



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI  
FACOLTÀ DI BIOLOGIA E FARMACIA

Dipartimento di Scienze Biomediche

Corso di Laurea in Scienze degli Alimenti e della Nutrizione Umana

Effetti neurochimici e comportamentali di stimoli gustativi edonici in ratti trattati col cannabinoide sintetico JWH-018: ruolo della trasmissione dopaminergica nella corteccia prefrontale mediale (mPFC)

Relatrice:

*Prof.ssa Maria Antonietta De Luca*

Tesi di Laurea di:

*Giuseppe Urru*

Anno accademico 2020/2021

*A Grazy e Roby che hanno avuto tanta pazienza nei confronti di un marito e padre molto impegnato, contribuendo attivamente al raggiungimento di un ottimo risultato di squadra;*

*A mio fratello Simone, sempre presente, che contribuisce ogni giorno a mantenere vivo il ricordo degli anni passati in una bellissima famiglia assieme ai nostri amati genitori;*

*A mamma e papà, col rammarico di non aver potuto dare loro questa soddisfazione quando ancora erano presenti, ed a cui devo tutto ciò che sono diventato oggi.*

## INDICE

### **ABBREVIAZIONI**

### **RIASSUNTO**

<b>1. INTRODUZIONE</b>	1
1.1 Cannabinoidi sintetici	1
1.2 JWH-018	2
1.3 Dopamina e Sistema dopaminergico	4
1.4 Il Sistema Limbico	8
1.5 La corteccia prefrontale (PFC) e la corteccia prefrontale mediale (mPFC)	10
1.6 Il ruolo della DA nella mPFC	13
1.7 Il ruolo differenziale della DA nella ricompensa (alimentare e farmacologica)	14
1.8 Sistema endocannabinoide	19
1.9 Cannabinoidi e alimentazione	21
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b>	22
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	24
3.1 Animali	24
3.2 Sostanze	25
3.3 Preparazione cannule orali	27
3.4 Preparazione delle sonde da microdialisi	28
3.5 Chirurgia	30
3.6 Microdialisi cerebrale nella corteccia prefrontale mediale (mPFC)	32
3.7 Registrazione delle reazioni comportamentali	33
3.8 Procedura analitico-sperimentale	34
3.9 Determinazione quantitativa della dopamina (DA)	35
3.10 Analisi istologica	36
3.11 Analisi statistiche	38
<b>4. RISULTATI</b>	39
4.1 Effetto del trattamento con JWH-018 sui livelli extracellulari di dopamina nella mPFC: valutazione dopo 7 giorni di astinenza.	39
4.2 Effetto della somministrazione orale di cioccolato sui livelli extracellulari di dopamina nella mPFC: valutazione dopo la prima e dopo la seconda esposizione al cioccolato.	40
4.3 Effetto della somministrazione orale di cioccolato sulle reazioni gustative: valutazione tramite Taste reactivity test dopo la prima e dopo la seconda esposizione al cioccolato.	42
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	43
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	46

## ABBREVIAZIONI

2-AG	2-arachidonoilglicerolo
5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-Idrossidopamina
$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo
AA	Acido arachidonico
AC	Adenilato ciclasi
AEA	Anandamide
AIDS	Sindrome da immunodeficienza acquisita
ANOVA	Analisi della varianza
CA	Cingolo anteriore
cAMP	AMP ciclico
CBR1 e CBR2	Recettori cannabinoidi 1 e 2
CESA	Comitato Etico per la Sperimentazione sugli Animali
Cg	Corteccia cingolata
DA	Dopamina
DAergico	Dopaminergico
DAT	Trasportatore specifico dopamina
eCB	Endocannabinoidi
FM	Fase mobile
GABA	Acido gamma-amminobutirrico
Glu	Glutammato
HPLC	Cromatografia liquida ad alte prestazioni
i.p.	Somministrazione intraperitoneale
IL	Corteccia infralimbica
JWH-018	1-Pentyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenylmethanone
LC	Locus coeruleus
LEC	Liquido extracellulare
MAO	Monoammino ossidasi
MD	Nucleo talamico mediodorsale

MetOH	Metanolo
mPFC	Corteccia prefrontale mediale
NA	Noradrenalina
NAc	Nucleus accumbens
NAergiche	Noradrenergiche
NAPE	Narachidonil-fosfatidiletanolamina
NAT	N-aciltransferasi
NPS	Nuove sostanze psicoattive
OCF	Corteccia orbitofrontale
PFC	Corteccia prefrontale
PKA	Protein chinasi A
PL	Corteccia prelimbica
PLC	Fosfolipasi C
PLD	Fosfolipasi D
RM	Misure ripetute
SC	Cannabinoidi sintetici
SCRA	Agonisti sintetici del recettore dei cannabinoidi
SNe	Substantia nigra pars compacta
SNC	Sistema nervoso centrale
SR 141716	Rimonabant
TGD	Triacilgliceroli
Tyr	Tirosina
Veh	Veicolo
VTa	Area ventrale tegmentale

## RIASSUNTO

La trasmissione DAergica mesolimbica ed il sistema endocannabinoide svolgono un ruolo centrale nei processi emozionali e di ricompensa legati a stimoli gratificanti naturali e farmacologici che determinano un incremento della trasmissione DAergica nel sistema mesolimbico (Bassareo et al., 2002; Di Chiara, 1990; Maldonado et al., 2006; Volkow et al., 2003, 2017). Tuttavia, in queste aree, la trasmissione DAergica va incontro ad una regolazione adattativa (*habituation*) dopo ripetute esposizioni agli stimoli gratificanti naturali (ad es. il cioccolato) mentre questo non avviene dopo esposizioni successive alle sostanze d'abuso (Pontieri et al., 1995, 1996; Tanda et al., 1997). I cannabinoidi sintetici (SC) sono agonisti completi del recettore dei cannabinoidi (SCRA), sintetizzati per studiare il sistema endocannabinoide (Castaneto et al., 2014; De Luca & Fattore, 2018; Graddy et al., 2018) e a scopo terapeutico (De Luca & Fattore, 2018). Sono una classe delle nuove sostanze psicoattive (NPS) in quanto identificati nelle *herbal highs*, miscele di varie erbe chiamate più comunemente *Spice* o *K2* e consumate per i loro effetti psicoattivi simili e spesso più potenti rispetto a quelli indotti dalla Cannabis; in essi è risultato spesso presente il JWH-018 che possiede affinità per i recettori cannabinoidi (CBR1 e CBR2) superiore a quella del principio psicoattivo della Cannabis ( $\Delta^9$ -THC) e per questo stimola la trasmissione DAergica nel NAc shell *in vivo* a dosi inferiori (De Luca et al., 2015). Gli effetti sulla trasmissione DAergica causati dall'esposizione cronica a queste sostanze e la loro presunta relazione con i processi alla base della dipendenza e del comportamento alimentare, non sono stati ancora ampiamente caratterizzati. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la risposta DAergica nella corteccia prefrontale mediale (mPFC) in seguito all'esposizione ripetuta a stimoli gustativi (soluzione cioccolato) in ratti Sprague-Dawley adulti trattati ripetutamente con JWH-018. Inoltre, sono state valutate le reazioni gustative edoniche e avversive (taste reactivity). Abbiamo osservato che dopo la seconda esposizione al cioccolato compare un'inaspettata *habituation* della risposta DAergica nella mPFC, correlabile ad una perdita di *habituation* nel NAc shell (Pintori et al., 2021) nel gruppo trattato ripetutamente con JWH-018, suggerendo quindi un ruolo inibitorio della mPFC sulle aree DAergiche sottocorticali e una interessante correlazione tra il sistema DAergico e quello endocannabinoide; la stimolazione di quest'ultimo, in seguito all'esposizione ripetuta al JWH-018, potrebbe indurre una disregolazione del sistema DAergico, associabile ad una perdita di controllo della valutazione motivazionale degli stimoli gratificanti (Volkow et al., 2003; Di Chiara et al., 2004; Volkow & Morales, 2015).

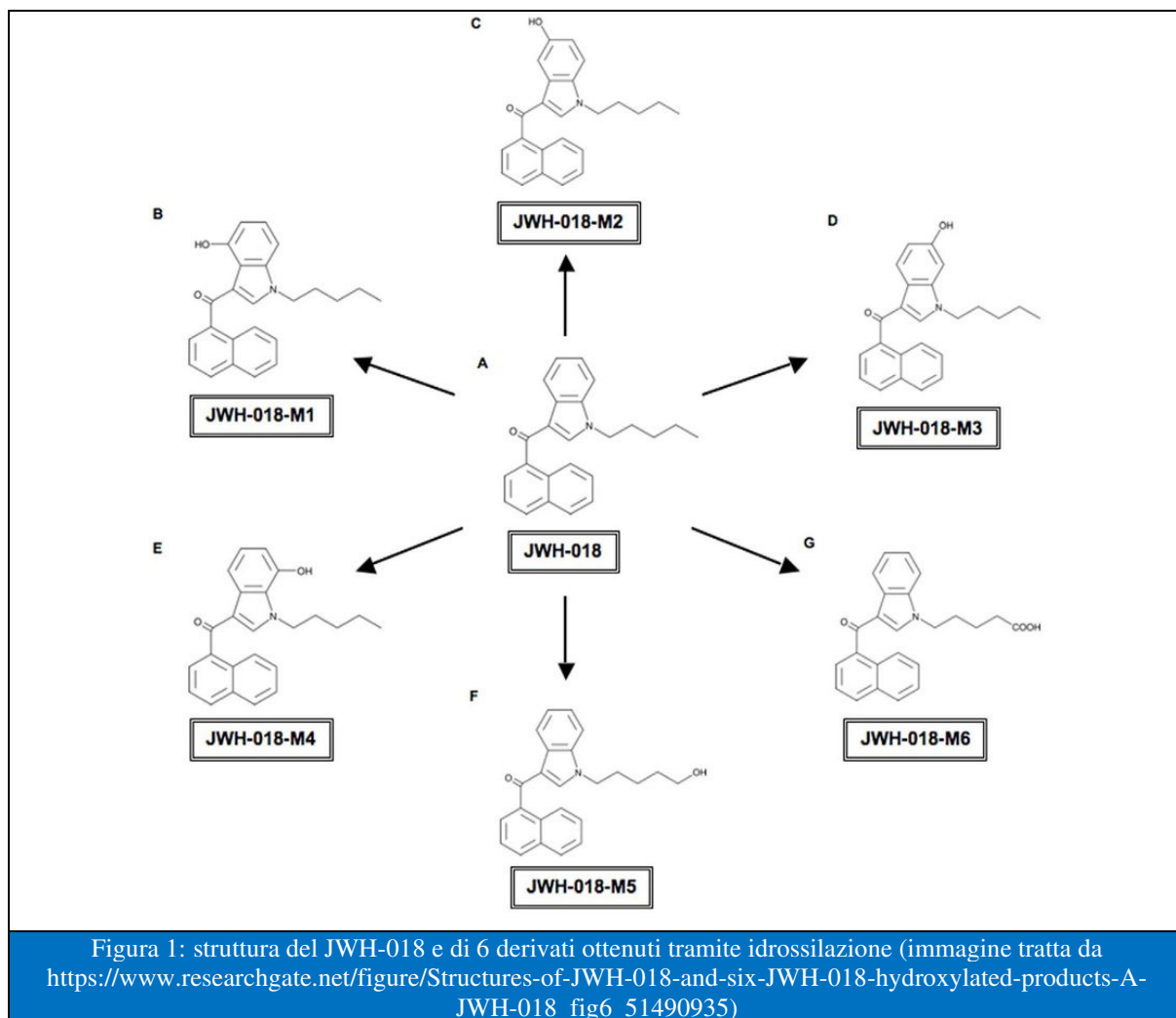
## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Cannabinoidi sintetici

I cannabinoidi sintetici (SC) sono un gruppo ampio ed eterogeneo di composti delle cosiddette nuove sostanze psicoattive (NPS) e sono agonisti sintetici completi del recettore dei cannabinoidi (SCRA) grazie alla loro elevata affinità in particolare nei confronti dei recettori CBR1 e CBR2 rispetto al fitocannabinoide naturale  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC), agonista parziale degli stessi recettori e principale composto psicoattivo della Cannabis (Papanti et al., 2013; Pintori et al., 2021; Schifano et al., 2016). Sono stati sintetizzati per studiare il funzionamento del sistema endocannabinoide (Castaneto et al., 2014; De Luca & Fattore, 2018; Graddy et al., 2018) e per essere utilizzati nel trattamento di diverse condizioni patologiche nell'uomo (es. epilessia, spasticità, infiammazione, disturbi alimentari, alcuni tipi di dolore e cancro) (De Luca & Fattore, 2018). Inoltre, già a partire dal 2004, sono stati identificati nelle *herbal highs*, miscele di varie erbe inerti o psicoattive vendute in Europa, negli Stati Uniti e in Giappone attraverso il web e negozi specializzati (smart shops) con diversi nomi (Mc Lachlan, 2009) e spesso indicate come *Spice* o *K2*, particolarmente popolari in Germania a partire dal 2008 in seguito a diversi casi di intossicazione (Zimmermann et al., 2009; Muller et al., 2010; Fisher, 2010; Gay, 2010; Scheiner et al., 2011; Kronstrand et al., 2011; Simmons et al., 2011). Per questo sono diventate oggetto di studio da parte dello European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), dell'Early Warning System on new drugs (EWS) e dei diversi sistemi di allerta nazionali (NEWS, National Early Warning System) come il Sistema Nazionale di Allerta Precoce e Risposta Rapida per le Droghe del Dipartimento Politiche Antidroga della Presidenza del Consiglio dei Ministri in Italia (DPA). Le *Spice* vengono consumate mediante inalazione per i loro effetti psicoattivi simili, e sovente più potenti rispetto a quelli indotti dalla Cannabis e talvolta come alternativa ad essa per eludere i controlli di screening tossicologico-forensi. All'interno delle miscele delle *herbal highs* sono stati identificati diversi e potenti agonisti sintetici dei recettori cannabinoidi (Auwarter et al., 2009; Uchiyama et al., 2009) appartenenti alle classi degli aminoalchilindoli suddivisi in naftoilindoli (JWH-018, JWH-015, JWH-073, JWH-122, JWH-210, WIN-55212), fenilacetilindoli (JWH-250 e JWH-251), naftilmetilindoli e benzoilindoli (pravadolina, AM-694, RSC-4). Inoltre, sono state identificate analiticamente anche molecole a struttura cicloesilfenolica o 3-arilcicloesanolli (CP-47497, CP-55940, CP-55244). Fra di essi uno in particolare, chiamato JWH-018 (1-Pentyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenylmethanone), è risultato spesso presente benché in quantità differenti a seconda del tipo di *herbal highs* analizzata.

## 1.2 JWH-018

Il JWH-018 (Figura 1) venne sintetizzato per scopi puramente scientifici nel 1995 da John William Huffman, dal quale prende il nome, presso i laboratori della Clemmson University (USA) ed è un potente agonista dei recettori cannabinoidi CBR1 e CBR2 (Chin et al., 1999; Huffman et al., 2005; Atwood et al., 2011) che produce in vivo effetti simili al cannabinoide naturale  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC).



Infatti, è grazie alla sua elevata affinità per i recettori dei cannabinoidi CBR1 e CBR2, rispettivamente di circa quattro e dieci volte maggiore rispetto a quella del  $\Delta^9$ -THC (Showalter et al., 1996; Atwood et al., 2011), che le *herbal highs* contenenti JWH-018 producono gli stessi effetti della Marijuana ma amplificati e più intensi oltre alla evidente comparsa di una serie di effetti collaterali sia lievi che gravi come mal di testa, vomito e paranoia, fino a tachicardia, convulsioni, panico, psicosi ed allucinazioni (Lapoint et al., 2011; Every-Palmer, 2011). Studi in vitro su microsomi epatici (Wintermeyer et al., 2010) e su campioni di urine hanno

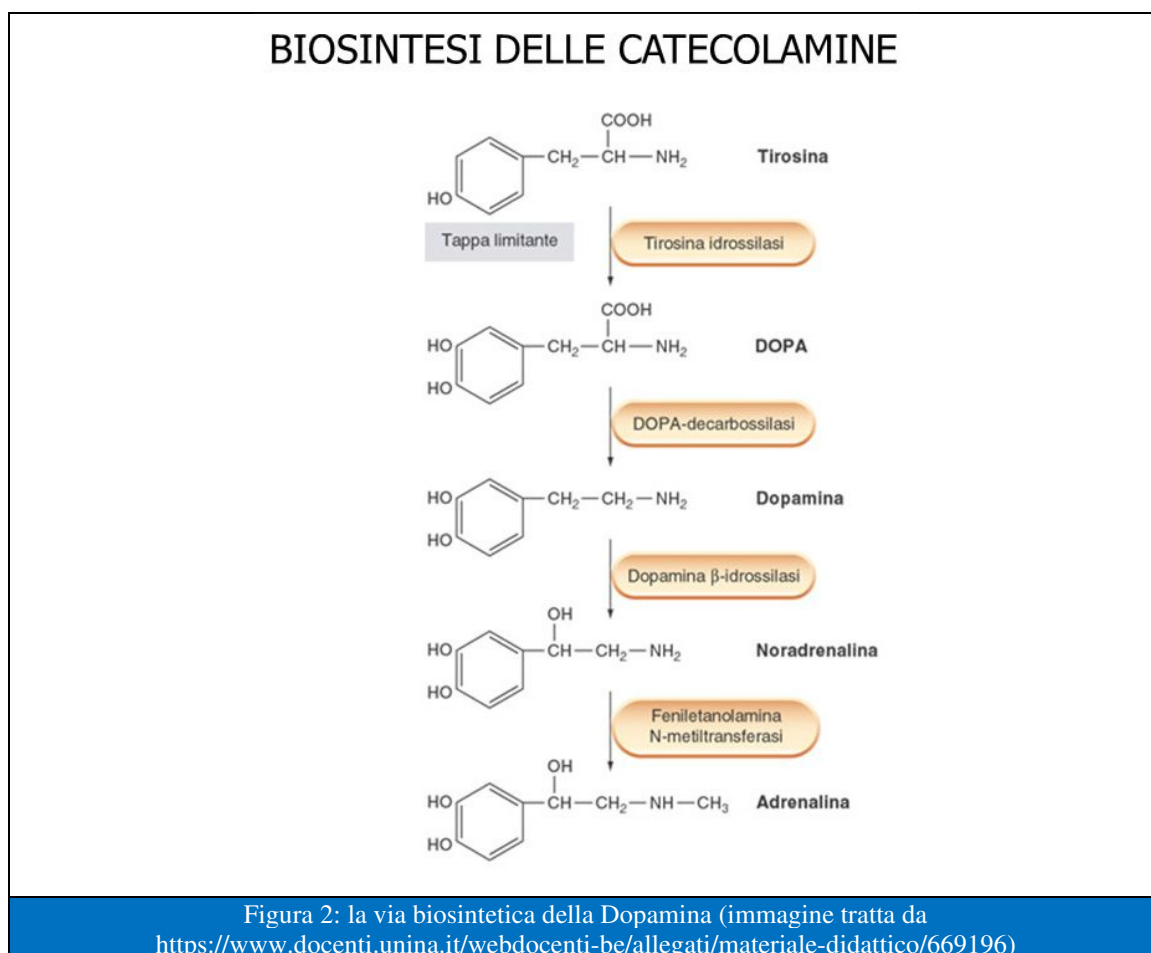


dimostrato la formazione di numerosi metaboliti del JWH-018 capaci di legarsi ai recettori CBR1 e di mantenere un'attività agonista che potrebbe verificarsi a lungo soprattutto dopo l'uso ripetuto della sostanza (Brents et al., 2011; Seely et al., 2011). La formazione di metaboliti farmacologicamente attivi ha imposto quindi una più attenta sperimentazione nello studio degli effetti in vivo a breve e lungo termine indotti da JWH-018 e congeneri.

In particolare, studi effettuati dal nostro gruppo di ricerca hanno mostrato che il JWH-018 stimola preferenzialmente la trasmissione DArgica nella shell del NAc di ratto alla dose di 0.25 mg/kg ip. L'aumento di dopamina (DA), tuttavia, non si osserva né a dosi più basse (0.125 mg/kg ip) né a dosi più alte (0.5 mg/kg ip), producendo pertanto una curva dose-risposta a campana (De Luca et al., 2015). Inoltre, mediante un modello animale di tossicodipendenza, qual'è l'autosomministrazione (AS) endovenosa, è stata dimostrata la proprietà di rinforzo del JWH-018 (De Luca et al., 2011; De Luca et al., 2012).

### 1.3 Dopamina e Sistema dopaminergico

La dopamina (DA) è un'ammina biogena appartenente alla famiglia delle catecolammine e sintetizzata a livello endogeno (soprattutto nel tessuto nervoso e nella midollare del surrene) a partire dalla tirosina (Tyr), amminoacido non essenziale comunemente introdotto con la dieta o sintetizzato a partire dalla fenilalanina. All'interno del cervello la dopamina funziona sia da neurotrasmettitore, tramite l'attivazione dei recettori dopaminergici specifici, sia da neurormone a livello dell'ipotalamo, con la principale funzione di inibire il rilascio di prolattina da parte del lobo anteriore dell'ipofisi. A livello centrale, la dopamina modula funzioni quali: movimenti volontari, comportamento, motivazione e attenzione, gratificazione, emesi. A livello periferico, la dopamina stimola la natriuresi e regola il tono vascolare (BahenaTrujillo et al., 2000; Fibiger, 1993; Jackson & Westlind-Danielsson, 1994).

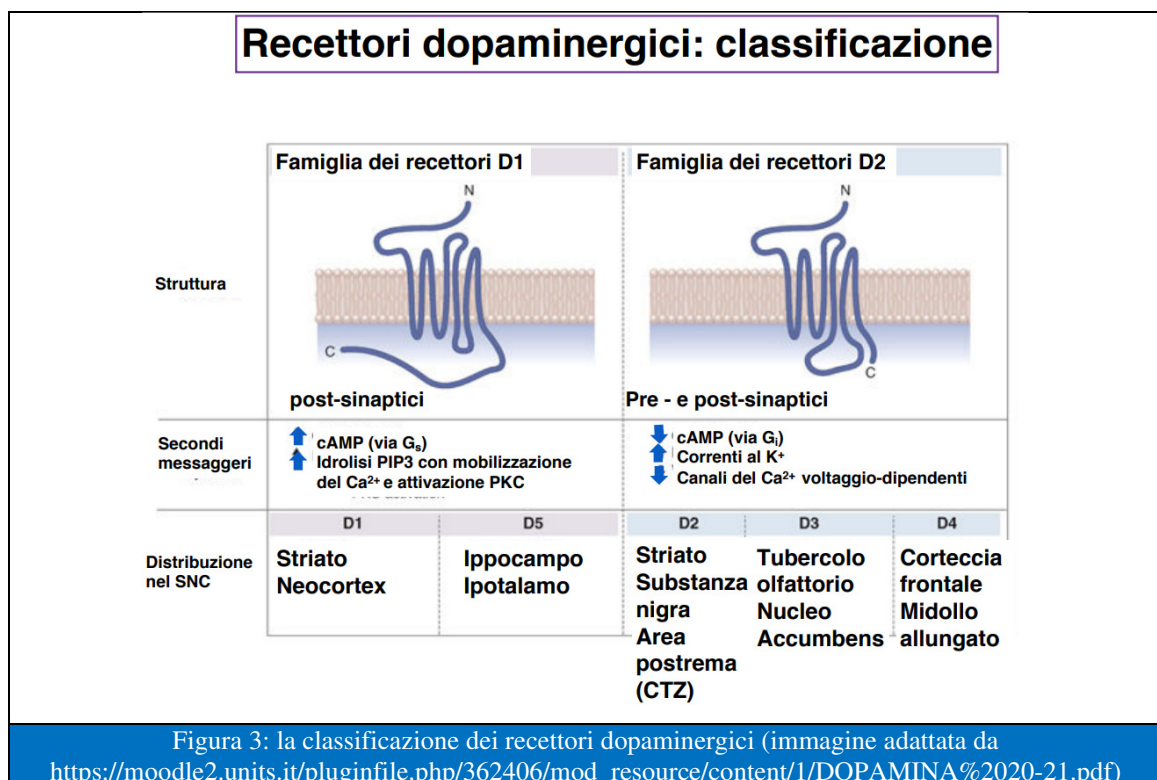


Una volta sintetizzata (Figura 2) a livello citoplasmatico, la DA viene immagazzinata all'interno di vescicole sinaptiche che evitano la degradazione da parte delle monoammino ossidasi (MAO) e viene poi rilasciata nello spazio sinaptico in seguito all'impulso nervoso che

causa la fusione delle vescicole con la membrana neuronale e la sua successiva liberazione. Una volta liberata, oltre ad esplicare la sua funzione neuromodulatoria agendo attraverso i suoi recettori, viene anche ricaptata grazie all'azione di un trasportatore specifico (DAT) e metabolizzata dalle MAO e dalle catecol-O-metiltransferasi.

La dopamina (DA) agisce tramite recettori metabotropici lenti (tempo di risposta superiore a 100 ms) accoppiati a proteine G (GPCR) (Missale et al., 1998) e distinti in 2 categorie in base alla loro capacità di stimolare o inibire l'Adenilato Ciclasi (AC): i recettori della famiglia D1-like (che comprende i recettori D1 e D5) stimolano la sintesi di AC; i recettori della famiglia D2-like (che comprende i recettori D2, D3 e D4) inibiscono la sintesi di AC (Webster, 2001). La DA quindi non può essere classificata né come neurotrasmettitore eccitatorio né come neurotrasmettitore inibitorio, il che potrebbe spiegare perché non è in grado di produrre effetti identici in tutte le condizioni sperimentali.

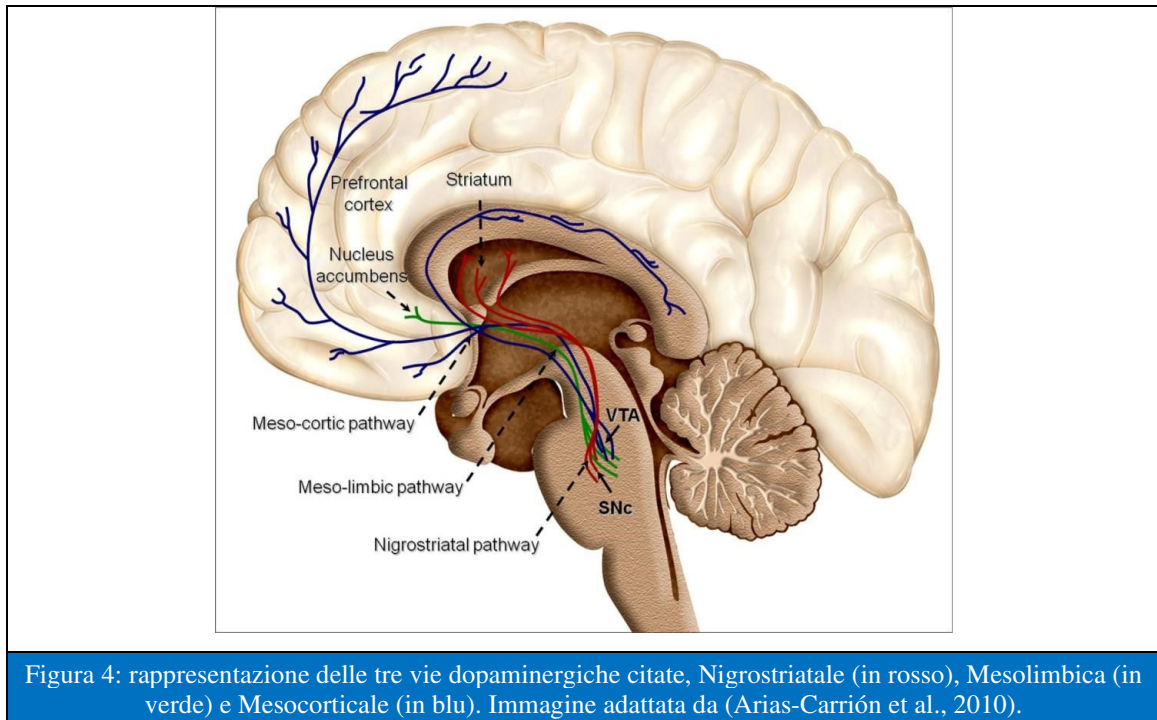
I recettori DAergici presentano delle differenze a livello della distribuzione sinaptica, infatti i recettori della famiglia D1 sono diffusi a livello postsinaptico mentre i recettori della famiglia D2 sono presenti sia a livello presinaptico che postsinaptico (Figura 3).



Sulla base delle differenze anatomiche e funzionali dei neuroni del mesencefalo è possibile identificare almeno tre principali sistemi DAergici nel cervello dei mammiferi (Carlsson et al., 1962; Dahlstroem & Fuxe, 1964) (Figura 4):

- la via nigrostriatale che nasce dai corpi cellulari dei neuroni della substantia nigra pars compacta (SNc, gruppo laterale A9) e che proiettano allo striato dorsale. Questo percorso svolge un ruolo importante nel controllo del movimento volontario ed è anche correlato all'inizio e all'esecuzione del comportamento abituale. Infatti, proprio la degenerazione selettiva di questa via è responsabile dei disordini motori osservati nei pazienti con malattia di Parkinson;
- la via mesolimbica: comprende i neuroni localizzati nell'area ventrale tegmentale (VTA, gruppo A10 mediale) del mesencefalo che proiettano al nucleus accumbens (NAc) e alle relative regioni limbiche implicate nei processi di ricompensa; tutti gli stimoli naturali (es. cibo) e farmacologici (es. droghe) dotati di potere motivazionale positivo, determinano un aumento della trasmissione DAergica nei neuroni di quest'area, soprattutto nel NAc;
- la via mesocorticale: questa è la via oggetto del nostro studio e comprende i neuroni localizzati nell'area ventrale tegmentale (VTA, gruppo A10 mediale) del mesencefalo che proiettano alla Corteccia Prefrontale (PFC) ed è coinvolta nella regolazione della funzionalità cognitiva ed emozionale. Oltre alla ricompensa, questi percorsi sono coinvolti in modo importante nella regolazione della cognizione e delle emozioni e sono stati implicati in condizioni patologiche come depressione e schizofrenia, nonché nella tossicodipendenza.

Le proiezioni dei gruppi cellulari DAergici A9 e A10 del mesencefalo non sono limitate solo a queste regioni ma si ramificano all'interno di più di una regione; pertanto, questi campi di proiezione sono noti collettivamente come sistema DAergico mesotelencefalico (Elsworth & Roth, 2009).

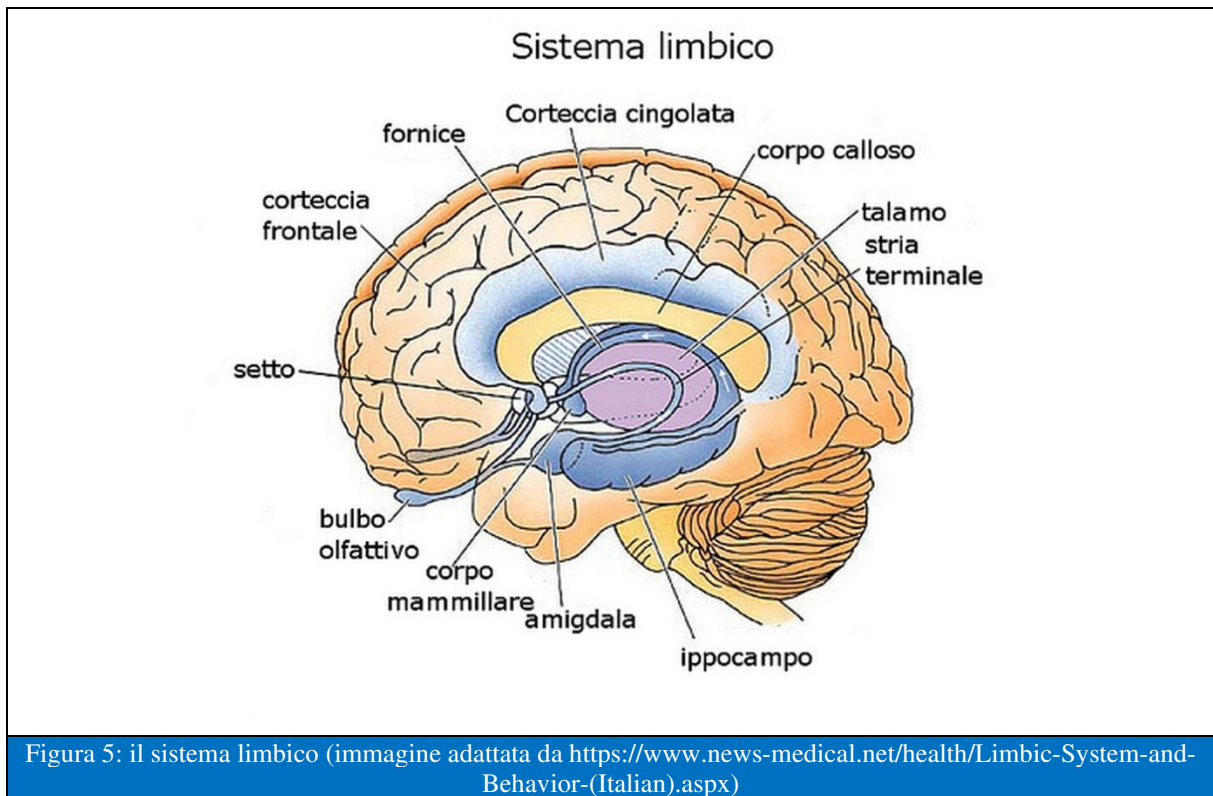


Per quanto riguarda l'attività neuronale, le cellule DAergiche si attivano in due indipendenti modalità di rilascio, con proprietà temporali distinte:

- un rilascio fasico (veloce e transitorio) di DA molto abbondante e necessario per stimolare i recettori D1 a bassa affinità nel NAc (Grace, 1991; Phillips et al., 2003; Dreyer et al., 2010).
- un rilascio tonico (lento e costante) di DA, in un processo che richiede lunghi periodi di tempo (da minuti a ore). Sebbene questo rilascio determini aumenti di DA inferiori rispetto all'attivazione fasica, esso è comunque sufficiente per stimolare i recettori D2 ad alta affinità (Grace, 1991; Dreyer et al., 2010).

## 1.4 Il Sistema Limbico

Il sistema limbico (Figura 5) è costituito da aree filogeneticamente antiche, sviluppatesi attorno alla funzione olfattoria e comprende formazioni diencefaliche e telencefaliche come il Nucleus Accumbens (NAc), l'ipotalamo, l'amigdala, il nucleo mediodorsale e il nucleo anteriore del talamo, l'ippocampo, il setto, la corteccia prefrontale (PFC), la corteccia entorinale (Castano e Donato, 2001).



Il termine *limbico* venne utilizzato per la prima volta dall'anatomista francese Paul Broca nel 1878 (*le grand lobe limbique*, dal termine latino *limbus*), per identificare la cresta curva della corteccia che include i giri cingolato e paraippocampale. Il lobo limbico, situato nel lato inferomediale degli emisferi cerebrali, consiste di due giri concentrici che circondano il corpo calloso. La funzione del lobo limbico nelle emozioni venne elaborata successivamente nel 1937 dall'anatomista americano James Papez ed il cui modello anatomico descritto viene ancora ad oggi definito *circuito di Papez*, ossia l'asse corteccia cerebrale, ipotalamo, talamo, corteccia (Papez 1937).

Anatomicamente le strutture che compongono il sistema limbico si trovano localizzate in differenti zone degli emisferi cerebrali, ovvero nel telencefalo, nel diencefalo e nel mesencefalo. Da un punto di vista morfologico è possibile distinguere il sistema limbico in due

definite aree, quelle paralimbiche e quelle limbiche propriamente dette (Mesulam 2000); le prime sono le aree corticali che formano il classico limbus (secondo il concetto di Broca) e comprendono il complesso del cingolo, il giro ippocampale, il polo temporale, l'insula e la corteccia orbito-frontale caudale. Le seconde invece sono le aree sottocorticali costituite dal nucleus accumbens (NAc). A livello del mesencefalo sono localizzate altre strutture del sistema limbico quali alcuni nuclei del tronco encefalico contenenti neurotrasmettitori monoaminergici che proiettano al sistema limbico e che costituiscono il sistema mesolimbico-corticale. L'ipotalamo, essendo interconnesso con tutte le strutture limbiche, svolge un importante ruolo di coordinazione di molte delle attività del sistema limbico creando complessivamente una fitta rete di circuiti neuronali. Il sistema mesolimbico costituito da nuclei dopaminergici (DAergici) che hanno origine principalmente a livello dell'area ventrale tegmentale (VTA), innerva il nucleus accumbens (NAc), il tubercolo olfattorio e il nucleo interstiziale della stria terminalis, tutte strutture appartenenti al sistema limbico, la cui primaria funzione risiede nella modulazione del comportamento emotivo. Dalla VTA si originano altre fibre che innervano il setto (soprattutto il nucleo del setto laterale) l'ippocampo, l'amigdala, la corteccia entorinale, la corteccia prefrontale, la corteccia peririnale e quella piriforme (sistema mesolimbocorticale).

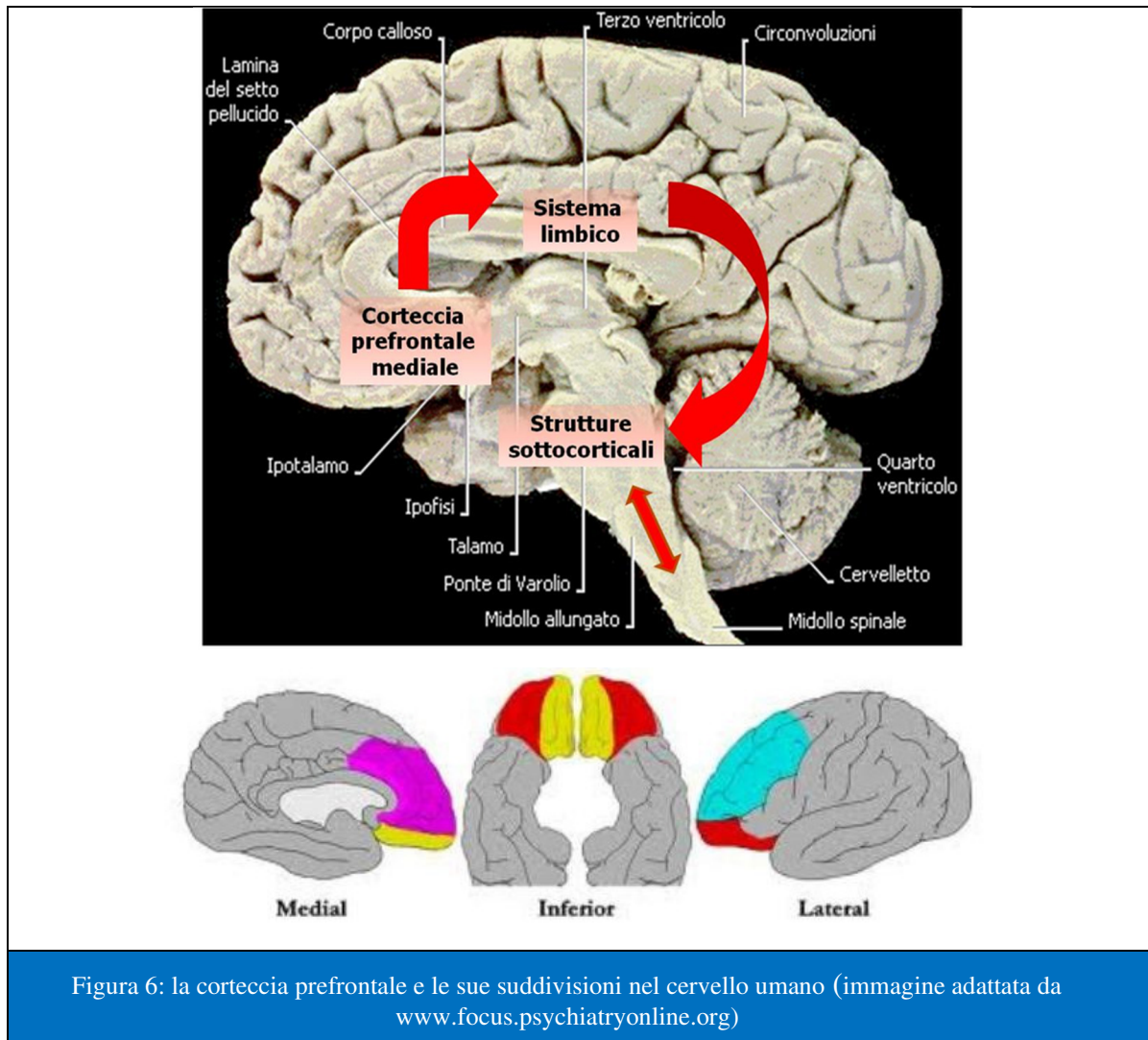


### 1.5 La corteccia prefrontale (PFC) e la corteccia prefrontale mediale (mPFC)

La corteccia prefrontale (PFC) rappresenta la parte anteriore della corteccia frontale e sebbene si presenti con notevoli differenze tra le varie specie, Jersey Rose e Clinton Woolsey alla fine degli anni '50, nominarono *corteccia prefrontale* l'area dei lobi frontali dei mammiferi di tutte le specie con proiezioni reciproche con il nucleo talamico mediodorsale (MD) (Groenewegen et al., 1990; Steketee, 2003; 2005).

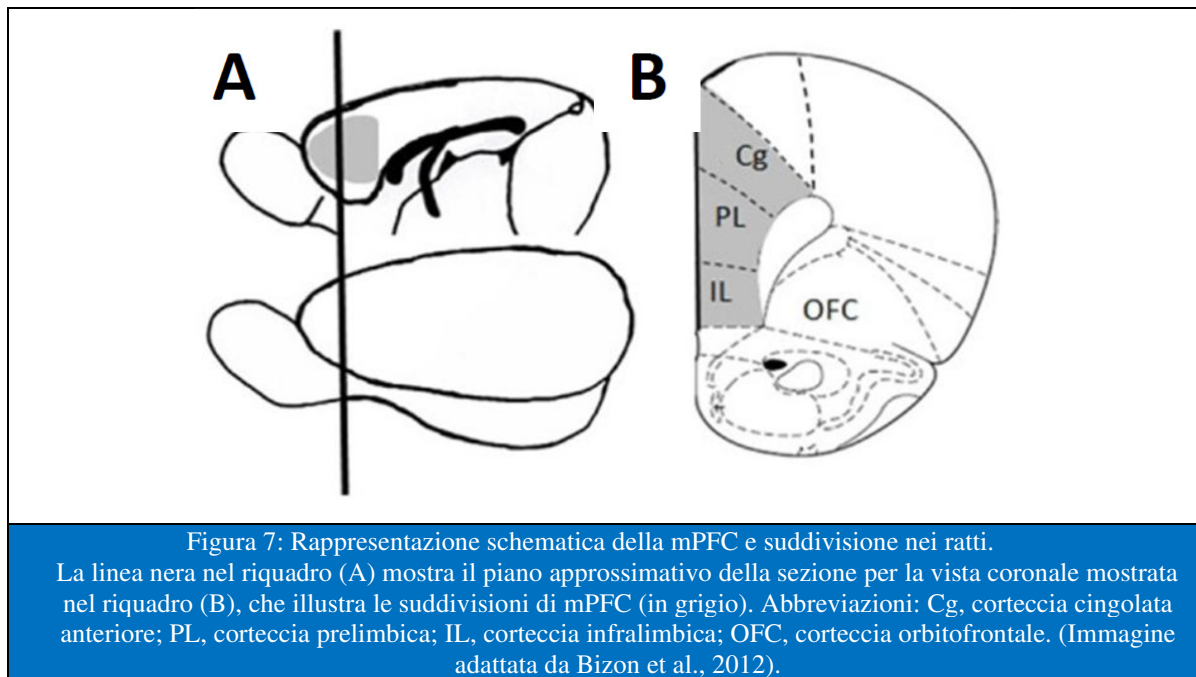
Nell'uomo, la PFC è divisa in tre regioni principali (Figura 6):

- la PFC dorsolaterale (aree di Broadmann 9 e 46);
- la PFC ventrale inferiore (aree 11, 12, 13 e 14) nota anche come corteccia orbitofrontale, (OCF);
- la PFC mediale (mPFC) che è considerata parte dell'area del cingolo anteriore (CA) (Kolb & Whishaw, 2003).





La corteccia prefrontale mediale (mPFC), oggetto del nostro studio, nell'uomo si trova lungo la parete mediale degli emisferi cerebrali anteriore e dorsale al corpo calloso (Heidbreder & Groenewegen, 2003), mentre nei roditori (es. ratti) può essere suddivisa (Figura 7) in infralimbica (IL), prelimbica (PL) e cingolata (Cg) (Krettek & Price, 1977; Van Eden & Uylings, 1985; Groenewegen et al., 1990; Ray & Price, 1992; Van Eden et al., 1992; Steketee, 2003; 2005).



La mPFC riceve importanti afferenze corticali dalla mPFC controlaterale e importanti afferenze sottocorticali dal nucleo talamico mediodorsale (MD), entrambe glutamatergiche come lo sono anche gli input che arrivano dall'ippocampo e dall'amigdala (Conde et al., 1990; Groenewegen et al., 1990; Ray & Price, 1992; Kuroda et al., 1993; Conde et al., 1995).

Inoltre, la mPFC riceve proiezioni noradrenergiche (NAergiche) dal locus coeruleus (LC) e proiezioni DAergiche dalla VTA (Thierry et al., 1973; Bjorklund et al., 1978; Foote et al., 1983).

È stata anche descritta una forte innervazione ad aree subcorticali come il NAc (shell e core) e VTA (Thierry et al., 1983; Christie et al., 1985a; Sesack et al., 1989; Sesack & Pickel, 1992). Nel complesso, l'innervazione DAergica della mPFC è meno densa rispetto a quella del NAc o dello striato e i livelli basali extracellulari e tissutali di dopamina (DA) sono molto più bassi in quest'area (Garris et al., 1993; Ihalaenen et al., 1999; Tzschenke, 2001).

Oltre alla dopamina (DA), al glutammato (Glu) ed alla noradrenalina (NA), nella mPFC sono presenti anche altre sostanze neuroattive come acido gamma-amminobutirrico (GABA), oppioidi, endocannabinoidi endogeni (eCB), serotonina (5-HT) e neurotensina (Mansour et al., 1994; Moldrich & Wenger, 2000; Tzschentke, 2001).

La DA nella mPFC funge da neuromodulatore inibitorio sia direttamente sui neuroni piramidali che indirettamente modulando l'attività GABAergica (Ferron et al., 1984; Godbout et al., 1991; Pirot et al., 1992; Sesack et al., 1995). Infatti, è stato dimostrato che sia gli agonisti della DA somministrati localmente nella VTA che la stimolazione chimico/elettrica della VTA inducono un rilascio di DA nella mPFC che porta ad un'inibizione delle cellule piramidali della mPFC (Bernardi et al., 1982; Ferron et al., 1984; Thierry et al., 1986; Peterson et al., 1987; Mantz et al., 1988; Yang & Mogenson, 1990; Karreman & Moghaddam, 1996).

Nonostante questa chiara evidenza di un ruolo inibitorio della DA nella mPFC, i dati in letteratura suggeriscono un ruolo più complesso della DA in quest'area e, in generale, nella PFC. Infatti, essendo un'area eterogenea, è stato dimostrato come la PFC sia coinvolta in una grande varietà di funzioni comportamentali come la pianificazione del movimento volontario, l'adeguamento del comportamento in relazione allo spazio, l'eccitazione e l'attenzione, la sequenza temporale delle azioni, la pianificazione del prossimo comportamento basato su informazioni acquisite in precedenza, selezione e inibizione della risposta, risposte allo stress, umore, apprendimento spaziale e associativo, recupero della memoria e memoria di lavoro (Tzschentke, 2001; Curtis & D'Esposito, 2003; Ramnani & Owen, 2004; Surmeier, 2007 ).

Per quanto riguarda i disturbi da abuso di sostanze, è stato suggerito che il loro abuso a lungo termine potrebbe indurre cambiamenti in importanti funzioni cognitive/esecutive come il processo decisionale e la corretta valutazione degli stimoli.

## 1.6 Il ruolo della DA nella mPFC

Oggi è ampiamente accettato che la DA nella mPFC abbia un ruolo modulatorio e che le modificazioni dei suoi livelli in quest'area non producono un chiaro e definito output comportamentale. Infatti, sebbene molte prove mostrino un ruolo inibitorio della DA nella mPFC, la letteratura suggerisce un suo ruolo più complesso.

Analogamente al NAc, anche se non in maniera completamente chiara, nella mPFC la DA sembra svolgere un ruolo nei processi di ricompensa, ma non solo: è stato dimostrato che un aumento di DA nella mPFC è associabile anche a "novità, eccitazione, aspettativa, risposte operanti e condizionate classiche" e che "codifica per un generico valore motivazionale" (Bassareo & Di Chiara, 1997; Tzschentke, 2001; Bassareo et al., 2002). Inoltre, come suggerito da Di Chiara e colleghi (1997), a differenza della DA nel NAc (shell in particolare), l'aumento della DA nella mPFC non è principalmente correlato alla capacità di alcuni farmaci di indurre comportamenti abusivi; i farmaci che aumentano la DA (o la NA) preferenzialmente nella mPFC non sono abusati dagli esseri umani o hanno un basso potenziale di abuso (Tanda et al., 1994; Bassareo et al., 1996). Come nel caso dei processi di ricompensa nel NAc, diverse teorie hanno cercato di spiegare l'esatto ruolo e funzione delle proiezioni DAergiche mesocorticali proponendo un modello in cui la DA nella mPFC serve "per facilitare a livello sinaptico gli input, sia eccitatori che inibitori" regolando l'accesso delle informazioni alla memoria attiva (aggiornando informazioni utili e rilevanti per il compito), ma anche come meccanismo di protezione nei confronti di interferenze determinate da informazioni irrilevanti. (Servan-Schreiber *et al.*, 1990; Cohen & Servan-Schreiber, 1992; Braver *et al.*, 1999). Al fine di correlare i processi di ricompensa e le funzioni cognitive di ordine superiore come la memoria di lavoro e il processo decisionale, alcuni studi (Hitchcott et al., 2007), hanno mostrato che la DA nelle parti ventrali della mPFC (cioè la corteccia IL) è necessaria per l'adeguamento del comportamento in relazione all'aspettativa del risultato. Gli autori hanno discusso la possibilità che la DA nella corteccia IL della mPFC abbia un ruolo importante nei processi attenzionali, con un impatto nelle manifestazioni comportamentali (Hitchcott et al., 2007). In un altro studio recente, animali con lesioni nella corteccia PL hanno mostrato deficit nell'adattare il loro comportamento strumentale finalizzato alla consegna della ricompensa (Naneix et al., 2009). In conclusione, sebbene questi dati supportino l'ipotesi di un ruolo non specifico della DA nella mPFC, si suggerisce che la DA sia coinvolta nelle tre principali funzioni motoria, di ricompensa e cognitiva, al fine di aiutare l'organismo a "imparare, prevedere e rispondere in modo appropriato agli eventi che portano alla ricompensa" (Braver et al., 1999).

### 1.7 Il ruolo differenziale della DA nella ricompensa (alimentare e farmacologica)

Per quanto riguarda il ruolo della DA nei processi di ricompensa è importante sottolineare le diverse modalità di attivazione del sistema DAergico in risposta a stimoli gratificanti naturali, come cibo e sesso, o farmacologici come le droghe d'abuso. Infatti, in questi anni, diversi studi hanno cercato di capire, oltre al ruolo della trasmissione DAergica in questi processi, anche come le droghe d'abuso influenzano il sistema DAergico mesocorticolimbico e come questi effetti siano implicati nella capacità dei farmaci di indurre dipendenza (Bassareo & Di Chiara, 1999; Bassareo *et al.*, 2002; Di Chiara *et al.*, 2004; Kalivas & Volkow, 2005; Goldstein & Volkow, 2011; De Luca, 2014).

Considerando la risposta DAergica a stimoli gratificanti naturali, come gli stimoli gustativi, alcuni autori (Bassareo & Di Chiara, 1997; 1999; Bassareo *et al.*, 2002), attraverso esperimenti di microdialisi in vivo sul cervello dei ratti, hanno dimostrato che l'esposizione a stimoli gustativi nuovi (non familiari) determina un aumento rapido della DA nel core del NAc e nella mPFC indipendentemente dalla valenza positiva (appetitoso) o negativa (avverso) dello stimolo gustativo.

Gli stimoli gustativi appetitivi (oggetto di studio di questa tesi), sono in grado di stimolare la DA nella shell del NAc, inducendo un suo rapido aumento però solo in risposta ad un gusto appetitoso non familiare (come cioccolato dolce o Fonzie) (Bassareo *et al.*, 2002). Oltre alla valenza positiva degli stimoli, è quindi necessaria anche una relativa novità per la stimolazione della trasmissione DAergica della shell del NAc. Questo ruolo è stato supportato dall'evidenza che il cibo appetibile non familiare stimola il rilascio di DA nella shell del NAc, nel core del NAc e nella mPFC ma solo nella shell del NAc questo effetto viene a mancare in seguito ad *habituation* dopo esposizioni ripetute (Tabella 1) (Bassareo, 1997 n. 268; De Luca, 2014). Inoltre, l'*habituation* della risposta DAergica nella shell del NAc alle ricompense naturali è specifica per il gusto (Bassareo & Di Chiara, 1997) ed è stata correlata al ruolo della DA nell'apprendimento associativo mediato dalla ricompensa alimentare. Secondo questa visione, la DA rilasciata nella shell del NAc in seguito ad uno stimolo alimentare sarebbe necessaria per consentire il consolidamento dell'esperienza e l'associazione con le sue conseguenze post-ingestione, come osservato in un paradigma di avversione al gusto (Fenu *et al.*, 2001; Bassareo *et al.*, 2007). Poiché la novità è un prerequisito per la stimolazione del rilascio di DA nella shell del NAc ma non per le reazioni edoniche comportamentali, è probabile che il rilascio di DA nella shell del NAc sia una conseguenza piuttosto che la causa delle proprietà appetitive degli stimoli gustativi, secondo l'ipotesi che l'edonia del gusto non dipende dalla DA (Berridge & Robinson, 1998).

Questa e altre evidenze supportano l'ipotesi dell'*incentive learning* (Di Chiara, 1998), in cui la DA, nello specifico nella shell NAc, “è coinvolta nell'acquisizione di proprietà incentivo-motivazionali da stimoli condizionati a ricompense” (Di Chiara et al., 2004; Di Chiara & Bassareo, 2007).

Invece le proprietà della trasmissione DAergica nel core del NAc e nella mPFC sono più coerenti con un ruolo nell'espressione della motivazione, in accordo con la definizione di NAc come interfaccia tra motivazione e azione (Mogenson & Yang, 1991).

Per comprendere meglio questa relazione reciproca tra mPFC e NAc nella reattività DAergica agli stimoli, De Luca e colleghi hanno studiato la risposta DAergica a stimoli appetitivi non familiari sotto diverse manipolazioni farmacologiche e anatomiche (Tabella 1) (De Luca et al., 2011; Bimpisidis et al., 2013; De Luca, 2014).

In uno di questi studi, è stato dimostrato che la sensibilizzazione agli oppiacei (morfina) induce cambiamenti adattativi differenziali alla risposta della trasmissione DAergica dopo esposizione ripetuta a stimoli gratificanti naturali. In particolare, la sensibilizzazione alla morfina è stata in grado di indurre una diversa risposta DAergica nel core del NAc dopo esposizione allo stimolo gratificante naturale: aumentata ma ritardata alla prima esposizione al cioccolato; aumento rapido ed immediato invece nei ratti pre-esposti. Inoltre, questo studio ha mostrato un andamento opposto della trasmissione di DA nella shell del NAc e nella mPFC in seguito all'esposizione ripetuta al cioccolato: infatti, negli animali sensibilizzati alla morfina, si è osservata l'inaspettata comparsa di *habituation* nella risposta DAergica nella mPFC alla seconda esposizione al cioccolato, e contemporaneamente la perdita della stessa nella shell del NAc (De Luca et al., 2011).

Nel frattempo, non sono stati osservati cambiamenti nella reattività comportamentale al gusto e questa evidenza supporta l'ipotesi che l'edonia del gusto non dipende dalla DA (Berridge & Robinson, 1998).

Pertanto, è stato proposto che questi cambiamenti a lungo termine nella risposta DAergica di diverse aree terminali abbiano implicazioni nei processi motivazionali e probabilmente si traducano in un aumento dell'incentivazione e dell'apprendimento (De Luca et al., 2011).

Infatti, da un lato la comparsa di *habituation* della risposta DAergica nella mPFC al cioccolato e dall'altra la mancata *habituation* della risposta DAergica nella shell del NAc, potrebbero facilitare approcci ripetuti verso uno stimolo motivazionale (De Luca et al., 2011). Inoltre, questa mancanza di *habituation* della risposta DAergica nel NAc può essere considerata di per sé come un marker di tossicodipendenza (De Luca, 2014).

Secondo questa ipotesi, diversi studi hanno mostrato quindi un ruolo inibitorio della trasmissione DAergica della mPFC sulle aree subcorticali DAergiche nei processi di ricompensa e motivazionali.

Infatti, è stato dimostrato che l'aumento dei livelli di DA nella mPFC corrisponde a una diminuzione di DA nel NAc (Louilot et al., 1989; Jaskiw et al., 1991; Vezina et al., 1991; Kolachana et al., 1995; Lacroix et al., 2000). Questo controllo della mPFC sulle aree sottocorticali è stato inoltre confermato dai risultati ottenuti studiando l'effetto delle lesioni della mPFC con 6-OHDA sulla risposta DAergica in seguito all'esposizione ripetuta al cioccolato (Bimpisidis et al., 2013) (Tabella 1): gli animali hanno mostrato aumento della DA nella shell del NAc dopo la prima esposizione al cioccolato, in maniera simile a ciò che accade nei ratti privi di lesioni; mentre dopo la seconda esposizione non si è osservata l'*habituation* della risposta DAergica nella shell del NAc. Inoltre, in maniera similare alla sensibilizzazione indotta dalla morfina, le lesioni dei terminali DAergici della mPFC hanno prodotto un aumento elevato, ritardato e prolungato di DA nel core del NAc in risposta alla prima esposizione allo stimolo del gusto appetitoso, mentre, diversamente, non hanno influenzato la reattività DAergica nel core del NAc degli animali con pre-esposizione a cioccolato (seconda esposizione).

Complessivamente questi studi, in accordo con la letteratura, confermano il ruolo cruciale delle vie DAergiche mesocorticolimbiche nella valutazione del valore motivazionale di stimoli gratificanti naturali, e ha mostrato il ruolo inibitorio della mPFC sulle aree subcorticali coinvolte in questi processi.

Inoltre, i risultati sopra descritti potrebbero aiutare a spiegare il motivo per cui le disregolazioni della trasmissione DAergica mesocorticolimbica sono state identificate come critiche in diversi disturbi neuropsichiatrici, come la schizofrenia e la tossicodipendenza (Kalivas & Volkow, 2005; Jensen et al., 2008; Goldstein & Volkow, 2011; Deserno et al., 2013; De Luca, 2014).

stimulus	Nac shell DA	Nac core DA	mPFC DA	references
CHOCOLATE 1 <sup>st</sup> exposure	↑	↑	↑	Bassareo et al., 2002
CHOCOLATE 2 <sup>nd</sup> exposure	HABITUATION	↑	↑	
CHOCOLATE 1 <sup>st</sup> exposure after MORPHINE SENSITIZATION	↑	↑ (Higher and delayed)	↑	De Luca et al., 2011
CHOCOLATE 2 <sup>nd</sup> exposure after MORPHINE SENSITIZATION	↑	↑ (Higher)	HABITUATION	
CHOCOLATE 1 <sup>st</sup> exposure in mPFC 6-OHDA LESIONED RATS	↑	↑ (Higher and delayed)	✗	Bimpisidis et al., 2013
CHOCOLATE 2 <sup>nd</sup> exposure in mPFC 6-OHDA LESIONED RATS	↑	↑	✗	

Tabella 1: rappresentazione schematica dei risultati della risposta DA a stimoli gustativi appetitivi non familiari

Infatti, l'eccessiva attivazione di questi processi da parte delle droghe d'abuso, che inducono una stimolazione disadattativa della trasmissione della DA nella shell del NAc, potrebbe portare a una motivazione compulsivamente focalizzata sulle droghe e sugli stimoli correlati alla droga tipici della tossicodipendenza (Volkow et al., 2003; Di Chiara et al., 2004; Volkow & Morales, 2015).

In questa disfunzione sottocorticale, che può manifestarsi in diversi stadi della tossicodipendenza, l'mPFC sembra svolgere un ruolo cruciale (Schenk et al., 1991; Weissenborn et al., 1997; Bolla et al., 2003; Kalivas & Volkow, 2005). A questo proposito, la comparsa di *habituation* nella mPFC osservata in animali sensibilizzati alla morfina (De Luca et al., 2011) potrebbe essere considerata un marker di disfunzione della mPFC nella sua capacità di inibire funzioni subcorticali cruciali. Pertanto, la disfunzione della mPFC può portare a una motivazione eccessiva e quindi ad una chiara perdita del controllo degli impulsi (De Luca, 2014).

I farmaci e le sostanze che inducono dipendenza, indipendentemente dalla classe farmacologica di appartenenza e dal loro meccanismo d'azione sul sistema nervoso centrale (SNC), possono

essere definiti come surrogati di stimoli gratificanti naturali, essendo capaci di mimare le proprietà incentive e funzionali degli stimoli primari e di condizionare il comportamento motivato. Tutte le sostanze d'abuso come ad esempio gli analgesici narcotici, gli psicostimolanti (anfetamina e cocaina), la nicotina, l'alcol, e il  $\Delta^9$ -THC, hanno in comune la proprietà di aumentare la concentrazione extracellulare di dopamina (DA) nella shell del nucleus accumbens (NAc) con proprietà rinforzanti (Pontieri et al., 1995; Tanda et al., 1997).

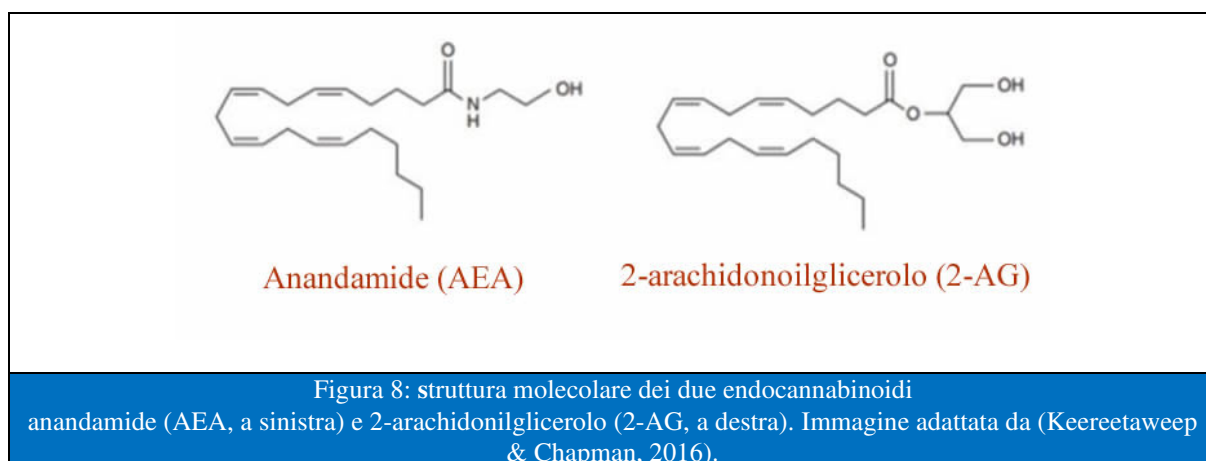


## 1.8 Sistema endocannabinoide

Il sistema endocannabinoide è un sistema complesso implicato nella regolazione di molti processi fisiologici presente sia nel sistema nervoso centrale che in periferia (Boisselier et al., 2017) caratterizzato dalla presenza di 3 componenti:

- gli endocannabinoidi (eCB, agonisti endogeni dei recettori);
- i recettori cannabinoidi (CBR1 e CBR2);
- le proteine coinvolte nei processi di sintesi e degradazione degli eCB (Lu & Mackie, 2016; Maldonado et al., 2006; Spanagel, 2020);

Il sistema degli endocannabinoidi agisce in modo diverso dalla maggior parte dei sistemi di neurotrasmettitori; vengono infatti prodotti *on demand* dalle cellule postsinaptiche, attraversano le sinapsi come messaggeri retrogradi e si legano ai CBR1 espressi presinapticamente inibendo il rilascio dei neurotrasmettitori e quindi modulandone la loro stessa attività e regolazione (R. I. Wilson & Nicoll, 2002). Gli eCB maggiormente studiati (Figura 8) sono l'anandamide (AEA) che è un agonista parziale dei CBR1 e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) che è un agonista completo sia dei CBR1 che dei CBR2 (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995).



L'AEA e il 2-AG sono molecole di natura lipofila. L'AEA si forma per scissione di un precursore fosfolipidico, sintetizzato dall'enzima N-aciltransferasi (NAT), la N-arachidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). Il NAT catalizza il trasferimento dell'acido arachidonico (AA) dalla fosfatidilcolina alla fosfatidiletanolamina.

L'attività del NAT è potenziata tramite la fosforilazione mediata dalla *protein chinasi A* (PKA) AMP ciclico (cAMP) dipendente (Cadas et al., 1996; Piomelli, 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 2005). Il rilascio in circolo dell'AEA dalla NAPE è catalizzato da una fosfolipasi D

specifica (PLD). Il 2-AG è un monogliceride, e in quanto tale, la sua sintesi è associata al metabolismo dei triacilgliceroli (TGD) e sfrutta l'azione di una fosfolipasi di tipo C (PLC) (Piomelli, 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 2005).

I recettori CBR1 sono quelli maggiormente rappresentati nel sistema nervoso centrale (SNC), soprattutto nella corteccia, nei gangli della base, nell'ippocampo, nel cervelletto (Mackie, 2008), ma anche nel bulbo olfattivo e nello striato (Boisselier et al., 2017). Sono stati identificati su molti neuroni (in quantità significativamente maggiore sui neuroni GABAergici rispetto ai neuroni glutamatergici) (Spanagel, 2020), sui terminali postsinaptici, negli astrociti (Oliveira da Cruz et al., 2016) e in diversi tessuti periferici (Boisselier et al., 2017; Herkenham et al., 1991). La loro attivazione inibisce l'adenilato ciclasi e quindi la formazione dell'cAMP; inoltre, inibisce i canali del  $Ca^{2+}$ , attiva quelli del  $K^{+}$  bloccando la trasmissione sinaptica. I recettori CBR2 sono rappresentati sia a livello centrale (corteccia cerebrale, cervelletto e tronco cerebrale) (Van Sickle et al., 2005) che nei tessuti periferici (cellule epatiche non parenchimali, pancreas endocrino e ossa), e hanno anche un ruolo importante a livello del sistema immunitario (Galiègue et al., 1995; Maccarrone et al., 2015) ed ematopoietico (Maccarrone et al., 2015).

Il sistema endocannabinoidale, attraverso l'interazione col sistema DAergico, partecipa alla ricompensa naturale e farmacologica (Spanagel, 2020), all'elaborazione degli stimoli motivazionali (Melis et al., 2012; Melis & Pistis, 2012) e di conseguenza anche nelle dipendenze (Gardner, 2005; Maldonado et al., 2006). Infatti, i CBR1 sono presenti nelle diverse regioni del circuito di ricompensa cerebrale che coinvolge, tra le diverse aree, la VTA che, come già detto in precedenza, proietta al NAc. Gli eCB agiscono come messaggeri retrogradi, modulando gli input sinaptici eccitatori glutamatergici e inibitori GABAergici nella VTA, e la trasmissione del glutammato nel NAc (Maldonado et al., 2006). Di conseguenza, l'attivazione dei CBR1 localizzati sui terminali assionali dei neuroni GABAergici nella VTA va ad inibire la trasmissione del GABA (Lupica & Riegel, 2005; Riegel & Lupica, 2004) disinibendo i neuroni DAergici (Spanagel, 2020). È così che le droghe d'abuso come i fitocannabinoidi della cannabis e i cannabinoidi sintetici JWH-018 (1-Pentyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenylmethanone), nonché gli stimoli gratificanti naturali come cibo e sesso, sono in grado di aumentare i livelli di dopamina all'interno del NAc (Di Chiara & Imperato, 1988; Spanagel & Weiss, 1999).

## 1.9 Cannabinoidi e alimentazione

Negli ultimi anni sono stati portati avanti moltissimi studi grazie ai quali è stato possibile dimostrare che sia gli endocannabinoidi (AEA e 2-AG), che i cannabinoidi esogeni come  $\Delta^9$ -THC agendo sui CBR1 a livello ipotalamico ed in tutti i centri preposti al comportamento alimentare, sono in grado di stimolare il food intake, soprattutto nei confronti di cibi particolarmente ricchi di grassi e carboidrati (Pagotto et al., 2006). Queste proprietà, infatti, vengono sfruttate anche per contrastare condizioni cliniche particolari, quali l'anoressia e la cachessia, molto diffuse in pazienti affetti da neoplasie maligne o da sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) (Cota et al., 2003; Devane et al., 1992; Kirkham, 2003; Matias & Di Marzo, 2007b; Pagotto et al., 2006). In particolare, l'utilizzo di un antagonista dei CBR1, il Rimonabant noto anche con la sigla SR 141716A, è in grado di ridurre l'assunzione di cibo e in particolare di soluzioni dolci (Arnone et al., 1997; Colombo et al., 1998; Freedland et al., 2000; McLaughlin et al., 2003), dimostrando il coinvolgimento del sistema eCB nel food intake.

Gli eCB prodotti a livello postsinaptico una volta che vengono rilasciati vanno ad agire seguendo la via retrograda sul neurone presinaptico, riducendo così l'aumento di calcio intracellulare e inibendo il rilascio di neuropeptidi solitamente inibitori come il GABA (Woods, 2007) che nella sua normale attività agisce stimolando il senso di sazietà. Di conseguenza l'azione degli endocannabinoidi attivata dalla sensazione di piacere data dalla visione o anche dall'assunzione di un alimento appetitoso (dolci), attenua proprio l'azione inibitoria del GABA con conseguente riduzione del senso di sazietà e stimolazione del food intake a giustificazione del ruolo oreosizzante svolto dal sistema endocannabinoide (Pagotto et al., 2008).

Studi preclinici oltre ad aver dimostrato la presenza dei recettori CBR1 nelle aree limbiche come il NAc (Hermann et al., 2002; Marsicano & Lutz, 1999), hanno messo in evidenza la comunicazione tra il sistema eCB e quello DAergico nel controllo della ricompensa per il cibo gustoso grazie all'utilizzo degli antagonisti del recettore D1 che alleviano e riducono lo stimolo oreosigeno indotto dal  $\Delta^9$ -THC (Verty et al., 2004).

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

La trasmissione DAergica mesolimbica svolge un ruolo centrale nei processi emozionali e di ricompensa legati al comportamento alimentare, sessuale, materno ed al consumo delle sostanze d'abuso. Tutti questi stimoli sono in grado di determinare un incremento della DA (Bassareo et al., 2002; Di Chiara, 1990; Volkow et al., 2003) ma, mentre gli stimoli gustativi, in seguito alla seconda esposizione allo stesso stimolo, vanno incontro alla regolazione adattativa della trasmissione DAergica (definita *habituation*), questo non avviene in seguito ad esposizioni successive alle sostanze d'abuso (Pontieri et al., 1995, 1996; Tanda et al., 1997). Inoltre, un altro ruolo di rilievo nell'elaborazione delle informazioni emotive e nel processo della ricompensa, è svolto dal sistema endocannabinoide che interagisce col sistema DAergico (Maldonado et al., 2006; Volkow et al., 2017).

Il JWH-018 è un cannabinoide sintetico (SC) utilizzato come sostanza di partenza per la sintesi di nuovi composti (De Luca & Fattore, 2018; Miliano et al., 2016) dai quali differisce chimicamente per piccole modifiche che hanno consentito di mettere in commercio (anche se per periodi limitati) le cosiddette *Spice Drugs*, commercializzate come alternativa legale, naturale e più sicura ma anche con effetti più potenti, della marijuana (Carroll et al., 2012). È un agonista sintetico dei recettori cannabinoidi (CBR) per cui ha un'affinità molto elevata e superiore a quella del più comune cannabinoide naturale della marijuana, il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC) (Miliano et al., 2016; Pintori et al., 2017, 2021) ed è per questo motivo che sono ad esso riconducibili anche più reazioni avverse, effetti a lungo termine e conseguenze psichiatriche, nonché diversi sintomi di astinenza e una maggior dipendenza dopo l'utilizzo ripetuto (Papanti et al., 2014; Schifano et al., 2015).

Il JWH-018 possiede, come il  $\Delta^9$ -THC, proprietà rinforzanti che dipendono dal CBR1 e un effetto stimolante nei confronti della dopamina (DA) soprattutto nella shell del NAc; per produrre gli stessi effetti la dose di cannabinoide sintetico necessaria è di 0.25 mg/kg (ip), mentre invece per il  $\Delta^9$ -THC è di 1 mg/kg i.p., a conferma della maggiore potenza del JWH-018 (De Luca et al., 2015).

Nonostante la sempre più ampia diffusione ed il crescente utilizzo, gli effetti causati dall'esposizione cronica a sostanze come il JWH-018 sulla trasmissione DAergica, e quindi la loro relazione con i processi alla base del comportamento alimentare e delle dipendenze, non sono stati ancora ampiamente caratterizzati.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare, in ratti Sprague-Dawley maschi adulti, gli effetti neurochimici dati dall'esposizione ripetuta (14 giorni) al JWH-018, a una dose in grado

di aumentare in modo selettivo la trasmissione DAergica nell shell del NAc (0.25 mg/kg, ip) dopo esposizione ad uno stimolo gustativo appetitivo naturale (soluzione di cioccolato) dotato di potere motivazionale positivo ed in grado di determinare un aumento della trasmissione DAergica finalizzata al comportamento di ricerca dello stesso. Nello specifico, droghe d'abuso e stimoli gustativi appetitivi (ad esempio cioccolato, zucchero, fonzie) aumentano l'attività DA nella NAc *shell* (Bassareo et al., 2002; Di Chiara, 1990; Volkow et al., 2003). Però, a differenza di quanto osservato con gli stimoli gratificanti naturali, in seguito a ripetute esposizioni alle droghe d'abuso (come nicotina, oppiacei, cannabinoidi, psicostimolanti), non si evidenzia l'assuefazione della risposta DAergica nella NAc *shell* (Pontieri et al., 1995, 1996; Tanda et al., 1997).

L'utilizzo di uno stimolo gustativo edonico permetterà di studiare, in maniera indiretta, l'eventuale reciproca influenza della stimolazione dei sistemi cannabinoide e dopaminergico e la loro importanza anche nel codificare la gratificazione legata al cibo.


In particolare, abbiamo valutato se quest'esposizione fosse in grado di modificare, a livello della corteccia prefrontale mediale (mPFC), l'attività DAergica basale e la reattività DAergica in seguito all'esposizione ripetuta a stimoli gustativi (soluzione di cioccolato, Nesquik Squeeze©). In parallelo, durante l'esposizione al cioccolato, sono state valutate anche le reazioni gustative edoniche e avversive (taste reactivity).

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Animali

Gli animali utilizzati per gli esperimenti sono ratti maschi di ceppo Sprague – Dawley (Envigo, Italia) del peso di 275-300 g (Figura 9 e Tabella 2).


Gli animali sono stati tenuti in una stanza in condizioni ambientali controllate (temperatura  $22 \pm 2$  C° e umidità 60%), con un ciclo luce-buio di 12h (a partire dalle 7:00 a.m.); il trattamento degli animali e le tecniche sperimentali utilizzate erano in accordo alle Direttive 609/86 e 63/2010 UE, riguardante la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici e con l'approvazione da parte del Ministero della Salute e del Comitato Etico per la Sperimentazione sugli Animali dell'Università di Cagliari (CESA, Università di Cagliari).

	Albino
	Carattere docile
	Eccellenti prestazioni riproduttive e caratteristiche materne
	Cuciolata media: 11
	È il ratto più utilizzato nella ricerca sugli animali
Figura 9 e Tabella 2: caratteristiche salienti Sprague – Dawley ( <a href="https://www.envigo.com/model/hsd-sprague-dawley-sd">https://www.envigo.com/model/hsd-sprague-dawley-sd</a> )	

### 3.2 Sostanze

Le sostanze utilizzate per gli esperimenti eseguiti sono:

- il JWH-018 (Tocris, Bristol, UK, Figura 10) disciolto in 0.5% di Etanolo assoluto, 0.5% di Tween 80 e 99% di soluzione salina; somministrato per via intraperitoneale con un volume di iniezione di 3 ml/kg alla concentrazione di 0.25 mg/kg. La soluzione veicolo è stata preparata utilizzando gli stessi eccipienti (0.5% di Etanolo assoluto, 0.5% di Tween 80 e 99% salina) utilizzati per disciogliere il JWH-018;



Print Date: Apr 9<sup>th</sup> 2020

**Certificate of Analysis**

[www.tocris.com](http://www.tocris.com)

**Product Name:** JWH 018

**CAS Number:** 209414-07-3

**IUPAC Name:** (1-Pentyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenylmethanone

**Catalog No.:** 1342

**Batch No.:** 1

**1. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES**

**Batch Molecular Formula:**

C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>NO

**Batch Molecular Weight:**

341.45

**Physical Appearance:**

Yellow oil

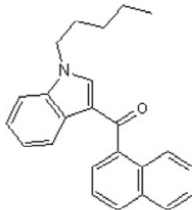
**Solubility:**

DMSO to 100 mM  
ethanol to 100 mM

**Storage:**

Desiccate at -20°C

**Batch Molecular Structure:**



**2. ANALYTICAL DATA**

**TLC:**

R<sub>f</sub> = 0.4 (Ethyl acetate:Petroleum ether [4:1])

**HPLC:**

Shows >99.4% purity

**<sup>1</sup>H NMR:**

Consistent with structure

**Mass Spectrum:**

Consistent with structure

Figura 10: certificato analisi JWH-018 (immagine tratta da  
[https://documents.tocris.com/pdfs/tocris\\_coa/1342\\_1\\_coa.pdf?1628611502&\\_ga=2.18798201.1736702833.1628611503-587380635.1628611503](https://documents.tocris.com/pdfs/tocris_coa/1342_1_coa.pdf?1628611502&_ga=2.18798201.1736702833.1628611503-587380635.1628611503))

- una soluzione di cioccolato (Nesquik Squeeze©, Nestlè, CH, Figura 11 e Tabella 3) disciolto in acqua con rapporto di 1:1, utilizzata come stimolo gustativo. Gli ingredienti dello sciroppo sono i seguenti: zucchero, acqua, cacao magro in polvere 10%, sciroppo di zucchero invertito, destrosio, correttore di acidità acido citrico, sale, conservante sorbato di potassio, aromi, cannella.



	Per 100 grammi	Per Porzione	% per porzione
Energia	279 kcal	117 kcal	6%
Grassi	1.2 g	2.6 g	4%
Di cui Saturi	0.7 g	1.6 g	8%
Carboidrati	62.6 g	17.5 g	7%
Di cui Zuccheri	60.5 g	17.1 g	19%
Fibre	3.4 g	0.5 g	-
Proteine	2.2 g	5.5 g	11%
Sale	0.18 g	0.25 g	4%

Tabella 3: valori nutrizionali del Nesquik Squeeze©, Nestlè tratto da "nestlèprofessional.it". I valori per porzione sono riferiti a 16 g di prodotto in 150 ml di latte parzialmente scremato.

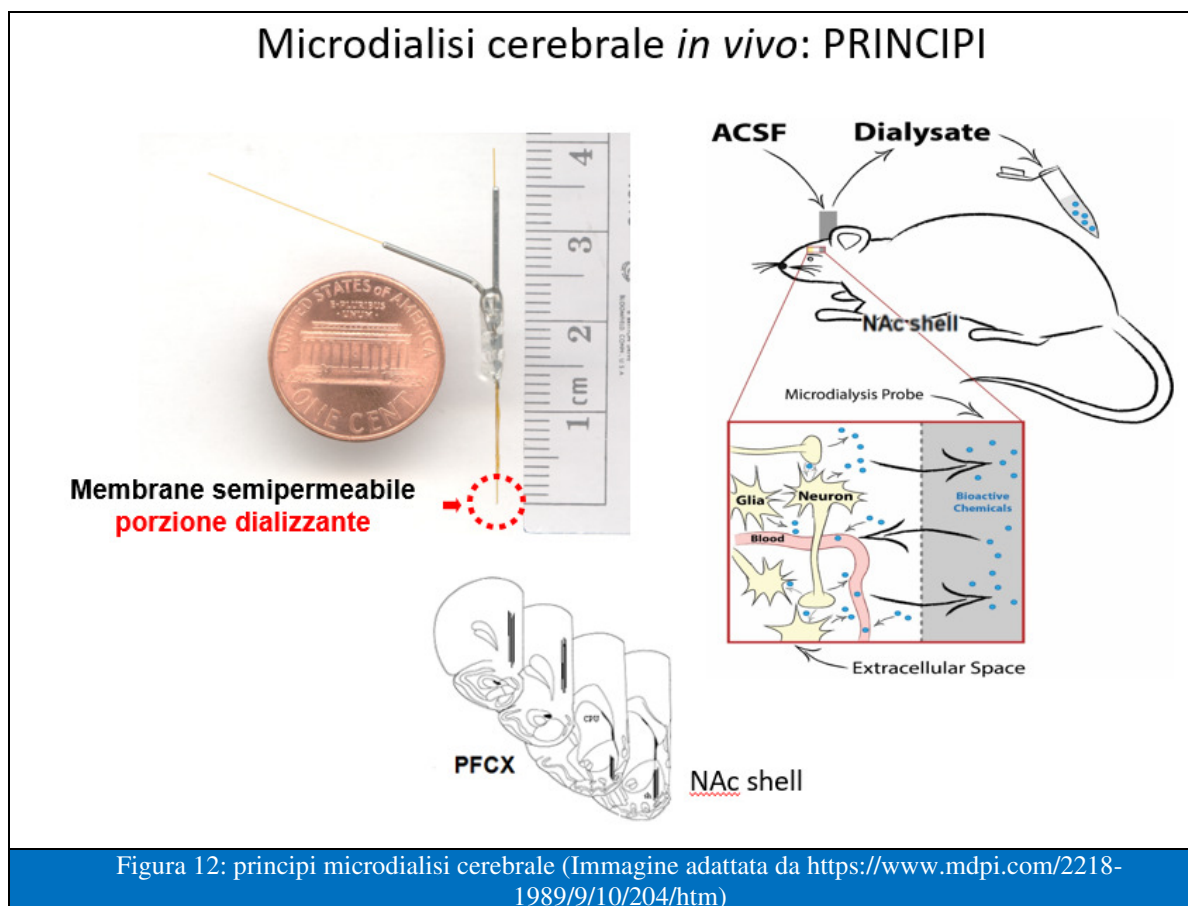


### **3.3 Preparazione cannule orali**

I cateteri per la somministrazione orale sono costituiti da una parte metallica e da una parte in polietilene flessibile; per la preparazione della parte metallica viene utilizzato un ago in acciaio inossidabile da 22G, lungo 2 cm dalla punta, smussato ad un'estremità e poi inserito nel tubicino di polietilene (Portex Ltd, Hythe, Inghilterra) che termina con un disco circolare forato. Il tubicino in polietilene presenta un diametro interno di 0.58 mm e un diametro esterno pari a 0.96 mm (Bimpisidis et al., 2013b) con un'estremità slargata e arrotondata che consente di bloccare il catetere all'interno della cavità orale del ratto. Questi cateteri permettono di introdurre nella cavità orale le soluzioni di cioccolato in modo inatteso per l'animale, libero di non deglutire la sostanza nel caso in cui percepisca il sapore come non gradevole. Inoltre, presenta il vantaggio di consentire una miglior osservazione del comportamento manifestato dall'animale durante la somministrazione orale (reazioni edoniche e avversive).

### 3.4 Preparazione delle sonde da microdialisi

Le sonde per la microdialisi (Figura 12 e Figura 13), di tipo verticale e concentriche, sono state preparate e assemblate almeno 24 ore prima dell'inizio dell'esperimento. Sono costituite da una sottile fibra da dialisi, l'AN69, composta da un copolimero acrilico di sodiometa-allil-solfonato, con un diametro interno di 220  $\mu\text{m}$  e un diametro esterno di 310  $\mu\text{m}$  (Hospal, Dasco, Italy), (De Luca et al., 2015). All'interno della fibra da dialisi è stato poi inserito un mandrino di tungsteno, con funzione di sostegno. Un'estremità della fibra è stata chiusa con l'ausilio di una goccia di colla epossidica che penetra per capillarità per circa 1 mm all'interno della fibra e che viene fatta solidificare per 24 ore in modo tale da formare un tappo di colla consistente e smerigliabile a forma di cono per ridurre al minimo il danno provocato dal passaggio della fibra attraverso il tessuto cerebrale. Successivamente, si estrae il mandrino e si taglia la fibra in modo da ottenere una porzione di circa 7 mm a partire dal tappo di colla. Quest'ultimo è stato allargato e al suo interno sono stati inseriti due sottilissimi capillari di silica fusa, con un diametro interno di 75  $\mu\text{m}$  e un diametro esterno di 150  $\mu\text{m}$ , sfalsati fra loro di 3 mm. La porzione dializzante attiva è di 1,5 mm.



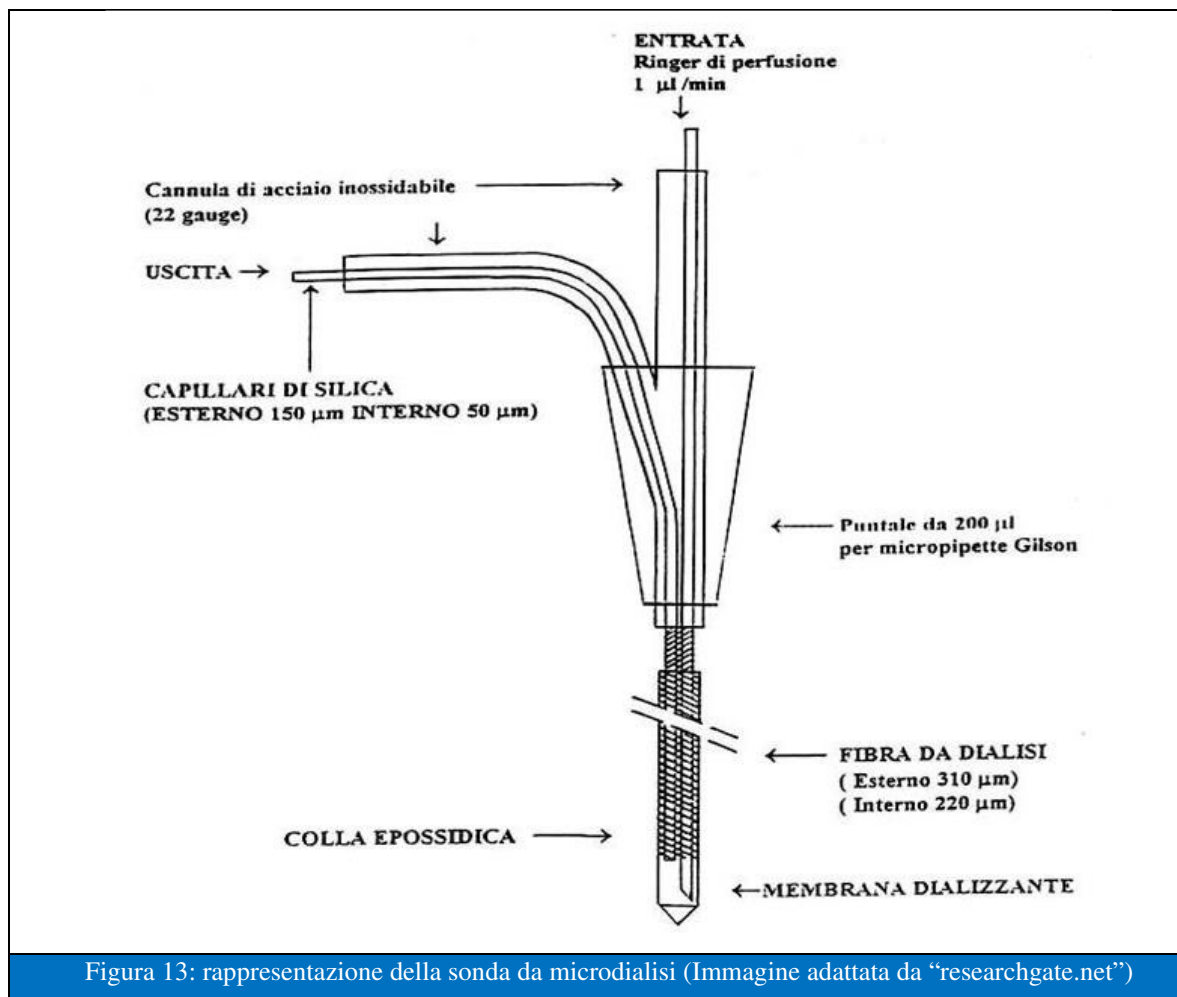
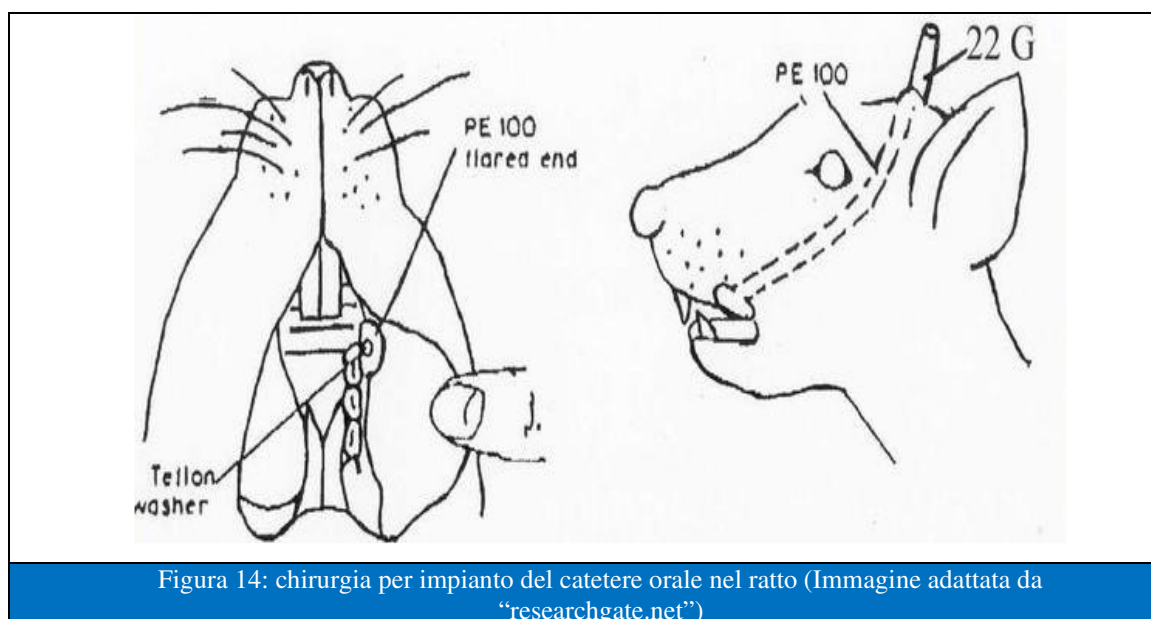


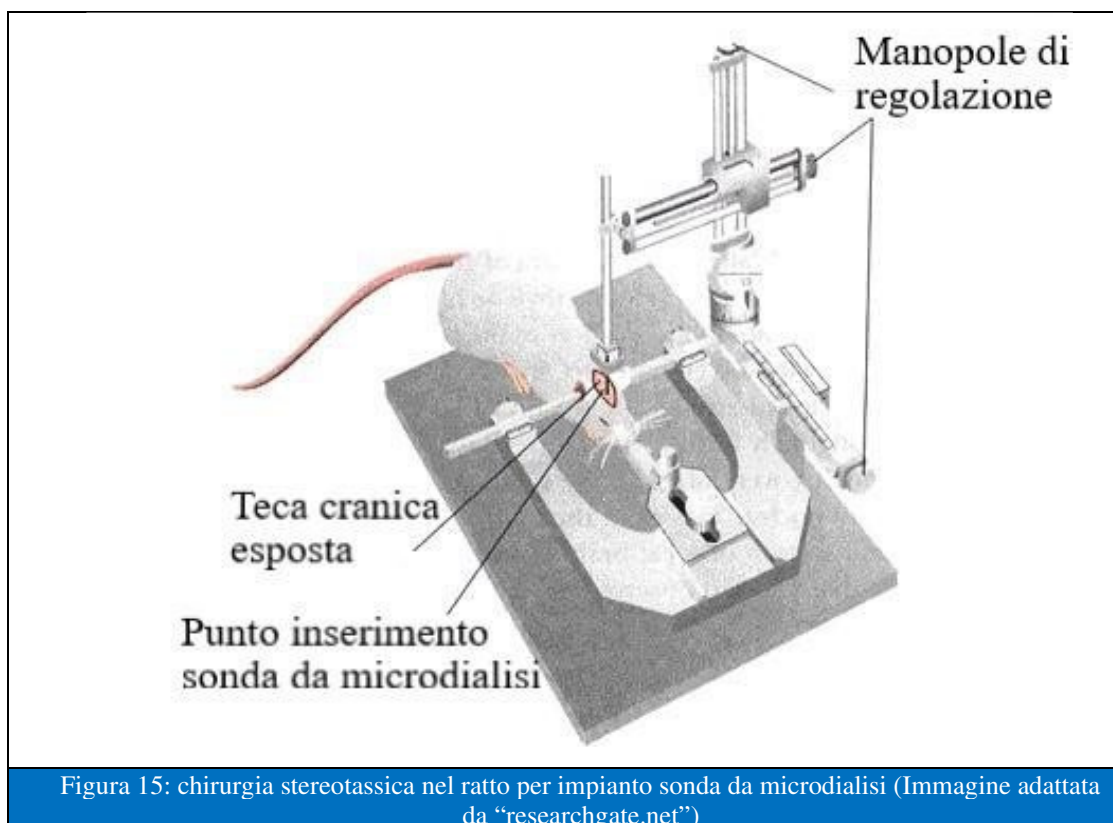
Figura 13: rappresentazione della sonda da microdialisi (Immagine adattata da "researchgate.net")

### 3.5 Chirurgia

Prima di procedere all'impianto del catetere orale e della sonda per la microdialisi, i ratti sono stati anestetizzati con isofluorano al 3% (Merial, Milano, Italia); una volta raggiunto un profondo stato di sedazione, agli animali è stato prima di tutto impiantato il catetere, inserito a livello del primo molare dell'arcata dentale superiore, col passaggio dell'ago 22G nello spazio tra il muscolo temporale e il cranio e fissato alla teca cranica con una piccola punta di plastica riempita di colla cianoacrilica (Figura 14). Durante l'esperimento il catetere orale è stato collegato a una pompa per infusione della soluzione di cioccolato (pompata a una velocità costante di 0,2 ml min<sup>-1</sup>, per un totale di 1 ml in 5 min) (Bimpisidis et al., 2013; De Luca et al., 2011).

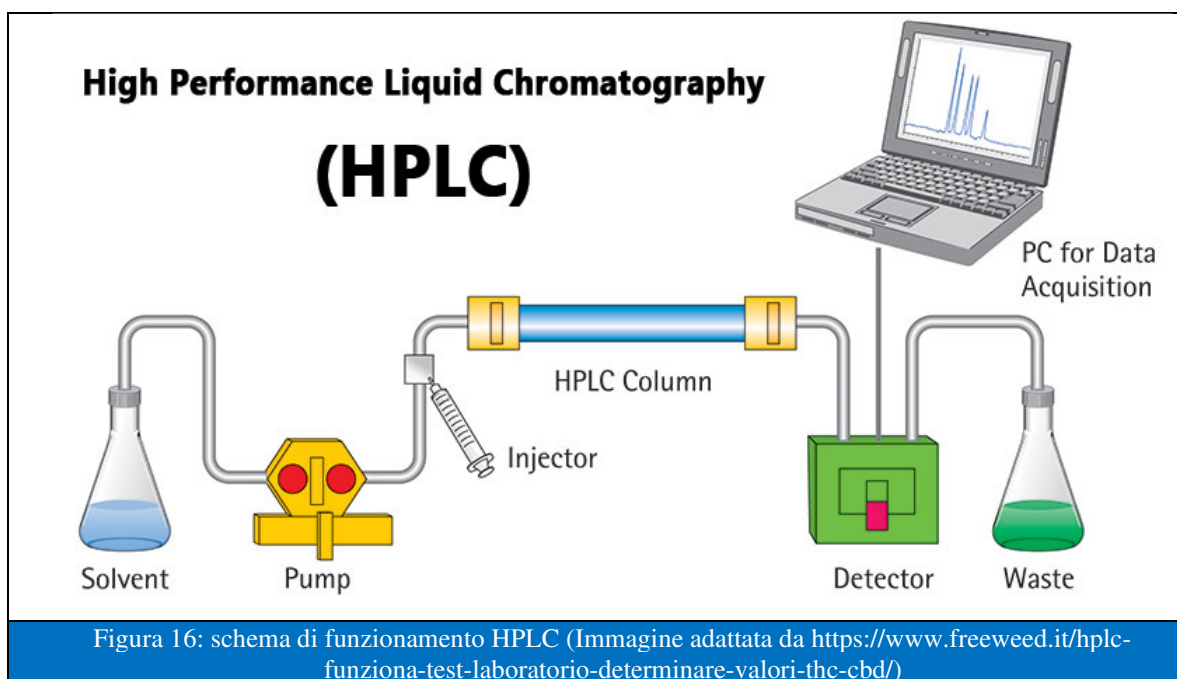


Successivamente, gli animali sono stati posizionati sullo stereotassico (Figura 15) e dopo aver esposto la teca cranica, con l'ausilio di un trapano, è stato fatto un piccolo foro sulla teca seguendo l'Atlante del cervello di ratto Paxinos & Watson (2007) per l'inserimento della fibra della sonda da microdialisi a livello della Corteccia Prefrontale Mediale (mPFC) usando le seguenti coordinate: Anteriore-posteriore +3.7 mm, Laterale +0.8 mm dal bregma, Ventrale -5.0 mm dalla dura madre; Una volta inserita la fibra nell'area cerebrale di interesse, la sonda è stata fissata alla teca cranica tramite cemento dentale vetro-ionomerico (CX-Plus, ShofuInc., Tokyo, Giappone). Alla fine dell'intervento gli animali sono stati sistemati in apposite gabbie semisferiche con acqua e cibo ad libitum per poter recuperare dall'intervento e dopo un giorno sono stati eseguiti gli esperimenti di microdialisi.



### 3.6 Microdialisi cerebrale nella corteccia prefrontale mediale (mPFC)

La microdialisi cerebrale è la tecnica che viene utilizzata per misurare la concentrazione della dopamina (DA) extracellulare nel dializzato ottenuta nel nostro esperimento dalla corteccia prefrontale mediale (mPFC) in diverse condizioni sperimentali, e dopo esposizione alla soluzione di cioccolato. Questa tecnica viene effettuata su animali liberi di potersi muovere e quindi consente di poter osservare modificazioni comportamentali parallelamente alle variazioni biochimiche che si verificano a livello neuronale. La tecnica prevede l'impianto della sonda, con una sottile fibra da dialisi (con diametro esterno 310  $\mu\text{m}$ , diametro interno 220  $\mu\text{m}$ ), in aree cerebrali specifiche. I neurotrasmettitori vengono recuperati mediante il passaggio attraverso la membrana dializzante della sonda secondo gradiente di concentrazione: tutti i composti a basso peso molecolare contenuti nel liquido extracellulare (LEC) diffondono all'interno della sonda da microdialisi per poi essere recuperati e analizzati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC - high performance liquid chromatography) associata ad un rivelatore elettrochimico (Figura 16).



### 3.7 Registrazione delle reazioni comportamentali

Nei 2 gruppi sperimentali (JWH-018 e Veicolo), durante l'esposizione alla soluzione di cioccolato e parallelamente alla microdialisi cerebrale, sono state poi valutate le reazioni gustative, secondo il paradigma di reattività al gusto descritto per la prima volta da Grill e Norgren (Grill & Norgren, 1978) e riutilizzato successivamente da Berridge (Berridge, 2000; Berridge & Robinson, 1998).

Il catetere orale per la somministrazione del cioccolato è stato collegato ad una pompa di infusione programmata per somministrare, a velocità costante, 0.2 ml/min di soluzione per un totale di 1 ml in 5 minuti (la durata totale della somministrazione e della registrazione delle reazioni comportamentali) (Bimpisidis et al., 2013b; De Luca et al., 2011).

Sono state prese in considerazione due classi di modelli di reattività al gusto (Figura 17), come già precedentemente descritto in alcuni studi (Bassareo et al., 2002; De Luca et al., 2012; Pintori et al., 2021):

- comportamento gustativo edonico (positivo, appetitive) che comprende: protrusione ritmica della lingua (rhythmic tongue protrusion), protrusione laterale della lingua (lateral tongue protrusion) e leccarsi le zampe (paw licks);
- comportamento gustativo avversivo (negativo, aversive) che comprende: sfregamento del mento sulle pareti della semisfera (chin rubs), scuotimento delle zampe anteriori (forelimb flails), sbadigli (gapes), pulizia del muso (face washing), movimento (locomotion) e allungamento delle zampe come per allontanare qualcosa (paw tread).

A ogni reazione è stato assegnato un punteggio di un punto se è durata 1-5s e due punti se la durata era superiore ai 5s.

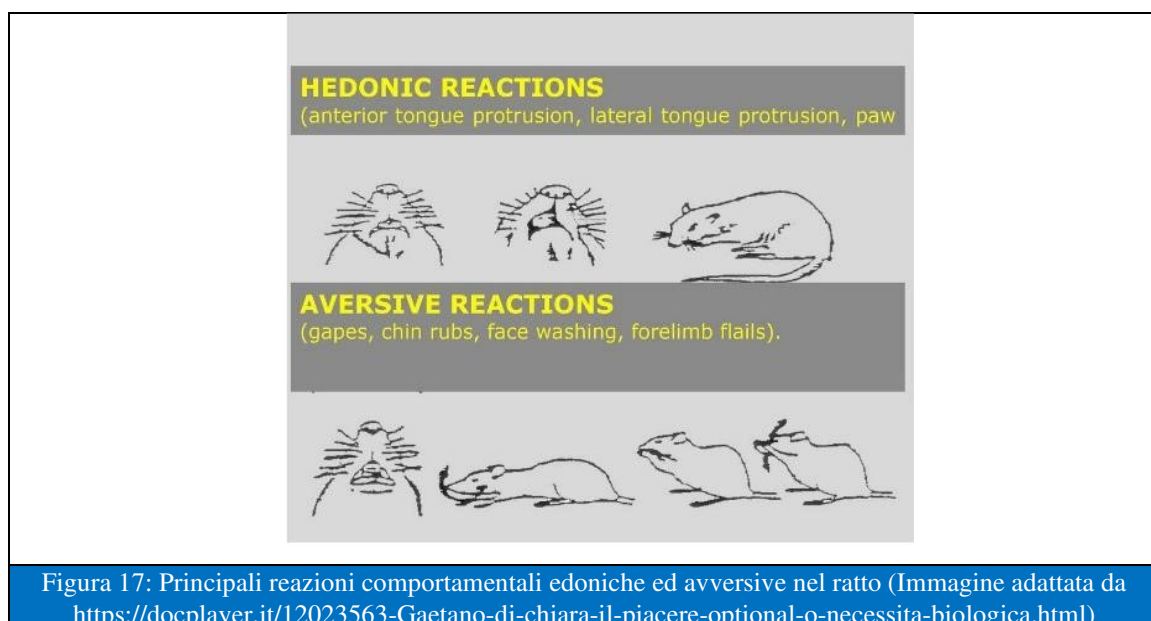


Figura 17: Principali reazioni comportamentali edoniche ed avversive nel ratto (Immagine adattata da <https://docplayer.it/12023563-Gaetano-di-chiara-il-piacere-optional-o-necessita-biologica.html>)

### 3.8 Procedura analitico-sperimentale

Gli animali sono stati innanzitutto assegnati in maniera randomizzata ai diversi gruppi sperimentali (gruppo JWH-018 e veicolo) per la valutazione neurochimica e comportamentale. Ciascun animale (Tabella 4) ha ricevuto giornalmente una dose di JWH-018 (0.25 mg/kg) o di veicolo (Veh) tramite somministrazione intraperitoneale (i.p.) per 14 giorni consecutivi. Dopo 7 giorni dalla fine del trattamento farmacologico (JWH-018, veicolo), i ratti sono stati sottoposti a microdialisi cerebrale per valutare i livelli extracellulari di DA nella mPFC in risposta a ripetute esposizioni ad uno stimolo appetitivo gustativo (soluzione di cioccolato). Parallelamente alla valutazione neurochimica della DA, durante l'esposizione allo stimolo appetitivo, è stato anche eseguito il "Test di reattività al gusto", al fine di valutare le reazioni edoniche e aversive nei diversi gruppi sperimentali.

Dal giorno 1 al giorno 14 (14 giorni)	Somministrazione giornaliera JWH-018 (0.25 mg/kg) o di veicolo (Veh) tramite somministrazione intraperitoneale (i.p.)
Dal giorno 15 al giorno 21 (7 giorni)	Interruzione del trattamento
Dal giorno 22	1) Microdialisi cerebrale: - Determinazione livelli DA basale; - Determinazione risposta DAergica in seguito a 1° e 2° esposizione a stimolo gustativo; 2) Test di reattività al gusto

Tabella 4: Linea temporale dell'esperimento



### **3.9 Determinazione quantitativa della dopamina (DA)**

Il giorno successivo all'intervento, le sonde dialitiche sono state perfuse con la soluzione di Ringer (composta come segue: 147mM NaCl, 4mM KCl, 2.2mM CaCl<sub>2</sub>) a velocità costante di 1μL/min. Il volume dei campioni di dializzato, di 10μL, è stato poi iniettato in un HPLC (cromatografia liquida ad alte prestazioni) munito di una colonna cromatografica a fase inversa (C8 3.5 μm, Waters, Mildford, MA, USA) e accoppiato ad un rivelatore elettrochimico coulometrico (ESA, Coluchem II, Bedford MA, USA) per la determinazione quantitativa della DA, come descritto in studi precedenti (De Luca et al., 2015). Il primo elettrodo del rivelatore è stato impostato a +130 mV (ossidazione) e il secondo a -175 mV (riduzione). La fase mobile (FM) era rappresentata da una soluzione tampone a pH=5.5 contenente: 50 Mm di NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 Mm di Na<sub>2</sub>-EDTA, 0.5 mM di n-ottil solfato di sodio e 15% (v/v) metanolo (MetOH). A queste condizioni la sensibilità del metodo usato per la determinazione della DA era di 5 femtomoli (10-15 mol) per campione di dializzato.

### **3.10 Analisi istologica**

Una volta terminato l'esperimento, i ratti sono stati completamente anestetizzati con Equithesin e poi sottoposti alla perfusione transcardica di una soluzione tampone fosfato 0.1 M a pH 7.4 contenente 4% di paraformaldeide e 0.1% di glutaraldeide (fissativi usati in istologia). Successivamente sono stati sacrificati e infine si è proceduto all'estrazione dei cervelli, conservati in formalina all'8%.

Per identificare la localizzazione corretta dei probes nelle aree cerebrali d'interesse (mPFC), i cervelli sono stati crioprotetti in saccarosio al 30% in PBS (tampone fosfato salino) per 48 ore. L'analisi è stata eseguita utilizzando sezioni coronali da 40 µm ottenute grazie all'uso di un criostato seguendo le coordinate d'interesse in base all'Atlante del Cervello del Ratto di Paxinos & Watson del 2007. Le sezioni d'interesse per mPFC erano comprese tra AP +3,70/+2,70 (Figura 18).

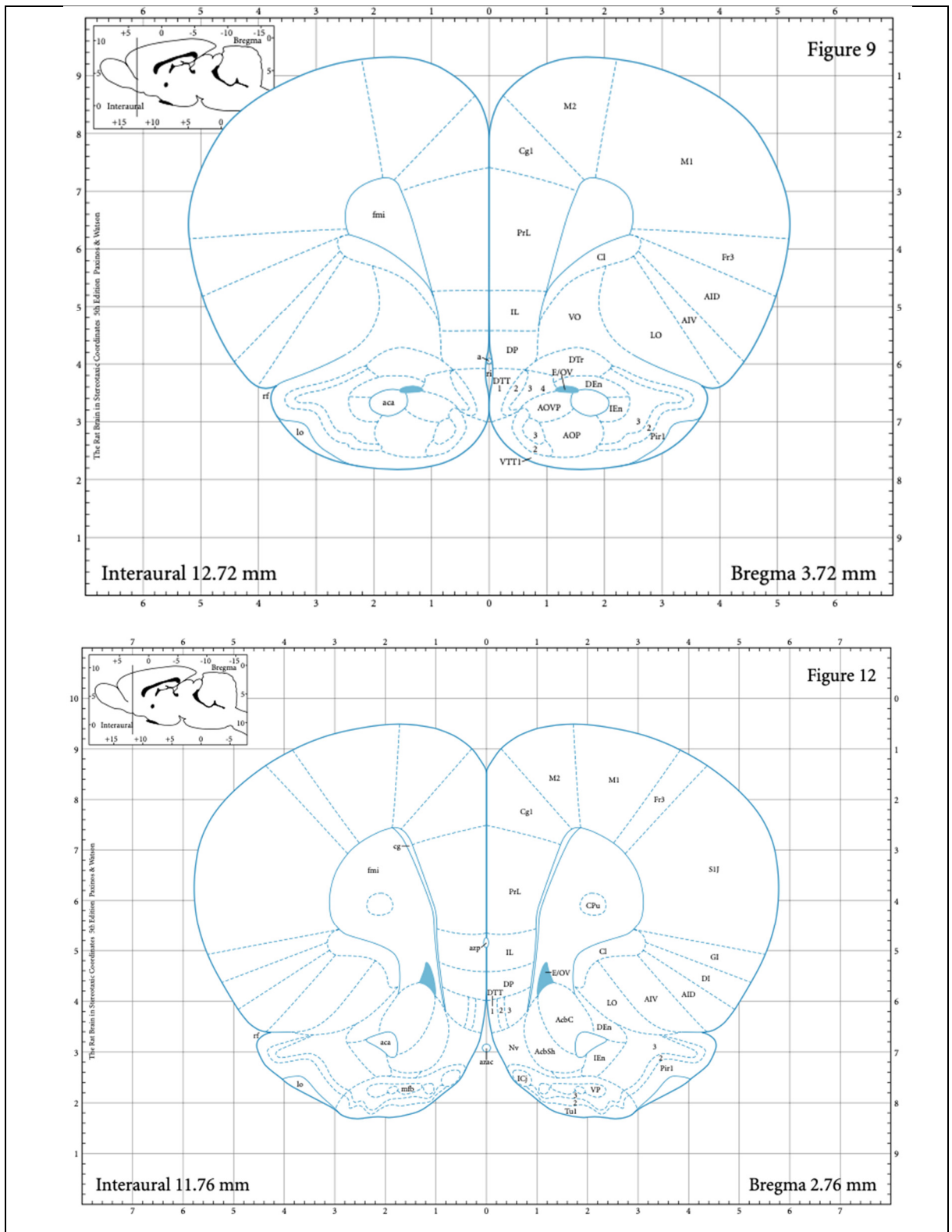


Figura 18: Rappresentazione schematica della sezione cerebrale in riferimento alle aree mPFC, in accordo con le coordinate dell'Atlante del Cervello di Ratto di Paxinos & Watson, 2007.

### 3.11 Analisi statistiche

I test per valutare la distribuzione normale dei dati sono stati eseguiti tramite il test di Shapiro-Wilk. Per quanto riguarda i livelli basali di DA e le reazioni gustative, quando i dati sono risultati distribuiti normalmente, l'effetto trattamento è stato analizzato tramite il test di t di Student; viceversa è stato utilizzato il test di Mann-Whitney.

La valutazione degli effetti sulla trasmissione DAergica alla ripetuta somministrazione della soluzione di cioccolato è stata eseguita sfruttando il test analitico ANOVA (analisi della varianza) a due vie (consente di mettere in relazione due fattori, il trattamento e il tempo) per misure ripetute (RM), seguito dal test di confronto multiplo di Bonferroni.

Quando i dati non avevano una distribuzione normale, per valutare l'andamento della risposta DAergica nel tempo, è stato utilizzato il test di Friedman seguito dal test di confronto multiplo di Dunn.

In questo studio, i valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati significativi. I dati numerici sono forniti come media  $\pm$  SEM per l'analisi parametrica o come mediana con 95% CI per l'analisi non parametrica. Per l'analisi statistica è stato utilizzato Statistica (StatSoft, Tulsa, OK, USA) o GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism).

## 4. RISULTATI

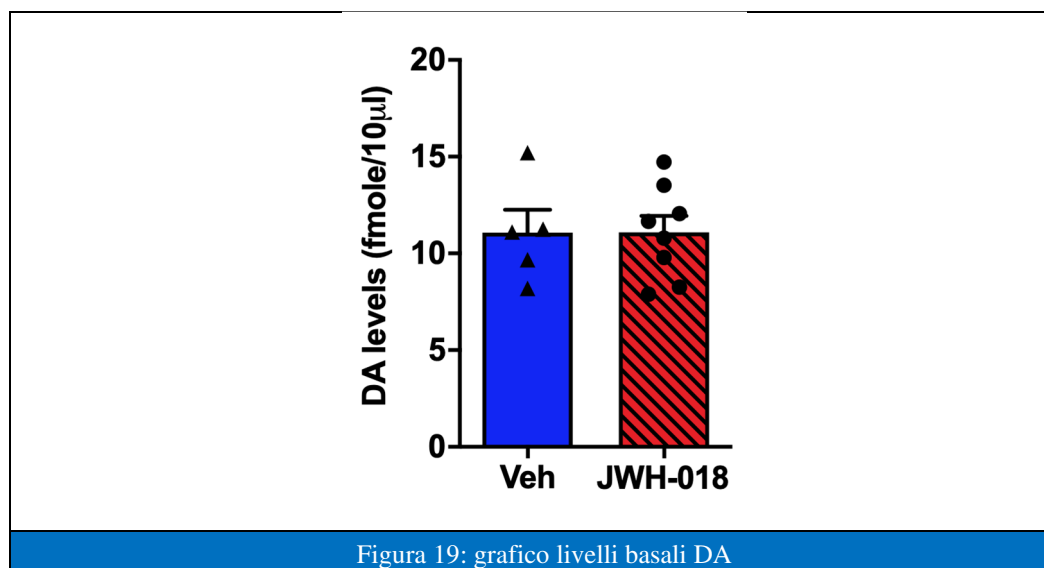
### 4.1 Effetto del trattamento con JWH-018 sui livelli extracellulari di dopamina nella mPFC: valutazione dopo 7 giorni di astinenza.

Prima dell'esposizione allo stimolo gustativo (soluzione di cioccolato) sono stati determinati i livelli basali di DA della corteccia prefrontale mediale (mPFC) a 7 giorni dall'interruzione dei trattamenti con JWH-018 (0.25 mg/kg) e con il veicolo (Veh). Sono stati considerati come livelli basali di DA i tre campioni consecutivi di dializzato con una differenza dei livelli di DA  $\leq$  al 10%.

Il grafico mostra la media  $\pm$  SEM dei livelli di DA basali, riferiti alle aree cerebrali d'interesse, espressi in fmoli/10 $\mu$ l. I valori di DA ottenuti dopo 7 giorni dall'interruzione del trattamento sono:

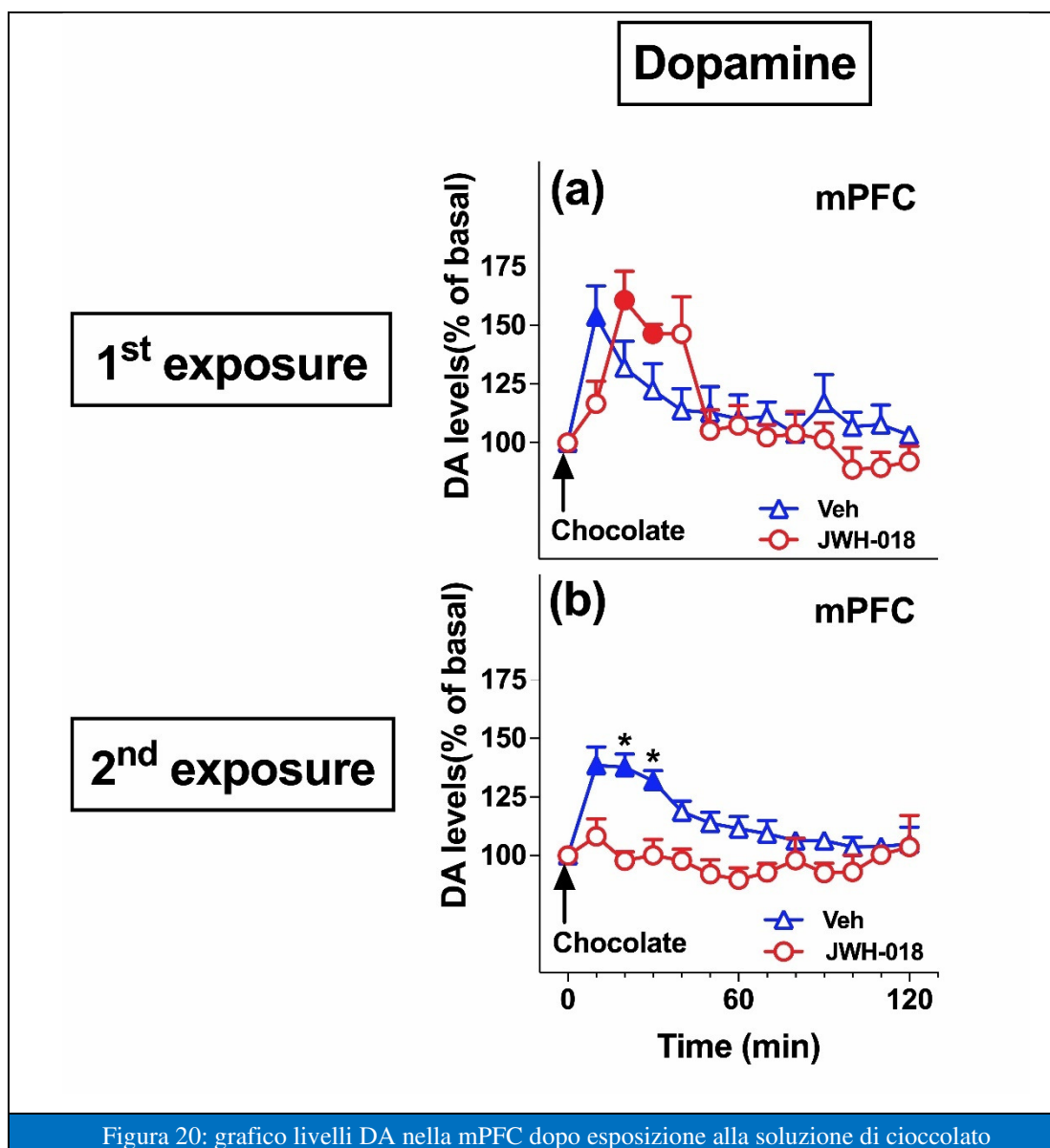
- per il gruppo trattato con Veh (blu),  $11 \pm 1$ ;
- per il gruppo trattato con JWH-018 (rosso),  $11 \pm 1$ ;

Non sono state quindi osservate differenze significative nei livelli di DA basale tra i 2 gruppi (Figura 19).



#### 4.2 Effetto della somministrazione orale di cioccolato sui livelli extracellulari di dopamina nella mPFC: valutazione dopo la prima e dopo la seconda esposizione al cioccolato.

Durante quest'esperimento è stata valutata, a 7 giorni dall'interruzione del trattamento con JWH-018, la reattività DAergica a livello della corteccia prefrontale mediale (mPFC) in seguito all'esposizione ripetuta allo stimolo gustativo (soluzione di cioccolato). L'obiettivo è quello di valutare e capire se l'esposizione al JWH-018 fosse in grado di causare una perdita di controllo del valore motivazionale degli stimoli gustativi gratificanti, nel caso specifico un'alterazione della risposta DAergica nella mPFC, e di conseguenza la perdita del controllo inibitorio nella valutazione degli stimoli gratificanti.



I risultati (Figura 20) evidenziano che dopo la prima esposizione (1st exposure) al cioccolato si osserva un aumento della DA dializzata nella mPFC sia nel gruppo trattato ripetutamente con JWH-018 sia nel gruppo di controllo (Veicolo); mentre dopo la seconda esposizione (2nd exposure) al cioccolato si osserva un aumento del rilascio di DA nella mPFC del gruppo di controllo, ma non nel gruppo trattato ripetutamente con il JWH-018.

L'analisi ANOVA a due vie della DA dializzata nel mPFC dopo la prima esposizione al cioccolato ha mostrato un effetto significativo del fattore tempo ( $F_{(12,120)}=10.43$ ,  $P<0.05$ ) e dell'interazione tempo x trattamento ( $F_{(12,120)}=3.81$ ,  $P<0.05$ ). In particolare, il test post hoc di Bonferroni ha rivelato dopo la prima esposizione al cioccolato un aumento della DA dializzata nella mPFC del gruppo trattato con JWH-018 rispetto ai valori basali (30').

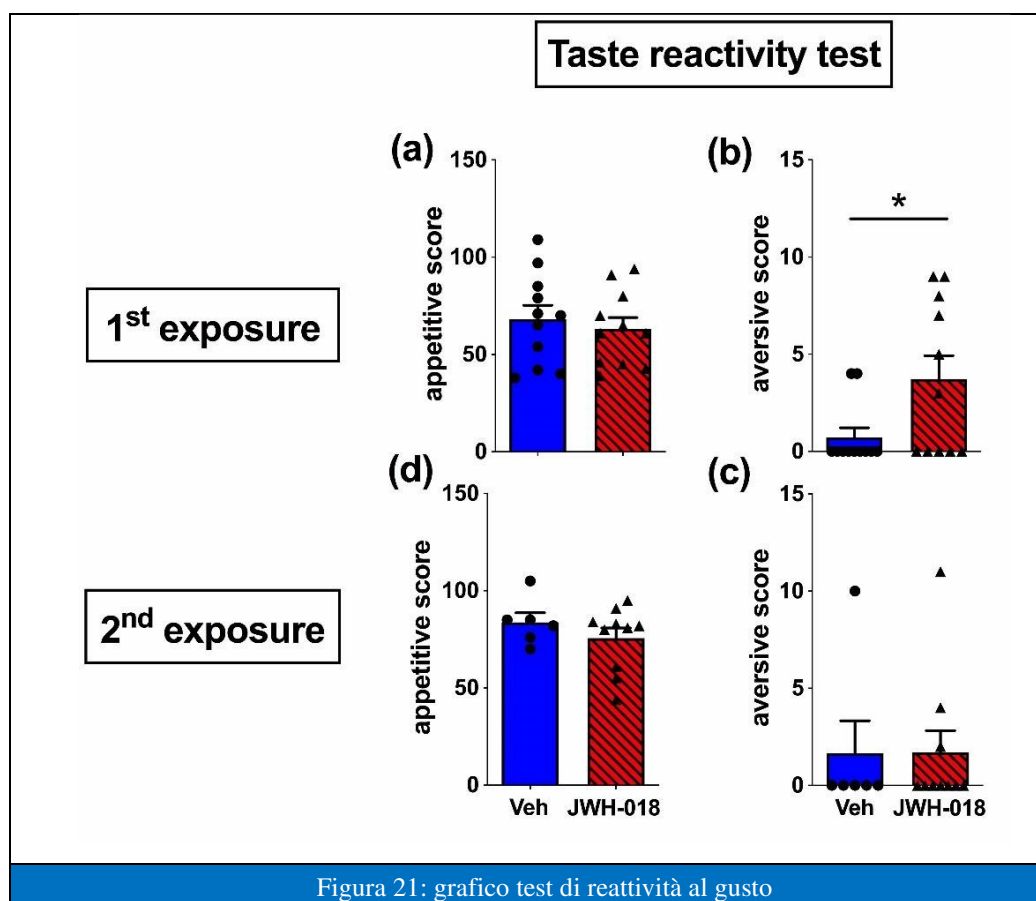
L'analisi ANOVA a due vie della DA dializzata nella mPFC dopo la seconda esposizione al cioccolato ha mostrato un effetto significativo del tempo ( $F_{(12,120)}=4.51$ ,  $P<0.05$ ), del trattamento ( $F_{(1,10)}=21.60$ ,  $P<0.05$ ) e dell'interazione tempo x trattamento ( $F_{(12,120)}=2.64$ ,  $P<0.05$ ). I test post hoc di Bonferroni hanno rivelato dopo la seconda esposizione al cioccolato un aumento della DA dializzata nella mPFC del gruppo trattato con il veicolo (Veh) rispetto ai valori basali e al gruppo trattato con JWH-018 (20'-30').

L'analisi dei dati con il test di Friedman, usato per valutare in maniera più precisa il decorso temporale della risposta DAergica in ciascun gruppo, ha portato alla luce delle differenze significative, nel gruppo di controllo (Veh) dopo la prima esposizione al cioccolato ( $FR=23.95$ ,  $df\ 13,6$ ,  $P<0.05$ ) e la seconda esposizione al cioccolato ( $FR=41.97$ ,  $df\ 13, 6$ ,  $P<0.05$ ), e nel gruppo trattato con JWH-018 dopo la prima esposizione al cioccolato ( $FR=47.13$ ,  $df\ 13,6$ ,  $P<0.05$ ).

Il test di Dunn ha rivelato un aumento della DA dializzata rispetto ai valori basali nella mPFC sia nel gruppo trattato con il veicolo (10', 1° esposizione al cioccolato; 10'-30', 2° esposizione al cioccolato) che nel gruppo trattato con JWH-018 (20'-30', 2a esposizione al cioccolato).

#### 4.3 Effetto della somministrazione orale di cioccolato sulle reazioni gustative: valutazione tramite Taste reactivity test dopo la prima e dopo la seconda esposizione al cioccolato.

Durante la microdialisi sono state osservate e valutate le varie reazioni gustative degli animali in seguito alla doppia somministrazione di cioccolato.



Il test di Mann-Whitney ha mostrato un aumento significativo del punteggio relativo alle reazioni gustative aversive alla prima esposizione al cioccolato nel gruppo trattato con JWH-018 rispetto al gruppo di controllo ( $U = 34,50$   $P < 0,05$ ; Figura 21, pannello b). Non sono state osservate invece delle differenze significative sia nelle reazioni aversive tra i due gruppi (JWH-018 e Veh) durante la seconda esposizione al cioccolato (pannello c), sia nelle reazioni gustative positive (appetitive) durante entrambe le esposizioni al cioccolato (pannelli a e d).



## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Durante questa tesi sperimentale sono stati valutati i livelli extracellulari di DA nella mPFC di ratti maschi Sprague-Dawley dopo 7 giorni dall'interruzione del trattamento con JWH-018 (0.25 mg/kg ip per 14 giorni consecutivi) e la risposta della trasmissione DAergica nella stessa area in seguito all'esposizione ripetuta ad una soluzione di cioccolato (Nesquik Squeeze©, Nestlè, Svizzera). Questo stimolo gustativo ci ha permesso di studiare la relazione tra il sistema DAergico, stimolato dalla presentazione del cioccolato, e quello cannabinoide, modificato dal trattamento ripetuto con JWH-018, e il loro ruolo nel processo di gratificazione legata al consumo di cibi gradevoli e gratificanti. Inoltre, durante l'esposizione alla soluzione di cioccolato, sono state valutate le reazioni gustative edoniche e avversive. Questo esperimento rientra nell'ambito di uno studio più ampio che ha coinvolto la valutazione della risposta DAergica anche a livello di aree sottocorticali quali la shell e il core del NAc (Pintori et al., 2021).

I livelli extracellulari basali di DA nella mPFC, prima dell'esposizione al cioccolato, misurati nel gruppo di animali trattati ripetutamente con JWH-018 e nel gruppo di controllo, non hanno mostrato differenze significative. Lo studio ha invece evidenziato una diversa risposta della trasmissione DAergica dopo le diverse esposizioni alla soluzione di cioccolato. Infatti, dopo la prima esposizione (1<sup>st</sup> exposure) al cioccolato si osserva un aumento della DA nella mPFC sia nel gruppo trattato ripetutamente con JWH-018 che nel gruppo di controllo, mentre dopo la seconda esposizione (2<sup>nd</sup> exposure) al cioccolato si osserva un aumento del rilascio di DA nella mPFC del gruppo di controllo, ma non nel gruppo trattato ripetutamente con il JWH-018. È molto importante sottolineare che, contemporaneamente a questa inaspettata *habituation* della risposta DAergica nella mPFC, negli stessi animali trattati ripetutamente con il JWH-018 si osserva una perdita di *habituation* della risposta DAergica nella shell del NAc, confermando il rapporto reciproco tra la trasmissione DA corticale e quella sottocorticale (Pintori et al., 2021).

Il controllo top-down della mPFC sulle aree sottocorticali DAergiche è stato osservato anche da Bimpisidis e colleghi (2013) che, utilizzando lo stesso paradigma comportamentale, hanno dimostrato che le lesioni dei terminali DAergici della mPFC abolivano l'*habituation* della risposta DAergica nella shell del NAc dopo esposizione ripetuta al cioccolato (Bimpisidis et al., 2013). I nostri risultati confermano l'importanza della DA a livello della mPFC nel controllo del valore motivazionale degli stimoli gratificanti naturali (De Luca, 2014) e, in accordo con la

letteratura (De Luca et al., 2011; De Luca, 2014), suggeriscono che i cannabinoidi sintetici, come il JWH-018, inducono dei cambiamenti della risposta DAergica mesolimbica e mesocorticale a stimoli gratificanti che probabilmente dipendono dalla disregolazione della valutazione motivazionale degli stimoli gratificanti (De Luca et al., 2011).

Numerose evidenze confermano l'importante correlazione tra il sistema DAergico e quello cannabinoide nei processi di ricompensa e nella valutazione motivazionale degli stimoli gratificanti che siano essi naturali, come il cibo, o farmacologici. Studi precedenti dei nostri laboratori hanno evidenziato che la somministrazione di  $\Delta^9$ -THC determina, tramite l'attivazione dei recettori CBR1, un aumento notevole delle reazioni edoniche ad una soluzione dolce (saccarosio al 20%) e consente al saccarosio stesso, normalmente privo di queste proprietà, di aumentare i livelli di DA nella NAc shell ma non nel core (De Luca et al., 2012). Questo effetto però, a differenza di quanto osservato negli animali trattati con JWH-018, mostra le stesse proprietà adattative di un alimento altamente appetibile, andando incontro ad *habituation* della risposta DAergica nella shell del NAc dopo la prima esposizione (Bassareo et al., 2002). Inoltre, nei nostri animali trattati con JWH-018, è stato osservato un aumento solo delle reazioni avversive, e non edoniche, alla prima esposizione allo stimolo gustativo.

È molto importante sottolineare che in questi processi (risposta DAergica e reattività comportamentale al gusto) potrebbe giocare un ruolo importante lo stato avversivo o disforico in cui si trova l'animale, in quanto le valutazioni mostrate in questo studio sono state effettuate dopo un periodo di astinenza dal JWH-018 di 7 giorni. In accordo con questa ipotesi, allo stesso time point (7 gg dopo l'ultima somministrazione), negli animali trattati ripetutamente con il JWH-018 si è osservato un aumentato stato d'ansia e un aumento di comportamenti ossessivo-compulsivi (Pintori et al., 2021). È importante inoltre sottolineare che nello studio di De Luca et al., (2012) è stata studiata una relazione diretta tra stimolazione del sistema cannabinoide e incremento delle proprietà motivazionali del cibo, in quanto la somministrazione di  $\Delta^9$ -THC precedeva immediatamente (30 min prima) quella del cioccolato. Nel nostro studio invece abbiamo effettuato un trattamento ripetuto col cannabinoide sintetico JWH-018 ma la somministrazione dello stimolo gustativo edonico e saliente è avvenuta 7 giorni dopo l'ultima somministrazione di JWH-018. Appare quindi evidente che lo stato in cui si trovavano gli animali è opposto nei due esperimenti: edonico, nel caso della concomitante somministrazione acuta di un cannabinoide naturale ( $\Delta^9$ -THC); avversivo, nel caso della sospensione del trattamento con un cannabinoide sintetico (JWH-018).

In conclusione, il nostro studio ha dimostrato che l'esposizione ripetuta al JWH-018 induce una profonda disregolazione del sistema DAergico, poiché abbiamo osservato cambiamenti nella risposta alla trasmissione di DA mesolimbica ad uno stimolo gustativo.

Inoltre, i nostri dati confermano il ruolo cruciale della via DAergica mesocorticale e mesolimbica nella valutazione del valore motivazionale degli stimoli gratificanti e il ruolo inibitorio fondamentale della mPFC sulle aree DAergiche sottocorticali (NAc) coinvolte in questi processi.

In questo contesto, la disregolazione DAergica mesocorticale e mesolimbica indotta dal JWH-018 potrebbe dipendere da una disregolazione del sistema endocannabinoide, che porta ad una perdita di controllo della valutazione motivazionale degli stimoli gratificanti naturali.

Negli ultimi anni molti studi hanno inoltre dimostrato che sia gli endocannabinoidi (AEA e 2AG) che i cannabinoidi esogeni naturali ( $\Delta^9$ -THC) o sintetici (SC), agendo sui CBR1 a livello ipotalamico sono in grado di stimolare l'appetito, soprattutto nei confronti di cibi particolarmente ricchi di lipidi e carboidrati. Considerando quindi il coinvolgimento del sistema cannabinoide nell'alimentazione, queste caratteristiche vengono usate per il trattamento di condizioni cliniche particolari, quali l'anoressia e la cachessia, molto diffuse in pazienti affetti da neoplasie maligne o AIDS (Cota et al., 2003; Devane et al., 1992; Kirkham, 2003; Matias & Di Marzo, 2007a; Pagotto et al., 2006) e per il trattamento di nausea e vomito associati alla chemioterapia (FraguasSánchez & Torres-Suárez, 2018). Ad esempio, uno studio del 2017 ha evidenziato che l'utilizzo di agonisti naturali o sintetici dei CBR1 porta a una riduzione della perdita di peso corporeo in ratti con anoressia nervosa (Scherma et al., 2017). A conferma di ciò, l'inibizione dei recettori CBR1 potrebbe rappresentare un approccio importante per ridurre l'assunzione di cibo in altre condizioni cliniche particolari come l'obesità (Després, 2007).

Per questo motivo, si ipotizza che tale stato possa favorire una disregolazione del sistema DAergico e di quello endocannabinoide; e questo è evidente anche nell'origine di alcuni disturbi alimentari come l'obesità in quanto alcuni studi hanno mostrato in questi casi una possibile compromissione del sistema endocannabinoide (Scherma et al., 2014) e delle vie DAergiche che regolano i sistemi neuronal associati alla sensibilità, al condizionamento e al controllo della ricompensa (Volkow et al., 2011).

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Arnone, M., Maruani, J., Chaperon, F., Thiébot, M. H., Poncelet, M., Soubrié, P., & Le Fur, G. (1997). Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, 132(1), 104–106. <https://doi.org/10.1007/s002130050326>
- Atwood, B. K., Lee, D., Straiker, A., Widlanski, T. S., and Mackie, K. (2011). CP47,497-C8 and JWH073, commonly found in “spice” herbal blends, are potent and efficacious CB(1) cannabinoid receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.* 659,139-145.
- Auwärter, V., Dresen, S., Weinmann, W., Müller, M., Pütz, M., & Ferreirós, N. (2009). «Spice» and other herbal blends: Harmless incense or cannabinoid designer drugs? *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 44(5), 832–837. <https://doi.org/10.1002/jms.1558>
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaña, J. A. (2000). Dopamine: Synthesis, release and receptors in the central nervous system. *Revista Biomédica*, 11(1), 39–60.
- Bassareo, V. & Di Chiara, G. (1997) Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci*, 17, 851-861.
- Bassareo, V. & Di Chiara, G. (1999) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience*, 89, 637-641.
- Bassareo, V., De Luca, M. A., & Di Chiara, G. (2002). Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(11), 4709–4719. <https://doi.org/20026445>
- Bassareo, V., De Luca, M.A. & Di Chiara, G. (2007) Differential impact of pavlovian drug conditioned stimuli on in vivo dopamine transmission in the rat accumbens shell and core and in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 689-703.
- Bassareo, V., Tanda, G., Petromilli, P., Giua, C. & Di Chiara, G. (1996) Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 124, 293-299.
- Bernardi, G., Cherubini, E., Marciani, M.G., Mercuri, N. & Stanzione, P. (1982) Responses of intracellularly recorded cortical neurons to the iontophoretic application of dopamine. *Brain research*, 245, 267-274.

- Berridge, K. C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(2), 173–198. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(99\)00072-x](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(99)00072-x)
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research. Brain Research Reviews*, 28(3), 309–369. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00019-8)
- Bimpisidis, Z., De Luca, M. A., Pisanu, A., & Di Chiara, G. (2013b). Lesion of medial prefrontal dopamine terminals abolishes habituation of accumbens shell dopamine responsiveness to taste stimuli. *The European Journal of Neuroscience*, 37(4), 613–622. <https://doi.org/10.1111/ejn.12068>
- Bimpisidis, Z., De Luca, M.A., Pisanu, A. & Di Chiara, G. (2013) Lesion of medial prefrontal dopamine terminals abolishes habituation of accumbens shell dopamine responsiveness to taste stimuli. *Eur J Neurosci*, 37, 613-622.
- Bjorklund, A., Divac, I. & Lindvall, O. (1978) Regional distribution of catecholamines in monkey cerebral cortex, evidence for a dopaminergic innervation of the primate prefrontal cortex. *Neuroscience letters*, 7, 115-119.
- Boisselier, R. L., Alexandre, J., Lelong-Boulouard, V., & Debruyne, D. (2017). Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 101(2), 220–229. <https://doi.org/10.1002/cpt.563>
- Bolla, K.I., Eldreth, D.A., London, E.D., Kiehl, K.A., Mouratidis, M., Contoreggi, C., Matochik, J.A., Kurian, V., Cadet, J.L., Kimes, A.S., Funderburk, F.R. & Ernst, M. (2003) Orbitofrontal cortex dysfunction in abstinent cocaine abusers performing a decision-making task. *NeuroImage*, 19, 1085-1094.
- Braver, T.S., Barch, D.M. & Cohen, J.D. (1999) Cognition and control in schizophrenia: a computational model of dopamine and prefrontal function. *Biol Psychiatry*, 46, 312-328.
- Brents LK, Reichard EE, Zimmerman SM, Moran JH, Fantegrossi WE, Prather PL. (2011) Phase I hydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-018 retain in vitro and in vivo cannabinoid 1 receptor affinity and activity. *PLoS One*. 6: e21917. Seely et al., 2012
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., & Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(12), 3934– 3942.
- Carlsson, A., Falck, B., & Hillarp, N. A. (1962). Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 56(196), 1–28.

- Carroll, F. I., Lewin, A. H., Mascarella, S. W., Seltzman, H. H., & Reddy, P. A. (2012). Designer drugs: A medicinal chemistry perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1248, 18–38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06199.x>
- Castaneto, M. S., Gorelick, D. A., Desrosiers, N. A., Hartman, R. L., Pirard, S., & Huestis, M. A. (2014). Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence*, 144, 12–41. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005>
- Castano P, Donato RF. (2001). *Anatomia dell'uomo*. Edi Ermes, Milano, 361-362
- Chin CN, Murphy JW, Huffman JW, Kendall DA. The third transmembrane helix of the cannabinoid receptor plays a role in the selectivity of aminoalkylindoles for CB2, peripheral cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Nov;291(2):837-44.
- Christie, M.J., Bridge, S., James, L.B. & Beart, P.M. (1985a) Excitotoxin lesions suggest an aspartatergic projection from rat medial prefrontal cortex to ventral tegmental area. *Brain research*, 333, 169172.
- Cohen, J.D. & Servan-Schreiber, D. (1992) Context, cortex, and dopamine: a connectionist approach to behavior and biology in schizophrenia. *Psychological review*, 99, 45-77.
- Colombo, G., Agabio, R., Diaz, G., Lobina, C., Reali, R., & Gessa, G. L. (1998). Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sciences*, 63(8), PL113-117. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00322-1](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00322-1)
- Conde, F., Audinat, E., Maire-Lepoivre, E. & Crepel, F. (1990) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents. *Brain research bulletin*, 24, 341-354.
- Conde, F., Maire-Lepoivre, E., Audinat, E. & Crepel, F. (1995) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *The Journal of comparative neurology*, 352, 567-593.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortmann, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A. C. E., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G. K., & Pagotto, U. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 423–431. <https://doi.org/10.1172/JCI17725>
- Curtis, C.E. & D'Esposito, M. (2003) Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. *Trends in cognitive sciences*, 7, 415-423.
- Dahlstroem, A., & Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. demonstration of monoamines in the cell bodies

of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, SUPPL 232:1-55.

- De Luca M.A., Caboni P, Bimpisidis Z, Di Chiara G (2011) JWH-018: a cannabinoid compound of Spice drugs stimulates dopamine transmission in the nucleus accumbens shell. 8th IBRO Meeting, Florence, July 14-17, 2011.
- De Luca MA, Caboni P, Bimpisidis Z, Valentini V, Marti M, Di Chiara G (2012). Behavioral and neurochemical rewarding properties of a cannabinoid compound of Spice drugs: JWH-018. SFN Annual Meeting, New Orleans, October, 13-17, 2012.
- De Luca, M. A., & Fattore, L. (2018). Therapeutic Use of Synthetic Cannabinoids: Still an OpenIssue? *Clinical Therapeutics*, 40(9), 1457–1466.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.08.002>
- De Luca, M. A., Bimpisidis, Z., Bassareo, V., & Di Chiara, G. (2011). Influence of morphine sensitization on the responsiveness of mesolimbic and mesocortical dopamine transmission to appetitive and aversive gustatory stimuli. *Psychopharmacology*, 216(3), 345–353. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2220-9>
- De Luca, M. A., Bimpisidis, Z., Melis, M., Marti, M., Caboni, P., Valentini, V., Margiani, G., Pintori, N., Polis, I., Marsicano, G., Parsons, L. H., & Di Chiara, G. (2015). Stimulation of in vivo dopamine transmission and intravenous self-administration in rats and mice by JWH-018, a Spice cannabinoid. *Neuropharmacology*, 99, 705–714.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.08.041>
- De Luca, M. A., Solinas, M., Bimpisidis, Z., Goldberg, S. R., & Di Chiara, G. (2012). Cannabinoid facilitation of behavioral and biochemical hedonic taste responses. *Neuropharmacology*, 63(1), 161–168.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.018>
- De Luca, M.A. (2014) Habituation of the responsiveness of mesolimbic and mesocortical dopamine transmission to taste stimuli. *Frontiers in integrative neuroscience*, 8, 21.
- Deserno, L., Boehme, R., Heinz, A. & Schlagenhauf, F. (2013) Reinforcement learning and dopamine in schizophrenia: dimensions of symptoms or specific features of a disease group? *Front Psychiatry*, 4, 172.
- Després, J.-P. (2007). The endocannabinoid system: A new target for the regulation of energy balance and metabolism. *Critical Pathways in Cardiology*, 6(2), 46–50.  
<https://doi.org/10.1097/HPC.0b013e318057d4b4>
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5090), 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>

- Di Chiara, G. (1990). In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11(3), 116–121. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90197-G](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90197-G)
- Di Chiara, G. (1998) A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *Journal of psychopharmacology* (Oxford, England), 12, 54-67.
- Di Chiara, G. & Bassareo, V. (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current opinion in pharmacology*, 7, 69-76.
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14), 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M.A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V. & Lecca, D. (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 227-241.
- Dreyer, J.K., Herrik, K.F., Berg, R.W. & Hounsgaard, J.D. (2010) Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. *J Neurosci*, 30, 14273-14283.
- Elsworth, J.D. & Roth, R.H. (2009) Dopamine. In Squire, L.R. (ed) *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press, Oxford, pp. 539-547.
- Every-Palmer S. (2011) Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: an explorative study. *Drug Alcohol Depend.* 117: 152-157.
- Fenu, S., Bassareo, V. & Di Chiara, G. (2001) A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *J Neurosci*, 21, 6897-6904.
- Ferron, A., Thierry, A.M., Le Douarin, C. & Glowinski, J. (1984) Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic system on spontaneous activity or excitatory response induced from the thalamic mediodorsal nucleus in the rat medial prefrontal cortex. *Brain research*, 302, 257-265.
- Fibiger, H. C. (1993). Mesolimbic dopamine: An analysis of its role in motivated behavior. *Seminars in Neuroscience*, 5(5), 321–327. [https://doi.org/10.1016/S1044-5765\(05\)80039-9](https://doi.org/10.1016/S1044-5765(05)80039-9)
- Fisher, W.G. (2010). Inhaled Incense “K2” May Cause Heart Damage. Available at: <http://drwes.blogspot.com/2010/08/inhaled-incense-k2-may-cause-heart.html>
- Foot, S.L., Bloom, F.E. & Aston-Jones, G. (1983) Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiological reviews*, 63, 844-914.



- Fraguas-Sánchez, A. I., & Torres-Suárez, A. I. (2018). Medical Use of Cannabinoids. *Drugs*, 78(16), 1665–1703. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0996-1>
- Freedland, C. S., Poston, J. S., & Porrino, L. J. (2000). Effects of SR141716A, a central cannabinoid receptor antagonist, on food-maintained responding. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 67(2), 265–270. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(00\)00359-2](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(00)00359-2)
- Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European Journal of Biochemistry*, 232(1), 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x>
- Gardner, E. L. (2005). Endocannabinoid signaling system and brain reward: Emphasis on dopamine. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 81(2), 263–284. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.01.032>
- Garris, P.A., Collins, L.B., Jones, S.R. & Wightman, R.M. (1993) Evoked extracellular dopamine in vivo in the medial prefrontal cortex. *J Neurochem*, 61, 637-647.
- Gay, M. (2010). Synthetic Marijuana Spurs State Bans. In *The New York Times*, July 10. Available at: <http://www.nytimes.com/2010/07/11/us/11k2.html>
- Godbout, R., Mantz, J., Pirot, S., Glowinski, J. & Thierry, A.M. (1991) Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic neurons on their target cells: electrophysiological and pharmacological characterization. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 258, 728-738.
- Goldstein, R.Z. & Volkow, N.D. (2011) Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nature reviews. Neuroscience*, 12, 652-669.
- Grace, A.A. (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience*, 41, 1-24.
- Graddy, R., Buresh, M. E., & Rastegar, D. A. (2018). New and Emerging Illicit Psychoactive Substances. *The Medical Clinics of North America*, 102(4), 697–714. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.02.010>
- Grill, H. J., & Norgren, R. (1978). The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research*, 143(2), 263–279. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90568-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90568-1)

- Groenewegen, H.J., Berendse, H.W., Wolters, J.G. & Lohman, A.H. (1990) The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *Progress in brain research*, 85, 95-116; discussion 116-118.
- Heidbreder, C.A. & Groenewegen, H.J. (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorsoventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 555-579.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(2), 563–583.
- Hermann, H., Marsicano, G., & Lutz, B. (2002). Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience*, 109(3), 451–460. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00509-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00509-7)
- Hitchcott, P.K., Quinn, J.J. & Taylor, J.R. (2007) Bidirectional modulation of goal-directed actions by prefrontal cortical dopamine. *Cereb Cortex*, 17, 2820-2827.
- Huffman JW, Zengin G, Wu MJ, Lu J, Hynd G, Bushell K, Thompson AL, Bushell S, Tartal C, Hurst DP, Reggio PH, Selley DE, Cassidy MP, Wiley JL, Martin BR. Structure-activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl)indoles at the cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors: steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB(2) receptor agonists. *Bioorg Med Chem*. 2005 Jan 3;13(1):89-112.
- Ihalainen, J.A., Riekkinen, P., Jr. & Feenstra, M.G. (1999) Comparison of dopamine and noradrenaline release in mouse prefrontal cortex, striatum and hippocampus using microdialysis. *Neuroscience letters*, 277, 71-74.
- Jackson, D. M., & Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 64(2), 291–370. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)90041-8)
- Jaskiw, G.E., Weinberger, D.R. & Crawley, J.N. (1991) Microinjection of apomorphine into the prefrontal cortex of the rat reduces dopamine metabolite concentrations in microdialysate from the caudate nucleus. *Biol Psychiatry*, 29, 703-706.
- Jensen, J., Willeit, M., Zipursky, R.B., Savina, I., Smith, A.J., Menon, M., Crawley, A.P. & Kapur, S. (2008) The formation of abnormal associations in schizophrenia: neural and behavioral evidence. *Neuropsychopharmacology*, 33, 473-479.
- Kalivas PW, Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice *Am J Psychiatry* 162:1403–1413

- Karreman, M. & Moghaddam, B. (1996) The prefrontal cortex regulates the basal release of dopamine in the limbic striatum: an effect mediated by ventral tegmental area. *J Neurochem*, 66, 589-598.
- Kirkham, T. C. (2003). Endogenous cannabinoids: A new target in the treatment of obesity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(2), R343-344. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00706.2002>
- Kolachana, B.S., Saunders, R.C. & Weinberger, D.R. (1995) Augmentation of prefrontal cortical monoaminergic activity inhibits dopamine release in the caudate nucleus: an in vivo neurochemical assessment in the rhesus monkey. *Neuroscience*, 69, 859-868.
- Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (2003). *Fundamentals of human neuropsychology* (5th ed.). Worth Publishers.
- Krettek, J.E. & Price, J.L. (1977) Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *The Journal of comparative neurology*, 172, 687-722.
- Kronstrand, R., Roman, M., Thelander, G., and Eriksson, A. (2011). Unintentional fatal intoxications with mitragynine and odesmethyltramadol from the herbal blend krypton. *J. Anal.Toxicol.* 35, 242–247.
- Kuroda, M., Murakami, K., Oda, S., Shinkai, M. & Kishi, K. (1993) Direct synaptic connections between thalamocortical axon terminals from the mediodorsal thalamic nucleus (MD) and corticothalamic neurons to MD in the prefrontal cortex. *Brain research*, 612, 339-344.
- Lacroix, L., Broersen, L.M., Feldon, J. & Weiner, I. (2000) Effects of local infusions of dopaminergic drugs into the medial prefrontal cortex of rats on latent inhibition, prepulse inhibition and amphetamine induced activity. *Behav Brain Res*, 107, 111-121.
- Lapoint J, James LP, Moran CL, Nelson LS, Hoffman RS, Moran JH. (2011). Severe toxicity following synthetic cannabinoid ingestion. *Clin Toxicol.* 49: 760-764.
- Louilot, A., Le Moal, M. & Simon, H. (1989) Opposite influences of dopaminergic pathways to the prefrontal cortex or the septum on the dopaminergic transmission in the nucleus accumbens. An in vivo voltammetric study. *Neuroscience*, 29, 45-56.
- Lu, H.-C., & Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biological Psychiatry*, 79(7), 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Lupica, C. R., & Riegel, A. C. (2005). Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: A potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology*, 48(8), 1105–1116. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.03.016>

- Maccarrone, M., Bab, I., B    , T., Cabral, G. A., Dey, S. K., Di Marzo, V., Konje, J. C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., Sharkey, K. A., & Zimmer, A. (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(5), 277–296. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.008>
- Mackie, K. (2008). Cannabinoid receptors: Where they are and what they do. *Journal of Neuroendocrinology*, 20 Suppl 1, 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01671.x>
- Maldonado, R., Valverde, O., & Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends in Neurosciences*, 29(4), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.01.008>
- Mansour, A., Fox, C.A., Burke, S., Meng, F., Thompson, R.C., Akil, H. & Watson, S.J. (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *The Journal of comparative neurology*, 350, 412-438.
- Mantz, J., Milla, C., Glowinski, J. & Thierry, A.M. (1988) Differential effects of ascending neurons containing dopamine and noradrenaline in the control of spontaneous activity and of evoked responses in the rat prefrontal cortex. *Neuroscience*, 27, 517-526.
- Marsicano, G., & Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *The European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4213–4225. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00847.x>
- Matias, I., & Di Marzo, V. (2007a). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.11.006>
- Matias, I., & Di Marzo, V. (2007b). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 18(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.11.006>
- McLachlan G. (2009) Taking the spice out of legal smoking mixtures. *Lancet*. 2009 Aug 22;374(9690):600.
- McLaughlin, P. J., Winston, K., Swezey, L., Wisniecki, A., Aberman, J., Tardif, D. J., Betz, A. J., Ishiwari, K., Makriyannis, A., & Salamone, J. D. (2003). The cannabinoid CB1 antagonists SR 141716A and AM 251 suppress food intake and food-reinforced behavior in a variety of tasks in rats. *Behavioural Pharmacology*, 14(8), 583–588. <https://doi.org/10.1097/00008877-200312000-00002>
- Mechoulam, R., Pacher, P., Sharkey, K. A., & Zimmer, A. (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(5), 277–296. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.008>

- Melis, M., & Pistis, M. (2012). Hub and switches: Endocannabinoid signalling in midbrain dopamine neurons. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1607), 3276–3285. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0383>
- Melis, M., Muntoni, A. L., & Pistis, M. (2012). Endocannabinoids and the Processing of Value-Related Signals. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00007>
- Mesulam M (2000) Brain, mind, and the evolution of connectivity. *Brain Cogn* 42(1):4-6
- Miliano, C., Serpelloni, G., Rimondo, C., Mereu, M., Marti, M., & De Luca, M. A. (2016). Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS): Focus on the Rewarding and Reinforcing Properties of Cannabimimetics and Amphetamine-Like Stimulants. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 153. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00153>
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Mogenson, G.J. & Yang, C.R. (1991) The contribution of basal forebrain to limbic-motor integration and the mediation of motivation to action. *Advances in experimental medicine and biology*, 295, 267-290.
- Moldrich, G. & Wenger, T. (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*, 21, 1735-1742.
- Müller, H., Sperling, W., Köhrmann, M., Huttner, H. B., Kornhuber, J., and Maler, J. M. (2010). The synthetic cannabinoid Spice as a trigger for an acute exacerbation of cannabis induced recurrent psychotic episodes. *Schizophr. Res.* 118, 309–310.
- Naneix, F., Marchand, A.R., Di Scala, G., Pape, J.R. & Coutureau, E. (2009) A role for medial prefrontal dopaminergic innervation in instrumental conditioning. *J Neurosci*, 29, 6599-6606.
- Oliveira da Cruz, J. F., Robin, L. M., Drago, F., Marsicano, G., & Metna-Laurent, M. (2016). Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB1): A new player in the tripartite synapse. *Neuroscience*, 323, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.002>
- Pagotto, U., Cervino, C., Vicennati, V., Marsicano, G., Lutz, B., & Pasquali, R. (2006). How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? *International Journal of Obesity* (2005), 30 Suppl 1, S39-43. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803277>
- Pagotto, U., Vicennati, V., & Pasquali, R. (2008). [Endocannabinoid system and energy metabolism: Physiology and pathophysiology]. *Giornale Italiano Di Cardiologia* (2006), 9(4 Suppl 1), 74S-82S.

- Papanti, D., Orsolini, L., Francesconi, G., & Schifano, F. (2014). "Noids" in a nutshell: Everything you (don't) want to know about synthetic cannabimimetics. *Advances in Dual Diagnosis*, 7(3), 137–148. <https://doi.org/10.1108/ADD-02-2014-0006>
- Papanti, D., Schifano, F., Botteon, G., Bertossi, F., Mannix, J., Vidoni, D., Impagnatiello, M., Pascolo-Fabrizi, E., & Bonavigo, T. (2013). "Spiceophrenia": A systematic overview of "Spice" related psychopathological issues and a case report. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 28(4), 379–389. <https://doi.org/10.1002/hup.2312>
- Papez JW (1937) A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry* 38:725-743
- Peterson, S.L., St Mary, J.S. & Harding, N.R. (1987) cis-Flupentixol antagonism of the rat prefrontal cortex neuronal response to apomorphine and ventral tegmental area input. *Brain research bulletin*, 18, 723-729.
- Phillips, P.E., Stuber, G.D., Heien, M.L., Wightman, R.M. & Carelli, R.M. (2003) Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 422, 614-618.
- Pintori, N., Castelli, M. P., Miliano, C., Simola, N., Fadda, P., Fattore, L., Scherma, M., Ennas, M. G., Mostallino, R., Flore, G., De Felice, M., Sagheddu, C., Pistis, M., Di Chiara, G., & De Luca, M. A. (2021). REPEATED EXPOSURE TO JWH-018 INDUCES ADAPTIVE CHANGES IN THE MESOLIMBIC AND MESOCORTICAL DOPAMINE PATHWAYS, GLIAL CELLS ALTERATION AND BEHAVIOURAL CORRELATES. *British Journal of Pharmacology*, bph.15494. <https://doi.org/10.1111/bph.15494>
- Pintori, N., Loi, B., & Mereu, M. (2017). Synthetic cannabinoids: The hidden side of Spice drugs. *Behavioural Pharmacology*, 28(6), 409–419. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000323>
- Pirot, S., Godbout, R., Mantz, J., Tassin, J.P., Glowinski, J. & Thierry, A.M. (1992) Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience*, 49, 857-865.
- Pontieri, F. E., Tanda, G., Orzi, F., & Di Chiara, G. (1996). Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature*, 382(6588), 255–257. <https://doi.org/10.1038/382255a0>
- Pontieri, F.E., Tanda, G. & Di Chiara, G. (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 12304-12308.

- R. I. Wilson & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* (New York, N.Y.), 296(5568), 678–682. <https://doi.org/10.1126/science.1063545>
- Ramnani, N. & Owen, A.M. (2004) Anterior prefrontal cortex: insights into function from anatomy and neuroimaging. *Nature reviews. Neuroscience*, 5, 184-194.
- Ray, J.P. & Price, J.L. (1992) The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *The Journal of comparative neurology*, 323, 167-197.
- Riegel, A. C., & Lupica, C. R. (2004). Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(49), 11070–11078. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3695-04.2004>
- Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A., & Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: Physiology and pharmacology. *Alcohol and Alcoholism* (Oxford, Oxfordshire), 40(1), 2–14. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh110>
- Schenk, S., Horger, B.A., Peltier, R. & Shelton, K. (1991) Supersensitivity to the reinforcing effects of cocaine following 6-hydroxydopamine lesions to the medial prefrontal cortex in rats. *Brain research*, 543, 227-235.
- Scherma, M., Fattore, L., Castelli, M. P., Fratta, W., & Fadda, P. (2014). The role of the endocannabinoid system in eating disorders: Neurochemical and behavioural preclinical evidence. *Current Pharmaceutical Design*, 20(13), 2089–2099. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990429>
- Scherma, M., Satta, V., Collu, R., Boi, M. F., Usai, P., Fratta, W., & Fadda, P. (2017). Cannabinoid CB1/CB2 receptor agonists attenuate hyperactivity and body weight loss in a rat model of activity-based anorexia. *British Journal of Pharmacology*, 174(16), 2682–2695. <https://doi.org/10.1111/bph.13892>
- Schifano, F., Orsolini, L., Duccio Papanti, G., & Corkery, J. M. (2015). Novel psychoactive substances of interest for psychiatry. *World Psychiatry: Official Journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, 14(1), 15–26. <https://doi.org/10.1002/wps.20174>
- Schifano, F., Papanti, G. D., Orsolini, L., & Corkery, J. M. (2016). Novel psychoactive substances: The pharmacology of stimulants and hallucinogens. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(7), 943–954. <https://doi.org/10.1586/17512433.2016.1167597>
- Schneir, A. B., Cullen, J., and Ly, B.T. (2011). “Spice” girls: synthetic cannabinoid intoxication. *J. Emerg. Med.* 40, 296–299.

- Servan-Schreiber, D., Printz, H. & Cohen, J.D. (1990) A network model of catecholamine effects: gain, signal-to-noise ratio, and behavior. *Science* (New York, N.Y.), 249, 892-895.
- Sesack, S.R. & Pickel, V.M. (1992) Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of comparative neurology*, 320, 145-160.
- Sesack, S.R., Deutch, A.Y., Roth, R.H. & Bunney, B.S. (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *The Journal of comparative neurology*, 290, 213-242.
- Sesack, S.R., Snyder, C.L. & Lewis, D.A. (1995) Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. *The Journal of comparative neurology*, 363, 264-280.
- Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 989–999.
- Simmons, J., Cookman, L., Kang, C., and Skinner, C. (2011). Three cases of “spice” exposure. *Clin. Toxicol. (Phila.)* 49, 431–433.
- Spanagel, R. (2020). Cannabinoids and the endocannabinoid system in reward processing and addiction: From mechanisms to interventions. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 241–250. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/rspanagel>
- Spanagel, R., & Weiss, F. (1999). The dopamine hypothesis of reward: Past and current status. *Trends in Neurosciences*, 22(11), 521–527. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01447-2](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01447-2)
- Steketee, J.D. (2003) Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Brain research. Brain research reviews*, 41, 203-228.
- Steketee, J.D. (2005) Cortical mechanisms of cocaine sensitization. *Critical reviews in neurobiology*, 17, 6986.
- Surmeier, D.J. (2007) Dopamine and working memory mechanisms in prefrontal cortex. *The Journal of physiology*, 581, 885.
- Tanda, G., Carboni, E., Frau, R. & Di Chiara, G. (1994) Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology* (Berl), 115, 285-288.



- Tanda, G., Pontieri, F.E. & Di Chiara, G. (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu opioid receptor mechanism. *Science* (New York, N.Y.), 276, 2048-2050.
- Thierry, A.M., Blanc, G., Sobel, A., Stinus, L. & Glowinski, J. (1973) Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science* (New York, N.Y.), 182, 499-501.
- Thierry, A.M., Chevalier, G., Ferron, A. & Glowinski, J. (1983) Diencephalic and mesencephalic efferents of the medial prefrontal cortex in the rat: electrophysiological evidence for the existence of branched axons. *Experimental brain research*, 50, 275-282.
- Thierry, A.M., Le Douarin, C., Penit, J., Ferron, A. & Glowinski, J. (1986) Variation in the ability of neuroleptics to block the inhibitory influence of dopaminergic neurons on the activity of cells in the rat prefrontal cortex. *Brain research bulletin*, 16, 155-160.
- Tzschentke, T.M. (2001) Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in neurobiology*, 63, 241-320.
- Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., & Goda, Y. (2009). Identification of a cannabimimetic indole as a designer drug in a herbal product. *Forensic Toxicology*, 27(2), 61– 66. <https://doi.org/10.1007/s11419-009-0069-y>
- Van Eden, C.G. & Uylings, H.B. (1985) Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 241, 253-267.
- Van Eden, C.G., Lamme, V.A. & Uylings, H.B. (1992) Heterotopic Cortical Afferents to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat. A Combined Retrograde and Anterograde Tracer Study. *Eur J Neurosci*, 4, 77-97.
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D., & Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* (New York, N.Y.), 310(5746), 329–332. <https://doi.org/10.1126/science.1115740>
- Verty, A. N. A., McGregor, I. S., & Mallet, P. E. (2004). The dopamine receptor antagonist SCH 23390 attenuates feeding induced by Delta9-tetrahydrocannabinol. *Brain Research*, 1020(1–2), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.033>
- Vezina, P., Blanc, G., Glowinski, J. & Tassin, J.P. (1991) Opposed Behavioural Outputs of Increased Dopamine Transmission in Prefrontocortical and Subcortical Areas: A Role for the Cortical D-1 Dopamine Receptor. *Eur J Neurosci*, 3, 1001-1007.

- Volkow, N. D., Fowler, J. S., & Wang, G.-J. (2003). The addicted human brain: Insights from imaging studies. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1444–1451. <https://doi.org/10.1172/JCI18533>
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., & Baler, R. D. (2011). Reward, dopamine and the control of food intake: Implications for obesity. *Trends in cognitive sciences*, 15(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.11.001>
- Volkow, N. D., Wise, R. A., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: Implications for drug and food addiction. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(12), 741–752. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130>
- Volkow, N.D. & Morales, M. (2015) The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162, 712-725.
- Webster (2001) Dopamine (DA) Neurotransmitters, Drugs and Brain Function.
- Weissenborn, R., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (1997) Effects of medial prefrontal or anterior cingulate cortex lesions on responding for cocaine under fixed-ratio and second-order schedules of reinforcement in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 134, 242-257.
- Wintermeyer A, Möller I, Thevis M, Jübner M, Beike J, Rothschild MA, Bender K. (2010) In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Anal Bioanal Chem*. 398: 2141-2153.
- Woods, S. C. (2007). Role of the endocannabinoid system in regulating cardiovascular and metabolic risk factors. *The American Journal of Medicine*, 120(3 Suppl 1), S19-25. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.01.004>
- Yang, C.R. & Mogenson, G.J. (1990) Dopaminergic modulation of cholinergic responses in rat medial prefrontal cortex: an electrophysiological study. *Brain research*, 524, 271-281.
- Zimmermann US, Winkelmann PR, Pilhatsch M, Nees JA, Spanagel R, Schulz K. (2009) Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of "spice gold". *Dtsch Arztebl Int*. Jul;106(27):464-7.