimento nei giovani, del calo della motivazione ad affrontare i problemi della vita, anche per il ruolo di "gateway" ovvero nell'agevolare, spesso in associazione con l'alcol, l'accesso precoce e la progressione verso sostanze quali cocaina ed eroina da parte delle persone più vulnerabili.

E' quindi grande e necessario il bisogno di conoscenza, di monitoraggio ma anche di prevenzione e intervento precoce per garantire alle generazioni future una corretta e proficua vita sociale.

# Introduzione

Sebbene in molti paesi i governi stanno o, hanno già legalizzato la marijuana, derivata della *Cannabis*, essa rimane la sostanza illecita più comunemente abusata nel mondo (World Drug Report, 2013) e quasi sempre il suo utilizzo coincide con un target di consumatori molto giovane. Le evidenze epidemiologiche sull'utilizzo di marijuana precedentemente a quello di altre droghe ha rafforzato l'idea a conferma della "*Cannabis gateway hypothesis*" o "teoria del passaggio" in base alla quale l'esposizione precoce alla *Cannabis* aumenterebbe il rischio di passare all'uso di droghe più pesanti, quali eroina, amfetamina e cocaina (Kandel, 1975). Diversi studi hanno dimostrato che coloro che iniziano ad utilizzare la *Cannabis* precocemente hanno una maggiore probabilità di passare dall'uso occasionale al diventare consumatori abituali o sviluppare dipendenza da altre droghe rispetto a coloro che iniziano a fumare marijuana ad una maggiore età (SAMHSA, 2005; Stenbacka et al., 1993; Yamaguchi e Kandel, 1984). Tuttavia, spesso fattori confondenti quali fattori culturali, sociali e morali hanno offuscato la reale portata del problema. L'uso di modelli sperimentali animali aiuta a cercare di eliminare ogni possibile fattore confondente rappresentando, così, la migliore strategia per studiare le possibili basi neurobiologiche per comprendere se l'utilizzo precoce della *Cannabis* determina l'aumentata vulnerabilità all'uso di altre droghe (O'Brien et al., 2005).

Attualmente la maggioranza degli studi sulla dipendenza da sostanze d'abuso sono stati condotti quasi esclusivamente su soggetti maschi nonostante numerosi *report* indichino nel genere femminile una costante ascesa dei tassi di assunzione delle droghe rispetto ai maschi (World Drug Report, 2013). La scarsità di evidenze cliniche specificamente indirizzate alla popolazione femminile costituisce un serio problema in quanto l'inizio del consumo di una droga è scatenato da fattori che possono essere molto differenti tra uomo

e donna, ed anche la stessa dipendenza può svilupparsi in maniera diversa tra i due sessi. Studi recenti condotti sugli animali da laboratorio hanno evidenziato delle importanti differenze sesso-dipendenti nel comportamento d'abuso da sostanze (Carrol et al. 2004; Cicero et al. 2003; Donny et al. 2000; Fattore et al. 2007; Hu et al. 2004; Lynch et al. 2000; Lynch e Carroll 1999; Perkins et al., 1999), in quanto maschi e femmine possono differire per la loro preferenza ad una specifica droga, per la motivazione ad ottenerla, per le quantità di droga assunta, o per la propensione (ricaduta) a riprendere il comportamento d'abuso dopo periodi di astinenza.

L'esistenza di una diretta relazione causale tra l'assunzione di *Cannabis* ed il passaggio all'utilizzo di droghe più pesanti è argomento ampiamente discusso negli ultimi decenni: una possibile causa potrebbe riflettere cambiamenti neurobiologici dovuti alla sua precoce esposizione, che rende l'individuo più vulnerabile agli effetti rinforzanti della stessa *Cannabis* e di altre droghe. A tal proposito, numerose evidenze sperimentali (per una revisione della letteratura vedi Parolaro e Rubino, 2008) hanno suggerito la presenza di significative interazioni funzionali tra il sistema endocannabinoide e quello dopaminergico (Cheer et al., 2007; González et al., 2002), tra il sistema endocannabinoide e quello colinergico-nicotinico (Scherma et al., 2008) e, tra il sistema endocannabinoide e quello oppioide (Fattore et al., 2005). Il sistema endocannabinoide potrebbe infatti svolgere un ruolo primario, o comunque di cooperazione, nell'espressione di comportamenti correlati alla gratificazione da eroina (Fattore et al., 2007) e da nicotina (Castané et al. 2005; Solinas et al. 2007; Valjent et al. 2002).

Considerando il vasto utilizzo di *Cannabis* nel mondo, e l'impatto negativo di questo fenomeno sulla salute pubblica, è particolarmente importante studiare se possibili effetti neurobiologici dovuti all'esposizione alla *Cannabis* durante un periodo di attivo sviluppo cerebrale, come l'adolescenza, possano produrre eventuali differenze sesso-specifiche e

una maggiore vulnerabilità sia nei maschi che nelle femmine, agli effetti rinforzanti dell'eroina e/o della nicotina nell'età adulta.

## La dipendenza dalle sostanze d'abuso

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) già nel 1951 inquadrava la tossicodipendenza in un contesto medico e sociale come: "*Stato di intossicazione periodica prodotta dalle ripetute assunzioni di una sostanza naturale o sintetica con le seguenti caratteristiche: un irresistibile bisogno o desiderio di continuare ad assumere la sostanza e quindi di procurarsela con ogni mezzo; tendenza ad aumentare la dose per tolleranza; dipendenza psichica e dipendenza fisica caratterizzata da sindrome di astinenza; effetti dannosi all'individuo e alla società*".

### **Dipendenza (Tossicodipendenza)**

uso continuativo di una sostanza nonostante la presenza di notevoli problemi correlati all'uso della stessa.

### **Dipendenza psichica**

È definita come "uno stato di disagio" prodotto dall'acuta sottrazione di una sostanza ad un soggetto che vi è stato esposto cronicamente. Tale disagio può essere alleviato dalla rinnovata somministrazione della sostanza stessa o di un'altra con effetti farmacologici simili. E' comune a quasi tutte le sostanze d'abuso ed è presente anche in assenza di dipendenza fisica.

Il craving è l'espressione della dipendenza psichica.

### **Dipendenza fisica**

È sempre accompagnata da tolleranza

Alla sospensione della sostanza di solito si osserva una sindrome (segni e sintomi) opposta a quella derivante dall'assunzione cronica della sostanza stessa (sindrome astinenziale).

### **Dipendenza sociale**

Il tossicodipendente si organizza in gruppi che hanno come scopo comune l'abuso di sostanze come la morfina, l'eroina, l'alcool, gli psicostimolanti (amfetamine, derivati amfetaminici, cocaina), allucinogeni e cannabinoidi.

### **Dipendenza patologica**

Malattia correlata ad una alterazione del sistema della gratificazione, caratterizzata da craving, perdita di controllo e passaggio all'atto fisico, dalla coartazione dei mezzi con cui il soggetto si procura il piacere e da una relazione con un oggetto (sostanza, situazione, comportamento) connotata da reiterazione e marcata difficoltà alla rinuncia.

**Tabella 1:** Classificazione della dipendenza secondo criteri fisici e sociali



## **Incidenza**

Il *World Drug Report* dell'Ufficio delle Nazioni Unite contro la droga e il crimine (Unodc) è una delle fonti più attendibili sulla situazione mondiale riguardante le problematiche derivanti dall'abuso di sostanze. Il documento offre una panoramica internazionale sui più recenti sviluppi del mercato internazionale della droga, incluse informazioni sulla produzione, traffico, consumo delle sostanze stupefacenti e le conseguenze in termini di salute. I dati contenuti nel rapporto annuale (2013), che analizza il periodo 2008-2011, riguardano anche molti adolescenti e giovani: la fascia di età presa in considerazione dall'Unodc è infatti quella compresa tra i 15 e i 64 anni. Diminuisce, soprattutto in Occidente, il consumo di droghe tradizionali come cocaina ed eroina sebbene nel complesso l'uso degli oppiacei rimanga stabile nel mondo (0,4 % della popolazione) e aumenta, invece, l'abuso di nuove sostanze psicoattive. Infatti, il rapporto evidenzia che il numero di nuove sostanze segnalate dagli Stati membri all'Ufficio delle Nazioni Unite è passato da 166 alla fine del 2009 a 251 entro la metà del 2012: un aumento di oltre il 50 per cento. L'uso delle amfetamine, escludendo l'ecstasy, rimane molto diffuso e sembra essere in aumento nella maggior parte delle regioni. L'incidenza della diagnosi di alcolismo tra le donne, i bambini, gli adolescenti e gli studenti è in aumento. Il rapporto tra uomini e donne è di circa 4:1.

La sostanza illecita più utilizzata a livello globale resta la *Cannabis* con l'Europa che rappresenta il più grande mercato per l'hashish; anche se il suo uso è diminuito tra i giovani in Europa negli ultimi dieci anni, c'è stato un minore aumento della prevalenza di consumatori di *Cannabis* (180 milioni di persone, pari al 3,9 per cento della popolazione nella fascia di età compresa tra i 15 e i 64 anni) rispetto alle stime precedenti nel 2009.

Entro il 2015 l'Italia assisterà a una crescita, seppur moderata, del numero di consumatori di eroina, soprattutto nella fascia più giovane della popolazione. Mentre è destinato a calare l'uso di cocaina, il cui prezzo è in calo, ma ancora troppo alto per un Paese nella morsa della crisi economica. La previsione matematica, effettuata con dati IPSAD® (*Italian Population Survey on Alcohol and other Drugs*) sulla popolazione generale, indica che il numero dei consumatori di eroina, nel 2015, sarà di circa 300.000 individui, pari allo 0,75% della popolazione italiana fra i 15 e i 64 anni. L'eroina risulta in crescita fra gli studenti e, almeno fino a oggi, questa sostanza non era mai arrivata nelle scuole. Ciò che preoccupa è che per l'eroina la prevalenza di consumatori prevista nella popolazione studentesca è circa doppia di quella prevista nella popolazione generale. Un valore molto superiore a quello relativo alle altre sostanze: per la cocaina e per i cannabinoidi, ad esempio, la prevalenza nella popolazione studentesca è solo il 38 e il 37% superiore rispetto a quella nella popolazione generale.

La *Cannabis* è la droga più utilizzata in Italia. Secondo il *World Drug Report* delle Nazioni Unite l'ha sperimentata il 14,6 per cento della popolazione di età compresa fra i 15 e i 64 anni, ma la percentuale sale molto fra gli adolescenti. Il rapporto annuale ESPAD-Italia® (*European School Survey Project on Alcohol and other Drugs*) sul consumo di droghe e alcol fra i giovani, elaborato dall'Istituto di fisiologia clinica del CNR di Pisa e reso noto a maggio, riporta che nell'ultimo anno il 22% dei 15-19enni ha fumato *Cannabis* e che, nell'arco della vita, il 28 % l'ha provata almeno una volta. Sebbene l'uso occasionale di *Cannabis* sia piuttosto comune, i consumatori frequenti (coloro che la fumano più volte al mese) non arrivano comunque al 5% degli intervistati. L'indagine italiana, che ha coinvolto 45.000 studenti, mostra infine che mediamente il primo contatto con la droga avviene a 15 anni e che i ragazzi fumano più delle ragazze (27% contro il 17%).

Per quanto riguarda le droghe sintetiche nel prossimo triennio il numero dei consumatori di droghe sintetiche registrerà un moderato aumento. La 'platea' di chi le usa, nel 2015, sarà di circa 250.000 individui (lo 0,65% circa della popolazione italiana fra i 15 e i 64 anni). Infine, alcol e farmaci: per il primo, si segnala una tendenza alla precocizzazione dei consumi, possibile preludio di un consolidamento come sostanza d'abuso, prima, e generatrice di dipendenza, dopo. Per i farmaci, è ragionevole attendersi un aumento dell'impiego improprio e anche un incremento di situazioni di dipendenza a essi collegate.

Esistono diversi criteri per classificare le sostanze d'abuso. Essi dipendono dall'ente formulante (APA, OMS, etc.) o dalle leggi nazionali ed internazionali o, ancora, da altri fattori storici, chimici e medici. Il criterio storico le divide in "antiche" e "moderne", il criterio legislativo in Italia le riconduce a 6 tabelle in base al grado di nocività (Art. 12 L.S. n.685/75), quello preparativo le differenzia in "naturali", "semisintetiche" e "sintetiche" mentre quello chimico le raggruppa in base alle similitudini strutturali. Il criterio sintomatologico invece ripartisce le sostanze in rapporto alla loro azione sul sistema nervoso centrale (SNC): deprimenti (alcol etilico, inalanti, solventi organici, narcotici, barbiturici), stimolanti (cocaina, amfetamine e derivati, caffeina, antidepressivi) e psichedeliche (allucinogeni, cannabinoidi).

Qui saranno riportate le descrizioni, i substrati coinvolti e i meccanismi d'azione delle sostanze oggetto del nostro studio ovvero di nicotina, oppioidi e cannabinoidi.

## Nicotina e sistema colinergico

L'alcaloide nicotina, estratto dalla pianta del tabacco (*Nicotiana Tabacum*), è il componente primario tra gli oltre 4.000 composti chimici presenti nei prodotti a base di tabacco ed agisce sul cervello con proprietà gratificanti. Diversi studi dimostrano la capacità di questo farmaco di fungere da rinforzo positivo sia nell'uomo che nell'animale da laboratorio e di indurre dipendenza fisica, oltre che psicologica (Balfour, 2005; Hughes, 1988; Stolerman e Jarvis, 1995; Stolerman e Shoaib, 1991). Il fumo di sigaretta è il metodo più popolare con cui viene assunto il tabacco: attraverso di esso il fumatore assume in media da 1 a 2 mg di nicotina a sigaretta. La sigaretta è un sistema di autosomministrazione della droga ad elevata ingegnerizzazione ed estremamente efficace. Quando il tabacco è fumato, la nicotina rapidamente raggiunge livelli di picco nel torrente circolatorio ed entra nel cervello in quanto possiede una struttura altamente lipofila che le permette di superare la barriera ematoencefalica (BEE). La nicotina esplica i suoi effetti centrali attraverso i recettori nicotinici (nAChRs), i quali appartengono alla classe di recettori di membrana che funzionano attraverso canale ionico (Corringer et al., 2000; Lindstrom, 1997); essi vengono compresi nel sistema colinergico, regolato dal neurotrasmettitore endogeno acetilcolina (Kandel, 1998), che raggruppa oltre ai recettori nicotinici anche i recettori muscarinici ( $M_n$ ) (Ishii e Kurachi, 2006; Wess, 1996). Ad oggi sono state isolate diciassette subunità del recettore canale, divise in tipo muscolare [ $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  (presente solo nel feto)] e neuronale [ $\alpha_2 - \alpha_{10}$ ,  $\beta_2 - \beta_4$ ] (Mishina et al., 1986; Witzemann et al., 1987). Le subunità recettoriali possono essere disposte in forma omomericata (ad esempio cinque subunità  $\alpha_7$ ) o eteromericata ( $\alpha_4\beta_2$ ). Nel sistema nervoso centrale i diversi sottotipi recettoriali sono largamente distribuiti (Rang et al., 1998) e sono coinvolti nella modulazione di molteplici funzioni cognitive e motorie (Champtiaux et al., 2003; Kaway et al., 2002). Anche la nicotina, come tutte le altre droghe, attiva nel

cervello i cosiddetti “circuiti della gratificazione”, quelli che regolano le sensazioni di piacere, che sono localizzati in quell’insieme di aree cerebrali denominate “sistema mesolimbico” e dove sono largamente distribuiti sui neuroni dopaminergici i recettori nicotinici (Di Chiara, 2000). I nAChRs maggiormente responsabili degli effetti di rinforzo positivo e di induzione del piacere (Maskos et al., 2005; Picciotto et al., 1998) nonché dello sviluppo della dipendenza fisica (Tapper, 2004) da nicotina sono il recettore  $\alpha 4\beta 2$  e quello  $\alpha 7$  (Klink et al., 2001; Mansvelder et al., 2002; Wooltorton et al., 2003). La nicotina ha una affinità nM per i recettori  $\alpha 4\beta 2$  e  $\mu\text{M}$  per gli  $\alpha 7$  (McGehee e Role, 1995). L’unità  $\beta 2$  del recettore nicotinico ha un ruolo cruciale nella mediazione delle proprietà additive della nicotina (Picciotto et al. 1998; Zhou et al. 2001) mentre la area ventrale tegmentale (VTA) e in nucleo accumbens (NAc) sono considerati i principali substrati neuroanatomici attraverso i quali la nicotina esercita le sue proprietà di rinforzo positivo. La nicotina non solo attiva i neuroni dopaminergici della VTA (Mereu et al., 1987) per azione diretta sul corpo cellulare di questi ultimi, ma è capace di modulare le trasmissioni GABAergiche e glutamatergiche della VTA (Mansvelder e McGehee, 2002; Yin e French, 2000); infatti, la presenza di nAChRs a livello dei terminali assonali pre-sinaptici (Wonnacott, 1997) e la loro capacità di regolare la liberazione di neurotrasmettitori (acetilcolina, noradrenalina, dopamina, glutammato e GABA) (Sher et al., 2004) nonché la colocalizzazione con altri recettori nelle stesse terminazioni, come accade con i recettori glutamatergici sulle terminazioni dopaminergiche (Mansvelder et al., 2002) o noradrenergiche ippocampali, può in parte spiegare il coinvolgimento dei nAChRs nel regolare il circuito mesolimbico-dopaminergico e la dipendenza da nicotina (Laviolette e van der Kooy, 2003). La sommatoria degli *input* inibitori e eccitatori nella VTA produce nel NAc un aumento del rilascio di dopamina (DA) (Di Chiara e Imperato, 1988; Pontieri et al., 1995 e 1996).

Le stesse proprietà farmacocinetiche della nicotina aumentano il suo potenziale di abuso (Benowitz, 2009). Il fumo di sigaretta infatti, produce una rapida distribuzione della nicotina nel cervello (entro i 10 secondi dall'inalazione) ma gli effetti acuti della nicotina scemano in pochi minuti, così come la sensazione di gratificazione, e ciò costringe il fumatore a continuare l'autosomministrazione di "dosi" al fine di mantenere gli effetti piacevoli della sostanza e prevenire l'astinenza. I sintomi di astinenza da nicotina includono irritabilità, *craving* (forte desiderio di assumere la sostanza), deficit cognitivi e attentivi, disturbi del sonno, accresciuto appetito. Il picco sintomatologico dell'astinenza avviene nei primi giorni dalla sospensione dell'uso di tabacco e può diminuire in poche settimane, anche se in alcune persone i sintomi possono protrarsi anche per mesi.

### **Eroina e sistema oppioide**

Con il termine oppioidi si identificano l'oppio (*Papaver Somniferum*), i suoi derivati e, più in generale, un gruppo di sostanze, non necessariamente tossicomaniogene, aventi in comune la proprietà di interagire con specifici recettori, i cui mediatori naturali, isolati per la prima volta nel 1975 (Hughes, 1975), appartengono a 4 famiglie di peptidi endogeni: le encefaline, le endorfine, le dinorfine e le endomorfine. Il principale alcaloide che si ricava dall'oppio grezzo, il succo lattiginoso estratto dalle capsule del "*Papaver somniferum*" è la morfina. L'oppioide più comunemente abusato è l'eroina (diacetilmorfina), sintetizzata clandestinamente dalla morfina e di cui rappresenta il profarmaco.

L'eroina si presenta come una polvere finissima o granulare di colore bianco, bruno o rossastro, solubile in acqua e viene assunta per iniezione, per inalazione o fumata. Dopo l'assunzione l'eroina arriva dal sangue al cervello; lì, attraversata la BEE, l'eroina perde i gruppi acetili, si trasforma in morfina e rapidamente si lega ai recettori degli oppioidi di

cui sono stati identificati, grazie all'utilizzo di tecniche di binding recettoriale (Pert e Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973), i recettori  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$  (Dhawan et al., 1996) e ORL-1, recentemente denominati MOP, DOP, KOP e NOP. Tali recettori appartengono alla super famiglia di recettori associati a proteine G. Attraverso  $G_i/o$  modulano in senso inibitorio la cascata di trasduzione del segnale adenil-ciclastasi, AMP ciclico, protein chinasi C (PKC). Gli oppioidi tendono ad inibire la trasmissione neuronale (Yaksh, 1997); la stimolazione dei recettori oppioidi presinaptici riduce il rilascio di neurotrasmettitori attraverso l'inibizione dei canali al calcio ( $Ca^{++}$ ) di tipo N, mentre a livello post sinaptico determina iperpolarizzazione delle membrane dei neuroni attraverso l'attivazione di un canale di rettificazione per il potassio ( $K^+$ ) e l'inibizione di un canale cationico per il sodio ( $Na^+$ ) e dei canali al  $Ca^{++}$  di tipo L. La distribuzione dei recettori oppioidi nel SNC spiega il loro ruolo fisiologico e gli effetti farmacologici degli agonisti oppioidi. I recettori degli oppioidi del NAc e della VTA sono coinvolti negli effetti di rinforzo degli oppioidi; infatti, le proprietà additive degli oppioidi appaiono legate soprattutto alla rispettiva capacità di agonismo col recettore  $\mu$  che, frenando a livello della VTA la tonica inibizione esercitata da neuroni GABAergici su neuroni dopaminergici (Johnson e North, 1992), determina un cospicuo aumento, dose dipendente, della concentrazione extraneuronale di DA a livello del circuito mesolimbico di gratificazione; la dopamina del sistema limbico ha un ruolo fondamentale nelle proprietà di rinforzo di un dato stimolo e nell'apprendimento (Nestler, 1996 e 1997). Gli oppioidi, inoltre, stimolano la plasticità a livello delle sinapsi dopaminergiche di tale sistema (Chen et al., 2010).

Dopo un iniziale ondata di sensazioni piacevoli, il cosiddetto rush, prevale uno stato di rilassatezza e, già dopo poche dosi possono presentarsi: rapido sviluppo di tolleranza con l'insorgere del desiderio irresistibile di assumere al più presto un'altra dose di droga. Il meccanismo cellulare alla base della tolleranza dovuta all'esposizione cronica agli

oppiacei sarebbe una sovraregolazione del sistema del cAMP per cui vi sarebbero delle modificazioni a lungo termine dell'attività neuronale, quale una sovraespressione dei geni che codificano tale proteina, probabilmente regolata da un fattore di trasmissione che risponde al cAMP, il quale è effettivamente controllato dagli oppiacei. In queste condizioni, è necessaria una maggiore quantità di oppiacei perché si osservi inibizione dell'attività neuronale. L'assunzione prolungata di eroina comporta una serie di problematiche per il corpo e una progressiva debilitazione fisica generando nel giro di poco tempo una fortissima dipendenza; in conseguenza dell'assuefazione, ben presto le sensazioni di artificiale benessere non si presentano più, e si deve assumere la droga semplicemente per restare normali ed evitare le crisi di astinenza. Con l'aumento delle dosi le funzioni mentali si offuscano per l'effetto dell'eroina sul SNC; l'individuo non si rende conto ma la tolleranza agli effetti gratificanti non si instaura invece nel sistema respiratorio il che comporta un abbassamento della frequenza cardiaca e della respirazione, che diminuisce enormemente, per azione sui recettori oppioidi localizzati nel bulbo a volte causando, in caso di *overdose*, l'insorgere del coma e la morte. Del resto, una volta instaurato un legame di dipendenza dalla sostanza, la mancata assunzione può provocare una più o meno grave sindrome di astinenza. Questa si presenta dopo poche ore dall'ultima assunzione con l'insorgere di uno stato di agitazione, seguito da dolori diffusi, crampi, naso gocciolante, tremori, panico, sudorazioni, brividi, diarrea, nausea e vomito. La manifestazione massima dei sintomi si raggiunge fra le 48 e le 72 ore dopo l'ultima assunzione, e possono durare anche fino ad una settimana.



## **Cannabis e sistema endocannabinoide**

La Canapa (*Cannabis sativa*) è una pianta erbacea a ciclo annuale appartenente alla famiglia delle Cannabinacee (Hillig e Mahlberg, 2004). La *Cannabis* contiene più di 400 sostanze, molte delle quali (~60) hanno una peculiare struttura terpenofenolica e formano una classe distinta detta cannabinoidi (Iversen, 2003). Il tipo cannabigerolo (CBG), cannabicromene (CBC), cannabidiolo (CBD), il  $\Delta^9$ -THC ed il cannabinolo (CBN) sono i più rappresentati. Il contenuto psicoattivo capace di interagire con le funzioni neuropsichiche è il delta-9 tetraidrocannabinolo (THC). Hashish (8,2% di contenuto medio di THC rinvenuto in Italia), marijuana (5,8%) e olio (30%) sono le principali droghe ricavate dalle foglie, dalle infiorescenze femminili e dalla resina essiccata della pianta. Hashish e marijuana non sono solubili in acqua perciò, solitamente, vengono fumate mischiate a tabacco. Gli effetti del fumo di hashish e marijuana si avvertono dopo pochi minuti e possono durare anche due ore. L'intensità dell'effetto dipende soprattutto dalla quantità di THC contenuta nella sostanza assunta ed in base alle caratteristiche psicofisiche individuali, alla modalità di assunzione e associazione con alcol o altre sostanze. L'assunzione di *Cannabis* stimola la fame e la sete, provocando secchezza alla bocca. Gli effetti immediati sono euforia, ilarità, rilassamento, alterazione delle percezioni sensoriali e temporali similamente agli effetti indotti dall'alcol. A breve termine subentra un deficit di attenzione e la difficoltà a coordinare i movimenti; è molto pericoloso mettersi alla guida per il rallentamento dei tempi di reazione e di coordinazione dei movimenti. Il fumo di *Cannabis* influisce sul cervello e altera la memoria a breve termine, l'apprendimento, la capacità di giudizio e le abilità motorie. Contrariamente a quanto comunemente ed erroneamente creduto, questa sostanza è in grado di creare uno stato di dipendenza (come dimostrano le ricerche del *National Institute on Drug Abuse*, NIDA) che si manifesta soprattutto con sintomi psichici quali un

forte e costante desiderio di assumere la sostanza, crisi demotivazionale, forte irritabilità ed aumento dell'aggressività, oltre che disfunzioni nella capacità di giudizio (Iyalomhe, 2009).

I recettori cannabinoidi (CB), gli endocannabinoidi, composti lipidici prodotti dall'organismo che si legano ai recettori, ed i meccanismi proteici che regolano la sintesi, il trasporto e la loro degradazione costituiscono il sistema endocannabinoide (o sistema cannabinoide endogeno) (Di Marzo et al., 2004; Freund et al., 2003; Fride, 2005; Piomelli, 2003; Wilson e Nicoll, 2002). L'identificazione del principale composto attivo, il THC, determinò la nascita di un filone di ricerca teso ad individuare i target cellulari e molecolari dei cannabinoidi nel cervello; mediante tecniche biochimiche con ligandi radioattivi Devane e collaboratori (1988) scoprirono un primo recettore, successivamente isolato e clonato, il recettore CB<sub>1</sub> (Matsuda et al., 1990), mentre nel 1993 fu localizzato nei leucociti umani il recettore CB<sub>2</sub> (Munro et al., 1993). Questi recettori appartengono alla numerosa famiglia dei recettori di membrana accoppiati alla proteina G (GPCR) (Howlett, 2002). I recettori CB<sub>1</sub> sono ampiamente distribuiti nell'encefalo (Johnson et al., 1992; Freund et al., 2003, Mackie, 2005; Matsuda et al., 1992) espressi anche sulle terminazioni presinaptiche centrali e periferiche dei neuroni di altri sistemi neurotrasmettitoriali dove inibiscono il rilascio di neurotrasmettitori (Iversen, 2003). Così l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> protegge il sistema nervoso centrale da sovrastimolazione o sovrainibizione da parte di neurotrasmettitori. L'attivazione dei recettori cannabinoidi causa inibizione dell'adenilciclasi e quindi inibizione della conversione di ATP ad AMP ciclico (cAMP). Sono stati osservati anche altri meccanismi come l'interazione con alcuni canali ionici (inibizione dei canali al calcio di tipo N e P/Q; attivazione canali al potassio) e la stimolazione delle MAP kinasi. I recettori CB<sub>1</sub> sono espressi particolarmente nelle regioni dell'encefalo che sono responsabili della

coordinazione motoria e movimento (cervelletto e gangli della base tra cui: substantia nigra, globo pallido, nucleo entopeduncolare, e caudato-putamen), dell'attenzione e delle funzioni cognitive complesse (corteccia cerebrale), dell'apprendimento, memoria ed emozioni (amigdala, ippocampo) e della modulazione del dolore (alcune zone del midollo spinale, la sostanza grigia periacquidottale) (Ameri, 1999; Biegon e Kerman, 2001; Glass et al., 1997; Herkenham et al., 1990; Hohmann et al., 1999; Maileux et al., 1992; Pettit et al., 1998; Tsou et al., 1998). La loro espressione a livello del tronco encefalico è bassa, il che può spiegare la mancanza di mortalità acuta *Cannabis*-correlata. I recettori CB<sub>1</sub> sono presenti anche in alcuni organi e tessuti periferici tra cui ghiandole endocrine, ghiandole salivari, leucociti, milza, cuore e parte dell'apparato riproduttivo, urinario e gastrointestinale. I recettori CB<sub>2</sub> sono localizzati principalmente nelle cellule immunocompetenti (Carrier et al., 2004), tra cui i leucociti, nella zona marginale della milza, nelle tonsille, nel midollo osseo ematopoietico ma anche nel pancreas. Recentemente sono stati identificati anche nel SNC, pur se a basse concentrazioni (Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Van Sickle et al. 2005), in particolare sulle cellule gliali e microgliali. Una delle funzioni dei recettori cannabinoidi nel sistema immunitario è la modulazione del rilascio di citochine, che sono responsabili delle risposte infiammatorie e della regolazione del sistema immunitario.

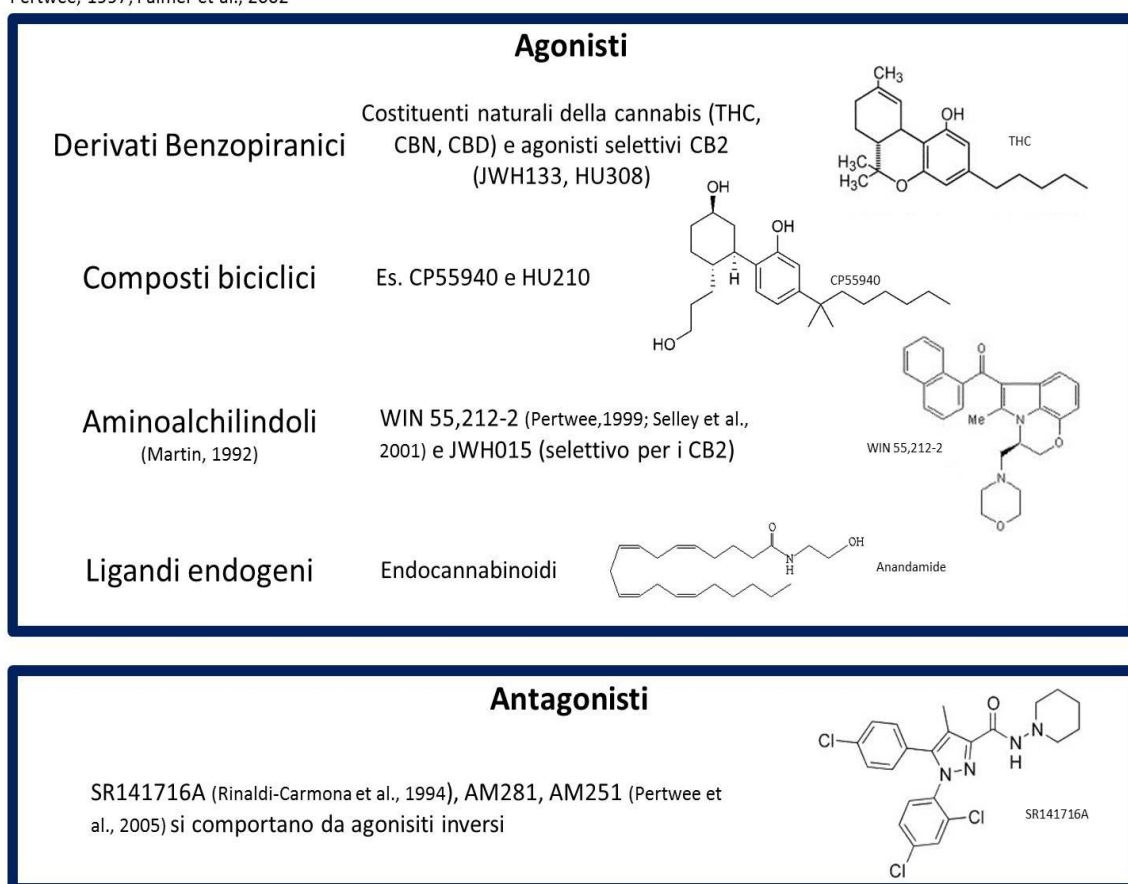
Nel 1992, Devane e collaboratori riuscirono ad identificare e isolare, partendo da degli estratti di cervello porcino, una sostanza lipidica (amide degli acidi grassi) l'N-arachidoniletanolamina denominata poi Anandamide (AEA) (Devane et al., 1992). In seguito, un altro derivato dell'acido arachidonico, isolato da tessuti periferici, il 2-arachidonilglicerolo (2-AG) è stato assegnato tra i composti endogeni modulanti la trasmissione cannabinergica (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). L'AEA è largamente distribuita nel SNC e a livello periferico. La sua concentrazione e

distribuzione nel cervello è correlata con quella dei recettori CB e in linea con quelle di altri neurotrasmettitori ampiamente diffusi. L'AEA si lega come agonista a entrambi i recettori CB ma con un'affinità più bassa ( $K_i$ ) per i recettori CB<sub>2</sub>. L'AEA può essere prodotta seguendo due vie biosintetiche: una, principale, catalizzata da una N-aciltransferasi (NAT) e una fosfodiesterasi, e l'altra attraverso una condensazione tra l'acido arachidonico e l'etanamina (Cadas et al., 1997; Di Marzo et al., 1994; Freund et al., 2003; Okamoto et al., 2005). Il 2-AG è presente soprattutto a livello del SNC, dove si trova a una concentrazione circa 200 volte superiore a quella dell'AEA (Piomelli, 2004); rispetto a quest'ultima, tuttavia possiede una minore affinità ma anche una maggiore efficacia per i recettori CB (Howlett et al., 2002). Anche per il 2-AG esistono due vie di biosintesi (Bisogno et al., 2003; Piomelli, 2003; Stella e Piomelli, 2001).

Gli endocannabinoidi (ECBs) non sono sintetizzati e immagazzinati nelle vescicole delle cellule nervose ma prodotti "*on demand*" (solo quando necessario) dai loro precursori lipidici di membrana e quindi rilasciati dai neuroni nello spazio sinaptico in seguito alla depolarizzazione della membrana e all'aumento intracellulare dei livelli del calcio ( $Ca^{++}$ ) provocato dall'interazione di altri neurotrasmettitori con i rispettivi recettori (Cadas et al., 1997; Di Marzo et al., 1994; Freund et al. 2003; Giuffrida et al., 1999; Piomelli 2003) si muovono in direzione retrograda per legarsi ai recettori cannabinoidi sui terminali presinaptici (Freund et al. 2003). L'attivazione di recettori cannabinoidi CB<sub>1</sub>, comporta l'inibizione dell'attività dell'adenilatociclastasi, riduzione di cAMP, inibizione ingresso di ioni  $Ca^{++}$ , entrata del potassio ( $K^+$ ) ed iperpolarizzazione delle membrane (Szabo e Schliker, 2005). Dopo il rilascio, gli ECBs sono rapidamente disattivati e trasportati nelle cellule dove vengono metabolizzati (De Petrocellis et al., 2004; Pertwee et al., 2000). L'AEA viene idrolizzata nei tessuti e nelle cellule attraverso l'azione dell'amidasi degli acidi grassi (FAAH) che la degrada ad ac. arachidonico ed etanamina (Cravatt et al.

1996; Hillard et al. 1995, Ueda et al. 1995). Sebbene anche l'idrolisi del 2-AG possa essere catalizzata dalla FAAH, sembrerebbe maggiormente coinvolta nella sua degradazione una monoacilglicerol-lipasi (MAGL), che converte i monogliceridi in acido grasso e glicerolo (Dinh et al. 2002; Goparaju et al. 1999; Piomelli, 2003; Saario et al., 2004).

Pertwee, 1997; Palmer et al., 2002



**Tabella 2:** Principali composti naturali e sintetici ad azione agonista ed antagonista sul sistema endocannabinoide

## **La vulnerabilità al consumo e alla dipendenza da sostanze d'abuso**

Non tutti i consumatori sviluppano una tossicodipendenza. Molte persone riescono a bere alcol moderatamente e persino parecchi consumatori di droghe pesanti, come cocaina ed eroina, utilizzano tali sostanze in modo “ricreativo”, senza sviluppare dipendenza. Prove empiriche indicano che la vulnerabilità alla dipendenza da sostanze d'abuso è sotto il controllo di tre grossi domini: a) i fattori genetici, b) i fattori psicopatologici, c) i fattori ambientali, che influenzano fortemente la progressione tossicomane e giocano un ruolo nel determinare le probabilità individuali di consumare droghe e sviluppare dipendenza (Ball et al., 2007). In altre parole, l'ambiente gioca un ruolo importante nell'influenzare una persona a provare una determinata droga, e magari a continuare ad usarla in maniera ricreativa, ma i fattori genetici giocano un ruolo più forte nel determinare se quella persona svilupperà dipendenza. Eventi ambientali significativi, come l'abuso fisico o sessuale adolescenziale, possono interagire con la suscettibilità genetica ad aumentare il rischio di sviluppare disturbi psichiatrici (Ball et al., 2007; Caspi et al., 2005; Goldman et al., 2005; Nestler et al., 1996; Nestler, 2000). Gli stressori ambientali e un'esposizione precoce all'uso di droga, in particolar modo durante l'adolescenza e il primo sviluppo, possono sortire anche effetti neuropsicologici significativi che lasciano gli individui vulnerabili all'abuso di sostanze o alla dipendenza da esse (Volkow e Li, 2005).

### **Differenze di genere e influenze ormonali**

Il termine genere descrive ruoli socialmente determinati e li integra agli aspetti biologici. Ciò significa che i generi “femminile” e “maschile” mutano e si modificano in relazione all'evoluzione sociale, economica, culturale e politica. In tema di dipendenze occorre

osservare che tra uomini e donne esistono differenze riguardo sia alle abitudini ed alle cause del consumo, sia ai meccanismi attraverso cui s'instaura la dipendenza e, infine, riguardo alla motivazione ed al processo che conduce all'astinenza. In una recente revisione della letteratura scientifica condotta presso il *Molecular and Behavioral Neuroscience Institute* e il *Department of Psychology* dell'Università del Michigan (USA) sono stati analizzati i fattori che predispongono in modo diverso uomini e donne allo sviluppo di una dipendenza considerandone le basi storiche, culturali, sociali e biologiche. Dalla ricerca emerge che gli uomini sono più propensi ad attuare comportamenti a rischio, tra cui appunto la sperimentazione di sostanze stupefacenti. Le donne invece, avrebbero maggiori probabilità di cominciare ad assumere farmaci da automedicazione per ridurre lo stress e alleviare la depressione. Per questo motivo le donne presentano un rischio maggiore nel diventare dipendenti da sostanze d'abuso più rapidamente degli uomini. Secondo gli autori ciò sarebbe dovuto, in parte, a differenze neurobiologiche e dei circuiti neurali responsabili dei processi cognitivi quali la motivazione e la gratificazione che inducono allo sviluppo della dipendenza. Sembra inoltre che proprio tali differenze di funzionamento neurobiologico tra i generi, siano accentuate con la dipendenza (Becker et al., 2012). Fra le donne c'è una percentuale più elevata di poliassuntori (42.1%) rispetto agli uomini (13.9%) e il genere femminile presenta una maggiore comorbilità psichiatrica indipendentemente dall'oggetto della dipendenza patologica.

Sebbene ad oggi nella ricerca clinica poca attenzione è stata rivolta alle possibili differenze di sesso nell'abitudine al fumo e nel consumo delle droghe, la ricerca preclinica ha recentemente focalizzato l'attenzione sul ruolo del sesso e degli ormoni ovarici attraverso studi sul comportamento animale e sulle risposte neurochimiche all'esposizione acuta e ripetuta alle sostanze d'abuso; le differenze evidenziate possono

migliorare le conoscenze delle cause biologiche dell'*addiction* e correlarle alle specifiche vulnerabilità dei due sessi e relazionarle all'età del consumatore.

Differenze di genere sono state riportate durante tutte le fasi del ciclo della dipendenza utilizzando specifici modelli animali per lo studio della dipendenza da sostanze (Carroll et al., 2004; Lynch et al., 2002; Roth et al., 2004): negli animali da laboratorio si sono osservate differenze specifiche nell'acquisizione del comportamento di autosomministrazione (SA) di oppiacei (Lynch e Carroll, 1999), nicotina (Donny et al., 2000), e di altre sostanze (Carroll et al., 2000; Hu et al., 2004; Lynch et al., 2000; Roth e Carroll, 2004), nonché nel mantenimento di tale comportamento (Almeida et al., 1998; Carroll et al., 2005; Cicero et al., 2003; Klein et al., 1997; Perkins et al., 1999; Vivian et al., 2001;) e nella ricaduta da oppioidi, nicotina e alcol (Hernandez-Avila et al., 2004; Lynch et al., 2002; Roth et al., 2004). Nel caso della nicotina i ratti femmine apprendono il comportamento di SA più rapidamente rispetto ai maschi, e in protocolli di *progressive ratio* (PR) lavorano più duramente per ricevere nicotina rispetto ai maschi (Lynch et al., 2002; Roth et al., 2004). In generale, si è osservato che le femmine tendono ad acquisire il comportamento di SA più rapidamente e tendono ad assumere *intake* maggiori di farmaco rispetto ai maschi durante la fase di mantenimento (Roth et al., 2004). Gli studi sul ripristino del comportamento di ricerca della droga dopo la sua estinzione convergono mostrando che le femmine sono più sensibili alle proprietà gratificanti delle droghe e più inclini alla ricaduta (Donny et al., 2000; Fuchs et al., 2005; Kippin et al., 2005; Juarez et al., 1993; Middaugh et al., 1999; Fattore et al., 2009b; Perkins et al., 1999;), in accordo con gli studi sull'uomo che hanno mostrato che le donne hanno un maggiore *craving* e rischio di ricaduta rispetto agli uomini (Fattore et al., 2008a), probabilmente a causa della maggiore vulnerabilità ad eventi stressanti o depressione (Wasilow-Mueller e Erickson, 2001; Weinberger et al., 2009). Il ruolo di primo piano



svolto dagli ormoni gonadici nel *craving* e nella tossicodipendenza è inequivocabile: estrogeni e progesterone non solo influenzano l'ovulazione e la riproduzione, ma incidono anche sulla ricompensa edonica (Wise, 1998), e sugli aspetti motivazionali di incentivazione al *drug-seeking* (Robinson e Berridge, 2008). Numerose evidenze hanno rivelato che i livelli di ormoni circolanti durante il ciclo estrale possono avere un notevole impatto sul consumo di droga e sulla ricaduta (Fox et al, 2008; Sinha et al., 2007).

Differenze sesso-specifiche sono state osservate in studi riguardanti il sistema endocannabinoide: ratti femmine sono più sensibili agli effetti antinocicettivi e sulla locomozione indotti dai cannabinoidi rispetto ai maschi (Tseng e Craft, 2001; Wiley, 2003) e studi preclinici indicano che gli ormoni sessuali e ovarici sono tra i fattori determinanti la vulnerabilità alla dipendenza da *Cannabis*. Infatti, ormoni ovarici hanno dimostrato di essere un fattore chiave che sottende all'assunzione di cannabinoidi nei ratti (Fattore et al., 2007c) e, nel fenomeno della ricaduta dove le femmine integre mostrano una ripresa del comportamento con un intensità maggiore rispetto ai maschi e alle femmine ovariectomizzate (OVX) (Fattore et al., 2010). Con l'acquisizione di un *intake* di WIN 55,212-2 stabile e maggiore e in minor tempo rispetto ai ratti maschi, le femmine sembrano più suscettibili al *reward* indotto dai cannabinoidi, in linea con le osservazioni cliniche che segnalano le donne come più vulnerabili degli uomini durante i periodi di transizione dal consumo occasionale all'abuso di droga (Brady e Randall, 1999; Randall et al., 1999). Analogamente, il livello più elevato di WIN 55,212-2 assunto e mantenuto nel tempo dalle femmine è in linea con osservazioni cliniche che le donne sono più sensibili degli uomini alle proprietà di dipendenza delle droghe (Lynch et al., 2002). Oltre agli effetti sul comportamento di autosomministrazione, le differenze sessuali potrebbero essere implicate in altri effetti farmacologici dei cannabinoidi, alcuni dei quali piacevoli e quindi rinforzati, come l'effetto ansiolitico e il miglioramento dell'umore (Ameri, 1999).

## **Meccanismi neurobiologici della dipendenza da sostanze d'abuso**

La neurobiologia ha permesso di capire come la dipendenza sia un comportamento disfunzionale appreso, una condizione che ruota intorno al piacere, le cui cause sono da ricercare in una alterazione dei meccanismi cerebrali che controllano la gratificazione e gli stati motivazionali (Hyman et al., 2006; Koob e Le Moal, 2005). Queste aree vengono principalmente controllate da due vie neurotrasmettitoriali: il sistema dopaminergico ed il sistema oppioide. Il primo sembrerebbe controllare la spinta motivazionale per la ricerca dello stimolo gratificante, mentre il secondo medierebbe i processi di gratificazione conseguenti al consumo della sostanza.

In natura esistono una serie di stimoli detti primari, essenziali per la sopravvivenza della specie come, la ricerca del cibo, dell'acqua, il sesso e la cura della prole. Tutti gli stimoli primari sono gratificanti ed hanno la capacità di indurre delle proprietà "cognitivo-incentive" attivando il sistema limbico. Le sostanze d'abuso sono dei potentissimi surrogati degli stimoli primari; i loro effetti possono rappresentare per l'uomo un fine primario dell'esistenza al pari, se non superiore, a quello indotto da stimoli naturali (Kelley e Berridge, 2002). Le proprietà motivazionali e gratificanti delle sostanze d'abuso fanno sì, al pari degli stimoli primari, che stimoli neutri o secondari di varia natura, associati ripetutamente agli effetti gratificanti delle sostanze d'abuso possano diventare con il tempo capaci, di *per se*, di scatenare un intenso desiderio della sostanza che viene più comunemente definito *craving*. Un ruolo di primaria importanza, per lo sviluppo ed il mantenimento della tossicodipendenza lo svolgono aree cerebrali come la corteccia prefrontale, l'amigdala, l'ippocampo ed il nucleo accumbens (Schoenbaum et al., 2006). Le aree prefrontali sono determinanti nel controllo degli impulsi (ipoattività da uso cronico); l'area del cingolo nei meccanismi che portano la persona a cercare esclusivamente la sostanza (iper-responsività agli stimoli strettamente legati alla

sostanza); l'area orbito-frontale nei funzionamenti che presiedono al controllo della motivazione; il nucleo accumbens e l'area ventrale tegmentale nella mediazione degli effetti gratificanti indotti dalla sostanza (mutata responsività del sistema dopaminergico meso-limbico corticale agli stimoli rinforzanti); e l'amigdala e l'ippocampo nella regolazione dei meccanismi di apprendimento e memoria.

### **La via cortico-meso-limbica**

L'utilizzo continuo di una sostanza d'abuso è in grado di alterare i meccanismi che regolano gli stati motivazionali e, contemporaneamente, produrre un consolidamento mnemonico dell'aberrante comportamento dell'uso attraverso un'aumentata trasmissione dopaminergica nel nucleo accumbens (e del glutammato) e nelle circuitazioni limbiche ed extra-piramidali ad esso funzionalmente integrate (Spanagel e Weiss, 1999).

Il rilascio di dopamina funziona come un segnale, che ha come conseguenza la fissazione di una memoria: la sostanza merita di essere riutilizzata. Questo crescere del desiderio in forma di memoria si associa poi ad un comportamento di ricerca: la sostanza è piacevole quindi significa che la voglio ancora. Il meccanismo finale, con cui una sostanza è in grado di indurre un comportamento di ricerca, è detto rinforzo. Memoria e rinforzo sono quindi gli effetti di tutte le sostanze d'abuso. Queste sostanze sono stimoli che sono capaci di suscitare nell'individuo un processo motivazionale gratificante attivando specifiche vie neuronali nel sistema cortico-mesolimbico. In particolare, aumenta l'attività di un fascio di fibre dopaminergiche (fascio A10) localizzate nell'area ventrale tegmentale (VTA) del mesencefalo che proiettano alla base dello striato dove è localizzato il nucleo accumbens (NAc) (Nakahara et al., 1989; Pontieri et al., 1996) e, in specifiche aree corticali (Ikemoto, 2007) responsabili principalmente del processo decisionale (corteccia prefrontale, giro del cingolo anteriore) (Hyman et al., 2006).

L'attivazione determina il rilascio del neurotrasmettitore dopamina (DA) aumentandone la concentrazione extracellulare (Di Chiara, 1998; Koob e Bloom, 1988; Wise e Bozarth, 1987) attraverso un meccanismo diretto sui recettori dopaminergici, sui meccanismi di ricaptazione (Blocco del trasportatore della dopamina - DAT) e metabolismo (Hutcheson et al., 2001). Gli oppioidi (eroina, etc.) favoriscono la trasmissione dopaminergica per mezzo dei propri recettori posti sia nella VTA che nel NAc; altre sostanze agiscono per via indiretta, come i cannabinoidi o la nicotina (Koob e Le Moal, 1997; McGranahan et al., 2011; Nisell et al., 1994). Lesioni neuro-chimiche della VTA e/o del NAc bloccano la tendenza all'auto-somministrazione di cocaina, d'oppioidi e d'amfetamine (Beninger, 1983; Taylor e Robbins, 1984). Quindi, non solo la dopamina sembra essere coinvolta nei meccanismi alla base della tossicodipendenza sebbene il suo ruolo rimanga centrale (Goodman, 2008). Il rilascio di dopamina nel NAc potrebbe rappresentare più che la capacità di ricompensare o l'euforia (Berridge, 2007; Kelley e Berridge, 2002; Robbins e Everitt, 2007) il segnale per apprendere un'esperienza ricompensante nuova, migliore di quella attesa, imprevista (Schultz, 2006 e 2007). L'iniziale aumento del rilascio di DA e del tono dopaminergico nel circuito della gratificazione seguente all'abuso va incontro con la dipendenza al fenomeno della *down-regulation* riducendo il numero dei recettori dopaminergici post-sinaptici (Volkow e Li, 2004). Ciò determina una variazione della soglia per l'attivazione del sistema di ricompensa nel NAc "tagliando", di fatto, tutti gli stimoli naturali legati alle attività quotidiane che non raggiungono tale soglia e motivando così l'assunzione cronica di droga. In questo senso la capacità di evitare la ripetizione compulsiva di un particolare comportamento o pensiero e la scelta degli obiettivi dipende dal rilascio di DA nella corteccia prefrontale (PFC) (Hyman, 2005; Hyman et al., 2006; Roesch e Olson, 2004; Rolls, 2004). L'uso cronico di droga potrebbe causare una ipofunzionalità dopaminergica (Jentsch e Taylor, 1999) di queste regioni cerebrali che

presiedono le funzioni cognitive e la modulazione delle aree sottocorticali deputate al controllo delle pulsioni come il NAc e l'amigdala. Il tono dopaminergico relativamente basso sostenuto dalle ricompense naturali non riuscirebbe ad aprire l'accesso alla PFC, allontanando l'individuo dalle attività quotidiane e spingendolo verso l'utilizzo di droghe rafforzandone il comportamento (Berke 2003; Berke e Hyman, 2000; Robbins e Everitt, 1999).

Il processo motivazionale che determina l'assunzione della sostanza indipendentemente dalla volontà individuale viene anche spiegato attraverso il meccanismo di sensibilizzazione (gli effetti della sostanza aumentano dopo auto-somministrazioni ripetute della stessa dose) che influenzerebbe gli schemi motori legati al comportamento di ricerca compulsivo tipico del tossicodipendente (Robinson e Berridge, 1993). La sensibilizzazione è associata al riadattamento delle arborizzazioni dendritiche sui neuroni GABAergici nel NAc ed all'aumento del tono DAergico nel medesimo nucleo. Tuttavia, la motivazione, la valutazione dell'impulso e della salienza sono regolati dalla corteccia orbitofrontale (OFC) (Baler e Volkow, 2006) che permette all'individuo di comparare le probabili conseguenze derivanti dal perseguimento di un obiettivo (Schoenbaum et al., 2006). Quando sono presenti delle alterazioni dovute all'esposizione alla sostanza aumenta notevolmente l'attività della DA nella OFC determinando un aumento del metabolismo che è correlato al desiderio compulsivo di droga e produce la perdita di controllo sull'uso di droga (Risinger et al., 2005).

La fissazione del rinforzo appreso nella memoria sarebbe poi dovuto all'instaurarsi nel sistema mesolimbico (NAc, amigdala, ippocampo e striato) di fenomeni elettrofisiologici di plasticità sinaptica determinanti potenziamento a lungo termine (LTP) o depressione (LTD) (Hyman e Malenka, 2001; Everitt e Robbins, 2005). L'LTP è un processo che permette alla connessione sinaptica tra due neuroni di essere rafforzata. L'esposizione

ripetuta alle sostanze d'abuso determinerebbe una riorganizzazione neuronale attraverso una complessa regolazione dell'LTP o LTD mediata dall'attivazione dei recettori dopaminergici e dai sistemi degli aminoacidi eccitatori (glutammato) ed inibitori (GABA). Caratteristica strettamente pertinente all'interazione dopamina-glutammato nell'ottica della plasticità sinaptica, è la colocalizzazione delle terminazioni dopaminergiche e glutamatergiche in prossimità delle stesse spine dendritiche; quindi si avrebbe la convergenza degli input dopaminergico-mesencefalico e glutamatergico-corticale (Sesack e Pickel, 1990, Smith e Bolam, 1990). Nella VTA la plasticità sinaptica è responsabile delle risposte acute iniziali all'abuso di droghe e degli adattamenti a lungo termine nelle aree innervate dai suoi neuroni DAergici (Kauer e Malenka, 2007). La VTA innerva la corteccia prefrontale che, a sua volta, fornisce degli *input* glutamatergici, attivando nei neuroni dopaminergici dei *pattern* di scarica che generano nel NAc un aumento della concentrazione di DA (Gariano e Groves, 1988) e, visto il ruolo della PFC nella valutazione dei processi diretti ad un obiettivo (Mesulam, 1986), il meccanismo di rinforzo sarebbe azionato quando la PFC stabilisce che il comportamento in atto conduce al raggiungimento del traguardo. Oltre a ciò, l'LTP o LTD sono associate a una vasta gamma di funzioni cognitive che si verificano nelle sinapsi presenti in altre aree cerebrali a valle della VTA e che regolano il mantenimento della dipendenza negli aspetti compulsivi e nella ricaduta (Calabresi et al., 2007; Kauer e Malenka, 2007). Ad esempio, l'ippocampo e l'amigdala, svolgono un ruolo primario nell'acquisizione e nel consolidamento dello stimolo appreso che guida il comportamento di ricaduta (Weiss et al., 2000).

L'esposizione ripetuta e continuativa alle sostanze d'abuso determinerebbe anche il mantenimento della condizione di dipendenza tramite meccanismi riadattativi neuronali e ormonali dello stress regolati dall'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) (Koob e

Le Moal, 2005). Oltre che dal nucleo paraventricolare (NPV) dell'ipotalamo il CRH è secreto con funzioni neuromodulatorie soprattutto in quelle aree del sistema limbico che regolano le risposte emozionali come la sostanza grigia periacquedottale, il locus coeruleus e il nucleo centrale dell'amigdala. L'individuo per alleviare i sintomi stressori assumerebbe la sostanza ma nel farlo si renderebbe più vulnerabile allo stress stesso; lo stress, su cui agisce il CRH, faciliterebbe il passaggio da un uso ricreativo al suo consumo sregolato determinando la dipendenza. Inoltre, e a conferma, l'attivazione di questo sistema è associato all'aggravarsi dei sintomi astinenziali (Koob, 2008; Koob et al., 1998) e alla recidiva dopo prolungata astinenza (Hansson, 2006; Koob, 1999).

### **Interazioni tra sistemi neuro trasmettitoriali nel circuito della gratificazione**

Tutte le sostanze d'abuso tra cui gli oppiacei, i cannabinoidi e la nicotina producono una serie di effetti farmacologici tra cui gli effetti di rinforzo che sono responsabili della fase iniziale del comportamento di dipendenza. Il meccanismo iniziale di azione di queste sostanze implica diversi bersagli neurochimici (Hyman e Malenka, 2001); tuttavia, tutti questi composti producono una disregolazione neurale che coinvolge vie neurochimiche e neuroanatomiche simili nei percorsi motivazionali e di ricompensa (Koob et al., 2004; Nestler, 2004). Il sistema mesocorticolimbico rappresenta il substrato neuronale comune per le proprietà rinforzanti delle sostanze d'abuso, dove sia la DA e la trasmissione oppioide sono cruciali (Maldonado, 2003). In questo contesto morfologico il sistema endocannabinoide gioca un ruolo fisiopatologico nel comune circuito della tossicodipendenza agendo attraverso l'azione neuromodulatoria dei cannabinoidi endogeni sul rilascio di altri neurotrasmettitori (Mackie, 2008).

Il coinvolgimento del sistema endocannabinoide negli effetti gratificanti della nicotina è noto da tempo ed è stato confermato da diversi studi sperimentali sia negli animali da

laboratorio che nell'uomo. A livello del sistema mesolimbico la nicotina esplica i suoi effetti rinforzanti legandosi ai nAChRs mediante i quali interferisce sulla funzione di vari sistemi neurotrasmettitoriali (Piciotto, 2003). I recettori nAChRs sono abbondantemente rappresentati nella VTA dove sono espressi sui corpi cellulari dei neuroni dopaminergici e sulle terminazioni glutamatergiche discendenti dalla corteccia prefrontale. Quando i recettori  $\alpha_4\beta_2$  vengono attivati, determinano un aumento del rilascio di DA nel NAc e questo aumento viene considerato essenziale per lo sviluppo della dipendenza da nicotina (Pontieri et al., 1996). La nicotina risponde positivamente nei principali modelli animali di tossicodipendenza: induce preferenza di spazio condizionata (CPP) (Le Foll e Goldberg, 2005) e viene autosomministrata spontaneamente per via endovenosa (Corrigal e Cohen, 1989), inoltre in modelli di ricaduta dopo astinenza ripristina il comportamento di autosomministrazione (Shaham et al., 1997). Il sistema endocannabinoide è cruciale per gli effetti di dipendenza di questa sostanza. Studi farmacologici hanno rivelato che le dosi non efficaci di nicotina e THC hanno prodotto una significativa CPP nei topi quando somministrati insieme (Valient et al., 2002). La somministrazione dell'antagonista dei recettori CB<sub>1</sub>, SR141716A (Rimonabant) riduce fortemente l'autosomministrazione endovenosa (Cohen et al., 2005) e previene l'instaurarsi di CPP indotta da nicotina (Forget et al., 2005; Le Foll e Goldberg 2004). Tale azione antagonistica dipenderebbe dalla riduzione della stimolazione dei neuroni dopaminergici: infatti, il pre-trattamento con l'SR141716A ridurrebbe l'aumento del rilascio di DA nel NAc indotto dalla nicotina (Cohen et al., 2002). Anche composti che agiscono sulla degradazione degli endocannabinoidi modificano le risposte prodotte dalla nicotina; l'inibitore della FAAH che degrada l'AEA, l'URB597, previene la CPP e l'SA così come il pre-trattamento con questo farmaco impedisce il comportamento di ricaduta dopo astinenza (Scherma et al., 2008).



Diversi studi hanno rivelato l'esistenza di interazioni funzionali bidirezionali tra il sistema endocannabinoide e quello oppioide ed entrambi i sistemi partecipano negli stessi circuiti coinvolti nelle proprietà di dipendenza delle diverse sostanze d'abuso (Cossu et al., 2001; Maldonado e Rodriguez de Fonseca, 2002; Mascia et al., 1999; Rubino et al., 2000; Solinas et al., 2004). Sia le risposte gratificanti degli oppioidi che quelle indotte dai cannabinoidi sono correlate ai loro effetti facilitatori sulla trasmissione mesolimbica della DA (Maldonado, 2003) attraverso la convergenza in quelle aree cerebrali come il NAc dei loro recettori  $\mu$  e  $CB_1$  (Navarro et al., 1998; Pickel et al., 2004; Rodriguez et al., 2001) e di meccanismi cellulari (Shapira et al., 2003), intracellulari (Fimiani et al., 1999) o attraverso la trasduzione del segnale (Manzanares et al., 1999; Thorat e Bhargava, 1994). La stimolazione di uno dei recettori nei neuroni gabaergici inibisce la trasmissione GABAergica nel NAc (Hoffman e Lupica, 2001) mentre l'attivazione di entrambi i recettori colocalizzati potrebbe avere un effetto sinergico. I recettori  $CB_1$  dei cannabinoidi hanno un ruolo importante nelle proprietà gratificanti degli oppioidi. La CPP (Martin et al., 2000) e l'autosomministrazione endovenosa (IVSA) (Ledent et al., 1999) indotte da morfina sono state abolite nei topi *knockout* privi di recettori  $CB_1$ ; in accordo con questi risultati, la somministrazione di SR141716A ha ridotto l'auto-somministrazione e la CPP indotte da oppioidi nei roditori (De Vries et al., 2003; Navarro et al., 2001; Singh et al., 2004; Solinas et al., 2003). L'SR141716A ha anche impedito il comportamento di ricerca per l'eroina dopo un lungo periodo di estinzione mentre l'agonista cannabinoide HU-210 ha ripristinato tale comportamento (De Vries et al., 2003; Fattore et al., 2003 e 2005b; Solinas et al., 2003). D'altra parte gli effetti gratificanti indotti dal THC sono stati soppressi in topi *knockout* per i recettori  $\mu$  oppioidi (Ghozland et al., 2002) e, sono stati attenuati dall'antagonista naltrexone (Justinova et al., 2003). Il naloxone riduce la ICSA e la CPP indotte da cannabinoidi nonché la ricaduta in ratti astinenti da cannabinoidi

(Spano et al., 2004). I risultati ottenuti con i rispettivi topi *knockout* mostrano che la presenza e l'integrità dei recettori CB<sub>1</sub> e  $\mu$  sia essenziale per la reciproca espressione delle proprietà rinforzanti. Quantità costanti di eroina assunte attraverso l'IVSA in ratti adulti ha determinato un aumento generale non solo dei recettori  $\mu$  oppioidi ma anche dei recettori CB<sub>1</sub> e della loro funzionalità in diverse aree cerebrali (Fattore et al., 2007); viceversa dosi costanti dell'agonista CB<sub>1</sub> WIN 55,212-2 autosomministrate dai ratti aumentano oltre, prevedibilmente, il numero e la funzionalità dei recettori CB<sub>1</sub> anche i recettori  $\mu$  oppioidi (Fattore et al., 2007).

### **Modelli sperimentali del comportamento di abuso verso le sostanze**

Per comprendere se l'azione di una sostanza può determinare degli effetti sul comportamento che possono condurre l'individuo verso il suo abuso ed alla dipendenza sono stati sviluppati dei modelli sperimentali che permettono di valutarne gli effetti gratificanti e/o di discriminare eventuali effetti secondari legati all'*addiction*. In opportune condizioni gli animali di laboratorio possono diventare dipendenti da sostanze e tutti i mammiferi, dal ratto al primate non umano, tendono a produrre se la sostanza è gratificante, delle risposte comportamentali definite "operanti", con le medesime modalità, con cui ne abusa l'uomo (Wise e Hoffman, 1992).

Il modello sperimentale più semplice utilizzato si basa sull'osservazione delle reazioni soggettive (euforia, allucinazioni, rilassamento, etc.) alla somministrazione passiva di una potenziale sostanza d'abuso. Tali effetti sono alla base dei comportamenti di ricerca tipici dell'abuso. Con la *drug discrimination* attraverso somministrazioni ripetute vengono premiati i soggetti che riconoscono una sostanza instaurando così una discriminazione tra sostanza e veicolo; a questo punto vengono effettuati dei test, ad esempio di

agonismo/antagonismo, per contrastare e valutare gli effetti della sostanza (Colpaert, 1999; Solinas et al., 2006).

Gli effetti soggettivi gratificanti o avversivi possono essere studiati per mezzo della *conditioned place preference* (preferenza spaziale condizionata), CPP. Il protocollo consiste nel condizionare i soggetti tramite l'insorgere di un'associazione tra la somministrazione di una sostanza in un unico specifico ambiente e quella del veicolo in un ambiente simile ma distinguibile dal soggetto per alcuni particolari visivi come il colore delle pareti o la struttura e il pavimento delle gabbie sperimentali. Durante il test finale, gli animali hanno libero transito tra i due ambienti e lo sperimentatore valuta la capacità della sostanza di condizionare gli animali attraverso la misurazione del tempo speso nell'ambiente associato alla sua somministrazione (Bardo e Blevins, 2000; Tzschentke, 1998 e 2007;).

### Modelli di autosomministrazione

Per mezzo di questa metodica studiando il comportamento dell'animale è possibile la caratterizzazione delle proprietà di rinforzo di una sostanza e predire la capacità di esserne abusata dall'uomo (Young e Herling, 1986). Infatti, i modelli sperimentali di SA hanno mostrato la maggiore somiglianza nel riflettere la situazione umana e di possedere un significativo grado di validità predittiva (Henningfield et al., 1991; O'Brien e Gardner, 2005). Gli animali da laboratorio, similmente all'uomo, sono capaci, dentro specifiche condizioni sperimentali di autosomministrarsi diverse tipologie di sostanze d'abuso (Collins et al., 1984). Gli studi di auto somministrazione hanno permesso di migliorare le conoscenze sui meccanismi a livello del SNC che guidano il comportamento di ricerca (Koob e Goeders, 1989) e, inoltre, di studiare gli effetti sesso-dipendenti delle sostanze d'abuso e i meccanismi associati con le varie fasi del ciclo della dipendenza,

dall'assunzione iniziale al mantenimento incontrollabile del consumo di droga, alla ricaduta. I modelli animali di SA offrono ambienti controllati in cui il comportamento di ricerca e assunzione può essere studiato senza l'influenza di fattori sociali, culturali o di altro tipo offrendo in tal modo risultati più attendibili.

In generale, l'autosomministrazione della sostanza è permessa arbitrariamente all'animale per mezzo di leve retrattili o un foro associato ad una fotocellula all'interno della gabbia. Solitamente, l'associazione tra l'operatività degli strumenti (stimolo neutro) e l'effetto prodotto dalla sostanza (stato emozionale piacevole) sono sufficienti all'animale per apprendere ed indurlo a ripetere il comportamento: le proprietà gratificanti di una droga sono dedotte dalla misura in cui essa può stabilire e mantenere una risposta abitudinaria nell'animale (Panlilio e Goldberg, 2007). Secondo questo paradigma, la somministrazione della droga è subordinata a una o più pressioni da parte dell'animale su una leva attiva. Una sostanza viene considerata gratificante se il numero di risposte attive aumenta conseguentemente. Questa prima fase del *training* di autosomministrazione è definita come la "fase di acquisizione", durante il quale l'animale impara ad associare la sua pressione sulla leva attiva o l'attività di *nose-poking* con la contingente presentazione del farmaco. Quando si traduce questo comportamento nella situazione umana, la fase di acquisizione rappresenta il passaggio dalla iniziale esperienza al consumo regolare della droga. In genere, l'aumento dell'autosomministrazione della sostanza abusata si stabilizza dopo l'acquisizione. Questa seconda fase del *training* di SA, ossia la "fase di mantenimento", mimerebbe nell'uomo l'instaurarsi con il tempo della dipendenza. Infine, il comportamento può essere estinto con la semplice sostituzione del farmaco con uno stimolo neutro, quale soluzione salina, o più semplicemente scollegando la pompa a siringa, in modo che ogni risposta attiva da parte dell'animale non determini più il rilascio del farmaco. Di conseguenza, gli animali diminuiscono gradualmente la risposta operativa

fino a cessarla del tutto: questa fase si chiama “estinzione”. Indipendentemente dal programma specifico di rinforzo (FR/PR, intervalli fissi o variabili, programma di secondo ordine), il periodo di disponibilità dei farmaci (limitata, prolungata o di accesso intermittente), e il percorso attraverso il quale il farmaco può essere autosomministrato (per via orale, intracerebroventricolare o per via endovenosa), le procedure di SA sono state utilizzate in tutto il mondo nella ricerca preclinica come uno strumento prezioso per predire la potenziale dipendenza psicologica di un farmaco nell'uomo.

### **Gateway hypothesis**

La diversa vulnerabilità alla dipendenza e, l'evoluzione verso sostanze a più alta efficacia psicoattiva o verso l'estinzione della stessa, è condizionata da fattori individuali di tipo neurobiologico e cognitivo comportamentale. Tuttavia, è bene considerare che esistono diversificati gruppi di popolazioni che presentano una diversa attitudine al rischio ed alla sperimentazione e che, una volta entrati in contatto con le sostanze, stimolati e resi sensibili ai loro effetti, possono evolvere in maniera completamente diversa. L'ambiente sociale e quello familiare possono condurre dall'uso occasionale verso la ricerca di altre sostanze e alla dipendenza così come la disponibilità, l'accessibilità e le proprietà bio-tossicologiche della sostanza; alcune droghe potrebbero creare una predisposizione biologica, accorciando i tempi con cui, passando ad una sostanza diversa, si sviluppa un legame di dipendenza.

Le sostanze per le quali si parla di effetto *gateway* sono il tabacco, l'alcol e la *Cannabis*. In particolare, la *Cannabis* per le sue peculiari proprietà e per la sua “maneggevolezza”, può essere droga *gateway* in quanto fa sperimentare al soggetto sensazioni e alterazioni dello stato di coscienza che possono indurlo a reiterare tale comportamento, in quanto

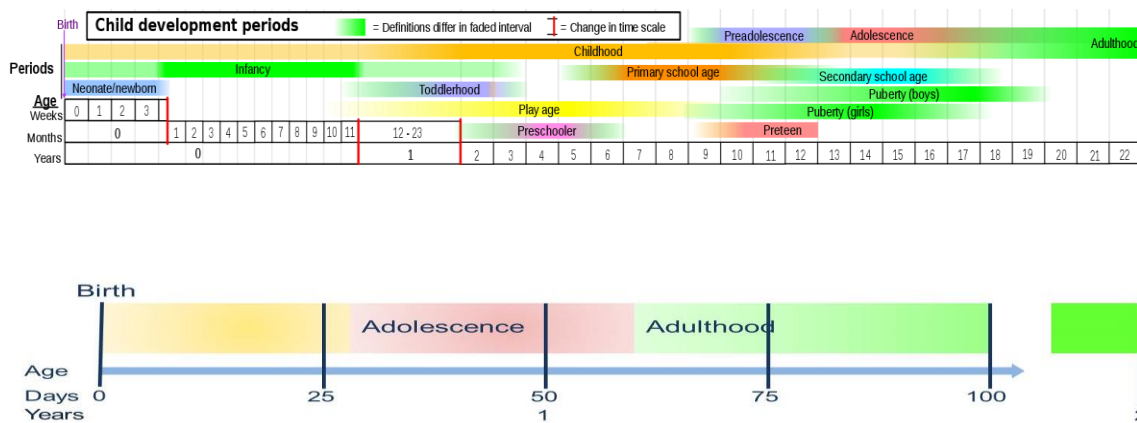
crea una specie di precedente “cerebrale” non nocivo, una sensibilizzazione neuronale in grado di attivare comportamenti d’abuso nel futuro con ricerca di sostanze a maggior attività farmacodinamica. Ovviamente, non tutti quelli che usano *Cannabis* andranno verso una progressione del consumo e quindi sperimenteranno altre sostanze fino a sviluppare dipendenza, ma è risaputo dalle evidenze cliniche che la quasi totalità delle persone dipendenti da eroina ha iniziato la propria storia tossicomana con l’uso di *Cannabis*; chi la usa di solito prova le altre droghe di più, e prima (ad una età minore). E’ anche vero che chi prova la *Cannabis* sotto i vent’anni tende a passare alle altre droghe molto più spesso che non chi la prova in età meno giovane.

La teoria scientifica che sostiene l’ipotesi *gateway* (*Cannabis* come ponte verso eroina/cocaina) è stata proposta in un articolo pubblicato da Science nel 1975 da parte di Denise Kandel della Columbia University (USA). L’analisi rivelava che su un totale di 5468 soggetti tra i 14 e i 18 anni, il 26% dei consumatori di *Cannabis* passarono all’uso di altre sostanze illecite, percentuale che si riduceva all’1% nei soggetti non consumatori (Kandel et al, 1975). Fondamentalmente la teoria del passaggio si basa su delle specifiche osservazioni riguardanti il consumo di *Cannabis*: chi la usa ha più opportunità di usare altre droghe perché l’illiceità stessa della sostanza determina un unico mercato con le altre droghe (fattore ambientale); il rapporto tra l’uso in età precoce di *Cannabis* e quello di altre sostanze è il risultato di un processo individuale di apprendimento e rinforzo nel quale il consumatore, mediante le sensazioni che sperimenta con la *Cannabis*, impara che le droghe hanno molti effetti piacevoli e poco nocivi indirizzandolo verso altre sostanze (Fergusson et al., 1997, 2002 e 2006); l’incremento dell’uso di *Cannabis* può determinare dei cambiamenti a livello cerebrale che aumentano la reattività individuale alle altre sostanze (fattore biochimico).

La *Cannabis*, quindi, sostiene nello sperimentatore l'azione *gateway* perché supporta le seguenti caratteristiche e condizioni correlate alla sostanza stessa: deve essere psicoattiva; deve essere percepita come possibile fonte di piacere; deve produrre un rinforzo positivo ed essere in grado di creare una traccia mnemonica; la sostanza deve generare nell'individuo il desiderio di ricerca di altre sostanze; deve essere stata riscontrata come sostanza di primo uso.

### **Adolescenza e sviluppo cerebrale**

L'OMS definisce l'adolescenza come il periodo della vita che inizia con la comparsa dei primi segni morfo-funzionali e/o psicosociali della pubertà e termina con l'arresto dell'accrescimento somatico. L'adolescenza costituisce una fase di transizione della vita estremamente importante, un periodo durante il quale intervengono nel bambino tutti i cambiamenti fisici, psicologici e sociali necessari a farne un individuo adulto inserito nella società civile (Steinberg, 2010). Rispetto agli adulti, gli adolescenti tendono a percepire meno un eventuale situazione borderline o la avvertono come più controllabile (Bentlin et al., 1993); sono inoltre meno capaci di definire i propri obiettivi e di valutare le proprie decisioni (Byrnes, 2002). Di fatto, l'impulsività e le tendenze a una scarsa capacità decisionale possono rendere gli adolescenti più vulnerabili nei confronti delle dipendenze (Chambers et al., 2003), nonché a una quantità di altre psicopatologie (Steinberg et al., 2005). Studi epidemiologici mostrano che l'adolescenza è un periodo di sviluppo caratterizzato da un aumentato rischio all'abuso di sostanze (Fried et al., 2001; Martin et al., 2002; Patton et al., 2004; Trad, 1994).



**Figura 1.** Le età associate con l'adolescenza sono comunemente considerate nell'uomo all'incirca tra i 12-14 e i 18-20 anni (in alto) e tra il 28° e il 55° giorno dopo la nascita nei roditori (in basso) (Spear, 2000; Dinieri e Hurd, 2012).

Il cervello di un adolescente si trova ancora in una fase di maturazione; le varie aree cerebrali necessitano di tempi differenti per giungere al completo sviluppo e funzionamento. Come è risaputo, l'adolescenza è un periodo caratterizzato da comportamenti correlati all'attitudine al rischio, all'impulsività (Arnett, 1992; Gardner e Steinberg, 2005; Spear, 2000) dove l'emotività gioca un ruolo predominante. Sfortunatamente, tali comportamenti di ricerca di novità e sensazioni sono fortemente predittivi di uso di alcool e droghe tra gli adolescenti (Wills et al, 1994). Dal punto di vista morfologico questi comportamenti si possono relazionare al sistema limbico che media l'emotività e gli impulsi ed in particolare ad un aumento dell'attività del NAc (Kuhnen e Knutson, 2005; Matthews et al., 2004; Montague e Berns, 2002), la quale è esasperata negli adolescenti rispetto ai bambini e agli adulti (Ernst et al., 2005; Galvan et al., 2006); anche gli studi sui modelli di roditori (Laviola et al., 2003) suggerisce un'attività accentuata del NAc alle ricompense durante l'adolescenza. Il sistema limbico, infatti, si sviluppa precocemente, rispetto alla corteccia prefrontale e frontale, che sono le parti legate alla razionalità, alla cognizione, alle funzioni sociali e al linguaggio (Casey et al., 1997 e 2002), le quali maturano più tardi, attorno ai 25 anni (Lenrott et al., 2007;



Sowell et al., 2004). Ciò rende evidente il fatto che negli anni della maturazione l'adolescente viene sbilanciato dalla maggiore forza del sistema del piacere (limbico), rispetto alla forza che può esercitare il controllo della corteccia sugli impulsi primari. Sebbene il cervello nel suo sviluppo segua un modello geneticamente guidato, esperienze di privazione ambientale possono alterare la normale traiettoria di maturazione cerebrale (Giedd, 2004). In generale, le regioni che controllano le funzioni primarie, quali i sistemi motori e sensoriali, maturano prima, mentre le aree associative di ordine più elevato, che integrano le funzioni primarie, maturano successivamente (Gogtay et al., 2004; Sowell et al., 2004). All'inizio dell'adolescenza il cervello va incontro ad un processo di formazione e maturazione delle sinapsi neuronali necessario all'alta specificità delle connessioni cellulari: la sinaptogenesi. Successivamente, inizia il processo di rimodellamento sinaptico per il quale alcune connessioni tra le cellule cerebrali vengono ridotte ed eliminate (*pruning* sinaptico) attraverso lo sfondamento delle sinapsi scarsamente utilizzate (Edelman, 1987) sia nell'uomo che nel ratto (Crews et al., 2007). Questi meccanismi portano alla ridefinizione dei circuiti cerebrali che acquistano maggiore efficienza funzionale. In altre parole, rimangono e si strutturano solo quelle connessioni che vengono effettivamente utilizzate, importanti per la sopravvivenza e per le funzioni ottimali nell'adulto (Bossong e Niesink, 2010; Cohen-Cory, 2002; Katz e Shatz, 1996; Luna, 2009; McDowell, 2009; Whitford et al., 2007).

### **Cannabis e adolescenza**

Il sistema endocannabinoide svolge un ruolo significativo nei processi fondamentali che regolano lo sviluppo dell'individuo dal feto all'adulto e, in particolare, nell'adolescenza (Spear, 2000; Steinberg e Morris, 2001). Questa sua funzione è dovuta al rilascio di cannabinoidi endogeni ed è coinvolta nel controllo della neurogenesi, nella plasticità

sinaptica modificando l'efficienza del funzionamento delle connessioni, di instaurarne di nuove e di eliminarne alcune, nella migrazione e nella specificazione fenotipica dei neuroni immaturi influenzando la formazione di complessi *network* neuronali in molte aree cerebrali comprese la neocorteccia, l'ippocampo, il cervelletto, e i gangli della base (Berghuis et al. 2005, 2007, Fernandez-Ruiz et al. 2000, Galve-Roperh et al. 2007, Harkany et al. 2008, Watson et al. 2008). L'esposizione alla *Cannabis* in questo periodo critico dello sviluppo neurale può alterare i processi di maturazione, e il cervello ancora in corso di sviluppo può essere più vulnerabile agli effetti neurotossici. Numerosi studi suggeriscono che l'uso prolungato di *Cannabis* ad alte dosi possa indurre cambiamenti strutturali cerebrali (Matochik et al, 2005; Welch et al, 2010; Yucel et al, 2008) probabilmente correlati alla precoce età di utilizzo (Arnone et al, 2008; Wilson et al, 2000).

La sovrastimolazione del sistema endocannabinoide alterando la sua capacità modulatoria può deviare o ridurre nell'individuo, il naturale raggiungimento degli equilibri neuronali. Uno studio sulla morfologia cerebrale ha dimostrato che l'uso di *Cannabis* in adolescenza determina una riduzione dei solchi cerebrali in entrambi gli emisferi, oltre ad uno spessore corticale più sottile nel lobo frontale destro. La formazione dei giri e dei solchi del cervello rappresenta un normale processo evolutivo, mentre l'uso di *Cannabis* in giovane età sembra portare ad importanti alterazioni morfologiche e asimmetrie emisferiche, che si manifestano attraverso una rallentata girificazione cerebrale (Mata et al., 2010). Un cervello sotto l'effetto della *Cannabis* sembra infatti rallentare o distruggere il suo normale processo evolutivo, mostrando una morfologia prematura, simile per struttura ad un cervello di età inferiore rispetto alla propria tappa evolutiva.

L'uso di marijuana in adolescenza è stato associato con un aumentato rischio di futuri disordini depressivi o d'ansia (Rey et al. 2004; SAMHSA, 2008) che possono risultare

ancora maggiori se il consumo di *Cannabis* avviene prima dei 15 anni (Hayatbakhsh et al., 2007; Henquet et al., 2006; Van Laar et al., 2007). Alcuni studi hanno mostrato un effetto maggiore della *Cannabis* sugli esiti psicotici tra gli individui che l'hanno usata per la prima volta prima dei 16 anni, rispetto a quelli che hanno iniziato più tardi (Arseneault et al., 2002; Stefanis et al., 2004). Inoltre, durante l'intossicazione da *Cannabis*, i ragazzi hanno un'alterata capacità di giudizio che può contribuire alla messa in atto di comportamenti a rischio (Gruber e Pope, 2002). Ogni deficit cognitivo prodotto dall'assunzione di *Cannabis* in adolescenza (Harvey et al., 2007; Lane et al., 2007; Medina et al., 2007; Schweinsburg et al., 2008) può avere implicazioni non favorevoli per il successivo funzionamento in ambito scolastico (ridotte performance, abbandono), lavorativo (disoccupazione) e sociale anche in età adulta (Linskey e Hall., 2000). Le evidenze suggeriscono che gli individui che iniziano a consumare *Cannabis* in età precoce possono essere più vulnerabili a deficit neuropsicologici duraturi rispetto ai soggetti che hanno iniziato ad usarla successivamente (Porath-Waller 2009).

### **Studi clinici ed epidemiologia**

Le principali evidenze per la *gateway hypothesis* riguardano analisi di coorte e gli studi sui gemelli. È stato ben documentato che l'uso di *Cannabis* negli adolescenti preceda il consumo di altre sostanze illecite (Cleveland et al., 2008). Fergusson e colleghi (2002) in uno studio su 1265 adolescenti australiani seguiti dalla nascita sino ai 21 anni di età, riporta che il consumo di *Cannabis* è associato ad un aumento dei problemi di adattamento nell'adolescenza (uso di altre sostanze, crimini, depressione e comportamenti suicidi) i cui effetti sono più marcati tra i giovani in età scolare con un uso regolare. L'intensità di tale relazione si riduce, ma rimane statisticamente significativa anche dopo il controllo di vari fattori confondenti. Per l'autore, anche il consumo saltuario di

*Cannabis* è effettivamente associato all'uso seguente di altre droghe. In un altro articolo Fergusson (2006) analizza i risultati di una coorte dopo 25 anni di osservazione. All'età di 25 anni il 42% dei soggetti aveva usato altre sostanze oltre alla *Cannabis*; la maggioranza l'aveva usata prima di queste droghe, il 98% nello stesso anno o prima, l'86% almeno un anno prima. L'associazione tra *Cannabis* e l'uso di altre droghe, pur rimanendo consistente, è più elevata a 15 anni per poi diminuire: sembra vi sia un processo di sviluppo in base al quale il suo consumo favorisce la suscettibilità individuale alle altre sostanze che si riduce poi con il crescere dell'età. Tra i vari motivi, ciò potrebbe riflettere una sorta di maturità biologica nella quale il cervello degli adolescenti non è del tutto "completato" ed è più sensibile agli effetti della sostanza. L'autore arriva alla conclusione che il consumo di *Cannabis* gioca un ruolo causale nello sviluppo di altre forme d'abuso (Ferguson et al., 2006). Uno studio su un campione di 18286 soggetti, riporta che i consumatori di Marijuana hanno una probabilità quasi doppia di successivo uso di altre sostanze illecite in età adulta rispetto ai non consumatori (Lessem et al., 2006). Le ricerche condotte sull'uso di stupefacenti tra gli adolescenti negli USA hanno dimostrato in modo consistente l'associazione d'uso di *Cannabis* e altre sostanze illecite: da questi studi vi sono forti evidenze che l'uso di *Cannabis* prima dei vent'anni determini maggiori probabilità di usare successivamente eroina. Per gli autori il consumo di *Cannabis* di per se non è un forte predittore dell'uso di altre sostanze, ma è piuttosto l'inizio precoce e l'uso regolare che vi è fortemente associato; la relazione sarebbe causale perché gli effetti della *Cannabis* aumentano negli adolescenti la propensione a utilizzare altre sostanze illecite (Hall e Lynskey, 2005). Una analisi epidemiologica recente ha concluso che sebbene l'uso regolare di *Cannabis* negli adolescenti è predittivo di un successivo abuso di altre sostanze nei giovani adulti in un rapporto dose-risposta, anche l'età di inizio e l'uso occasionale protratto fino all'età adulta è strettamente correlato ad un aumentato

rischio di consumo di altre sostanze illecite (Degenhardt et al., 2010). Anche un altro studio conferma che la variabile “età di primo utilizzo della marijuana” pare essere quella avente il maggior peso nel passare all’utilizzo di droghe più pesanti (Golub e Johnson, 2002). Un’indagine sulla popolazione americana ha dimostrato che quando il primo utilizzo di *Cannabis* è avvenuto a 14 anni o precedentemente la percentuale di abuso e dipendenza da altre sostanze era più alta rispetto agli individui che hanno iniziato il consumo ad un’età maggiore (SAMHSA, 2005). Lynskey e collaboratori (2003), per verificare la relazione tra uso precoce di *Cannabis* e uso successivo di altre sostanze illecite, tenendo conto di fattori ambientali e predisposizione genetica, analizza un campione di 622 gemelli con primo uso di *Cannabis* in età inferiore a 17 anni. Infatti, se la relazione è causale o spiegata con fattori ambientali per i quali vi sono elementi discordanti tra le coppie di gemelli, ci potremmo aspettare di trovare alti tassi di uso, abuso o dipendenza di altre sostanze sia nei giovani consumatori che nei loro fratelli. L’analisi dei risultati indica che l’uso precoce di *Cannabis* è associato con un sensibile incremento del rischio sia di uso di altre droghe che di abuso o dipendenza. Sia i gemelli monozigoti che dizigoti che avevano utilizzato *Cannabis* presentavano una più alta probabilità rispetto ai loro fratelli gemelli di utilizzare successivamente droghe pesanti: il rischio era da 2 a 4 volte superiore per l’uso di altre sostanze illegali e da 1.6 a 6 volte di sviluppare dipendenza da droga o Alcol. Anche se non si può escludere l’influenza di fattori ambientali non noti, si possono tuttavia escludere fattori genetici e legati all’influenza della famiglia.

## **Evidenze precliniche della teoria del passaggio**

I lavori preclinici disponibili che trattano la “*gateway hypothesis*” sono pochi, e, a tutt’oggi i risultati ottenuti, sul fatto che l’esposizione adolescenziale ai cannabinoidi possa indurre un uso successivo di altre droghe, possono considerarsi definitivi. Le evidenze indicano che i cannabinoidi indurrebbero adattamenti neuronali duraturi che potrebbero alterare la percezione e/o i valori di rinforzo di altre droghe d’abuso, indipendentemente da fattori genetici, sociali o culturali.

I principali studi riguardano le droghe psicostimolanti e gli oppiacei. Rodriguez-Arias e colleghi (2010) riportano un aumento degli effetti di rinforzo dell’MDMA in ratti esposti ai cannabinoidi durante l’adolescenza. Altre evidenze scientifiche mostrano un aumento della suscettibilità all’acquisizione dell’auto-somministrazione di cocaina nei soli ratti femmine adulti sottoposti ad esposizione cronica dell’agonista cannabinoide CP55,940 durante l’adolescenza (Higuera-Matas et al., 2008). Questa suscettibilità alterata potrebbe essere legata ai cambiamenti dell’attività metabolica cerebrale indotta dai cannabinoidi durante l’adolescenza; in particolare, una iper-attivazione della corteccia frontale e una ipofunzionalità della corteccia entorinale amigdaloidea nonché ad un incremento dei livelli del trasportatore della dopamina (DAT) nel caudato putamen (Higuera-Matas et al., 2010). Questo dato è confermato dai risultati ottenuti con i ratti maschi che non presentavano alterazioni nell’IVSA di cocaina e, conseguentemente non mostravano neppure cambiamenti nei livelli di DAT (Higuera-Matas et al., 2008 e 2010). Più recentemente il gruppo della Ellgren (2008) ha dimostrato che l’esposizione adolescenziale al THC ha aumentato l’auto-amministrazione di oppiacei (morfina e eroina) in ratti maschi adulti, e tutto ciò è stato associato con discrete alterazioni del sistema oppioide endogeno nelle stesse popolazioni neuronali limbiche riconosciute nel mediare il comportamento di ricompensa (Biscaia et al., 2008); la *Cannabis*, alterando il

sistema oppiaceo, potrebbe indurre un'elaborazione edonica che promuove l'uso successivo di oppioidi (Ellgren et al., 2007). Questa interpretazione è suggerita dal fatto che la somministrazione cronica di THC durante la pubertà incrementa l'IVSA di eroina nei ratti maschi adulti e aumenta l'm-RNA della pre-proenkefalina esclusivamente nella shell del NAc. Una forma duratura di adattamento neuronale che influenzerebbe le successive risposte alle sostanze d'abuso si verifica nei neuroni dopaminergici della VTA dopo trattamento subcronico con cannabinoidi durante l'adolescenza (Pistis et al., 2004). I ratti svilupparono una tolleranza crociata alla somministrazione acuta di cannabinoidi, alla morfina, cocaina e amfetamine. È noto che i recettori CB<sub>1</sub>, μ e D<sub>2</sub> hanno in comune analoghe G proteine di tipo inibitorio ed effettori e la stimolazione CB<sub>1</sub> subcronica potrebbe disregolare le comuni cascate di trasduzione del segnale (Pistis et al. 2004). La minore responsività dei neuroni dopaminergici indotta dalla *Cannabis* potrebbe riflettersi in una riduzione delle risposte agli stimoli naturali gratificanti e motivazionali che determinerebbero in ultima analisi una maggiore vulnerabilità all'abuso di droghe più pesanti.

Un recente studio condotto nel 2010 mette in relazione gli effetti dell'esposizione al THC durante il periodo critico di maturazione cerebrale adolescenziale correlandoli alle differenze di sesso nell'adolescenza e nell'età adulta (Burston et al., 2010); questo lavoro analizza da un punto di vista biochimico negli animali da laboratorio ciò che potrebbe verificarsi nell'uomo e nella donna. L'obiettivo primario di questo studio era di valutare l'adattamento del recettore CB<sub>1</sub> dei cannabinoidi dopo il trattamento ripetuto con il THC in ratti adolescenti rispetto agli adulti e alle femmine. La somministrazione di THC produce desensibilizzazione e *down-regulation* del recettore CB<sub>1</sub> in tutti e quattro gruppi, coerentemente con studi precedenti condotti nei ratti maschi adulti (Breivogel et al., 1999; Sim-Selley, 2003), ma il presente studio ha mostrato differenze di età e sesso-dipendenti

nella intensità della desensibilizzazione dei recettori CB<sub>1</sub> dopo il trattamento ripetuto con THC. I ratti adolescenti di sesso femminile hanno mostrato il maggior grado di desensibilizzazione in tutte le regioni cerebrali, il che suggerisce che gli adolescenti, in particolare le femmine, potrebbero essere particolarmente sensibili agli effetti dell'uso ripetuto di marijuana sul sistema endocannabinoide. Tuttavia, se la desensibilizzazione e la *down-regulation* dei CB<sub>1</sub> si verificasse negli adolescenti, come avviene nei ratti, le conseguenze dell'uso cronico di marijuana durante questa finestra critica di maturazione sinaptica potrebbe avere profonde conseguenze nel proseguo della vita. Alla luce dei dati provenienti da studi precedenti, l'aumentata suscettibilità alla desensibilizzazione nelle donne adolescenti potrebbe derivare da interazioni tra il THC (e dei suoi metaboliti) e gli endocannabinoidi; infatti, è noto che il THC può essere differenzialmente metabolizzato nei suoi metaboliti attivi e inattivi nei ratti maschi o femmine (Narimatsu et al., 1991), suggerendo che i livelli più elevati di metaboliti attivi nelle femmine possono contribuire ai loro maggiori effetti comportamentali indotti dal THC (Tseng et al., 2004).

Presi insieme, questi studi indicano che l'esposizione alla *Cannabis* durante la giovane età potrebbe avere un effetto *priming* sul cervello e rendere i consumatori di *Cannabis* più sensibili agli effetti di altre droghe illecite. Nonostante una forte evidenza suggerisca che i cannabinoidi inducono alterazioni neurobiologiche nelle vie della ricompensa comuni durante questo periodo critico, questi risultati, non escludono la possibilità che altri fattori come la predisposizione genetica, sociale e l'ambiente potrebbero influenzare questi effetti dei cannabinoidi migliorando, attenuando o facilitando l'ulteriore progressione nel consumo di sostanze illecite.



## Scopo della ricerca

L'obiettivo di questo studio è di valutare se l'esposizione alla *Cannabis* durante l'adolescenza attraverso il suo principale metabolita psicoattivo, il THC, sia in grado di alterare il comportamento di assunzione della sostanza d'abuso tale da determinare una maggiore vulnerabilità alla stessa *Cannabis* o ad altre sostanze, come eroina e nicotina, in età adulta nell'animale di laboratorio. Attraverso gli stessi studi comportamentali si vuole indagare inoltre se l'esposizione al THC sia in grado di aumentare il rischio di iniziare, continuare l'uso e diventare dipendenti dai cannabinoidi o da altre sostanze d'abuso in età adulta in maniera differente nel sesso maschile o femminile.

Lo studio è condotto su animali da laboratorio utilizzando un modello sperimentale di dipendenza da farmaci (l'autosomministrazione endovenosa, IVSA) in soggetti di sesso maschile e femminile. Tutti gli esperimenti di autosomministrazione con l'agonista sintetico dei recettori CB<sub>1</sub>, il WIN 55,212-2, l'eroina e con la nicotina saranno effettuati con l'utilizzo di ratti in età adulta maschi e femmine dopo essere stati esposti al THC durante la loro adolescenza, e sui rispettivi gruppi di controllo trattati con il veicolo del THC. Si studieranno diverse fasi del comportamento di IVSA, dall'iniziale acquisizione sino al mantenimento di un'assunzione stabile; come indici principali di vulnerabilità all'abuso delle sostanze suddette si considereranno le modalità di acquisizione ed il mantenimento di un comportamento stabile di autosomministrazione.

## Materiali e Metodi

Gli esperimenti e le procedure utilizzate sono state approvate dal comitato etico locale per la sperimentazione animale (Università degli studi di Cagliari) e sono stati condotti in conformità con le linee guida per la cura e la salute dell'animale da laboratorio del *National institute of Health* (NIH) e della direttiva del Consiglio della Comunità Economica Europea del 24 novembre 1986 (86/609; DL27/01/92, numero 116) per l'utilizzo di animali nella ricerca. Ogni azione possibile è stata eseguita per minimizzare la sofferenza animale nonché per ridurre il numero di animali utilizzati. La salute degli animali è stata monitorata giornalmente dagli sperimentatori e periodicamente da un consulente veterinario.

### Animali

Ratti adolescenti maschi Sprague Dawley e Lister hooded, di età corrispondente al 38mo giorno dalla nascita (post-natal day 38), del peso di 175–200 g (Harlan Italy, Udine) e, ratti adolescenti femmine degli stessi ceppi, di 28 giorni dalla nascita (PND 28), del peso di 100-150 g sono stati alloggiati all'arrivo in numero di 4 per gabbia e mantenuti in condizioni ambientali costanti (temperatura  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidità 55–60%) ed a ciclo invertito giorno/notte di 12h (luce spenta alle 7:00 AM). Gli animali sono stati manipolati giornalmente per circa 10 minuti durante la prima settimana dopo l'arrivo per l'ambientamento. Acqua e cibo standard (3% kcal di grassi, 61% kcal di carboidrati, 16% kcal di proteine, 20% umidità, contenente 2.9 kcal g<sup>-1</sup>, Safe, Francia) furono disponibili *ad libitum*, eccetto durante gli esperimenti di auto-somministrazione dove l'*intake* di cibo

era limitata a 20 g al giorno (vedi sotto). Gli esperimenti sono iniziati dopo una settimana di recupero dall'intervento chirurgico e sono stati condotti all'inizio del ciclo invertito.

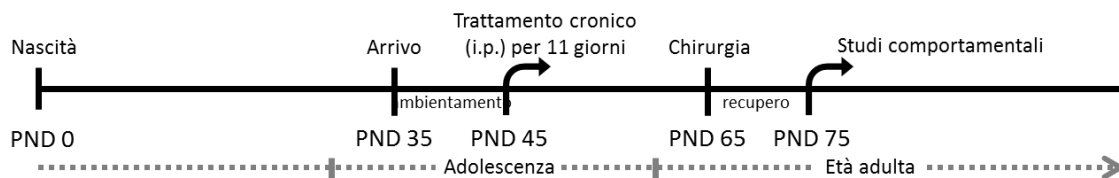
## **Sostanze**

Il THC (delta-9-tetraidrocannabinolo) (Dronabinol<sup>®</sup>, 1g/ml; THC Pharm GmbH, Germania) è stato scaldato a 70 °C, dissolto in etanolo (1:6, v/v) e poi diluito nella soluzione finale con una soluzione salina sterile allo 0.9% (96% salina, 2% THC, 2% EtOH). L'eroina (3,6-diacetyl-morphine Hydrochloride) (Sigma Aldrich, Italia) è stata sciolta in una soluzione salina sterile allo 0.9%, mentre il WIN 55,212-2 ([R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl) methyl] pyrrolol [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-yl]-(1-naphthalenyl) methanone mesylate]) (Tocris, Bristol, Regno Unito) è stato sciolto in una goccia di Tween 80 e diluito in una soluzione salina sterile allo 0.9%. Durante il *training* di autosomministrazione, l'eroina, la nicotina ed il WIN 55,212-2 sono stati diluiti in una soluzione salina sterile contenente eparina (1%). Al fine di garantire la sterilità la soluzione di farmaco è stata filtrata prima dell'uso per mezzo di siringhe con filtro sterile da 20 µm (Corning<sup>®</sup> incorporated, NY 14831).

## **Trattamento cronico in adolescenza**

Questo paradigma è stato utilizzato per simulare il consumo di *Cannabis* normalmente osservato negli adolescenti (Realini et al., 2009). Il trattamento inizia durante l'adolescenza rispettivamente al 35 giorno per i ratti femmine (PND 35) e al 45 giorno dalla nascita per i maschi (PND 45) e continua consecutivamente per 11 giorni (PND 45 e 55, rispettivamente per femmine e maschi). Gli animali ricevono due iniezioni giornaliere intraperitoneali (i.p.) (9:00 e 17:00) di dosi crescenti di THC da 2.5 mg/kg (PND 35-37 e

45-47), 5 mg/kg (PND 38-41 e 48-51) e 10 mg/kg (PND 42-45 e 52-55). Il gruppo di controllo ha ricevuto la soluzione veicolo del THC (salina/EtOH, 98:2, v/v). Questa dose moderata di  $\Delta^9$ -THC è sufficiente per indurre significative differenze comportamentali nell'autosomministrazione di eroina, nicotina e WIN 55,212-2, nonché alterazioni molecolari durature durante l'età adulta.



**Figura 2.** Diagramma temporale che mostra il protocollo sperimentale in relazione al periodo dell'adolescenza (trattamento cronico) e l'età adulta (studio comportamentale)

## Chirurgia

Due settimane dopo la fine del trattamento cronico con il THC, gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano/ossigeno (2.5%–4.5%) (MERIAL Italia S.p.A., Milano) e sono stati sottoposti ad intervento chirurgico per i successivi esperimenti di autosomministrazione. Tutti gli antibiotici, anestetici e medicinali sono stati acquistati in confezioni sterili da distributori locali.

In condizioni di sterilità, un catetere (Brian Fromant/CamCath, Cambridge, Regno Unito), costituito da un tubo di silastic (10 cm, ID 0.30 mm × OD 0.64 mm) e rivestito

internamente con una pellicola di soluzione eparinata TDMAC – Heparin complex (Polysciences Inc., Warrington, PA) per prevenire la formazione di coaguli di sangue, è stato cronicamente impiantato nella vena giugulare destra (Van Dongen et al., 1990) e fissato con dei punti di sutura; l'altra estremità, che presenta il raccordo per il tubo d'infusione della sostanza, è stata incanalata sottocute e fatta uscire sul dorso del ratto, posteriormente alle scapole. Dopo la chirurgia, ogni ratto è stato alloggiato singolarmente, con cibo e acqua liberamente disponibili e tenuto sotto cure antibiotiche per cinque giorni (0.1 ml/s.c., Baytrill, Bayer) come trattamento post-chirurgia per prevenire eventuali infezioni. Agli animali è stato dato un minimo di sette giorni di ricovero post-operatorio prima di iniziare la sessione sperimentale. I cateteri sono stati perfusi giornalmente con una soluzione salina eparinizzata (300 UI/ml; 0.1 ml/ratto). All'inizio del *training* di autosomministrazione è stata testata la pervietà di ogni catetere con una singola iniezione endovenosa (i.v.; 0.1–0.2 ml) di Propofol 10 mg/ml (2,6-Diisopropylphenol) (SAFC® Global, Irlanda), un barbiturico anestetico di veloce induzione e breve durata. I ratti che hanno mostrato un comportamento di “freezing” in risposta al Propofol, indicano che il catetere è aperto e funzionale.



**Figura 3.** Diagramma temporale che mostra le varie fasi del modello animale di autosomministrazione endovenosa (IVSA)

## **Autosomministrazione endovenosa**

### **Apparato**

L'apparato per il comportamento operante che utilizza la pressione di una leva come risposta al test, è costituito da 12 gabbie sperimentali standard ( $29.5 \times 32.5 \times 23.5$  cm; Med Associates, St Albans, VT, USA) poste dentro box di legno, in modo da isolare da luci e suoni gli animali, e dotati di un ventilatore per l'aerazione. Il pannello frontale contiene due leve retrattili della larghezza di quattro centimetri ciascuna che si estendono all'interno della gabbia per 1,5 cm e distanti tra loro 12 cm. Un led giallo, utilizzato come stimolo luminoso è posto 5 cm sopra ogni leva mentre una luce bianca che illumina la gabbia, costantemente accesa tranne che durante l'infusione si trova sulla parete opposta. Durante la sessione sperimentale una pompa di infusione, gestita per mezzo di un *software* (Med Associates), è collegata per mezzo di un tubo di polietilene ad uno *swivel* posizionato su un braccio basculante che permette all'animale di muoversi liberamente nella gabbia operante; dallo *swivel* si diparte un altro tubo di polietilene racchiuso in una molla metallica girevole che si connette sul catetere posto sul dorso dell'animale tramite avvvitamento. Le pompe di infusione sono posizionate esternamente ad ogni box. L'infusione della sostanza sarà determinata da un'unica pressione sulla leva definita come attiva (Protocollo *Fixed ratio 1* – FR1); nel dettaglio la pressione sulla leva retrattile produrrà: (1) estinzione della luce bianca e accensione dello stimolo led sopra la leva attiva per la durata di cinque secondi, (2) ritrazione di entrambe le leve per 20 secondi (periodo di *time-out*, TO) e (3) attivazione della pompa di infusione per 5.8 s, tempo necessario per iniettare la sostanza in soluzione nel sistema venoso dell'animale (0,1 ml di soluzione  $30 \mu\text{g kg}^{-1}$  di eroina o nicotina e 0,1 ml di soluzione  $12.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  di WIN 55,212-2). Al termine del periodo di *time-out*, entrambe le leve riprendono la posizione originaria, la luce stimolo si spegne e si riaccende la luce ambientale. La

pressione sull'altra leva (definita come inattiva) non ha effetti sulla pompa. Infatti, la sua pressione, non determina alcuna infusione di sostanza ma viene tuttavia sempre registrata al fine di verificare se ci sono effetti non specifici sugli animali. L'assegnazione della leva attiva associata al rilascio della sostanza o di quella inattiva (non associata) è controbilanciata tra gli animali e rimane costante per ogni ratto durante tutto lo studio. Durante ogni sessione giornaliera, il protocollo sperimentale, la raccolta dati e lo stoccaggio degli stessi viene attuato per mezzo di un interfaccia tra il *software* Med-PC (Med Associates) è un *computer* IBM compatibile.

### **Procedura sperimentale**

Gli esperimenti di auto-somministrazione di WIN 55,212-2, eroina o nicotina sono stati condotti in accordo con i protocolli pubblicati e precedentemente descritti (Fattore et al., 2001 e 2007). Ogni gruppo sperimentale (trattamento in adolescenza con il THC o con il veicolo) include dai sei ai dodici animali. Una volta completamente recuperati dalla chirurgia (7-10 giorni) e in corrispondenza con l'età adulta (PND 75), gli animali iniziano le sessioni sperimentali per sei giorni alla settimana ad un orario che rimane costante durante la fase di buio del ciclo (tra le 9:00 e le 13:00). L'apporto di cibo è stato ridotto per diminuire il peso corporeo degli animali del 18% in modo da facilitare l'apprendimento del comportamento di auto-somministrazione (De vaca e Carr, 1998); dopo ogni sessione, i ratti ricevono 20 g/giorno di cibo standard direttamente nella loro gabbia di stabulazione. L'inizio della sessione di auto-somministrazione è segnalata dall'accensione della luce ambientale della gabbia operante. La pervietà del catetere è stata controllata prima e dopo ogni sessione sperimentale attraverso il passaggio di 0.1 ml di soluzione salina sterile contenente eparina (1%).

### **Acquisizione del comportamento di auto-somministrazione**

Il *training* di autosomministrazione inizia dando libero accesso all'eroina (30 µg/kg/inf) o WIN 55-212,2 (12.5 µg/kg/inf) per due ore al giorno e alla nicotina (30 µg/kg/inf) per un ora sotto un programma di rinforzo a rapporto fisso (FR-1) a cui una sola pressione corrisponde una sola risposta come precedentemente descritto (Fattore et al., 2001 e 2007) con i ratti che imparano a premere la leva attiva per ricevere una contigua infusione (100 µl) di sostanza. Durante le prime sessioni sperimentali per facilitare l'apprendimento gli animali hanno ricevuto un *priming* di infusione nella camera sperimentale prima dell'inizio della sessione. La durata della fase di acquisizione è variata a seconda della sostanza utilizzata: in ogni caso, solo gli animali che hanno mostrato una forte discriminazione per la leva attiva rispetto a quella inattiva hanno proseguito lo studio, i ratti che non hanno raggiunto i criteri di acquisizione sono stati esclusi dalle seguenti fasi sperimentali.

### **Mantenimento del comportamento di auto-somministrazione**

Solo gli animali che hanno raggiunto una stabile assunzione di sostanza continuano le sessioni di auto-somministrazione endovenosa. La stabilità è stata definita come un *trend* costante nel numero di infusioni auto-somministrate di almeno quattro sessioni consecutive. Quindi o fintanto che i cateteri sono pervi, come l'assunzione giornaliera di sostanza si stabilizza in un *range* pari o minore al 15% i ratti proseguono le sessioni sperimentali per un'ulteriore settimana per poi passare alla fase successiva dello studio.



## 6. Analisi statistica

È stato registrato il numero cumulativo di risposte su entrambe le leve attiva e inattiva durante la sessione di 120 minuti per l'eroina ed il WIN 55,212-2 e di 60 minuti per la nicotina ed i risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media per il gruppo di trattamento in adolescenza con il THC e per il gruppo di animali che hanno ricevuto il veicolo in adolescenza. L'analisi statistica dei dati riguardanti il comportamento operante di auto-somministrazione del WIN 55,212-2, eroina o nicotina è stata calcolata usando l'analisi a una o due vie della varianza (ANOVA), usando il trattamento e le sessioni come fattori, seguita dal test di Newman-Keuls o Bonferroni post-hoc test per paragonare le medie individuali. Con l'eccezione dei primi giorni del periodo di *training*, la risposta a seguito della pressione sulla leva inattiva è stata costantemente minima e quindi non è stata inserita nell'analisi dei dati. In tutti i casi le differenze con una  $P \leq 0.05$  sono state considerate significative.

# Risultati

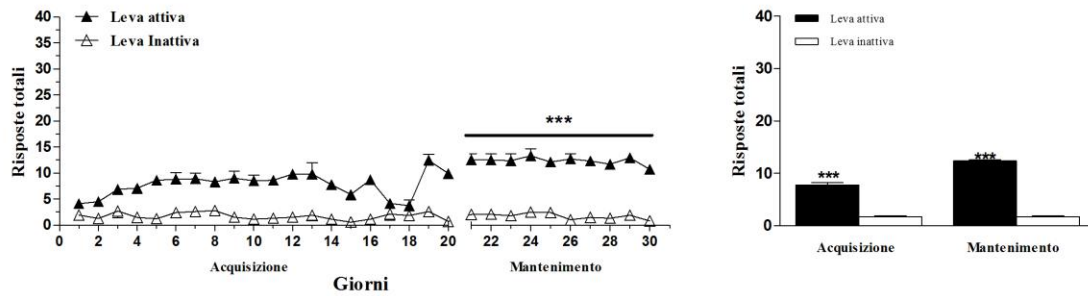
## 1. Effetto del trattamento cronico in adolescenza sul comportamento di autosomministrazione nei ratti maschi adulti

### Autosomministrazione di nicotina

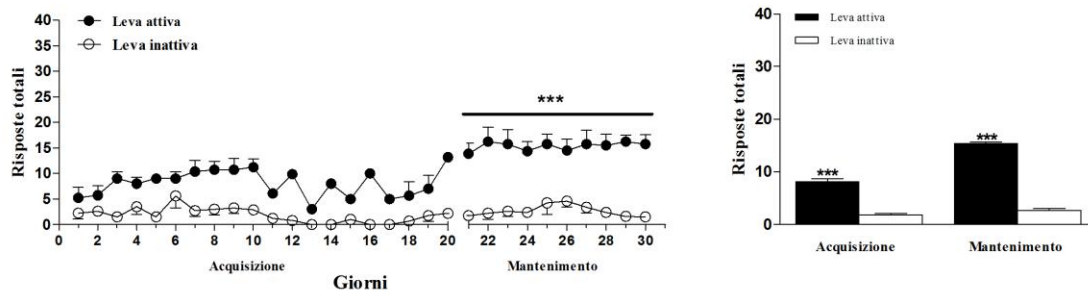
La **Figura 4** mostra l'andamento temporale della media delle pressioni sulla leva attiva e su quella inattiva durante le fasi di acquisizione e di mantenimento dell'autosomministrazione di nicotina nei due gruppi di ratti esposti durante l'adolescenza al trattamento cronico con il THC (in alto a sinistra) o con il suo veicolo (in basso a sinistra). In entrambi i gruppi la fase di acquisizione dura circa tre settimane, durante le quali si osserva un aumento graduale del numero delle pressioni sulla leva attiva che poi si stabilizza intorno al 20 giorno di *training*. Gli istogrammi sulla destra mostrano la media delle pressioni sulla leva attiva e quella inattiva per entrambi i gruppi di trattamento durante la fase di acquisizione (20 giorni) e di mantenimento (10 giorni).

L'analisi statistica (ANOVA a una via seguito dal Tukey's multiple comparison test) indica un aumento significativo del comportamento operante degli animali durante la fase di mantenimento rispetto al precedente periodo di *training* (numero di pressioni sulla leva attiva:  $15.4 \pm 2.7$  vs  $8.1 \pm 1.8$  per il gruppo di controllo;  $12.3 \pm 1.7$  vs  $7.8 \pm 1.7$  per il gruppo THC).

### Gruppo THC (PND 45-55)



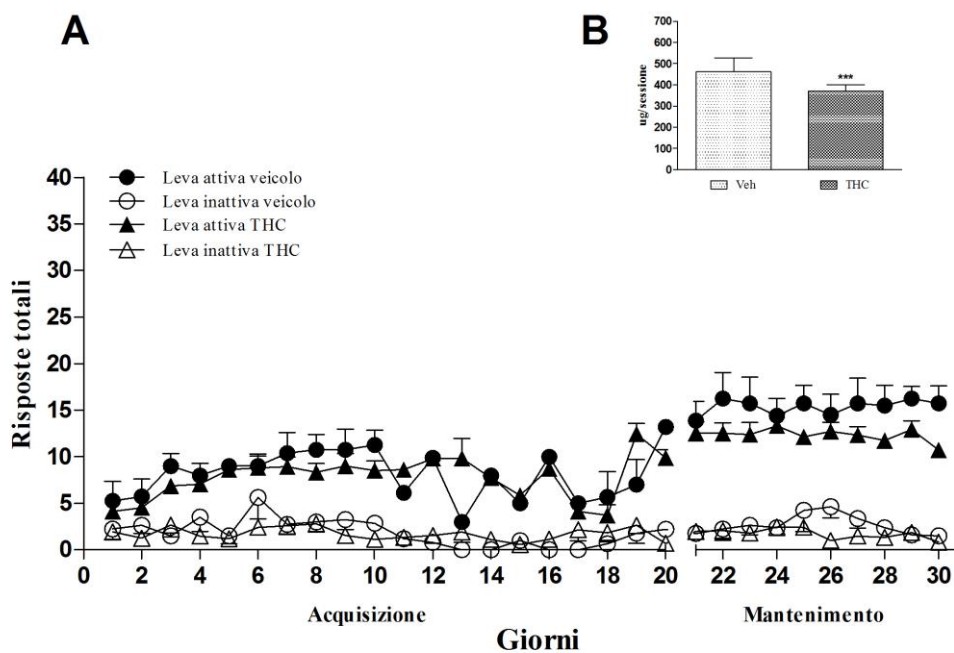
### Gruppo Veicolo (PND 45-55)



**Figura 4.** Fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di auto-somministrazione di nicotina (30 µg/kg/iniezione) in ratti maschi Sprague Dawley adulti trattati durante l'adolescenza con il THC (n=15) o il veicolo (n=8). *Sinistra:* i dati sono espressi come media ± SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di un'ora. \*\*\*P< 0.0001 vs la corrispondente leva inattiva. *Destra:* media delle pressioni sulle leve retrattili durante la fase di acquisizione e mantenimento dell'autosomministrazione di nicotina. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva.

La percentuale di animali che hanno acquisito un comportamento stabile di autosomministrazione di nicotina è stata del 71% per il gruppo esposto in adolescenza al THC e del solo 36% per il gruppo di controllo esposto al veicolo durante l'adolescenza. Tuttavia, una volta acquisita una stabile autosomministrazione di nicotina, il comportamento operante non differisce in maniera significativa nei due gruppi di animali trattati in adolescenza con il THC o il veicolo. Come illustrato in **Figura 5**, infatti, il comportamento operante del gruppo trattato con THC (nero) è ampiamente sovrapponibile a quello degli animali di controllo (bianco) durante la fase di acquisizione. Di conseguenza, la quantità di nicotina autosomministrata durante la fase di acquisizione

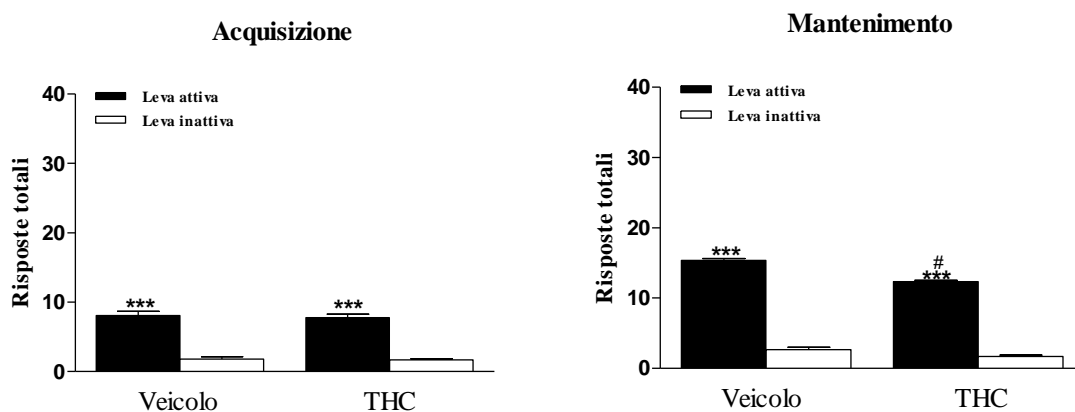
è in media del tutto simile tra i due gruppi ( $234 \pm 27 \mu\text{g}$  vs  $243 \pm 39 \mu\text{g}$  per i gruppi THC e Veicolo, rispettivamente). Durante la fase di mantenimento, invece, la quantità media di nicotina risulta significativamente ( $P < 0.0001$ ) maggiore nel gruppo di controllo (fig. 2B), con un'assunzione di nicotina pari a  $461 \pm 65 \mu\text{g}$  e  $370 \pm 29 \mu\text{g}$  rispettivamente nel gruppo di controllo e nel gruppo pre-trattato con il THC.



**Figura 5.** Confronto del comportamento di auto-somministrazione di nicotina ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) in ratti maschi Sprague Dawley adulti trattati durante l'adolescenza con il THC ( $n=15$ ) o il veicolo ( $n=8$ ). A: I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di 1 ora. B: Nicotina totale assunta nell'arco di dieci sessioni consecutive durante la fase di mantenimento dell'autosomministrazione. \*\*\* $P < 0.0001$  vs gruppo di controllo (t-tests).

La **Figura 6** mostra la discriminazione tra leva attiva e leva inattiva nelle fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di autosomministrazione di nicotina nei gruppi di animali pre esposti al THC o al veicolo durante l'adolescenza. Durante la fase di acquisizione (sinistra) entrambi i gruppi di animali apprendono il comportamento di auto-somministrazione con un comportamento operante pressoché identico. Nel periodo di

mantenimento (destra) aumenta il divario tra la media delle pressioni sulla leva attiva e su quella inattiva in entrambi i gruppi, con un aumento del numero medio di pressioni sulla leva attiva che risulta significativamente maggiore (+25%) nel gruppo di controllo rispetto al gruppo pre-trattato con il THC.



**Figura 6.** Acquisizione (*sinistra*) e mantenimento (*destra*) del comportamento di auto-somministrazione di nicotina (30 µg/kg/iniezione) in ratti maschi Sprague Dawley adulti trattati durante l'adolescenza con il THC (n=15) o il veicolo (n=8). Ogni istogramma rappresenta la media ± SEM del numero di pressioni sulla leva attiva e inattiva durante ogni sessione giornaliera di un'ora per ogni fase del comportamento di auto-somministrazione. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva; #P<0.0001 vs la leva attiva del gruppo di controllo.

## **Autosomministrazione di eroina**

La percentuale di animali che hanno acquisito il comportamento di auto-somministrazione è pari al 92% per ciascun gruppo di pre-trattamento in adolescenza. Alcuni animali non hanno mai mostrato un comportamento operante durante le sessioni sperimentali giornaliere mentre alcuni altri hanno iniziato l'auto-somministrazione di eroina ma non hanno mai raggiunto un'assunzione costante della droga e per tale motivo sono stati esclusi dallo studio. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, una volta raggiunta una stabile risposta, gli animali hanno mantenuto il comportamento operante per tutta la durata degli esperimenti (**Figura 7**).

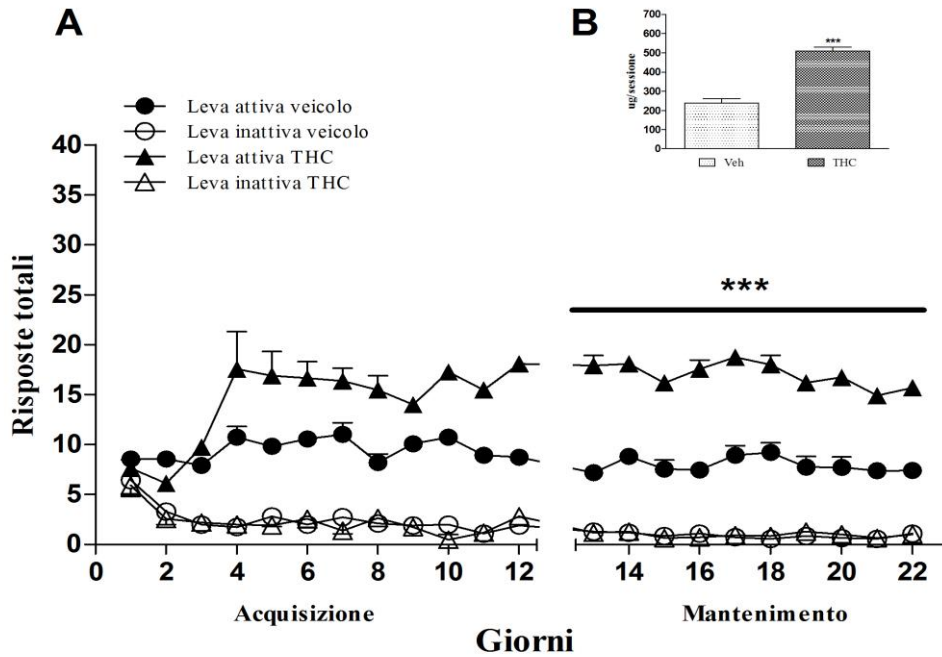
La **Figura 7.A** mostra l'andamento del tasso medio di risposta per ogni gruppo di trattamento nell'adolescenza durante i 22 giorni consecutivi di autosomministrazione di eroina. Gli animali sviluppano un forte autosomministrazione di eroina aumentando la pressione sulla leva attiva a partire dalla quarta sessione di allenamento e stabilizzando la quantità di sostanza assunta a partire dal decimo giorno di *training*. In particolare, la fase di acquisizione si è caratterizzata nelle prime sessioni giornaliere dal non mostrare chiare differenze tra tutti i gruppi esaminati: il livello iniziale di assunzione ( $242 \pm 20 \mu\text{g}$ ), corrispondeva ad una media di  $8.1 \pm 0.7$  di risposte attive per entrambi i gruppi. La rapida acquisizione del comportamento di auto-somministrazione da parte degli animali si osserva già nella prima settimana di sessioni giornaliere quando c'è un drastico aumento del numero medio di infusioni nel gruppo di ratti trattati in adolescenza con il THC ( $17.23 \pm 3.08$ ) con una forte discriminazione nella pressione della leva attiva rispetto alla leva inattiva (89%).

L'analisi *post-hoc* ha indicato che, dal giorno 4 in poi, la differenza nei tassi medi di risposta tra il gruppo THC ed il gruppo di veicoli calcolata dalla 4 sessione alla 12ma è diventata più pronunciata, con i ratti pre-esposti al THC che hanno aumentato il numero

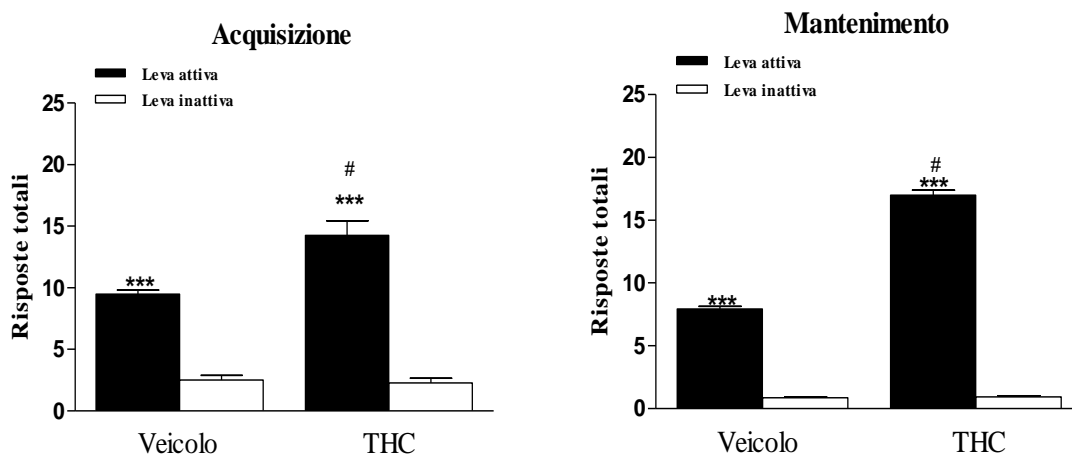
di pressioni sulla leva attiva ad un livello significativamente superiore ( $P < 0.0001$ ) rispetto agli animali di controllo (+39%). Questo comportamento operante di intensità crescente col trascorrere nel tempo specificatamente sulla leva attiva (l'attività su quella inattiva rimane a livelli nominali) indica che l'aumento della risposta è verosimilmente volto esclusivamente alla ricerca della sostanza da parte degli animali. In queste sessioni sperimentali è particolarmente evidente la maggiore risposta operativa del gruppo trattato con THC in adolescenza rispetto al gruppo di controllo. In particolare, è evidente come nel gruppo di controllo la dose giornaliera assunta rimane praticamente costante per tutto il periodo di *training*, sebbene con un valore inferiore rispetto al gruppo pre-esposto al THC ( $296 \pm 22$  vs  $492 \pm 43$   $\mu\text{g}$ ) raggiungendo un comportamento stabile di auto-somministrazione di eroina al decimo giorno della fase di acquisizione ( $F_{(11,220)} = 5.07$ ,  $P < 0.0001$ ).

I risultati ottenuti durante i dieci giorni della fase di mantenimento del comportamento di autosomministrazione di eroina sono riportati nella **Figura 7.B** per entrambi i gruppi di trattamento. Entrambi i gruppi di animali esibiscono in modo significativo un più alto e costante comportamento operante confermato da una quasi totale assenza di pressioni sulla leva inattiva e stabili livelli di assunzione giornaliera di eroina.

Rispetto al gruppo di controllo, i ratti pretrattati con il THC mostrano una risposta media significativamente ( $F_{(1,180)} = 124.86$ ,  $P < 0.0001$ ) superiore (+54%) e la quantità media di droga assunta durante le 10 sessioni consecutive di mantenimento è stata pari a  $510 \pm 19$  e  $238 \pm 23$   $\mu\text{g}$  rispettivamente per il gruppo pre-esposto al THC ed il gruppo di controllo.



**Figura 7.** Confronto del comportamento di auto-somministrazione di eroina (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) in ratti maschi Sprague Dawley adulti trattati durante l'adolescenza con il THC o il veicolo (n=11/gruppo). A: I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore. \*\*\*P<0.001 vs gruppo di controllo e la corrispondente leva inattiva (ANOVA a due vie seguita dal test *post hoc* di Bonferroni). B: Eroina totale assunta calcolata su dieci sessioni consecutive con una risposta operante stabile durante la fase di mantenimento dell'autosomministrazione. \*\*\* P<0.0001 vs gruppo di controllo (t-test).



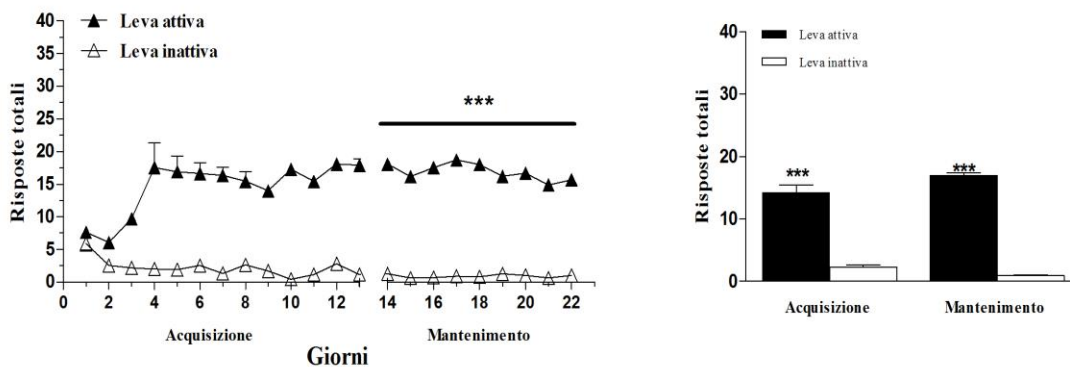
**Figura 8.** Acquisizione (*sinistra*) e mantenimento (*destra*) del comportamento di auto-somministrazione di eroina (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) in ratti maschi Sprague Dawley adulti trattati durante l'adolescenza con il THC (n= 11) o il veicolo (n= 11). Ogni istogramma rappresenta la media  $\pm$  SEM del numero di pressioni sulla leva attiva e inattiva durante ogni sessione giornaliera di un'ora per ogni fase del comportamento di auto-somministrazione. \*\*\*P< 0.0001 vs la corrispondente leva inattiva; #P< 0.0001 vs la leva attiva del gruppo di controllo.



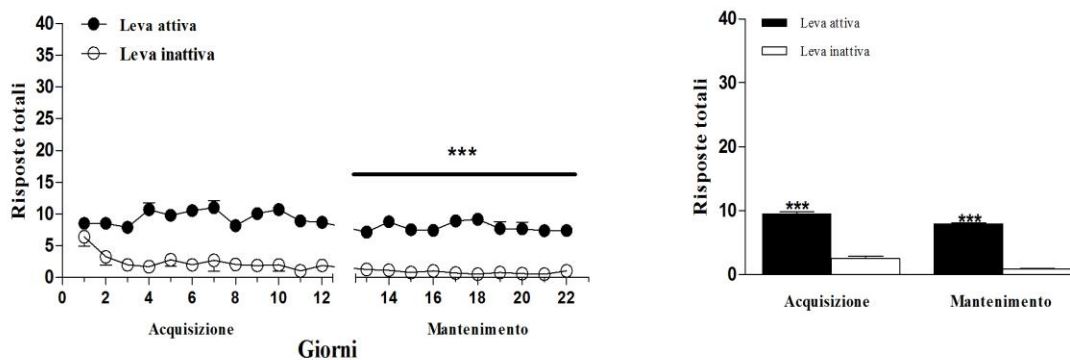
La **Figura 8** mostra la discriminazione nell'attività di pressione della leva attiva e inattiva nelle fasi di autosomministrazione di eroina (acquisizione e mantenimento) nei gruppi di animali trattati con THC o veicolo in adolescenza. Durante la fase di acquisizione (**Figura 8. sinistra**) entrambi i gruppi di animali pre-esposti apprendono il comportamento di auto-somministrazione: la pressione media sulla leva inattiva ottenuta su 12 giorni consecutivi di sessioni sperimentali rimane costante in entrambi i gruppi, mentre si comincia ad osservare una maggiore attività sulla leva attiva ( $14.3 \pm 2.3$  vs  $9.5 \pm 2.5$ ) a sostegno del gruppo di pre-esposizione al THC (+34%). Nel periodo di mantenimento, corrispondente a dieci sessioni sperimentali consecutive (**Figura 8. destra**), aumenta il divario tra il numero medio di pressioni sulla leva attiva e sulla inattiva in entrambi i gruppi. Mentre però nel gruppo di controllo il divario è dovuto principalmente ad una riduzione della pressione sulla leva inattiva, nel gruppo trattato con il THC questa riduzione è accompagnata da un ulteriore aumento della pressione sulla leva attiva da parte degli animali.

Confrontando le due fasi (**Figura 9**) si può osservare che il gruppo esposto al veicolo durante l'adolescenza mantiene una attività di pressione della leva attiva pressoché costante ( $9.5 \pm 2.5$  vs  $7.9 \pm 0.9$ ). Nel gruppo trattato con il THC vi è un aumento (+16%) della risposta operativa tra la fase di acquisizione e quella di mantenimento, come indicato dalle rispettive medie  $14.3 \pm 2.3$  e  $17 \pm 0.9$ , mentre il numero medio di pressioni sulla leva inattiva si riduce gradualmente nel tempo.

### Gruppo THC (PND 45-55)



### Gruppo Veicolo (PND 45-55)



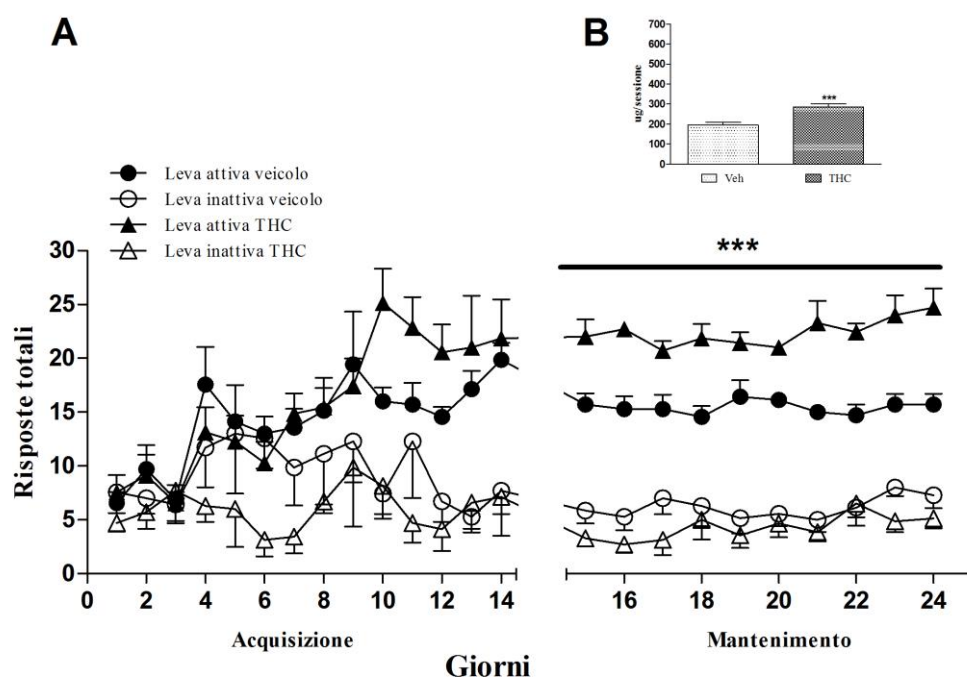
**Figura 9.** Fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di auto-somministrazione di eroina (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) in ratti maschi Sprague Dawley adulti trattati durante l'adolescenza con il THC ( $n=11$ ) o il veicolo ( $n=11$ ). *Sinistra:* i dati sono espressi come media  $\pm$  SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore.  $***P<0.0001$  vs la corrispondente leva inattiva. *Destra:* media delle pressioni sulle leve retrattili durante la fase di acquisizione e mantenimento dell'autosomministrazione di nicotina.  $***P<0.0001$  vs la corrispondente leva inattiva.

### **Autosomministrazione di WIN 55,212-2**

I ratti Lister Hooded hanno avuto bisogno di un tempo maggiore per acquisire e raggiungere una autosomministrazione costante di cannabinoidi: un minimo di 12 giorni è stato necessario per osservare un comportamento stabile di assunzione della droga. Non tutti gli animali hanno acquisito l'autosomministrazione dell'agonista cannabinoide sintetico WIN 55,212-2, e alcuni tra quelli che hanno mostrato una iniziale attività di assunzione della sostanza non hanno mai raggiunto una stabilità nell'assunzione (25%). Comunque, i ratti che hanno raggiunto un comportamento di auto-somministrazione costante hanno poi mantenuto una assunzione stabile di cannabinoide fino alla conclusione del protocollo sperimentale (**Figura 10**).

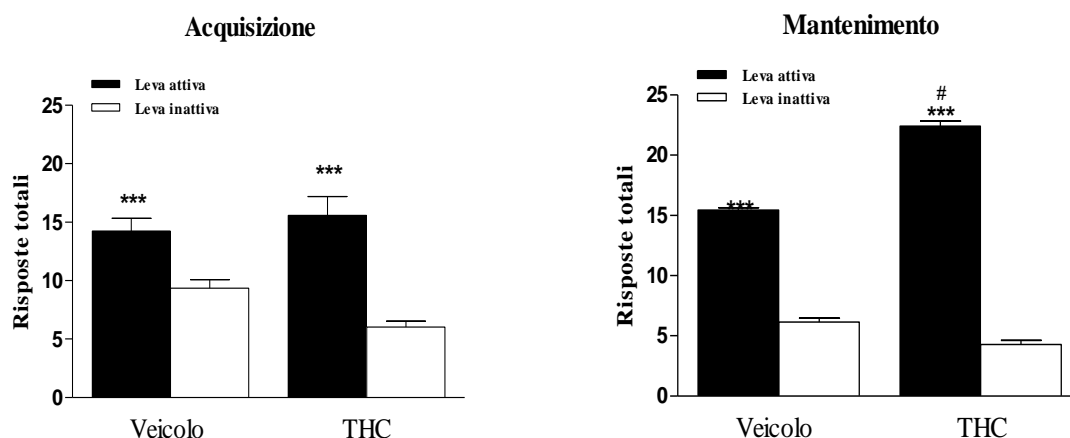
La media del numero di pressioni sulla leva attiva per ciascun gruppo di trattamento in adolescenza (THC e veicolo) nelle 24 sessioni giornaliere consecutive durante le fasi di acquisizione e mantenimento dell'autosomministrazione di WIN55,212-2 è illustrata nella **Figura 10.A**.

Durante i primi tre giorni di allenamento, all'interno di ogni gruppo sperimentale non ci sono state differenze significative nella risposta comportamentale. Nei giorni successivi, i dati prodotti hanno mostrato un aumento del consumo di WIN 55,212-2 in entrambi i gruppi sebbene negli animali pre-esposti al veicolo non vi è stata una chiara discriminazione nella pressione delle due leve (sessioni 4-7): solo dal decimo giorno in poi si è osservata una diminuzione nella pressione della leva inattiva (da  $11.8 \pm 4$  a  $7.9 \pm 2.6$ ) ed un forte incremento nell'assunzione di WIN 55,212-2 nel gruppo trattato con il THC. Nelle ultime sessioni della fase di acquisizione, la media  $\pm$  SEM del numero di risposte pressorie sulla leva attiva per il gruppo pre esposto al THC e il gruppo di controllo è stato  $22.3 \pm 3.4$  e  $16.7 \pm 1.5$ , con un aumento del 25% in più a favore degli animali trattati con il THC ( $F_{(1,156)}=0.56$ ;  $P<0.0001$ ).



**Figura 10.** Confronto del comportamento di auto-somministrazione di WIN 55,212-2 (12,5 µg/kg/iniezione) in ratti maschi Lister Hooded adulti trattati durante l'adolescenza con il THC o il veicolo (n=7/gruppo). **A:** I dati sono espressi come media ± SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore. \*\*\*P<0.001 vs gruppo di controllo e la corrispondente leva inattiva (ANOVA a due vie seguita dal test *post-hoc* di Bonferroni). **B:** Eroina totale assunta calcolata su dieci sessioni consecutive con una risposta operante stabile durante la fase di mantenimento dell'autosomministrazione. \*\*\* P<0.0001 vs gruppo di controllo (t-test).

La **Figura 10.B** mostra la fase di mantenimento del comportamento di auto-somministrazione di WIN 55,212-2 (ultimi dieci giorni) per entrambi i gruppi di trattamento in adolescenza. Durante le sessioni di mantenimento, i ratti hanno mostrato una significativo e costante comportamento operante: i livelli di assunzione di WIN 55,212-2 sono risultati stabili e si può osservare una pressione inferiore sulla leva inattiva rispetto ai valori ottenuti durante la fase di acquisizione. Rispetto al gruppo di controllo, i ratti pre-trattati con il THC hanno mostrato una maggiore risposta operante (+32%) ( $F_{(1,108)}=50.87$ ;  $P<0.0001$ ) e la quantità media assunta nelle dieci sessioni consecutive di due ore è stata di  $285\pm 16$  µg e  $195\pm 12$  µg per la dose di WIN 55,212-2 di 12.5 µg/kg per iniezione (100µl) rispettivamente per il gruppo pre esposto al THC e il gruppo di controllo ( $P<0.0001$ ).

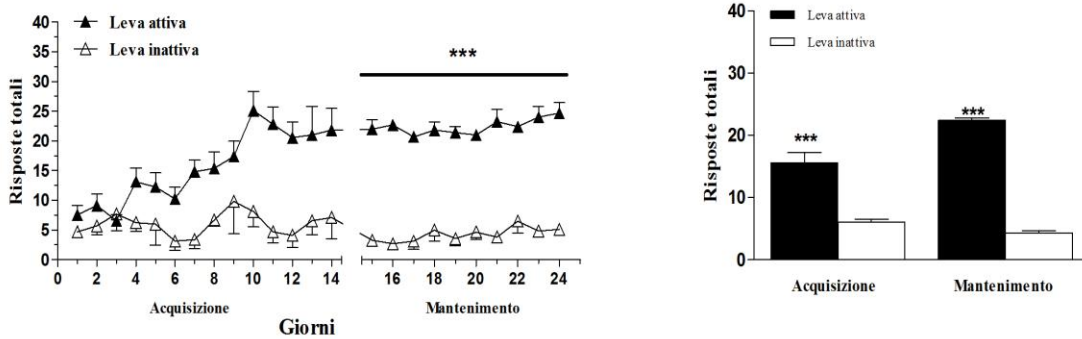


**Figura 11.** Acquisizione (*sinistra*) e mantenimento (*destra*) del comportamento di auto-somministrazione di WIN 55,212-2 (12.5 µg/kg/iniezione) in ratti maschi Lister Hooded adulti trattati durante l'adolescenza con il THC o il veicolo. Ogni istogramma rappresenta la media ± SEM del numero di pressioni sulla leva attiva e inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore per ogni fase del comportamento di auto-somministrazione. Ogni gruppo comprende sette animali. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva; #P<0.0001 vs la leva attiva del gruppo di controllo.

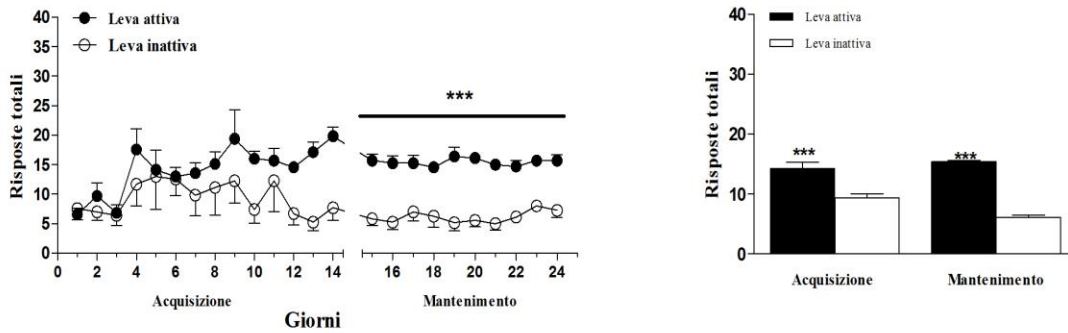
Le differenze per entrambi i gruppi di animali nel numero medio di pressioni sulle due leve, attiva e inattiva, nelle diverse fasi di autosomministrazione (acquisizione e mantenimento) sono illustrate nella **Figura 11**. Durante la fase di acquisizione (**Figura 11.sinistra**) entrambi i gruppi di animali trattati imparano ad autosomministrarsi la sostanza: la pressione media sulla leva attiva ottenuta su 14 giorni consecutivi di sessioni sperimentali rimane simile in entrambi i gruppi. Nel periodo di mantenimento, corrispondente alle ultime dieci sessioni sperimentali consecutive (**Figura 11. destra**), aumenta il divario tra la media delle pressioni sulla leva attiva e su quella inattiva in entrambi i gruppi; ciò è dovuto principalmente ad una riduzione della pressione sulla leva inattiva accompagnata da un ulteriore aumento della pressione sulla leva attiva.

Confrontando i due gruppi si può notare che gli animali esposti al THC durante l'adolescenza, aumentano la pressione sulla leva attiva (+30%) tra la fase di acquisizione e la fase di mantenimento (15.5±1 vs 22.4±1.2), mentre la risposta operativa rimane pressoché costante nel gruppo di controllo (**Figura 12**).

### Gruppo THC (PND 45-55)



### Gruppo Veicolo (PND 45-55)



**Figura 12.** Fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di auto-somministrazione di WIN 55,212-2 (12.5 µg/kg/iniezione) in ratti maschi Lister Hooded adulti trattati durante l'adolescenza con il THC o il veicolo (n=7 per gruppo). *Sinistra:* i dati sono espressi come media ± SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva. *Destra:* media delle pressioni sulle leve retrattili durante la fase di acquisizione e mantenimento dell'autosomministrazione di nicotina. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva.

## **2. Effetto del trattamento cronico in adolescenza sul comportamento di autosomministrazione nei ratti femmine adulti**

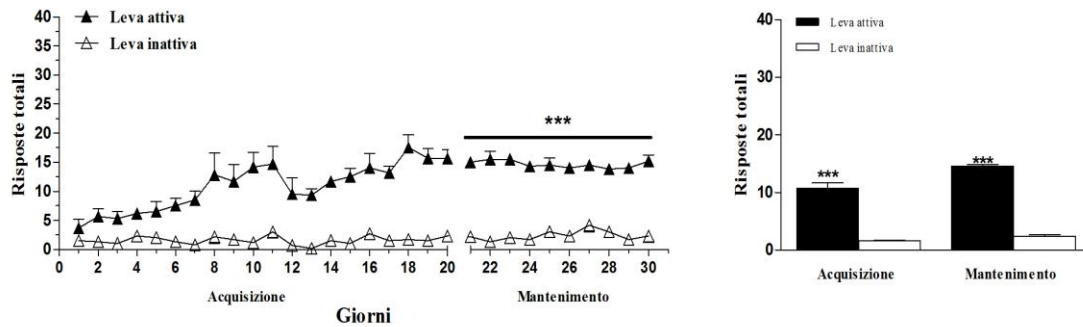
### **Autosomministrazione di nicotina**

I ratti femmina che hanno raggiunto e mantenuto fino alla fine dello studio un comportamento stabile nell'assunzione di nicotina sono state il 79% del totale. Il restante 21% non ha mai iniziato un comportamento di autosomministrazione o non ha mai raggiunto un *intake* stabile.

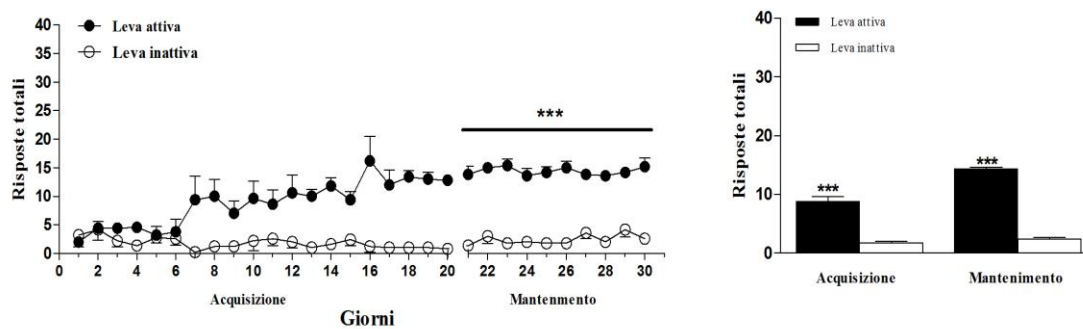
L'andamento dell'autosomministrazione di nicotina nei due gruppi di ratti esposti durante l'adolescenza al trattamento cronico con il THC o con il suo veicolo durante le 30 sessioni giornaliere è mostrato in **Figura 13**, insieme alla media delle pressioni sulla leva attiva o inattiva durante le fasi di acquisizione e di mantenimento.

La fase di acquisizione mostra un aumento graduale della pressione sulla leva attiva che rilascia la nicotina in entrambi i gruppi, con un andamento più regolare negli animali esposti al THC, per poi stabilizzarsi verso la fine della terza settimana. Gli istogrammi (destra) mostrano una differenza significativa nella media delle pressioni sulle leve attiva ed inattiva per entrambi i gruppi di trattamento. Tale differenza risulta maggiore nella fase di mantenimento rispetto al precedente periodo di *training* ( $14.4 \pm 2.4$  vs  $8.8 \pm 1.8$  per il gruppo di controllo;  $14.6 \pm 0.9$  vs  $10.8 \pm 1.9$  per il gruppo THC).

### Gruppo THC (PND 35-45)



### Gruppo Veicolo (PND 35-45)



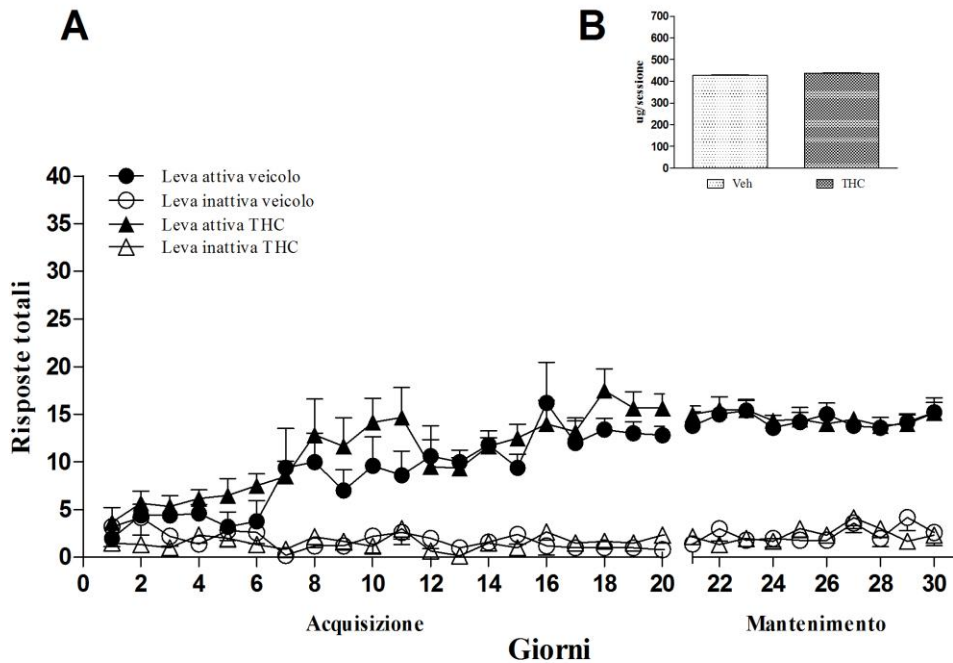
**Figura 13.** Fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di auto-somministrazione di nicotina (30 µg/kg/iniezione) in ratti femmine Sprague Dawley adulti trattati durante l'adolescenza con il THC (n=6) o il veicolo (n=5). *Sinistra:* i dati sono espressi come media ± SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di un'ora. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva. *Destra:* media delle pressioni sulle leve retrattili durante la fase di acquisizione e mantenimento dell'autosomministrazione di nicotina. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva.

I due gruppi di animali trattati in adolescenza con THC o veicolo mostrano un andamento sovrapponibile del comportamento di autosomministrazione di nicotina (**Figura 14**). Il livello medio di assunzione di nicotina durante la fase di acquisizione è maggiore nel gruppo esposto al THC in adolescenza rispetto al gruppo di controllo (323±56 vs 264±60 µg). L'analisi *post-hoc* non ha evidenziato differenze significative tra i due gruppi.

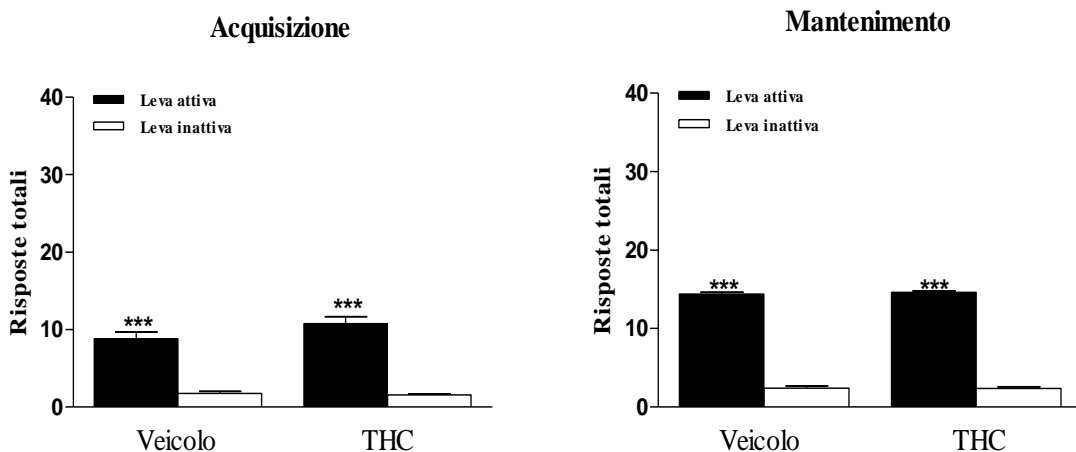
Come mostrano le sessioni di mantenimento, i ratti di entrambi i gruppi di trattamento manifestano un comportamento operante costante. La **Figura 14.B** riporta l'assunzione media di nicotina nell'arco dei dieci giorni della fase di mantenimento. La quantità media di droga assunta è simile tra i due gruppi di animali con un'assunzione pari a 461±65 µg e



431±32 µg per la dose di nicotina di rispettivamente nel gruppo di controllo e nel gruppo pre-trattato con il THC.



**Figura 14.** Confronto del comportamento di auto-somministrazione di nicotina (30 µg/kg/iniezione) in ratti femmine Sprague Dawley adulte trattate durante l'adolescenza con il THC (n=6) o il veicolo (n=5). A: i dati sono espressi come media ± SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di un'ora. B: quantità di nicotina totale assunta calcolata su dieci sessioni consecutive con una risposta operante stabile durante la fase di mantenimento dell'autosomministrazione. \*\*\*P<0.0001 vs gruppo di controllo (t-test).

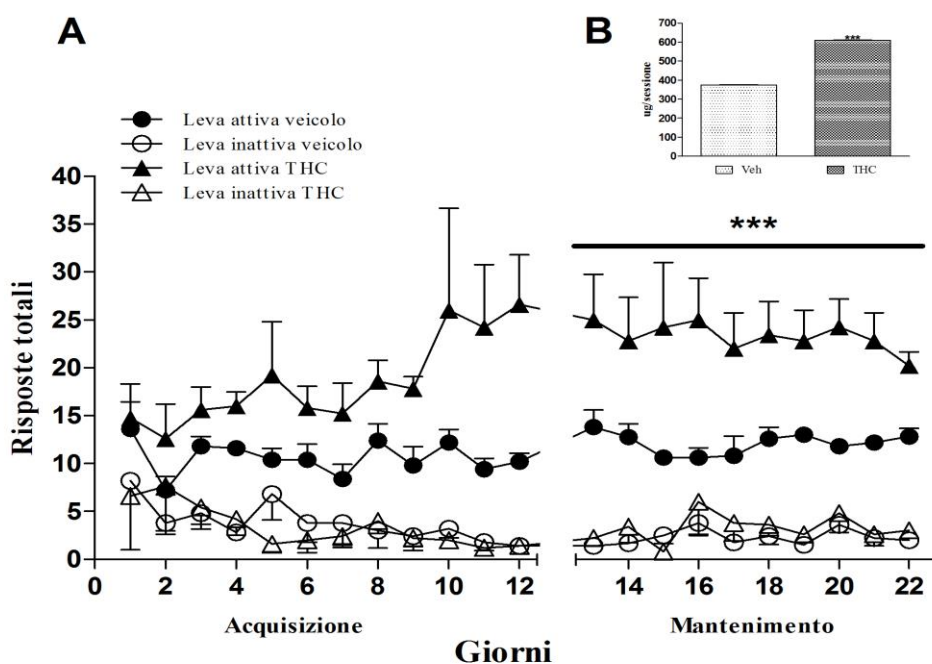


**Figura 15.** Acquisizione (*sinistra*) e mantenimento (*destra*) del comportamento di auto-somministrazione di nicotina (30 µg/kg/iniezione) in ratti femmine Sprague Dawley adulte trattate durante l'adolescenza con il THC (n=6) o il veicolo (n=5). Ogni istogramma rappresenta la media ± SEM del numero di pressioni sulla leva attiva e inattiva durante ogni sessione giornaliera di un'ora per ogni fase del comportamento di auto-somministrazione. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva; #P<0.0001 vs la leva attiva del gruppo di controllo.

La **Figura 15** mostra la discriminazione nella pressione della leva attiva e inattiva nelle fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di autosomministrazione di nicotina nei gruppi di ratti femmina pre esposti al THC o al veicolo nell'adolescenza. Durante la fase di acquisizione (**Figura 15.sinistra**), entrambi i gruppi di animali acquisiscono il comportamento di auto-somministrazione con una maggiore intensità nel gruppo esposto al THC. Nel periodo di mantenimento, corrispondente a dieci sessioni sperimentali consecutive (**Figura 15.destra**), il divario nella media delle pressioni tra le due leve retrattili è maggiore a causa di un aumento del numero di pressioni sulla leva attiva. Confrontando i due gruppi si può osservare che il comportamento operante è identico tra i due gruppi di animali trattati in adolescenza.

## Autosomministrazione di eroina

Le ratte di entrambi i gruppi sperimentali hanno appreso il comportamento di auto-somministrazione di eroina alla dose di 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per iniezione (100  $\mu\text{l}$ ). Sebbene non tutti gli animali abbiano concluso gli esperimenti, la maggior parte (80%) ha raggiunto un comportamento di auto-somministrazione stabile e mantenuto un *intake* costante di eroina fino al termine del protocollo sperimentale (**Figura 16**). La *time-course* per ogni gruppo di trattamento in adolescenza è mostrata in **Figura 16.A**, dove è illustrato il comportamento di autosomministrazione durante le 22 sessioni giornaliere consecutive.



**Figura 16.** Confronto del comportamento di auto-somministrazione di eroina (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) in ratte femmine Sprague Dawley adulte trattate durante l'adolescenza con il THC o il veicolo ( $n=5$  per gruppo). **A:** i dati sono espressi come media  $\pm$  SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore. \*\*\* $P < 0.001$  vs gruppo di controllo e la corrispondente leva inattiva (ANOVA a due vie seguita dal test *post-hoc* di Bonferroni). **B:** quantità di eroina totale assunta calcolata su dieci sessioni consecutive con una risposta operante stabile durante la fase di mantenimento dell'autosomministrazione. \*\*\* $P < 0.0001$  vs gruppo di controllo (t-test).

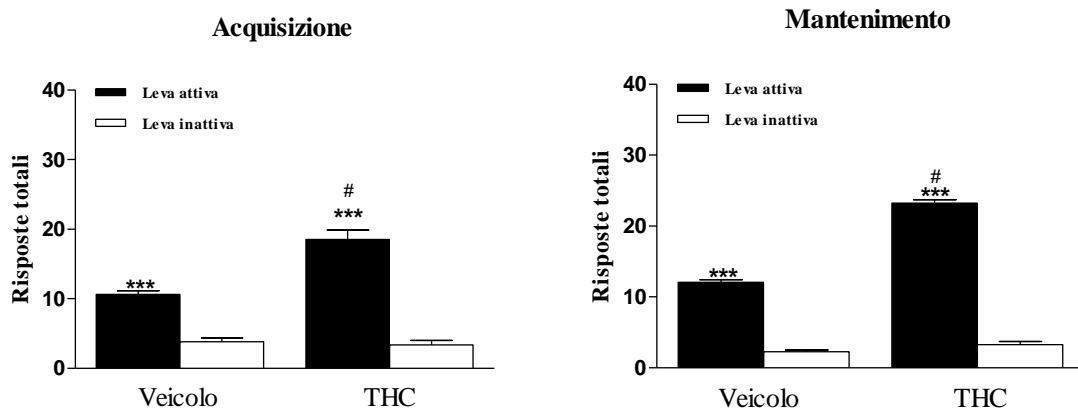
Le ratte di entrambi i gruppi trattati in adolescenza manifestano un evidente comportamento operante a partire dalla terza sessione di allenamento, e stabilizzano la quantità di sostanza assunta a partire dal decimo giorno di auto-somministrazione di

eroina. La fase di acquisizione per i due gruppi sperimentali è caratterizzata nelle prime sessioni giornaliere da un andamento pressoché parallelo, sebbene gli animali trattati con il THC assumano quotidianamente una quantità maggiore di droga ( $485\pm 85$  vs  $318\pm 47$   $\mu\text{g}$ ). Il divario tra i due gruppi di animali si evidenzia a partire dal decimo giorno di auto-somministrazione, quando si osserva un drastico aumento del numero medio di infusioni nel gruppo di ratti trattati in adolescenza con il THC (+58%).

L'analisi *post-hoc* ha indicato che, dal giorno 10 in poi, i ratti pre-esposti al THC hanno aumentato il numero di pressioni sulla leva attiva ad un livello significativamente superiore ( $P<0.0001$ ) rispetto agli animali di controllo (+141%). E' evidente la maggiore risposta operativa del gruppo trattato con THC in adolescenza rispetto al gruppo di controllo; infatti, la dose giornaliera media assunta durante la fase di acquisizione è pari a  $556\pm 120$  vs  $319\pm 44$   $\mu\text{g}$  per i rispettivi gruppi ( $F_{(1,92)}=28.52$ ,  $P<0.0001$ ).

I risultati mostrati in **Figura 16.B** riguardano la fase di mantenimento del comportamento di auto-somministrazione di eroina corrispondente alle ultime dieci sessioni sperimentali. Per quanto riguarda il gruppo di controllo, non vi è una evidente differenza nella risposta operativa rispetto alla fase di acquisizione ( $12.1\pm 1$  vs  $10.6\pm 1.5$ ) come si può vedere anche nella **Figura 18** dal confronto delle due fasi.

Il gruppo esposto al THC in adolescenza ha mostrato in modo significativo un più alto e costante comportamento operante. Rispetto al gruppo di controllo, i ratti pretrattati con il THC mostrano una risposta media significativamente ( $F_{(1,80)}=76.81$ ,  $P<0.0001$ ) superiore (+92%), e la quantità media di droga assunta durante le sessioni di mantenimento è stata pari a  $697\pm 115$  e  $363\pm 30$   $\mu\text{g}$ , rispettivamente, per il gruppo pre esposto al THC ed il gruppo di controllo.

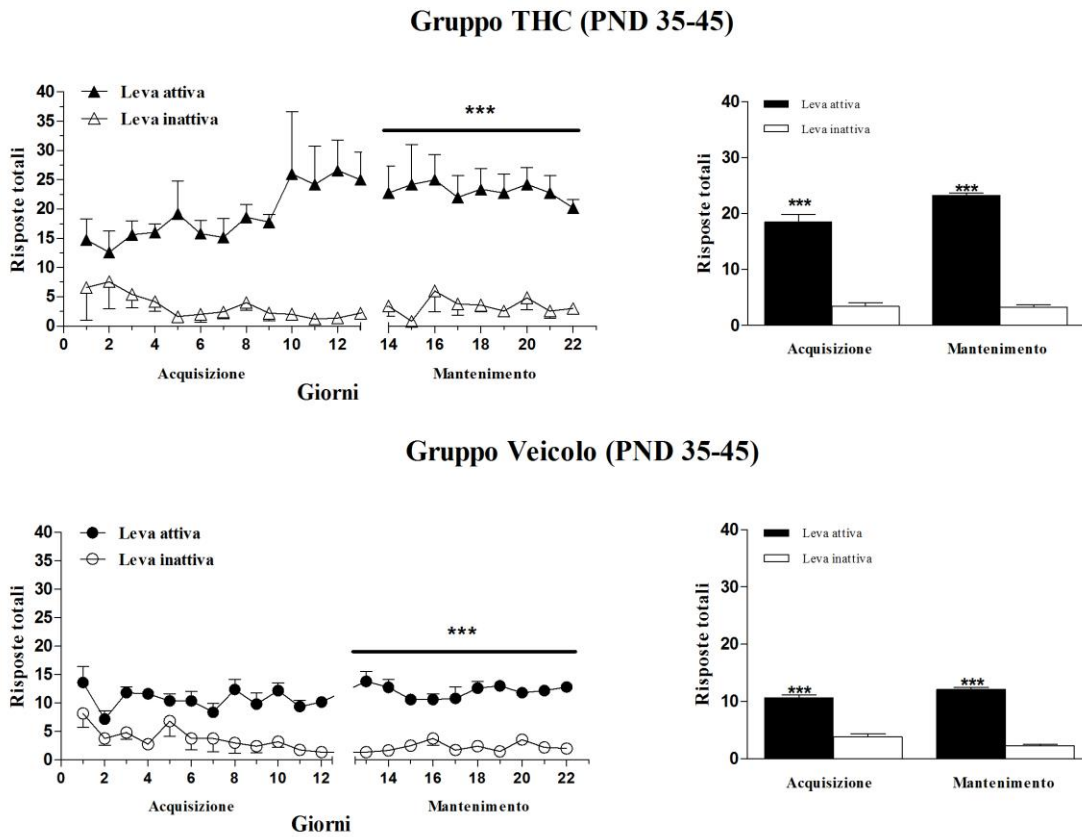


**Figura 17.** Acquisizione (*sinistra*) e mantenimento (*destra*) del comportamento di auto-somministrazione di eroina (30 µg/kg/iniezione) in ratti femmine Sprague Dawley adulte trattate durante l'adolescenza con il THC (n=5) o il veicolo (n=5). Ogni istogramma rappresenta la media ± SEM del numero di pressioni sulla leva attiva e inattiva durante ogni sessione giornaliera di un'ora per ogni fase del comportamento di auto-somministrazione. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva; #P<0.0001 vs la leva attiva del gruppo di controllo.

La risposta operativa di pressione della leva attiva e inattiva nelle fasi di autosomministrazione di eroina (acquisizione e mantenimento) nei gruppi di animali trattati con THC o veicolo nell'adolescenza è mostrata in **Figura 17**. Durante l'apprendimento (**Figura 17.sinistra**) entrambi i gruppi di animali pre-esposti acquisiscono il comportamento di auto-somministrazione: il numero medio di pressioni sulla leva inattiva durante i primi 12 giorni consecutivi di sessioni sperimentali è simile per entrambi i gruppi, mentre si osserva una maggiore discriminazione tra attività sulla leva attiva e quella inattiva (18.5±4 vs 10.6±1.5) a favore del gruppo pre-esposto al THC (+74%).

Nel periodo di mantenimento, corrispondente alle ultime dieci sessioni sperimentali (**Figura 17.destra**), aumenta il divario tra la media delle pressioni sulla leva attiva e su quella inattiva in entrambi i gruppi, a causa di un ulteriore aumento della pressione sulla leva attiva da parte degli animali. Nel gruppo trattato con il THC vi è un aumento (+25%) della risposta operativa tra la fase di acquisizione e quella di mantenimento come indicato

rispettivamente dalle medie  $18.5 \pm 4$  e  $23.2 \pm 3.8$ , mentre il numero medio di pressioni sulla leva inattiva si riduce gradatamente nel corso delle sessioni sperimentali.



**Figura 18.** Fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di auto-somministrazione di eroina ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) in ratti femmine Sprague Dawley adulte trattate durante l'adolescenza con il THC ( $n=5$ ) o il veicolo ( $n=5$ ). *Sinistra:* i dati sono espressi come media  $\pm$  SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore.  $***P < 0.0001$  vs la corrispondente leva inattiva. *Destra:* media delle pressioni sulle leve retrattili durante la fase di acquisizione e mantenimento dell'autosomministrazione di nicotina.  $***P < 0.0001$  vs la corrispondente leva inattiva.

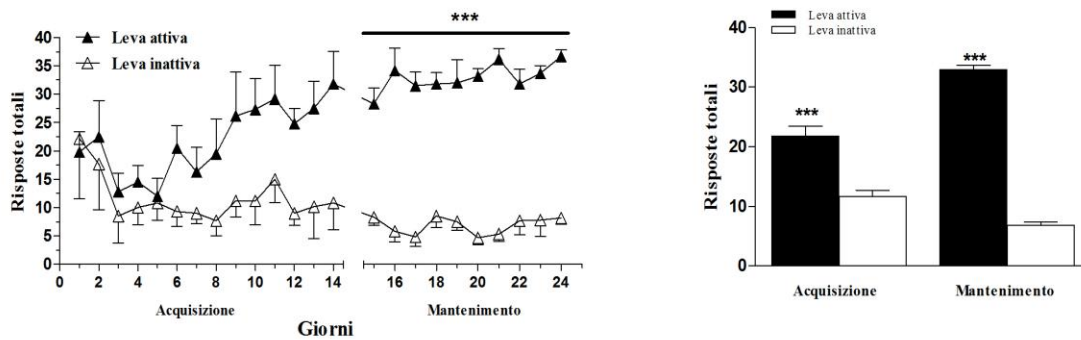
### **Autosomministrazione di WIN 55,212-2**

Le ratte Lister Hooded che hanno acquisito e mantenuto fino al termine della sperimentazione una costante auto-somministrazione di WIN 55,212-2 sono state il 75% del totale. Il restante gruppo di animali che ha iniziato l'addestramento non ha mai appreso il comportamento operante o non ha mai raggiunto un *intake* stabile di cannabinoidi.

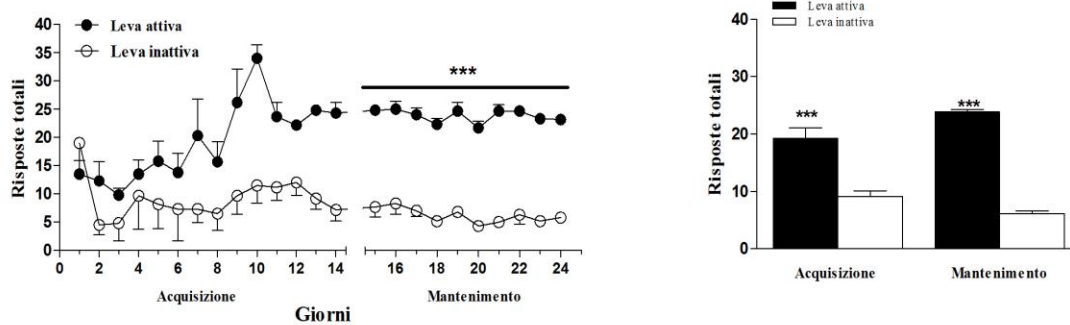
L'andamento dell'auto-somministrazione di WIN 55,212-2 nei due gruppi di animali esposti durante l'adolescenza al trattamento cronico con THC o con il suo veicolo durante le 24 sessioni giornaliere è mostrato in **Figura 19**, insieme alla media delle pressioni sulla leva attiva o inattiva durante le fasi di acquisizione e di mantenimento. Entrambi i gruppi di animali durante le prime sessioni (1-5) di allenamento hanno mostrato un comportamento esplorativo, con un alto numero di pressioni sulla leva attiva e su quella inattiva (rispettivamente  $13 \pm 2.6$  vs  $9.2 \pm 4.2$  per il gruppo di controllo;  $16.3 \pm 3.9$  vs  $13.8 \pm 5.9$  per il gruppo THC). A partire dalla fine della prima settimana di *training* si comincia ad apprezzare una certa discriminazione tra le due leve.

Rispetto alle prime sessioni, infatti, nelle seguenti sessioni di *training* della fase di acquisizione si osserva un aumento delle pressioni sulla leva attiva mentre il numero medio di pressioni sulla leva inattiva rimane pressoché costante ( $22.8 \pm 3.1$  vs  $13 \pm 2.6$  per il gruppo di controllo;  $24.8 \pm 5.2$  vs  $13.8 \pm 5.9$  per il gruppo THC). Gli istogrammi evidenziano una differenza significativa nel numero delle pressioni sulle leve per entrambi i gruppi di trattamento; questo *gap* è maggiore nella fase di mantenimento rispetto al precedente periodo di *training* ( $23.8 \pm 1$  vs  $6.8 \pm 1$  per il gruppo di controllo;  $32.9 \pm 2.4$  vs  $6.9 \pm 1.7$  per il gruppo THC).

### Gruppo THC (PND 35-45)



### Gruppo Veicolo (PND 35-45)

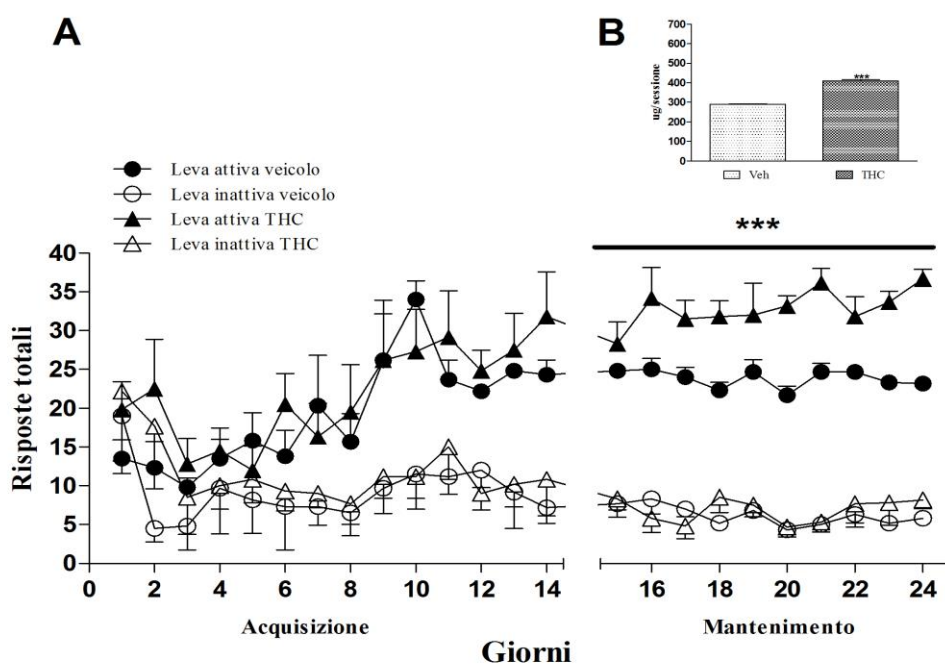


**Figura 19.** Fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di auto-somministrazione di WIN 55,212-2 (12.5 µg/kg/iniezione) in ratti femmine Lister Hooded adulte trattate durante l'adolescenza con il THC o il veicolo (n=6/gruppo). *Sinistra:* i dati sono espressi come media ± SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva. *Destra:* media delle pressioni sulle leve retrattili durante la fase di acquisizione e mantenimento dell'autosomministrazione di nicotina. \*\*\*P<0.0001 vs la corrispondente leva inattiva.

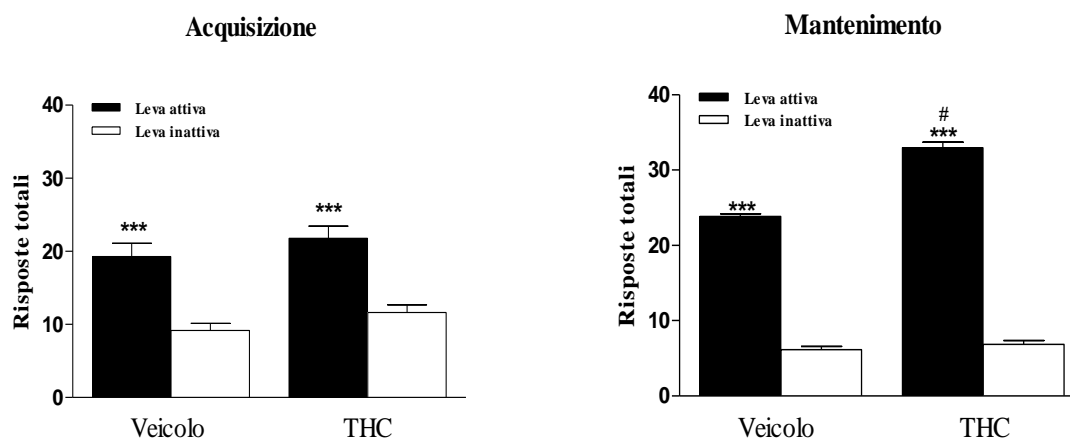
I due gruppi di animali trattati in adolescenza con THC o veicolo mostrano un andamento sovrapponibile del comportamento di autosomministrazione di WIN 55,212-2 per tutta la fase di acquisizione (**Figura 20**). Il livello medio di assunzione di cannabinoide è simile tra il gruppo di controllo e gli animali esposti al THC durante l'adolescenza (241±36 vs 272±59 µg). L'analisi *post-hoc* non ha evidenziato differenze significative tra i due gruppi. Nelle sessioni di mantenimento, i ratti di entrambi i gruppi di trattamento manifestano un comportamento di autosomministrazione costante. In **Figura 20.A** si osserva in entrambi i gruppi una netta discriminazione tra il numero medio di pressioni sulle due leve, con un significativo aumento nella quantità media di sostanza assunta nel gruppo pre-trattato con il THC (298±12 e 412±29 µg) ( $F_{(1,100)}=108.52$ ,  $P<0.0001$ ). La



**Figura 20.B** riporta l'assunzione media di WIN 55,212-2 nei dieci giorni consecutivi di sessioni sperimentali.



**Figura 20.** Confronto del comportamento di auto-somministrazione di WIN 55,212-2 (12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) in ratti femmine Lister Hooded adulte trattate durante l'adolescenza con THC o veicolo (n=6/gruppo). **A:** i dati sono espressi come media  $\pm$  SEM della pressione sulla leva attiva o inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore. \*\*\* $P < 0.001$  vs gruppo di controllo e la corrispondente leva inattiva (ANOVA a due vie seguita dal test *post-hoc* di Bonferroni). **B:** quantità di eroina totale assunta calcolata su dieci sessioni consecutive con una risposta operante stabile durante la fase di mantenimento dell'autosomministrazione. \*\*\* $P < 0.0001$  vs gruppo di controllo (t-test).



**Figura 21.** Acquisizione (*sinistra*) e mantenimento (*destra*) del comportamento di auto-somministrazione di WIN 55,212-2 (12,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) in ratti femmine Lister Hooded adulte trattate durante l'adolescenza con THC o veicolo. Ogni istogramma rappresenta la media  $\pm$  SEM del numero di pressioni sulla leva attiva e inattiva durante ogni sessione giornaliera di due ore per ogni fase del comportamento di auto-somministrazione. Ogni gruppo comprende sei animali. \*\*\* $P < 0.0001$  vs la corrispondente leva inattiva; # $P < 0.0001$  vs la leva attiva del gruppo di controllo.

La **Figura 21** mostra la discriminazione tra l'attività sulla leva attiva e inattiva nelle fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di autosomministrazione di WIN 55,212-2 nei gruppi di ratti femmina pre-esposti al THC o al veicolo in adolescenza. Durante la fase di acquisizione (**Figura 21.sinistra**) entrambi i gruppi di animali acquisiscono un simile comportamento di auto-somministrazione. Nel periodo di mantenimento, corrispondente a dieci sessioni sperimentali consecutive (**Figura 21.destra**), aumenta il divario nella media delle pressioni tra la due leve retrattili a causa di un incremento del numero medio di pressioni sulla leva attiva e una riduzione di quelle sulla leva inattiva in entrambi i gruppi, ma con un maggiore e significativo aumento nel gruppo trattato con il THC (+38% vs gruppo di controllo).

## Discussione

La *Cannabis* e più precisamente un suo derivato la marijuana, è la sostanza d'abuso più comunemente utilizzata al mondo e molto spesso, insieme al tabacco, il suo uso inizia in adolescenza. Il fatto che l'uso della marijuana spesso precede l'uso di altre droghe ha suggerito la formulazione della cosiddetta "*Cannabis gateway hypothesis*" in base alla quale l'uso precoce della *Cannabis* rappresenta un ponte verso l'utilizzo di altre droghe ed aumenta, quindi, il rischio di passare al consumo di altre droghe più pesanti (eroina, amfetamina e cocaina) o di consolidare l'uso di droghe meno pesanti ma il cui utilizzo rappresenta un rischio per la salute del consumatore (derivati della *Cannabis*, nicotina e alcool). Studi clinici ed epidemiologici hanno dimostrato che coloro i quali incominciano ad utilizzare la *Cannabis* intorno ai 14 anni di età presentano una maggiore probabilità di passare al consumo di altre droghe rispetto a chi inizia ad una età superiore. Il possibile legame tra un precoce consumo di *Cannabis* e il successivo abuso di altre droghe potrebbe essere dovuto a modificazioni neurobiologiche che si instaurano in seguito alla precoce esposizione alla *Cannabis* e che renderebbero l'individuo più vulnerabile agli effetti rinforzanti di altre droghe. Chiaramente, tale vulnerabilità potrebbe essere influenzata anche dall'associarsi di altri fattori come quelli culturali, sociali, morali e genetici. L'utilizzo di modelli sperimentali animali rappresenta pertanto, la migliore strategia per studiare le possibili correlazioni neurobiologiche esistenti tra il consumo precoce di *Cannabis* e l'aumentata vulnerabilità all'uso di altre droghe. Negli ultimi anni, un gran numero di evidenze sperimentali hanno suggerito la presenza di significative interazioni funzionali tra i sistemi endocannabinoide ed oppioide (Fattore et al. 2004) e tra i sistemi endocannabinoide e quello colinergico-nicotinico (Scherma et al., 2008).

La presente tesi ha avuto, appunto, come obiettivo l'indagare se l'esposizione adolescenziale alla *Cannabis* può indurre modificazioni neurobiologiche tali da

modificare il comportamento d'abuso alla stessa *Cannabis* o ad altre sostanze d'abuso quale l'eroina o la nicotina nell'età adulta. Inoltre, si sono valutate eventuali differenze di genere confrontando il comportamento in individui di sesso maschile e femminile. È stata dapprima valutata la risposta operativa degli animali di entrambi i sessi nella fase di acquisizione e mantenimento dell'autosomministrazione endovenosa per ogni singola sostanza d'abuso testata sia negli animali pre-esposti in adolescenza al THC, sia nel corrispondente gruppo di controllo. In seguito, sono stati analizzati i risultati ottenuti confrontando il comportamento di autosomministrazione tra i ratti maschi e femmine per valutare eventuali differenze sesso-specifiche.

### **Autosomministrazione di nicotina in ratti adulti maschi e femmine esposti in adolescenza al THC**

Tutti i dati riportati nella sezione dei risultati che riguardano questi esperimenti sono riassunti per un confronto tra maschi e femmine nella **Figura 22.a e b**.

La prima sostanza testata nel nostro studio mediante l'utilizzo del ben noto modello sperimentale di autosomministrazione cronica endovenosa, IVSA, è stata la nicotina. Il modello di IVSA è stato ampiamente utilizzato in letteratura per studiare gli effetti di rinforzo di molte droghe ed anche della nicotina (Caille et al., 2012; Le Foll e Goldberg, 2009; Levin et al., 2010) ed è stato documentato in diverse specie, tra cui roditori (Goldberg et al., 1983; Henningfield e Goldberg, 1983; Shoaib et al., 1997) ed esseri umani (Harvey et al., 2004). La nicotina viene autosomministrata spontaneamente per via endovenosa (Corrigal e Cohen, 1989). Tuttavia, le condizioni in cui la nicotina mantiene un comportamento di autosomministrazione negli animali sembrano essere più ristrette rispetto a quelle con altre sostanze d'abuso (Le Foll e Goldberg, 2006) e questo viene confermato anche in questo studio. Infatti, il comportamento di autosomministrazione si

manifesta e si stabilizza con maggiore difficoltà rispetto a quanto avviene dopo l'autosomministrazione di altre droghe come l'eroina o la cocaina.

Numerose evidenze dimostrano che il sistema endocannabinoide contribuisce a modulare gli effetti gratificanti della nicotina che si rendono manifesti e misurabili nei principali modelli animali che permettono di valutare il potenziale di indurre dipendenza da parte di una sostanza. Gli enzimi coinvolti nel metabolismo degli endocannabinoidi sembrano svolgere un ruolo nelle risposte prodotte dalla nicotina: l'inibitore della FAAH, enzima che degrada l'anandamide, l'URB597 inibisce la CPP e l'IVSA (Scherma et al., 2008). Inoltre, è stata dimostrata l'azione sinergica di THC e nicotina nell'indurre CPP, mentre la somministrazione di un antagonista specifico dei recettori CB<sub>1</sub> come l'SR141716A, riduce sia la CPP indotta dalla nicotina sia l'IVSA della stessa. Tale effetto viene prodotto anche da un altro antagonista dei recettori CB<sub>1</sub>, l'AM251 (Cohen et al., 2005; Forget et al., 2005; Shoaib, 2008; Valient et al., 2002). Tutti questi lavori indicherebbero quindi un diretto coinvolgimento degli endocannabinoidi endogeni e dei recettori CB<sub>1</sub> nella modulazione degli effetti gratificanti indotti nell'animale dalla nicotina.

In letteratura non ci sono lavori che permettano di evidenziare possibili alterazioni morfologiche e funzionali a carico del sistema colinergico dopo precoce esposizione alla *Cannabis* che possano in qualche modo spiegare il comportamento di IVSA e la possibile vulnerabilità all'abuso di nicotina. Nei ratti maschi del nostro studio, entrambi i gruppi pretrattati con THC e veicolo, apprendono il comportamento di autosomministrazione e, in modo del tutto simile, sostengono la risposta operativa durante la fase di mantenimento dell'autosomministrazione. Gli animali esposti precocemente al THC quindi non mostrano differenze significative nell'instaurare e mantenere il comportamento di IVSA. In realtà, se si guarda con maggiore attenzione i dati singoli, giorno dopo giorno, i nostri risultati mostrano che nelle sessioni del periodo di mantenimento vi è una tendenza

giornaliera da parte del gruppo di animali pretrattati in adolescenza con il THC, a premere un numero minore di volte la leva attiva che rilascia la nicotina rispetto al gruppo di controllo (che ha ricevuto il veicolo in giovane età). Tale differenza si rende significativamente evidente solo quando si va ad analizzare il numero totale delle pressioni medie giornaliere, per cui gli animali pretrattati con il THC si autosomministrano una minore quantità totale di nicotina rispetto agli animali pretrattati con il veicolo.

È ampiamente dimostrato in letteratura che la somministrazione acuta di nicotina, come per altri farmaci d'abuso, determina nell'animale di laboratorio, un aumento del rilascio di DA nella shell del NAc (Pontieri et al., 1996). Alcuni dati preliminari di microdialisi cerebrale, ottenuti nei nostri laboratori, in ratti maschi adulti pretrattati con il THC in adolescenza dimostrerebbero che la somministrazione di 0,4 mg/kg di nicotina in acuto determina un rilascio di DA significativamente più basso di quello ottenuto negli animali di controllo pretrattati con il veicolo in età adolescenziale. Questi dati potrebbero aiutarci a spiegare la minore risposta di assunzione totale di nicotina, evidenziata negli animali precocemente esposti al THC nei nostri esperimenti di IVSA. Infatti, una possibile spiegazione per i nostri risultati si potrebbe cercare nell'ipotesi che il pretrattamento con il THC abbia in qualche modo modificato la funzionalità del sistema dopaminergico mesolimbico che proietta dalla VTA al NAc. I recettori CB<sub>1</sub> si trovano ad alte concentrazioni sugli assoni terminali dei neuroni GABAergici. In condizioni di normalità, l'attivazione di questi recettori inibisce il rilascio di GABA (Katona et al., 1999; Manzoni e Bockaert, 2001; Szabo et al., 2002), determinando un aumento dell'attività dopaminergica e quindi un aumento del rilascio di DA nelle aree terminali ovvero nel NAc. Il pretrattamento con THC nei nostri esperimenti potrebbe aver determinato una modificazione di tali recettori rendendoli ipofunzionali, e ciò determinerebbe quindi un

aumento del rilascio di GABA che a sua volta causerebbe una riduzione del tono dopaminergico e del rilascio di DA. Tutto questo si potrebbe tradurre a livello comportamentale in una minor risposta operativa nella pressione della leva attiva, come evidenziato nei nostri animali. Un recente lavoro di Simonnet e collaboratori (2012) mostra come solo il blocco dei recettori CB<sub>1</sub> della VTA e non del NAc riduce l'autosomministrazione endovenosa di nicotina in animali adulti in accordo con l'evidenza che l'attività di rinforzo della nicotina sul comportamento operante si esplica principalmente per azione sui neuroni dopaminergici che originano nella VTA (Corrigal et al., 1994; Nisell et al., 1994). Oltre ad un azione recettoriale un'altra via di modulazione degli effetti della nicotina da parte del sistema cannabinoide coinvolgerebbe, come già accennato, il metabolismo dei cannabinoidi endogeni: la nicotina stimolando la produzione di AEA a livello dei neuroni dopaminergici della VTA (Melis et al., 2004) determinerebbe un'inibizione del rilascio di glutammato dai neuroni glutamatergici presinaptici della shell del NAc. Tale inibizione si tradurrebbe, quindi, in una mancata stimolazione dei neuroni dopaminergici determinando un minor rilascio di DA terminale.

La seconda parte degli studi comportamentali di IVSA di nicotina dopo esposizione in adolescenza al THC è stata condotta su ratti di sesso femminile. Il comportamento di autosomministrazione di nicotina si sviluppa nelle ratte femmine adulte in maniera del tutto simile agli animali maschi. Le ratte manifestano un comportamento operante costante durante la fase di mantenimento sia nel gruppo pretrattato con il THC sia nel gruppo di controllo. Tra i due gruppi (THC e veicolo) non ci sono differenze comportamentali significative. Contrariamente da quanto messo in evidenza nei nostri esperimenti sui maschi, nelle femmine non esiste nessuna differenza nella quantità totale media di nicotina assunta da ciascun gruppo durante l'intera fase di mantenimento.

Questi risultati confermano l'evidenza che all'interno di un intervallo di dose di 0,03-0,09 mg/kg l'acquisizione dell'autosomministrazione di nicotina è simile in ratti maschi e femmine (Donny et al., 2000; Lanza et al., 2004) e che sono necessari programmi di rinforzo diversi dall'FR1 per ottenere delle differenze (Caggiula et al., 2002; Donny et al., 2000), sebbene in letteratura siano presenti anche evidenze di differenze di sesso nel comportamento di autosomministrazione di nicotina sia negli animali che nell'uomo (Lynch et al., 2002; Roth et al., 2004; Perkins et al., 1999).

### **Autosomministrazione di eroina in ratti adulti maschi e femmine esposti in adolescenza al THC**

Tutti i dati riportati nella sezione dei risultati che riguardano questi esperimenti sono riassunti per un confronto tra maschi e femmine nella **Figura 22.c e d**.

La seconda sostanza d'abuso di cui abbiamo studiato il comportamento di autosomministrazione dopo somministrazione di THC in età adolescenziale e di cui abbiamo valutato il possibile insorgere di differenze sesso specifiche è l'eroina. Molti dati epidemiologici hanno mostrato che percentuali altissime di individui dipendenti da eroina sono stati in precedenza consumatori di *Cannabis* e che tale correlazione era più evidente quanto più il consumo di *Cannabis* è avvenuto precocemente. Numerose evidenze hanno mostrato come il sistema oppioide e cannabinoide endogeno siano interconnessi morfologicamente nei circuiti della gratificazione mesolimbici (Maldonado, 2003) e condividano interazioni bidirezionali a livello recettoriale e di trasduzione del segnale. In modelli animali di CPP e IVSA i topi *knockout* per i recettori CB<sub>1</sub> hanno mostrato la completa abolizione della CPP e IVSA indotte da oppiacei (Ledent et al., 1999; Martin et al., 2000); viceversa la CPP e l'IVSA da THC non si sono instaurate in topi *knockout* per



il recettore  $\mu$  degli oppioidi. L'interazione bidirezionale tra sistema oppioide e cannabinoide è ulteriormente confermata dall'evidenza nel ratto che l'autosomministrazione endovenosa di eroina e WIN 55,212-2 causa non solo un aumento dell'espressione dei propri recettori ma anche un aumento reciproco, ovvero l'agonista  $CB_1$  determina una modificazione dei recettori oppioidi mentre l'agonista oppioide quella dei recettori  $CB_1$ . Recentemente, uno studio condotto dalla Elgreen (2008) su ratti adulti esposti durante l'adolescenza al THC ha correlato il trattamento puberale con un aumento dell'mRNA della pre pro-enkefalina nella shell del NAc con un aumento del comportamento di autosomministrazione di oppiacei in età adulta. La percentuale di animali adulti maschi e femmine che ha acquisito l'autosomministrazione di eroina non differisce tra gli animali trattati in adolescenza con il THC e il veicolo a conferma di risultati ottenuti in altri studi sui ratti adulti (Solinas et al., 2004). L'alta percentuale di animali che hanno acquisito il comportamento di IVSA ottenuta conferma l'effetto di rinforzo proprio dell'eroina nel comportamento operante (Campbell e Carroll, 2000). Sia nei maschi che nelle femmine il comportamento di IVSA di eroina viene appreso rapidamente dagli animali di controllo così come riportato dalla letteratura scientifica. Studi precedenti hanno mostrato che i ratti adulti esposti al THC prima dell'inizio della IVSA di eroina stabiliscono in seguito una maggiore risposta operativa rispetto al gruppo di controllo (Solinas et al., 2004). In linea con questa evidenza anche nei nostri ratti adulti, sia nei maschi che nelle femmine, trattati in adolescenza con il THC, si ha una rapida acquisizione del comportamento operante di IVSA di eroina con dei livelli di pressioni sulla leva che determina il rilascio di eroina significativamente superiori rispetto al gruppo di controllo. Questa attività di pressione intensificata nel tempo sulla leva attiva ma non su quella inattiva (che rimane a livelli basali) indica che l'aumento della risposta è altamente specifico ed esclusivamente conseguenza del comportamento di

ricerca della sostanza rinforzante da parte degli animali. Nella fase di mantenimento entrambi i gruppi sperimentali dimostrano una maggiore risposta operativa rispetto alla precedente fase di acquisizione dell'autosomministrazione, comportamento che si traduce in una maggiore assunzione totale di eroina. Tra i due gruppi sperimentali, sia nei maschi che nelle femmine, si osserva una differenza significativa sia nell'andamento della curva delle pressioni giornaliere sia nella quantità totale media di eroina assunta durante la fase di mantenimento a sostegno di una maggiore vulnerabilità comportamentale degli animali esposti in adolescenza al THC ad autosomministrarsi eroina rispetto al gruppo di controllo. Questo risultato è in accordo con quanto riportato da Ellgren e collaboratori (2007) che oltre ai risultati comportamentali riportano evidenze di alterazioni del sistema oppioide endogeno nelle popolazioni neuronali limbiche che giustificherebbero le modificazioni dei processi edonici. I nostri risultati, quindi, confermerebbero la *Cannabis gateway hypothesis* per l'eroina in entrambi i generi maschile e femminile. È necessario sottolineare che nei nostri studi le femmine pretrattate con il THC acquisiscono e mantengono un'assunzione di eroina significativamente maggiore rispetto ai ratti maschi evidenziando quindi una maggiore vulnerabilità al passaggio verso una sostanza d'abuso più pesante quale l'eroina. Nei nostri esperimenti è anche confermato che anche le ratte femmine pretrattate con il veicolo si autosomministrano quantitativi superiori di eroina se paragonate ai corrispondenti maschi. Come evidenziato dalla letteratura (Corchero et al., 2004; Vigano et al., 2005) il sistema oppioide endogeno possiede molte caratteristiche neuroanatomiche e neurochimiche in comune con il sistema endocannabinoide. La pre-esposizione in adolescenza con il THC produce una maggiore espressione di Penk, il gene che codifica per l'encefalina, il neuropeptide oppioide maggiormente espresso nel sistema mesocorticolimbico ed implicato nella modulazione dell'omeostasi edonica (Kelley et al., 2002; Skoubis et al., 2005), nella shell del nucleo accumbens, area criticamente coinvolta

nei comportamenti di ricompensa (Ellgren et al., 2008). A tal proposito ed in relazione alla *Cannabis gateway hypothesis*, recentemente un lavoro ha fornito la prima evidenza in animali di laboratorio di una regolazione epigenetica per cui l'esposizione degli adolescenti al THC può aumentare la vulnerabilità all'eroina in età adulta (Tomasiewicz et al., 2012). Infatti, Tomasiewicz e collaboratori dapprima hanno dimostrato che una sovraespressione della Penk nel NAc aumenta l'autosomministrazione di eroina e successivamente hanno evidenziato che l'esposizione al THC durante l'adolescenza media la trascrizione del gene Penk attraverso la modulazione della metilazione dell'istone repressivo H3 lisina 9 (H3K9) nella shell del NAc, interrompendo così il normale sviluppo della Penk durante il passaggio da adolescenza all'età adulta. Questo lavoro fornisce la prima base molecolare sulla discussa "teoria del passaggio" e può fornire una spiegazione plausibile al sostenimento di una maggiore autosomministrazione di eroina osservato nel nostro studio nei ratti maschi e femmine adulti esposti al THC in adolescenza rispetto ai corrispondenti gruppi di controllo. I nostri studi confermano dati di precedenti lavori che hanno mostrato delle differenze sesso-specifiche nel comportamento di autosomministrazione di eroina (Lynch e Carroll, 1999); è stato infatti osservato che le femmine di ratto si autosomministrano per via endovenosa quantità maggiori di eroina rispetto ai maschi (Carroll et al., 2001). Risultato ulteriormente avvalorato da una ricerca condotta su ratti di entrambi i sessi in cui è stata valutata la IVSA di oppiacei dopo trattamento in adolescenza con un agonista cannabinoide (Biscaia et al., 2008). Sotto un programma di rinforzo FR1 le femmine pre-esposte all'agonista CP55,940 mostravano un aumento delle infusioni di morfina rispetto ai ratti maschi ad ulteriore conferma di un possibile effetto *gateway* dei cannabinoidi.

## **Autosomministrazione di WIN 55,212-2, agonista dei recettori CB<sub>1</sub>, in ratti adulti maschi e femmine esposti in adolescenza al THC**

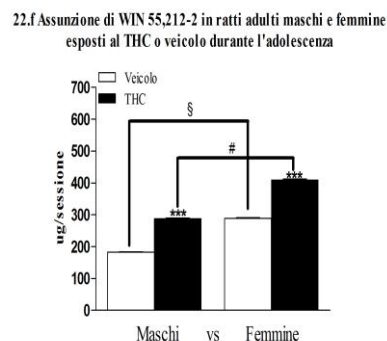
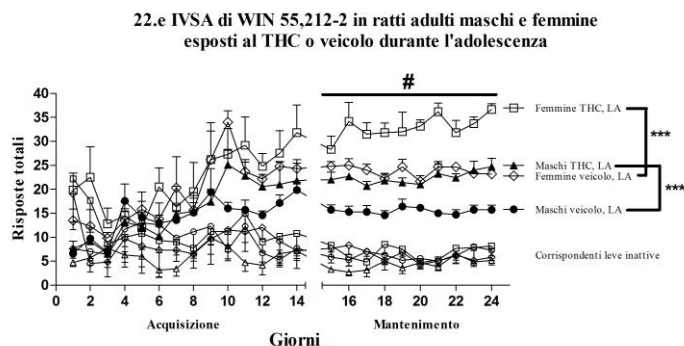
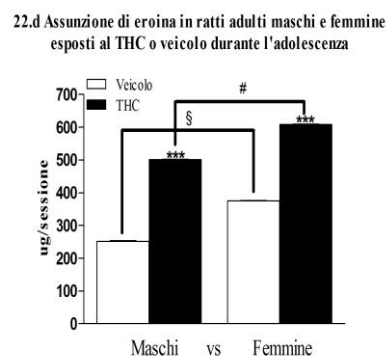
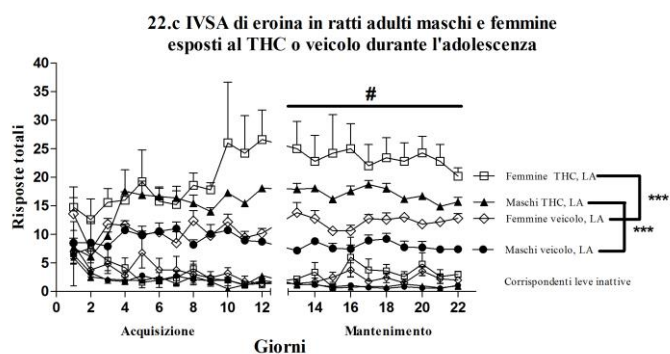
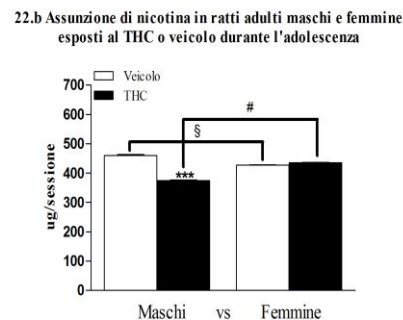
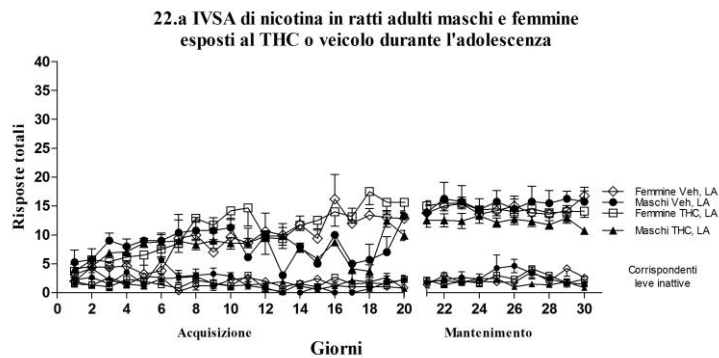
Tutti i dati riportati nella sezione dei risultati che riguardano questi esperimenti sono riassunti per un confronto tra maschi e femmine nella **Figura 22.e e f**.

Successivamente siamo passati all'analisi del ruolo del sistema endocannabinoide sul comportamento di autosomministrazione endovenosa per valutare il maggiore o più sostenuto consumo di *Cannabis* in età adulta. Molte evidenze dimostrano che i consumatori precoci di *Cannabis* rimangono dipendenti da essa per tutta la vita. Inoltre, sebbene il consumo di *Cannabis* sia dimostrato essere maggiore nel sesso maschile, molti *report* sul fenomeno dell'abuso di sostanze dimostrano un aumento e una precocizzazione del consumo di *Cannabis* nelle femmine. Questo dato emergente sul consumo di *Cannabis* da parte del sesso femminile in aumento, può essere spiegato adducendo differenze culturali, sociali ed economiche. Il modello sperimentale dell'autosomministrazione endovenosa elimina tutti questi fattori confondenti, permettendoci di verificare l'effetto comportamentale della sola sostanza. Poiché in letteratura non ci sono evidenze di un protocollo di autosomministrazione endovenosa con il principale componente psicoattivo della *Cannabis*, il THC, in quanto gli animali per diversi motivi non riescono ad apprendere il comportamento operante (Fattore et al., 2007; Mansbach et al., 1994), la terza sostanza testata nel nostro studio è stata l'agonista sintetico dei cannabinoidi WIN 55,212-2 per il quale esistono evidenze di IVSA nel ratto (Fattore et al., 2001). Con l'utilizzo di questo protocollo di IVSA di WIN 55,212-2, si è cercato di replicare un comportamento predittivo della condizione umana all'abuso continuato di *Cannabis* fin all'età adulta ed in relazione a differenze di genere. I risultati ottenuti sia con ratti maschi che con le ratte femmine, mostrano che in entrambi i gruppi di trattamento in adolescenza (veicolo o THC) gli animali apprendono il comportamento

di auto somministrazione. Così come riportato in letteratura per gli animali adulti anche nei gruppi pre-esposti al THC, sia nei maschi che nelle femmine, l'andamento dall'autosomministrazione di WIN 55,212-2 durante la fase di acquisizione è simile al gruppo di controllo. Nella fase di mantenimento gli animali pre trattati con il THC evidenziano una maggiore, significativa, assunzione di WIN 55,212-2 rispetto ai ratti che hanno ricevuto il veicolo in adolescenza. Questi risultati sembrano indicare una maggiore vulnerabilità nei ratti maschi e femmine adulti esposti al THC durante l'adolescenza, ad un maggiore consumo di cannabinoidi in età adulta avvalorando una possibile vulnerabilità degli animali pretrattati in adolescenza. Dati ottenuti nel nostro laboratorio con la metodica della microdialisi cerebrale hanno mostrato che l'effetto della somministrazione acuta di WIN 55,212-2 sui livelli extracellulari di DA nella shell del nucleo accumbens induce un rilascio di DA maggiore negli animali di controllo rispetto agli animali pretrattati con il THC in adolescenza. Anche altri lavori hanno riportato dati simili in animali pretrattati con THC sebbene non sia stato specificato il periodo di età in cui è avvenuta la preesposizione al cannabinoide (Cadoni et al., 2008). La differenza tra maggiore risposta operativa nell'autosomministrazione di WIN 55,212-2 e minore rilascio di DA nel NAc, apparentemente contraddittoria, può essere spiegata ipotizzando che la pre-esposizione al THC riduca la sensibilità recettoriale agli effetti dei cannabinoidi oppure riduca la durata degli effetti indotti dalla sostanza. Infatti, i risultati di microdialisi mostrano nei ratti pre esposti al THC un aumento del rilascio di DA ma di breve durata cui corrisponderebbe negli esperimenti di IVSA una nuova risposta operativa di pressione sulla leva attiva per ricevere una nuova scarica dopaminergica.

Come per l'IVSA di eroina anche per quella del cannabinoide la differenza tra animali di controllo e animali preesposti al THC risulta più marcata nelle femmine adulte rispetto ai maschi. Pochi lavori in letteratura hanno studiato possibili differenze di genere nel

comportamento di autosomministrazione (Fattore et al., 2007) dove però è stato dimostrato che il genere femminile evidenzia un consumo di cannabinoidi superiore al genere maschile. Le Differenze sessuali descritte nei nostri esperimenti sono in linea con i precedenti lavori che hanno dimostrato che le femmine sono più sensibili dei maschi agli effetti comportamentali indotti dai cannabinoidi. Ciò può essere attribuito, almeno in parte, alla funzione ovarica, come evidenziano esperimenti condotti su ratti femmina privi di entrambe le ovaie che hanno mostrato una minore sensibilità rispetto agli animali intatti alle proprietà gratificanti dei cannabinoidi (Fattore et al., 2007). La stessa cosa è stata evidenziata per le donne che risultano più vulnerabili degli uomini alla transizione dal consumo occasionale all'abuso di droga (Brady e Randall, 1999; Randall et al., 1999). Questi risultati sottolineano con forza l'importanza degli ormoni nella percezione delle proprietà gratificanti dei cannabinoidi, in linea con il ruolo permissivo più generale svolto dagli ormoni gonadici nel piacere e nella tossicodipendenza (Carroll et al., 2004). Un'altra possibile spiegazione è che ci possa essere un' aumentata desensibilizzazione dei recettori CB<sub>1</sub> nelle femmine adolescenti, così come evidenziato dal lavoro di Burston e colleghi (2010), desensibilizzazione dovuta all'interazione del THC con gli endocannabinoidi: la sua differente metabolizzazione nei ratti maschi e femmine suggerirebbe che i livelli più elevati di metaboliti attivi nelle femmine possano contribuire all'aumentata vulnerabilità comportamentale indotta dal THC in età adulta.



**Figura 22.** Confronto delle fasi di acquisizione e mantenimento del comportamento di auto-somministrazione di nicotina (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ), eroina (30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) e WIN 55,212-2 (12,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iniezione}$ ) in ratti maschi e femmine adulti trattati durante l'adolescenza con il THC o il veicolo. *Sinistra:* i dati sono espressi come media  $\pm$  SEM della pressione sulla leva attiva (LA) o inattiva (LI) durante ogni sessione giornaliera di due ore. \*\*\* $P < 0.0001$  vs il corrispondente gruppo e leva inattiva (ANOVA a due vie seguita dal test *post hoc* di Bonferroni). *Destra:* Assunzione totale di nicotina, eroina e WIN 55,212-2 calcolata su dieci sessioni consecutive con una risposta operante stabile durante la fase di mantenimento dell'auto-somministrazione. \*\*\*  $P < 0.0001$  vs gruppo di controllo; § $P < 0.0001$  vs gruppo di controllo maschi (t tests); # $P < 0.0001$  vs gruppo THC maschi (t-test).

## **Conclusioni**

I risultati ottenuti nel nostro studio sul comportamento di autosomministrazione sia con i ratti maschi che con le femmine supportano l'ipotesi che la pre esposizione in adolescenza con il THC aumenti la vulnerabilità ad un maggiore assunzione di eroina e WIN 55,212-2 ma non di nicotina nei ratti adulti. In linea con precedenti evidenze su differenze sesso specifiche tra ratti maschi e femmine una maggiore assunzione di eroina e WIN 55,212-2 è stata osservata nei ratti femmine rispetto ai maschi mentre non abbiamo osservato differenze nell'autosomministrazione endovenosa di nicotina.



## Bibliografia

Almeida OF, Shoaib M, Deicke J, Fischer D, Darwish MH, Patchev VK. *Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats. The role of the gonadal steroid environment.* J Clin Invest. 1998 Jun 15;101(12):2677-85;

Ameri A. *The effects of cannabinoids on the brain.* Prog Neurobiol. 1999 Jul;58(4):315-48;

Arnett JJ, Offer D, Fine MA. *Reckless driving in adolescence: 'state' and 'trait' factors.* Accid Anal Prev. 1997 Jan;29(1):57-63;

Arnone D, Barrick TR, Chengappa S, Mackay CE, Clark CA, Abou-Saleh MT. *Corpus callosum damage in heavy marijuana use: preliminary evidence from diffusion tensor tractography and tract-based spatial statistics.* Neuroimage. 2008 Jul 1;41(3):1067-74;

Arseneault L, Cannon M, Poulton R, Murray R, Caspi A, Moffitt TE. *Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study.* BMJ. 2002 Nov 23;325(7374):1212-3;

Baler RD, Volkow ND. *Drug addiction: the neurobiology of disrupted self-control.* Trends Mol Med. 2006 Dec;12(12):559-66;

Balfour DJ. *The neurobiology of tobacco dependence: a preclinical perspective on the role of the dopamine projections to the nucleus accumbens* [corrected]. Nicotine Tob Res. 2004 Dec;6(6):899-912. Review. Erratum in: Nicotine Tob Res. 2005 Apr;7(2):307;

Ball, D., Pembrey, M. and Stevens, D. (2007), 'Genomics', in: Nutt, D., Robbins, T., Stimson, G., Ince, M. and Jackson, A. (eds.), *Drugs and the future: Brain science, addiction and society*, Academic Press, London, pp. 89-132;

Bardo MT, Bevins RA. *Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward?* Psychopharmacology (Berl). 2000 Dec;153(1):31-43;

Becker JB, Perry AN, Westenbroek C. *Sex differences in the neural mechanisms mediating addiction: a new synthesis and hypothesis.* Biol Sex Differ. 2012 Jun 7;3(1):14;

Beninger RJ. *The role of dopamine in locomotor activity and learning.* Brain Res. 1983 Oct;287(2):173-96;

Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P 3rd. *Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers.* Handb Exp Pharmacol. 2009;(192):29-60;

Benthin A, Slovic P, Severson H. *A psychometric study of adolescent risk perception.* J Adolesc. 1993 Jun;16(2):153-68;

Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T. *Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 27;102(52):19115-20;

Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T. *Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity.* Science. 2007 May 25;316(5828):1212-6;

- Berke JD. *Learning and memory mechanisms involved in compulsive drug use and relapse*. Methods Mol Med. 2003;79:75-101;
- Berke JD, Hyman SE. *Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory*. Neuron. 2000 Mar;25(3):515-32;
- Berridge KC. *The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience*. Psychopharmacology (Berl). 2007 Apr;191(3):391-431;
- Biegon A, Kerman IA. *Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain*. Neuroimage. 2001 Dec;14(6):1463-8;
- Biscaia M, Fernández B, Higuera-Matas A, Miguéns M, Viveros MP, García-Lecumberri C, Ambrosio E. *Sex-dependent effects of periadolescent exposure to the cannabinoid agonist CP-55,940 on morphine self-administration behavior and the endogenous opioid system*. Neuropharmacology. 2008 Apr;54(5):863-73;
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. *Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain*. J Cell Biol. 2003 Nov 10;163(3):463-8;
- Bossong MG, Niesink RJ. *Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia*. Prog Neurobiol. 2010 Nov;92(3):370-85;
- Brady KT, Randall CL. *Gender differences in substance use disorders*. Psychiatr Clin North Am. 1999 Jun;22(2):241-52;
- Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Vogt LJ, Sim-Selley LJ. *Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain*. J Neurochem. 1999 Dec;73(6):2447-59;
- Burston JJ, Wiley JL, Craig AA, Selley DE, Sim-Selley LJ. *Regional enhancement of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor desensitization in female adolescent rats following repeated Delta-tetrahydrocannabinol exposure*. Br J Pharmacol. 2010 Sep;161(1):103-12;
- Byrnes JP. *The development of decision-making*. J Adolesc Health. 2002 Dec;31(6 Suppl):208-15;
- Cabeza de Vaca S, Carr KD. *Food restriction enhances the central rewarding effect of abused drugs*. J Neurosci. 1998 Sep 15;18(18):7502-10;
- Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. *Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain*. J Neurosci. 1997 Feb 15;17(4):1226-42;
- Cadoni C, Valentini V, Di Chiara G. *Behavioral sensitization to delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine: differential changes in accumbal shell and core dopamine transmission*. J Neurochem. 2008 Aug;106(4):1586-93;
- Caggiula AR, Donny EC, White AR, Chaudhri N, Booth S, Gharib MA, Hoffman A, Perkins KA, Sved AF. *Environmental stimuli promote the acquisition of nicotine self-administration in rats*. Psychopharmacology (Berl). 2002 Sep;163(2):230-7;

- Caille S, Clemens K, Stinus L, Cador M. *Modeling nicotine addiction in rats*. *Methods Mol Biol*. 2012;829:243-56;
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M. *Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity*. *Trends Neurosci*. 2007 May;30(5):211-9;
- Campbell UC, Carroll ME. *Acquisition of drug self-administration: environmental and pharmacological interventions*. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2000 Aug;8(3):312-25;
- Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. *Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism*. *Mol Pharmacol*. 2004 Apr;65(4):999-1007;
- Carroll ME, Roth ME, Voeller RK, Nguyen PD. *Acquisition of oral phencyclidine self-administration in rhesus monkeys: effect of sex*. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 May;149(4):401-8;
- Carroll ME, Campbell UC, Heideman P. *Ketoconazole suppresses food restriction-induced increases in heroin self-administration in rats: sex differences*. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2001 Aug;9(3):307-16;
- Carroll ME, Lynch WJ, Roth ME, Morgan AD, Cosgrove KP. *Sex and estrogen influence drug abuse*. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 May;25(5):273-9;
- Carroll ME, Batulis DK, Landry KL, Morgan AD. *Sex differences in the escalation of oral phencyclidine (PCP) self-administration under FR and PR schedules in rhesus monkeys*. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Jul;180(3):414-26;
- Casey BJ, Trainor RJ, Orendi JL, Schubert AB, Nystrom LE, Giedd JN, Castellanos FX, Haxby JV, Noll DC, Cohen JD, Forman SD, Dahl RE, Rapoport JL. *A Developmental Functional MRI Study of Prefrontal Activation during Performance of a Go-No-Go Task*. *J Cogn Neurosci*. 1997 Nov;9(6):835-47;
- Casey BJ, Tottenham N, Fossella J. *Clinical, imaging, lesion, and genetic approaches toward a model of cognitive control*. *Dev Psychobiol*. 2002 Apr;40(3):237-54;
- Caspi A, Moffitt TE, Cannon M, McClay J, Murray R, Harrington H, Taylor A, Arseneault L, Williams B, Braithwaite A, Poulton R, Craig IW. *Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction*. *Biol Psychiatry*. 2005 May 15;57(10):1117-27;
- Castañé A, Berrendero F, Maldonado R. *The role of the cannabinoid system in nicotine addiction*. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005 Jun;81(2):381-6;
- Chambers RA, Taylor JR, Potenza MN. *Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability*. *Am J Psychiatry*. 2003 Jun;160(6):1041-52;
- Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Léna C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, McIntosh JM, Gardier AM, Changeux JP. *Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice*. *J Neurosci*. 2003 Aug 27;23(21):7820-9;

- Cheer JF, Wassum KM, Sombers LA, Heien ML, Ariansen JL, Aragona BJ, Phillips PE, Wightman RM. *Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation*. J Neurosci. 2007 Jan 24;27(4):791-5;
- Chen BT, Hopf FW, Bonci A. *Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implications for substance abuse*. Ann N Y Acad Sci. 2010 Feb;1187:129-39;
- Cicero TJ, Aylward SC, Meyer ER. *Gender differences in the intravenous self-administration of mu opiate agonists*. Pharmacol Biochem Behav. 2003 Feb;74(3):541-9;
- Cleveland HH, Wiebe RP. *Understanding the association between adolescent marijuana use and later serious drug use: gateway effect or developmental trajectory?* Dev Psychopathol. 2008 Spring;20(2):615-32;
- Cohen C, Perrault G, Voltz C, Steinberg R, Soubrié P. *SR141716, a central cannabinoid (CB1) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats*. Behav Pharmacol. 2002 Sep;13(5-6):451-63;
- Cohen C, Perrault G, Griebel G, Soubrié P. *Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716)*. Neuropsychopharmacology. 2005 Jan;30(1):145-55;
- Cohen-Cory S. *The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits*. Science. 2002 Oct 25;298(5594):770-6;
- Collins RJ, Weeks JR, Cooper MM, Good PI, Russell RR. *Prediction of abuse liability of drugs using IV self-administration by rats*. Psychopharmacology (Berl). 1984;82(1-2):6-13;
- Colpaert FC. *Drug discrimination in neurobiology*. Pharmacol Biochem Behav. 1999 Oct;64(2):337-45;
- Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA. *Cannabinoid/opioid crosstalk in the central nervous system*. Crit Rev Neurobiol. 2004;16(1-2):159-72;
- Corrigall WA, Coen KM. *Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule*. Psychopharmacology (Berl). 1989;99(4):473-8;
- Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL. *Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area*. Brain Res. 1994 Aug 8;653(1-2):278-84;
- Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. *Nicotinic receptors at the amino acid level*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000;40:431-58;
- Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Böhme GA, Parmentier M, Fratta W. *Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse*. Behav Brain Res. 2001 Jan 8;118(1):61-5;
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. *Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides*. Nature. 1996 Nov 7;384(6604):83-7;
- Crews F, He J, Hodge C. *Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction*. Pharmacol Biochem Behav. 2007 Feb;86(2):189-99;

Degenhardt L, Coffey C, Carlin JB, Swift W, Moore E, Patton GC. *Outcomes of occasional cannabis use in adolescence: 10-year follow-up study in Victoria, Australia*. Br J Psychiatry. 2010 Apr;196(4):290-5;

Degenhardt L, Dierker L, Chiu WT, Medina-Mora ME, Neumark Y, Sampson N, Alonso J, Angermeyer M, Anthony JC, Bruffaerts R, de Girolamo G, de Graaf R, Gureje O, Karam AN, Kostyuchenko S, Lee S, Lépine JP, Levinson D, Nakamura Y, Posada-Villa J, Stein D, Wells JE, Kessler RC. *Evaluating the drug use "gateway" theory using cross-national data: consistency and associations of the order of initiation of drug use among participants in the WHO World Mental Health Surveys*. Drug Alcohol Depend. 2010 Apr 1;108(1-2):84-97;

De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. *The endocannabinoid system: a general view and latest additions*. Br J Pharmacol. 2004 Mar;141(5):765-74;

Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol Pharmacol. 1988 Nov;34(5):605-13;

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. Science. 1992 Dec 18;258(5090):1946-9;

De Vries TJ, Homberg JR, Binnekade R, Raasø H, Schoffelmeer AN. *Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats*. Psychopharmacology (Berl). 2003 Jul;168(1-2):164-9;

Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M. *International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors*. Pharmacol Rev. 1996 Dec;48(4):567-92;

Di Chiara G. *A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use*. J Psychopharmacol. 1998;12(1):54-67;

Di Chiara G. *Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction*. Eur J Pharmacol. 2000 Mar 30;393(1-3):295-314;

Di Chiara G, Imperato A. *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jul;85(14):5274-8;

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. *Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons*. Nature. 1994 Dec 15;372(6507):686-91;

Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. *The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation*. Nat Rev Drug Discov. 2004 Sep;3(9):771-84;

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. *Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 6;99(16):10819-24. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 2002 Oct 15;99(21):13961;

Donny EC, Caggiula AR, Rowell PP, Gharib MA, Maldovan V, Booth S, Mielke MM, Hoffman A, McCallum S. *Nicotine self-administration in rats: estrous cycle effects, sex differences and nicotinic receptor binding*. Psychopharmacology (Berl). 2000 Sep;151(4):392-405;

- Edelman, G.M. (1987) *Neural Darwinism: The Theory of Neuronal Group Selection*. Basic Books, New York;
- Ellgren M, Spano SM, Hurd YL. *Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats*. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Mar;32(3):607-15;
- Ellgren M, Artmann A, Tkalych O, Gupta A, Hansen HS, Hansen SH, Devi LA, Hurd YL. *Dynamic changes of the endogenous cannabinoid and opioid mesocorticolimbic systems during adolescence: THC effects*. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2008 Nov;18(11):826-34;
- Ernst M, Nelson EE, Jazbec S, McClure EB, Monk CS, Leibenluft E, Blair J, Pine DS. *Amygdala and nucleus accumbens in responses to receipt and omission of gains in adults and adolescents*. *Neuroimage*. 2005 May 1;25(4):1279-91;
- Everitt BJ, Robbins TW. *Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion*. *Nat Neurosci*. 2005 Nov;8(11):1481-9. Review. Erratum in: *Nat Neurosci*. 2006 Jul;9(7):979;
- Fattore L, Spano MS, Cossu G, Deiana S, Fratta W. *Cannabinoid mechanism in reinstatement of heroin-seeking after a long period of abstinence in rats*. *Eur J Neurosci*. 2003 Apr;17(8):1723-6;
- Fattore L, Cossu G, Spano MS, Deiana S, Fadda P, Scherma M, Fratta W. *Cannabinoids and reward: interactions with the opioid system*. *Crit Rev Neurobiol*. 2004;16(1-2):147-58;
- Fattore L, Deiana S, Spano SM, Cossu G, Fadda P, Scherma M, Fratta W. *Endocannabinoid system and opioid addiction: behavioural aspects*. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005 Jun;81(2):343-59;
- Fattore L, Spano S, Cossu G, Deiana S, Fadda P, Fratta W. *Cannabinoid CB(1) antagonist SR 141716A attenuates reinstatement of heroin self-administration in heroin-abstinent rats*. *Neuropharmacology*. 2005 Jun;48(8):1097-104;
- Fattore L, Spano MS, Deiana S, Melis V, Cossu G, Fadda P, Fratta W. *An endocannabinoid mechanism in relapse to drug seeking: a review of animal studies and clinical perspectives*. *Brain Res Rev*. 2007 Jan;53(1):1-16;
- Fattore L, Viganò D, Fadda P, Rubino T, Fratta W, Parolaro D. *Bidirectional regulation of mu-opioid and CB1-cannabinoid receptor in rats self-administering heroin or WIN 55,212-2*. *Eur J Neurosci*. 2007 Apr;25(7):2191-200;
- Fattore L, Altea S, Fratta W. *Sex differences in drug addiction: a review of animal and human studies*. *Womens Health (Lond Engl)*. 2008 Jan;4:51-65;
- Fattore L, Fadda P, Fratta W. *Sex differences in the self-administration of cannabinoids and other drugs of abuse*. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Dec;34 Suppl 1:S227-36;
- Fattore L, Spano MS, Altea S, Fadda P, Fratta W. *Drug- and cue-induced reinstatement of cannabinoid-seeking behaviour in male and female rats: influence of ovarian hormones*. *Br J Pharmacol*. 2010 Jun;160(3):724-35;
- Fergusson DM, Horwood LJ. *Early onset cannabis use and psychosocial adjustment in young adults*. *Addiction*. 1997 Mar;92(3):279-96;
- Fergusson DM, Horwood LJ, Swain-Campbell N. *Cannabis use and psychosocial adjustment in adolescence and young adulthood*. *Addiction*. 2002 Sep;97(9):1123-35;

- Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ. *Cannabis use and other illicit drug use: testing the cannabis gateway hypothesis*. *Addiction*. 2006 Apr;101(4):556-69;
- Fernández-Ruiz J, Berrendero F, Hernández ML, Ramos JA. *The endogenous cannabinoid system and brain development*. *Trends Neurosci*. 2000 Jan;23(1):14-20;
- Fimiani C, Liberty T, Aquirre AJ, Amin I, Ali N, Stefano GB. *Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1999 Jan;57(1):23-34;
- Forget B, Hamon M, Thiébot MH. *Cannabinoid CB1 receptors are involved in motivational effects of nicotine in rats*. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Oct;181(4):722-34;
- Fox HC, Hong KI, Siedlarz K, Sinha R. *Enhanced sensitivity to stress and drug/alcohol craving in abstinent cocaine-dependent individuals compared to social drinkers*. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Mar;33(4):796-805;
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling*. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):1017-66;
- Fride E. *Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior*. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005 Dec;4(6):633-42;
- Fried CS, Reppucci ND. *Criminal decision making: the development of adolescent judgment, criminal responsibility, and culpability*. *Law Hum Behav*. 2001 Feb;25(1):45-61;
- Fuchs RA, Evans KA, Mehta RH, Case JM, See RE. *Influence of sex and estrous cyclicity on conditioned cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats*. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 May;179(3):662-72;
- Galvan A, Hare TA, Parra CE, Penn J, Voss H, Glover G, Casey BJ. *Earlier development of the accumbens relative to orbitofrontal cortex might underlie risk-taking behavior in adolescents*. *J Neurosci*. 2006 Jun 21;26(25):6885-92;
- Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M. *The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease*. *Neuroscientist*. 2007 Apr;13(2):109-14;
- Gardner M, Steinberg L. *Peer influence on risk taking, risk preference, and risky decision making in adolescence and adulthood: an experimental study*. *Dev Psychol*. 2005 Jul;41(4):625-35. Erratum in: *Dev Psychol*. 2012 Mar;48(2):589;
- Gariano RF, Groves PM. *Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal and anterior cingulate cortices*. *Brain Res*. 1988 Oct 11;462(1):194-8;
- Ghozland S, Matthes HW, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL, Maldonado R. *Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors*. *J Neurosci*. 2002 Feb 1;22(3):1146-54;
- Giedd JN. *Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain*. *Ann NY Acad Sci*. 2004 Jun;1021:77-85;
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. *Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum*. *Nat Neurosci*. 1999 Apr;2(4):358-63;

Glass M, Dragunow M, Faull RL. *Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain.* Neuroscience. 1997 Mar;77(2):299-318;

Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF 3rd, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM. *Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 May 25;101(21):8174-9;

Goldberg SR, Spealman RD, Risner ME, Henningfield JE. *Control of behavior by intravenous nicotine injections in laboratory animals.* Pharmacol Biochem Behav. 1983 Dec;19(6):1011-20;

Goldman D, Oroszi G, Ducci F. *The genetics of addictions: uncovering the genes.* Nat Rev Genet. 2005 Jul;6(7):521-32;

Golub A, Johnson BD. *Substance use progression and hard drug use in inner-city New York.* In: Kandel DB. *Stages and Pathways of Drug Involvement: Examining the Gateway Hypothesis:* 90-112. Cambridge University Press, New York, 2002;

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain.* Brain Res. 2006 Feb 3;1071(1):10-23;

González S, Cascio MG, Fernández-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA. *Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine.* Brain Res. 2002 Nov 1;954(1):73-81;

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

Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S. *Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors.* Biochem Pharmacol. 1999 Feb 15;57(4):417-23;

Gruber AJ, Pope HG Jr. *Marijuana use among adolescents.* Pediatr Clin North Am. 2002 Apr;49(2):389-413;

Hall WD, Lynskey M. *Is cannabis a gateway drug? Testing hypotheses about the relationship between cannabis use and the use of other illicit drugs.* Drug Alcohol Rev. 2005 Jan;24(1):39-48;

Hansson AC, Cippitelli A, Sommer WH, Fedeli A, Björk K, Soverchia L, Terasmaa A, Massi M, Heilig M, Ciccocioppo R. *Variation at the rat Crhr1 locus and sensitivity to relapse into alcohol seeking induced by environmental stress.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 10;103(41):15236-41;

Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J. *Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development.* Mol Cell Endocrinol. 2008 Apr 16;286(1-2 Suppl 1):S84-90;

Harvey DM, Yasar S, Heishman SJ, Panlilio LV, Henningfield JE, Goldberg SR. *Nicotine serves as an effective reinforcer of intravenous drug-taking behavior in human cigarette smokers.* Psychopharmacology (Berl). 2004 Sep;175(2):134-42;

Harvey MA, Sellman JD, Porter RJ, Frampton CM. *The relationship between non-acute adolescent cannabis use and cognition.* Drug Alcohol Rev. 2007 May;26(3):309-19;



- Hayatbakhsh MR, Najman JM, Jamrozik K, Mamun AA, Alati R, Bor W. *Cannabis and anxiety and depression in young adults: a large prospective study*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 2007 Mar;46(3):408-17;
- Henningfield JE, Goldberg SR. *Nicotine as a reinforcer in human subjects and laboratory animals*. Pharmacol Biochem Behav. 1983 Dec;19(6):989-92;
- Henningfield JE, Cohen C, Heishman SJ. *Drug self-administration methods in abuse liability evaluation*. Br J Addict. 1991 Dec;86(12):1571-7;
- Henquet C, Krabbendam L, de Graaf R, ten Have M, van Os J. *Cannabis use and expression of mania in the general population*. J Affect Disord. 2006 Oct;95(1-3):103-10;
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. *Cannabinoid receptor localization in brain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Mar;87(5):1932-6;
- Hernandez-Avila CA, Rounsaville BJ, Kranzler HR. *Opioid-, cannabis- and alcohol-dependent women show more rapid progression to substance abuse treatment*. Drug Alcohol Depend. 2004 Jun 11;74(3):265-72;
- Higuera-Matas A, Soto-Montenegro ML, del Olmo N, Miguéns M, Torres I, Vaquero JJ, Sánchez J, García-Lecumberri C, Desco M, Ambrosio E. *Augmented acquisition of cocaine self-administration and altered brain glucose metabolism in adult female but not male rats exposed to a cannabinoid agonist during adolescence*. Neuropsychopharmacology. 2008 Mar;33(4):806-13;
- Higuera-Matas A, Boteau F, Del Olmo N, Miguéns M, Olías O, Montoya GL, García-Lecumberri C, Ambrosio E. *Periadolescent exposure to cannabinoids alters the striatal and hippocampal dopaminergic system in the adult rat brain*. Eur Neuropsychopharmacol. 2010 Dec;20(12):895-906;
- Hillard CJ, Wilkison DM, Edgemond WS, Campbell WB. *Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain*. Biochim Biophys Acta. 1995 Aug 3;1257(3):249-56;
- Hillig KW, Mahlberg PG. *A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae)*. Am J Bot. 2004 Jun;91(6):966-75;
- Hoffman AF, Lupica CR. *Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids*. J Neurophysiol. 2001 Jan;85(1):72-83;
- Hohmann AG, Briley EM, Herkenham M. *Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord*. Brain Res. 1999 Mar 20;822(1-2):17-25;
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors*. Pharmacol Rev. 2002 Jun;54(2):161-202;
- Hu M, Crombag HS, Robinson TE, Becker JB. *Biological basis of sex differences in the propensity to self-administer cocaine*. Neuropsychopharmacology. 2004 Jan;29(1):81-5;
- Hughes J. *Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine*. Brain Res. 1975 May 2;88(2):295-308;

- Hughes JR. *Dependence potential and abuse liability of nicotine replacement therapies*. Prog Clin Biol Res. 1988;261:261-77;
- Hutcheson DM, Everitt BJ, Robbins TW, Dickinson A. *The role of withdrawal in heroin addiction: enhances reward or promotes avoidance?* Nat Neurosci. 2001 Sep;4(9):943-7;
- Hyman SE. *Addiction: a disease of learning and memory*. Am J Psychiatry. 2005 Aug;162(8):1414-22;
- Hyman SE, Malenka RC. *Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence*. Nat Rev Neurosci. 2001 Oct;2(10):695-703;
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. *Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory*. Annu Rev Neurosci. 2006;29:565-98;
- Ikemoto S. *Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex*. Brain Res Rev. 2007 Nov;56(1):27-78;
- Ishii M, Kurachi Y. *Muscarinic acetylcholine receptors*. Curr Pharm Des. 2006;12(28):3573-81;
- Iyalomhe GB. *Cannabis abuse and addiction: a contemporary literature review*. Niger J Med. 2009 Apr-Jun;18(2):128-33;
- Iversen L. *Cannabis and the brain*. Brain. 2003 Jun;126(Pt 6):1252-70;
- Jentsch JD, Taylor JR. *Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli*. Psychopharmacology (Berl). 1999 Oct;146(4):373-90;
- Johnson MR, Rice KC, Howlett A, Melvin LS, Herkenham M. *The cannabinoid receptor-pharmacologic identification, anatomical localization and cloning*. NIDA Res Monogr. 1992;119:86-90;
- Johnson SW, North RA. *Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons*. J Neurosci. 1992 Feb;12(2):483-8;
- Juarez J, Guzman-Flores C, Ervin FR, Palmour RM. *Voluntary alcohol consumption in vervet monkeys: individual, sex, and age differences*. Pharmacol Biochem Behav. 1993 Dec;46(4):985-8;
- Justinova Z, Tanda G, Munzar P, Goldberg SR. *The opioid antagonist naltrexone reduces the reinforcing effects of Delta 9 tetrahydrocannabinol (THC) in squirrel monkeys*. Psychopharmacology (Berl). 2004 Apr;173(1-2):186-94;
- Kandel D. *Stages in adolescent involvement in drug use*. Science. 1975 Nov 28;190(4217):912-4;
- Kandel ER. *Principi di neuroscienze*. 1998; 150-54;
- Katona I, Sperl agh B, S ik A, K afalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. *Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons*. J Neurosci. 1999 Jun 1;19(11):4544-58;
- Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF. *Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission*. J Neurosci. 2001 Dec 1;21(23):9506-18;

- Katz LC, Shatz CJ. *Synaptic activity and the construction of cortical circuits*. Science. 1996 Nov 15;274(5290):1133-8;
- Kauer JA, Malenka RC. *Synaptic plasticity and addiction*. Nat Rev Neurosci. 2007 Nov;8(11):844-58;
- Kawai H, Zago W, Berg DK. *Nicotinic alpha 7 receptor clusters on hippocampal GABAergic neurons: regulation by synaptic activity and neurotrophins*. J Neurosci. 2002 Sep 15;22(18):7903-12;
- Kelley AE, Berridge KC. *The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs*. J Neurosci. 2002 May 1;22(9):3306-11;
- Kelley AE, Bakshi VP, Haber SN, Steininger TL, Will MJ, Zhang M. *Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum*. Physiol Behav. 2002 Jul;76(3):365-77;
- Klein LC, Popke EJ, Grunberg NE. *Sex differences in effects of predictable and unpredictable footshock on fentanyl self-administration in rats*. Exp Clin Psychopharmacol. 1997 May;5(2):99-106;
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP. *Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei*. J Neurosci. 2001; 21(5): 1452–1463;
- Kippin TE, Fuchs RA, Mehta RH, Case JM, Parker MP, Bimonte-Nelson HA, See RE. *Potentiation of cocaine-primed reinstatement of drug seeking in female rats during estrus*. Psychopharmacology (Berl). 2005 Oct;182(2):245-52;
- Koob GF. *Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction*. Ann N Y Acad Sci. 1999;897:27-45;
- Koob GF. *A role for brain stress systems in addiction*. Neuron. 2008 Jul 10;59(1):11-34;
- Koob GF, Bloom FE. *Cellular and molecular mechanisms of drug dependence*. Science. 1988 Nov 4;242(4879):715-23;
- Koob GF, Le Moal M. *Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation*. Science. 1997 Oct 3;278(5335):52-8;
- Koob GF, Le Moal M. *Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction*. Nat Neurosci. 2005 Nov;8(11):1442-4;
- Koob GF, Ahmed SH, Boutrel B, Chen SA, Kenny PJ, Markou A, O'Dell LE, Parsons LH, Sanna PP. *Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence*. Neurosci Biobehav Rev. 2004 Jan;27(8):739-49;
- Koob GF, Rocio M, Carrera A, Gold LH, Heyser CJ, Maldonado-Irizarry C, Markou A, Parsons LH, Roberts AJ, Schulteis G, Stinus L, Walker JR, Weissenborn R, Weiss F. *Substance dependence as a compulsive behavior*. J Psychopharmacol. 1998;12(1):39-48;
- Koob GF, Goeders NE (1989) In: Liebman L, Cooper H (eds) *The neuropharmacological basis of reward*. Oxford University Press, New York;
- Kuhnen CM, Knutson B. *The neural basis of financial risk taking*. Neuron. 2005 Sep 1;47(5):763-70;

- Lane SD, Cherek DR, Tcheremissine OV, Steinberg JL, Sharon JL. *Response perseveration and adaptation in heavy marijuana-smoking adolescents*. *Addict Behav*. 2007 May;32(5):977-90;
- Lanza ST, Donny EC, Collins LM, Balster RL. *Analyzing the acquisition of drug self-administration using growth curve models*. *Drug Alcohol Depend*. 2004 Jul 15;75(1):11-21;
- Laviola G, Macrì S, Morley-Fletcher S, Adriani W. *Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence*. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003 Jan-Mar;27(1-2):19-31;
- Laviolette SR, van der Kooy D. *Blockade of mesolimbic dopamine transmission dramatically increases sensitivity to the rewarding effects of nicotine in the ventral tegmental area*. *Mol Psychiatry*. 2003 Jan;8(1):50-9, 9;
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. *Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice*. *Science*. 1999 Jan 15;283(5400):401-4;
- Le Foll B, Goldberg SR. *Rimonabant, a CB1 antagonist, blocks nicotine-conditioned place preferences*. *Neuroreport*. 2004 Sep 15;15(13):2139-43;
- Le Foll B, Goldberg SR. *Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats*. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Apr;178(4):481-92;
- Le Foll B, Goldberg SR. *Nicotine as a typical drug of abuse in experimental animals and humans*. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006 Mar;184(3-4):367-81;
- Le Foll B, Goldberg SR. *Effects of nicotine in experimental animals and humans: an update on addictive properties*. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(192):335-67;
- Lenroot RK, Schmitt JE, Ordaz SJ, Wallace GL, Neale MC, Lerch JP, Kendler KS, Evans AC, Giedd JN. *Differences in genetic and environmental influences on the human cerebral cortex associated with development during childhood and adolescence*. *Hum Brain Mapp*. 2009 Jan;30(1):163-74;
- Lessem JM, Hopfer CJ, Haberstick BC, Timberlake D, Ehringer MA, Smolen A, Hewitt JK. *Relationship between adolescent marijuana use and young adult illicit drug use*. *Behav Genet*. 2006 Jul;36(4):498-506;
- Levin ED, Hampton D, Rose JE. *IV nicotine self-administration in rats using the consummatory operant licking response*. *Physiol Behav*. 2010 Dec 2;101(5):755-8;
- Lindstrom J. *Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease*. *Mol Neurobiol*. 1997 Oct;15(2):193-222;
- Luna B. *Developmental changes in cognitive control through adolescence*. *Adv Child Dev Behav*. 2009;37:233-78;
- Lynch WJ, Carroll ME. *Sex differences in the acquisition of intravenously self-administered cocaine and heroin in rats*. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 May;144(1):77-82;

- Lynch WJ, Arizzi MN, Carroll ME. *Effects of sex and the estrous cycle on regulation of intravenously self-administered cocaine in rats*. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 Oct;152(2):132-9;
- Lynch WJ, Roth ME, Carroll ME. *Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies*. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Nov;164(2):121-37;
- Lynskey M, Hall W. *The effects of adolescent cannabis use on educational attainment: a review*. *Addiction*. 2000 Nov;95(11):1621-30;
- Lynskey MT, Heath AC, Bucholz KK, Slutske WS, Madden PA, Nelson EC, Statham DJ, Martin NG. *Escalation of drug use in early-onset cannabis users vs co-twin controls*. *JAMA*. 2003 Jan 22-29;289(4):427-33;
- Mackie K. *Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system*. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):299-325;
- Mackie K. *Signaling via CNS cannabinoid receptors*. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Apr 16;286(1-2 Suppl 1):S60-5;
- Mailleux P, Verslijpe M, Vanderhaeghen JJ. *Initial observations on the distribution of cannabinoid receptor binding sites in the human adult basal ganglia using autoradiography*. *Neurosci Lett*. 1992 May 11;139(1):7-9;
- Maldonado, R. (2003) *Opioid system involvement in cannabinoid tolerance and dependence*. In *Molecular Biology of Drug Addiction* (Maldonado, R., ed.), pp. 221–248, Humana Press;
- Maldonado R, Rodríguez de Fonseca F. *Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates*. *J Neurosci*. 2002 May 1;22(9):3326-31;
- Mansbach RS, Nicholson KL, Martin BR, Balster RL. *Failure of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and CP 55,940 to maintain intravenous self-administration under a fixed-interval schedule in rhesus monkeys*. *Behav Pharmacol*. 1994 Apr;5(2):219-225;
- Mansvelder HD, McGehee DS. *Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction*. *J Neurobiol*. 2002 Dec;53(4):606-17;
- Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS. *Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas*. *Neuron*. 2002; 33:905–919;
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA. *Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids*. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Jul;20(7):287-94;
- Manzoni OJ, Bockaert J. *Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens*. *Eur J Pharmacol*. 2001 Jan 26;412(2):R3-5;
- Martin CA, Kelly TH, Rayens MK, Brogli BR, Brenzel A, Smith WJ, Omar HA. *Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence*. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2002 Dec;41(12):1495-502;
- Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. *Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice*. *Eur J Neurosci*. 2000 Nov;12(11):4038-46;

- Mascia MS, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Böhme GA, Imperato A, Fratta W. *Lack of morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of cannabinoid CB(1) receptor knockout mice*. Eur J Pharmacol. 1999 Nov 3;383(3):R1-2;
- Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N, Cloëz-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP. *Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors*. Nature. 2005 Jul 7;436(7047):103-7;
- Mata I, Perez-Iglesias R, Roiz-Santiañez R, Tordesillas-Gutierrez D, Pazos A, Gutierrez A, Vazquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. *Gyrification brain abnormalities associated with adolescence and early-adulthood cannabis use*. Brain Res. 2010 Mar 4;1317:297-304;
- Matochik JA, Eldreth DA, Cadet JL, Bolla KI. *Altered brain tissue composition in heavy marijuana users*. Drug Alcohol Depend. 2005 Jan 7;77(1):23-30;
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature. 1990 Aug 9;346(6284):561-4;
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ. *Cannabinoid receptors: which cells, where, how, and why?* NIDA Res Monogr. 1992;126:48-56;
- Matthews SC, Simmons AN, Lane SD, Paulus MP. *Selective activation of the nucleus accumbens during risk-taking decision making*. Neuroreport. 2004 Sep 15;15(13):2123-7;
- McDowell JJ. *Behavioral and neural Darwinism: selectionist function and mechanism in adaptive behavior dynamics*. Behav Processes. 2010 May;84(1):358-65;
- McFarland NR, Haber SN. *Convergent inputs from thalamic motor nuclei and frontal cortical areas to the dorsal striatum in the primate*. J Neurosci 2000;20:3798–3813;
- McGehee DS, Role LW. *Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons*. Annu Rev Physiol. 1995;57:521-46;
- McGranahan TM, Patzlaff NE, Grady SR, Heinemann SF, Booker TK.  *$\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic neurons mediate nicotine reward and anxiety relief*. J Neurosci. 2011 Jul 27;31(30):10891-902;
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors*. Biochem Pharmacol. 1995 Jun 29;50(1):83-90;
- Medina KL, Hanson KL, Schweinsburg AD, Cohen-Zion M, Nagel BJ, Tapert SF. *Neuropsychological functioning in adolescent marijuana users: subtle deficits detectable after a month of abstinence*. J Int Neuropsychol Soc. 2007 Sep;13(5):807-20;
- Melis M, Pistis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, Gessa GL. *Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors*. J Neurosci. 2004 Jan 7;24(1):53-62;
- Mereu G, Yoon KW, Boi V, Gessa GL, Naes L, Westfall TC. *Preferential stimulation of ventral tegmental area dopaminergic neurons by nicotine*. Eur J Pharmacol. 1987 Sep 23;141(3):395-9;
- Mesulam MM. *Frontal cortex and behavior*. Ann Neurol. 1986 Apr;19(4):320-5;

- Middaugh LD, Kelley BM, Bandy AL, McGroarty KK. *Ethanol consumption by C57BL/6 mice: influence of gender and procedural variables*. Alcohol. 1999 Apr;17(3):175-83;
- Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, Sakmann B. *Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor*. Nature. 1986 May 22-28;321(6068):406-11;
- Montague PR, Berns GS. *Neural economics and the biological substrates of valuation*. Neuron. 2002 Oct 10;36(2):265-84;
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature. 1993 Sep 2;365(6441):61-5;
- Nakahara D, Ozaki N, Kapoor V, Nagatsu T. *The effect of uptake inhibition on dopamine release from the nucleus accumbens of rats during self- or forced stimulation of the medial forebrain bundle: a microdialysis study*. Neurosci Lett. 1989 Sep 25;104(1-2):136-40;
- Nakahara D, Ozaki N, Miura Y, Miura H, Nagatsu T. *Increased dopamine and serotonin metabolism in rat nucleus accumbens produced by intracranial self-stimulation of medial forebrain bundle as measured by in vivo microdialysis*. Brain Res. 1989 Aug 21;495(1):178-81;
- Narimatsu S, Watanabe K, Yamamoto I, Yoshimura H. *Sex difference in the oxidative metabolism of delta 9-tetrahydrocannabinol in the rat*. Biochem Pharmacol. 1991 Apr 15;41(8):1187-94;
- Navarro M, Chowen J, Rocío A Carrera M, del Arco I, Villanúa MA, Martin Y, Roberts AJ, Koob GF, de Fonseca FR. *CBI cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats*. Neuroreport. 1998 Oct 26;9(15):3397-402;
- Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L, Chowen JA, Gomez R, del Arco I, Villanua MA, Maldonado R, Koob GF, Rodriguez de Fonseca F. *Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration*. J Neurosci. 2001 Jul 15;21(14):5344-50;
- Nestler EJ. *Under siege: The brain on opiates*. Neuron. 1996 May;16(5):897-900;
- Nestler EJ. *Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction*. Curr Opin Neurobiol. 1997 Oct;7(5):713-9;
- Nestler EJ. *Genes and addiction*. Nat Genet. 2000 Nov;26(3):277-81;
- Nestler EJ. *Molecular mechanisms of drug addiction*. Neuropharmacology. 2004;47 Suppl 1:24-32;
- Nestler EJ, Berhow MT, Brodtkin ES. *Molecular mechanisms of drug addiction: adaptations in signal transduction pathways*. Mol Psychiatry. 1996 Jul;1(3):190-9;
- Nisell M, Nomikos GG, Svensson TH. *Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral tegmental area*. Synapse. 1994 Jan;16(1):36-44;
- O'Brien CP, Gardner EL. *Critical assessment of how to study addiction and its treatment: human and non-human animal models*. Pharmacol Ther. 2005 Oct;108(1):18-58;

- Okamoto Y, Morishita J, Wang J, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Ueda N. *Mammalian cells stably overexpressing N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolysing phospholipase D exhibit significantly decreased levels of N-acylphosphatidylethanolamines*. *Biochem J*. 2005 Jul 1;389(Pt 1):241-7;
- 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, Teasensfitz L, Uhl GR. *Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain*. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Aug;1074:514-36;
- Palmer SL, Thakur GA, Makriyannis A. *Cannabinergic ligands*. *Chem Phys Lipids*. 2002 Dec 31;121(1-2):3-19;
- Panlilio LV, Goldberg SR. *Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool*. *Addiction*. 2007 Dec;102(12):1863-70;
- Parolaro D, Rubino T. *The role of the endogenous cannabinoid system in drug addiction*. *Drug News Perspect*. 2008 Apr;21(3):149-57;
- Patton GC, McMorris BJ, Toumbourou JW, Hemphill SA, Donath S, Catalano RF. *Puberty and the onset of substance use and abuse*. *Pediatrics*. 2004 Sep;114(3):e300-6;
- Perkins KA, Donny E, Caggiula AR. *Sex differences in nicotine effects and self-administration: review of human and animal evidence*. *Nicotine Tob Res*. 1999 Dec;1(4):301-15;
- Pert CB, Snyder SH. *Opiate receptor: demonstration in nervous tissue*. *Science*. 1973 Mar 9;179(4077):1011-4;
- Pertwee RG. *Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors*. *Pharmacol Ther*. 1997;74(2):129-80;.
- Pertwee RG. *Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development*. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000 Jul;9(7):1553-71;
- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA. *Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain*. *J Neurosci Res*. 1998 Feb 1;51(3):391-402;
- Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Léna C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K, Changeux JP. *Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine*. *Nature*. 1998 Jan 8;391(6663):173-7;
- Picciotto MR. *Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U*. *Trends Pharmacol Sci*. 2003 Sep;24(9):493-9;
- Pickel VM, Chan J, Kash TL, Rodríguez JJ, MacKie K. *Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens*. *Neuroscience*. 2004;127(1):101-12;
- Pistis M, Perra S, Pillolla G, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL. *Adolescent exposure to cannabinoids induces long-lasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons*. *Biol Psychiatry*. 2004 Jul 15;56(2):86-94;
- Piomelli D. *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Nov;4(11):873-84;



- Piomelli D. *The endogenous cannabinoid system and the treatment of marijuana dependence*. *Neuropharmacology*. 2004;47 Suppl 1:359-67;
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. *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*. 1995 Dec 19;92(26):12304-8;
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. *Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs*. *Nature*. 1996 Jul 18;382(6588):255-7;
- Porath-Waller A.J. *Clearing the Smoke on Cannabis*. Chronic Use and Cognitive Functioning and Mental Health (2009B) Canadian Centre on Substance Abuse;
- Randall CL, Roberts JS, Del Boca FK, Carroll KM, Connors GJ, Mattson ME. *Telescoping of landmark events associated with drinking: a gender comparison*. *J Stud Alcohol*. 1999 Mar;60(2):252-60;
- Rang HP, Dale MM, Ritter J. *Farmacologia*, 127 (1998);
- Realini N, Rubino T, Parolaro D. *Neurobiological alterations at adult age triggered by adolescent exposure to cannabinoids*. *Pharmacol Res*. 2009 Aug;60(2):132-8;
- Rey JM, Martin A, Krabman P. *Is the party over? Cannabis and juvenile psychiatric disorder: the past 10 years*. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004 Oct;43(10):1194-205;
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, et al. *SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor*. *FEBS Lett*. 1994 Aug 22;350(2-3):240-4;
- Risinger RC, Salmeron BJ, Ross TJ, Amen SL, Sanfilippo M, Hoffmann RG, Bloom AS, Garavan H, Stein EA. *Neural correlates of high and craving during cocaine self-administration using BOLD fMRI*. *Neuroimage*. 2005 Jul 15;26(4):1097-108;
- Robbins TW, Everitt BJ. *Drug addiction: bad habits add up*. *Nature*. 1999 Apr 15;398(6728):567-70;
- Robinson TE, Berridge KC. *The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction*. *Brain Res Brain Res Rev*. 1993 Sep-Dec;18(3):247-91;
- Robinson TE, Berridge KC. *Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008 Oct 12;363(1507):3137-46;
- Rodríguez-Arias M, Manzanedo C, Roger-Sánchez C, Do Couto BR, Aguilar MA, Miñarro J. *Effect of adolescent exposure to WIN 55212-2 on the acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 Feb 1;34(1):166-71;
- Rodríguez JJ, Mackie K, Pickel VM. *Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus*. *J Neurosci*. 2001 Feb 1;21(3):823-33;
- Roesch MR, Olson CR. *Neuronal activity related to reward value and motivation in primate frontal cortex*. *Science*. 2004 Apr 9;304(5668):307-10;

- Rolls ET. *The functions of the orbitofrontal cortex*. Brain Cogn. 2004 Jun;55(1):11-29;
- Roth ME, Carroll ME. *Sex differences in the acquisition of IV methamphetamine self-administration and subsequent maintenance under a progressive ratio schedule in rats*. Psychopharmacology (Berl). 2004 Apr;172(4):443-9;
- Roth ME, Cosgrove KP, Carroll ME. *Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies*. Neurosci Biobehav Rev. 2004 Oct;28(6):533-46;
- Rubino T, Massi P, Viganò D, Fuzio D, Parolaro D. *Long-term treatment with SR141716A, the CBI receptor antagonist, influences morphine withdrawal syndrome*. Life Sci. 2000 Apr 21;66(22):2213-9;
- Saario SM, Savinainen JR, Laitinen JT, Järvinen T, Niemi R. *Monoglyceride lipase-like enzymatic activity is responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes*. Biochem Pharmacol. 2004 Apr 1;67(7):1381-7;
- Scherma M, Panlilio LV, Fadda P, Fattore L, Gamaledin I, Le Foll B, Justinová Z, Mikics E, Haller J, Medalie J, Stroik J, Barnes C, Yasar S, Tanda G, Piomelli D, Fratta W, Goldberg SR. *Inhibition of anandamide hydrolysis by cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoylester (URB597) reverses abuse-related behavioral and neurochemical effects of nicotine in rats*. J Pharmacol Exp Ther. 2008 Nov;327(2):482-90. Erratum in: J Pharmacol Exp Ther. 2011 Jun;337(3):887;
- Scherma M, Fadda P, Le Foll B, Forget B, Fratta W, Goldberg SR, Tanda G. *The endocannabinoid system: a new molecular target for the treatment of tobacco addiction*. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2008 Nov;7(5):468-81;
- Schweinsburg AD, Nagel BJ, Schweinsburg BC, Park A, Theilmann RJ, Tapert SF. *Abstinent adolescent marijuana users show altered fMRI response during spatial working memory*. Psychiatry Res. 2008 May 30;163(1):40-51;
- Schoenbaum G, Roesch MR, Stalnaker TA. *Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction*. Trends Neurosci. 2006 Feb;29(2):116-24;
- Schultz W. *Behavioral theories and the neurophysiology of reward*. Annu Rev Psychol. 2006;57:87-115;
- Schultz W. *Behavioral dopamine signals*. Trends Neurosci. 2007 May;30(5):203-10;
- Selley DE, Rorrer WK, Breivogel CS, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR, Sim-Selley LJ. *Agonist efficacy and receptor efficiency in heterozygous CBI knockout mice: relationship of reduced CBI receptor density to G-protein activation*. J Neurochem. 2001 May;77(4):1048-57;
- Shaham Y, Adamson LK, Grocki S, Corrigall WA. *Reinstatement and spontaneous recovery of nicotine seeking in rats*. Psychopharmacology (Berl). 1997 Apr;130(4):396-403. Erratum in: Psychopharmacology (Berl) 1997 Sep;133(1):106;
- Shapira M, Gafni M, Sarne Y. *Long-term interactions between opioid and cannabinoid agonists at the cellular level: cross-desensitization and downregulation*. Brain Res. 2003 Jan 17;960(1-2):190-200;
- Sher E, Chen Y, Sharples TJ, Broad LM, Benedetti G, Zwart R, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, De Filippi G. *Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new*

*insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity.* Curr Top Med Chem. 2004;4(3):283-97;

Shoaib M, Schindler CW, Goldberg SR. *Nicotine self-administration in rats: strain and nicotine pre-exposure effects on acquisition.* Psychopharmacology (Berl). 1997 Jan;129(1):35-43;

Shoaib M. *The cannabinoid antagonist AM251 attenuates nicotine self-administration and nicotine-seeking behaviour in rats.* Neuropharmacology. 2008 Feb;54(2):438-44;

Sesack SR, Pickel VM. *In the rat medial nucleus accumbens, hippocampal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other.* Brain Res. 1990 Sep 17;527(2):266-79;

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

Simonnet A, Cador M, Caille S. *Nicotine reinforcement is reduced by cannabinoid CB1 receptor blockade in the ventral tegmental area.* Addict Biol. 2013 Nov;18(6):930-6;

Sim-Selley LJ. *Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids.* Crit Rev Neurobiol. 2003;15(2):91-119;

Sinha R, Fox H, Hong KI, Sofuoglu M, Morgan PT, Bergquist KT. *Sex steroid hormones, stress response, and drug craving in cocaine-dependent women: implications for relapse susceptibility.* Exp Clin Psychopharmacol. 2007 Oct;15(5):445-52;

Singh ME, Verty AN, McGregor IS, Mallet PE. *A cannabinoid receptor antagonist attenuates conditioned place preference but not behavioural sensitization to morphine.* Brain Res. 2004 Nov 12;1026(2):244-53;

Skoubis PD, Lam HA, Shoblock J, Narayanan S, Maidment NT. *Endogenous enkephalins, not endorphins, modulate basal hedonic state in mice.* Eur J Neurosci. 2005 Mar;21(5):1379-84;

Smith AD, Bolam JP. *The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones.* Trends Neurosci. 1990 Jul;13(7):259-65;

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

Solinas M, Panlilio LV, Goldberg SR. *Exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) increases subsequent heroin taking but not heroin's reinforcing efficacy: a self-administration study in rats.* Neuropsychopharmacology. 2004 Jul;29(7):1301-11;

Solinas M, Panlilio LV, Justinova Z, Yasar S, Goldberg SR. *Using drug-discrimination techniques to study the abuse-related effects of psychoactive drugs in rats.* Nat Protoc. 2006;1(3):1194-206;

Solinas M, Scherma M, Tanda G, Wertheim CE, Fratta W, Goldberg SR. *Nicotinic facilitation of delta9-tetrahydrocannabinol discrimination involves endogenous anandamide.* J Pharmacol Exp Ther. 2007 Jun;321(3):1127-34. Epub 2007 Mar 9;

- Sowell ER, Thompson PM, Toga A W. *Mapping changes in the human cortex throughout the span of life*. *Neuroscientist* 2004; 10:372-392;
- Spanagel R, Weiss F. *The dopamine hypothesis of reward: past and current status*. *Trends Neurosci*. 1999 Nov;22(11):521-7;
- Spano MS, Fattore L, Cossu G, Deiana S, Fadda P, Fratta W. *CBI receptor agonist and heroin, but not cocaine, reinstate cannabinoid-seeking behaviour in the rat*. *Br J Pharmacol*. 2004 Oct;143(3):343-50;
- Spear LP. *The adolescent brain and age-related behavioral manifestations*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2000;24:417-463;
- Stefanis, N.C., Delespaul, P., Henquet, C., Bakoula, C., Stefanis, C.N., & Van Os, J. (2004). *Early adolescent cannabis exposure and negative dimensions of psychosis*. *Addiction*, 99, 1333-134;
- Steinberg L, Morris AS (2001) *Adolescent development*. *Annu Rev Psychol* 52: 83-110;
- Steinberg, L.; Dahl, RE.; Keating, D.; Kupfer, D.; Masten, A.; Pine, DS. *Psychopathology in adolescence: integrating affective neuroscience with the study of context*. Cicchetti, D., editor. New York: Wiley; 2005;
- Steinberg L. *Adolescence*, 9th edn. New York, NY: McGraw-Hill Higher Education, 2010;
- Stenbacka M, Allebeck P, Romelsjö A. *Initiation into drug abuse: the pathway from being offered drugs to trying cannabis and progression to intravenous drug abuse*. *Scand J Soc Med*. 1993 Mar;21(1):31-9;
- Stella N, Piomelli D. *Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons*. *Eur J Pharmacol*. 2001 Aug 17;425(3):189-96;
- Stolerman IP, Jarvis MJ. *The scientific case that nicotine is addictive*. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995 Jan;117(1):2-10; discussion 14-20;
- Stolerman IP, Shoaib M. *The neurobiology of tobacco addiction*. *Trends Pharmacol Sci*. 1991 Dec;12(12):467-73;
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration. (2005). *Results from the 2004 National Survey on Drug Use and Health: National Findings* (Office of Applied Studies, NSDUH Series H-28, DHHS publication No. SMA 05-4062). Rockville, MD;
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Office of Applied Studies (2008). *Results from the 2007 National Survey on Drug Use and Health: National Findings* (NSDUH Series H-34, DHHS Publication No. SMA 08-4343). Rockville, MD;
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Oct 4;215(1):89-97;
- Szabo B, Siemes S, Wallmichrath I. *Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids*. *Eur J Neurosci*. 2002 Jun;15(12):2057-61;

- Szabo B, Schlicker E. *Effects of cannabinoids on neurotransmission*. Handb Exp Pharmacol. 2005;(168):327-65;
- Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC, Lester HA. *Nicotine activation of alpha4\* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization*. Science. 2004 Nov 5;306(5698):1029-32;
- Taylor JR, Robbins TW. *Enhanced behavioural control by conditioned reinforcers following microinjections of d-amphetamine into the nucleus accumbens*. Psychopharmacology (Berl). 1984;84(3):405-12;
- Terenius L. *Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex*. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). 1973;32(3):317-20;
- Thorat SN, Bhargava HN. *Evidence for a bidirectional cross-tolerance between morphine and delta 9-tetrahydrocannabinol in mice*. Eur J Pharmacol. 1994 Jul 21;260(1):5-13;
- Tomasiewicz HC, Jacobs MM, Wilkinson MB, Wilson SP, Nestler EJ, Hurd YL. *Proenkephalin mediates the enduring effects of adolescent cannabis exposure associated with adult opiate vulnerability*. Biol Psychiatry. 2012 Nov 15;72(10):803-10;
- Trad PV. *Developmental vicissitudes that promote drug abuse in adolescents*. Am J Drug Alcohol Abuse. 1994 Nov;20(4):459-81;
- Tseng AH, Craft RM. *Sex differences in antinociceptive and motoric effects of cannabinoids*. Eur J Pharmacol. 2001 Oct 26;430(1):41-7;
- Tseng AH, Harding JW, Craft RM. *Pharmacokinetic factors in sex differences in Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced behavioral effects in rats*. Behav Brain Res. 2004 Sep 23;154(1):77-83;
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. *Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system*. Neuroscience. 1998 Mar;83(2):393-411;
- Tzschentke TM. *Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues*. Prog Neurobiol. 1998 Dec;56(6):613-72;
- Tzschentke TM. *Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade*. Addict Biol. 2007 Sep;12(3-4):227-462;
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T. *Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide*. J Biol Chem. 1995 Oct 6;270(40):23823-7;
- Valjent E, Mitchell JM, Besson MJ, Caboche J, Maldonado R. *Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine*. Br J Pharmacol. 2002 Jan;135(2):564-78;
- Van Dongen, Remie, Rensema and Van Wunnick (eds). *Manual of microsurgery on the laboratory rat, part I*, Elsevier Science Publishers B.V., 1990 chapter 8:159-169;

- Van Laar M, van Dorsselaer S, Monshouwer K, de Graaf R. *Does cannabis use predict the first incidence of mood and anxiety disorders in the adult population?* *Addiction*. 2007 Aug;102(8):1251-60;
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. *Science*. 2005 Oct 14;310(5746):329-32;
- Viganò D, Rubino T, Vaccani A, Bianchessi S, Marmorato P, Castiglioni C, Parolaro D. *Molecular mechanisms involved in the asymmetric interaction between cannabinoid and opioid systems*. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Nov;182(4):527-36;
- Vivian JA, Green HL, Young JE, Majerksy LS, Thomas BW, Shively CA, Tobin JR, Nader MA, Grant KA. *Induction and maintenance of ethanol self-administration in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis): long-term characterization of sex and individual differences*. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001 Aug;25(8):1087-97;
- Volkow ND, Li TK. *Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry*. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Dec;5(12):963-70;
- Volkow N, Li TK. *The neuroscience of addiction*. *Nat Neurosci*. 2005 Nov;8(11):1429-30;
- Wasilow-Mueller S, Erickson CK. *Drug abuse and dependency: understanding gender differences in etiology and management*. *J Am Pharm Assoc (Wash)*. 2001 Jan-Feb;41(1):78-90;
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A. *The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation*. *Mol Cell Neurosci*. 2008 May;38(1):89-97;
- Weinberger AH, Maciejewski PK, McKee SA, Reutenauer EL, Mazure CM. *Gender differences in associations between lifetime alcohol, depression, panic disorder, and posttraumatic stress disorder and tobacco withdrawal*. *Am J Addict*. 2009 Mar-Apr;18(2):140-7;
- Weiss F, Maldonado-Vlaar CS, Parsons LH, Kerr TM, Smith DL, Ben-Shahar O. *Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 11;97(8):4321-6;
- Welch KA, McIntosh AM, Job DE, Whalley HC, Moorhead TW, Hall J, Owens DG, Lawrie SM, Johnstone EC. *The impact of substance use on brain structure in people at high risk of developing schizophrenia*. *Schizophr Bull*. 2011 Sep;37(5):1066-76;
- Wess J. *Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors*. *Crit Rev Neurobiol*. 1996;10(1):69-99;
- Whitford TJ, Rennie CJ, Grieve SM, Clark CR, Gordon E, Williams LM. *Brain maturation in adolescence: concurrent changes in neuroanatomy and neurophysiology*. *Hum Brain Mapp*. 2007 Mar;28(3):228-37;
- Wiley JL. *Sex-dependent effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on locomotor activity in mice*. *Neurosci Lett*. 2003 Dec 4;352(2):77-80;
- Wills TA, Vaccaro D, McNamara G. *Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory*. *J Subst Abuse*. 1994;6(1):1-20;

- Wilson RI, Nicoll RA. *Endocannabinoid signaling in the brain*. Science. 2002 Apr 26;296(5568):678-82;
- Wilson W, Mathew R, Turkington T, Hawk T, Coleman RE, Provenzale J. *Brain morphological changes and early marijuana use: a magnetic resonance and positron emission tomography study*. J Addict Dis. 2000;19(1):1-22;
- Wise RA. *Drug-activation of brain reward pathways*. Drug Alcohol Depend. 1998 Jun-Jul;51(1-2):13-22;
- Wise RA, Bozarth MA. *A psychomotor stimulant theory of addiction*. Psychol Rev. 1987 Oct;94(4):469-92;
- Wise RA, Hoffman DC. *Localization of drug reward mechanisms by intracranial injections*. Synapse. 1992 Mar;10(3):247-63;
- Witzemann V, Barg B, Nishikawa Y, Sakmann B, Numa S. *Differential regulation of muscle acetylcholine receptor gamma- and epsilon-subunit mRNAs*. FEBS Lett. 1987 Oct 19;223(1):104-12;
- Wonnacott S. *Presynaptic nicotinic ACh receptors*. Trends Neurosci. 1997 Feb;20(2):92-8;
- Wooltorton JRA, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA. *Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas*. J Neurosci. 2003; 23(8): 3176–3185;
- World Drug Report 2013. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), (United Nations publication, Sales No. E.13.XI.6), New York, May 2013;
- Yaksh TL. *Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity*. Acta Anaesthesiol Scand. 1997 Jan;41(1 Pt 2):94-111;
- Yamaguchi K, Kandel DB. *Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: III. Predictors of progression*. Am J Public Health. 1984 Jul;74(7):673-81;
- Yin R, French ED. *A comparison of the effects of nicotine on dopamine and non-dopamine neurons in the rat ventral tegmental area: an in vitro electrophysiological study*. Brain Res Bull. 2000 Apr;51(6):507-14;
- Young AM, Herling S. *Drugs as reinforcers: studies in laboratory animals*. In: Goldberg SR, Stoleman IP. Behavioral analysis of drug dependence: 9-67; Academic press INC, Orlando, FL, 1986;
- Yücel M, Solowij N, Respondek C, Whittle S, Fornito A, Pantelis C, Lubman DI. *Regional brain abnormalities associated with long-term heavy cannabis use*. Arch Gen Psychiatry. 2008 Jun;65(6):694-701;
- Zhou FM, Liang Y, Dani JA. *Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum*. Nature Neurosci. 2001; 4(12):1224–1229;