



PRESIDENZA DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI
Dipartimento Politiche Antidroga

Progetto

INSIDE - 018

Progetto multidisciplinare preclinico per la caratterizzazione degli effetti acuti e cronici sul sistema nervoso centrale del cannabinoide sintetico JWH-018.

Ente gestore (Centro Collaborativo DPA)



Dipartimento di Scienze Biomediche
Università degli Studi di Cagliari

In collaborazione con



Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Università degli Studi di Ferrara

Durata finanziata:
1 Anno
Budget finanziato:
€ 40.000,00



Indice

- 1 Titolo del progetto
- 2 Riassunto – Sintesi
- 3 Referenti amministrativi
- 4 Problem analysis and setting
 - 4.1 Problema che si vuole risolvere e/o motivazione per la proposta di progetto
 - 4.2 Dimensionamento e rilevanza del problema
- 5 Obiettivo generale dell'intervento proposto e risultati attesi
- 6 Sotto obiettivi specifici
- 7 Premesse tecnico scientifiche (Il Razionale) dell'intervento proposto
- 8 Target (Destinatari)
- 9 Territorio ed ambienti di intervento
- 10 Valore aggiunto atteso dell'intervento proposto
- 11 Sotto obiettivi e indicatori
- 12 Sotto obiettivi, Work Package e Metodi
- 13 Risk Assessment e Risk Management
- 14 Organigramma generale del progetto
- 15 Governance – Assegnazione dei compiti principali
- 16 Percorso operativo
 - 16.1 Articolazione in macro fasi e attività
 - 16.2 Gantt Preventivo
 - 16.3 Agenda Reporting
- 17 Risorse e Piano Finanziario
 - 17.1 Quote di finanziamento previsto
- 18 Accreditementi Ente Gestore

Allegato 1: Report di Rendicontazione Finanziaria

Allegato 2: Report di Rendicontazione Tecnico-Scientifica



1

Titolo Progetto

Acronimo o sigla	Progetto Inside - 018
Titolo per esteso	Progetto multidisciplinare preclinico per la caratterizzazione degli effetti acuti e cronici sul sistema nervoso centrale del cannabinoide sintetico JWH-018.
Ente committente	Presidenza del Consiglio dei Ministri – Dipartimento Politiche Antidroga Capo del Dipartimento: Dott. Giovanni Serpelloni
Gruppo di coordinamento tecnico-scientifico	Direzione tecnico-scientifica: Presidenza del Consiglio dei Ministri Dipartimento Politiche Antidroga Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Neuropsicofarmacologia, Università degli Studi di Cagliari
Ente Gestore	Dipartimento Scienze Biomediche (DiSB)-Università degli Studi di Cagliari
Responsabile per l'Ente Gestore	Prof.ssa Maria Del Zompo
Responsabile Operativo del progetto per l'Ente Gestore	Dott.ssa Maria Antonietta De Luca
Collaborazioni previste	Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale Università degli Studi di Ferrara
Gruppo di lavoro previsto	Dott.ssa Maria Antonietta De Luca Dipartimento di Scienze Biomediche Università degli Studi di Cagliari Dott.ssa Miriam Melis Dipartimento di Scienze Biomediche Università degli Studi di Cagliari Dott. Pierluigi Caboni Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente Università degli Studi di Cagliari Dott. Matteo Marti Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale Università degli Studi di Ferrara

2.0 Titolo del Progetto

Progetto Inside – 018. Progetto multidisciplinare preclinico per la caratterizzazione degli effetti acuti e cronici sul sistema nervoso centrale del cannabinoide sintetico JWH-018.

2.1 Premesse

I cannabinoidi sintetici, già a partire dal 2004, sono stati identificati nelle herbal blend, miscele di varie erbe inerti o psicoattive (ad es. *Leonotis leonurus*, *Pedicularis densiflora*) vendute in Europa, negli Stati Uniti e in Giappone attraverso internet e in negozi specializzati (smart shops) con diversi nomi (Spice, nJoy, Blaze, Orange, Lilla, ecc.) (Mc Lachlan, 2009; Early Warning System, 2009; EMCDDA, 2009). Le herbal blend, spesso indicate come “Spice”, sono diventate particolarmente popolari in Germania a partire dal 2008 in seguito a diversi casi di intossicazione volontaria o accidentale (Zimmermann et al., 2009; Muller et al., 2010; Fisher, 2010; Gay, 2010; Scheiner et al., 2011; Kronstrand et al., 2011; Simmons et al., 2011) e sono per questo diventati oggetto di studio da parte dello European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), dell’Early Warning System on new drugs (EWS, 2009; EMCDDA, 2009) e dei diversi sistemi di allerta nazionali (NEWS, National Early Warning System) (EMCDDA, 2009). In Italia, il fenomeno della diffusione dei cannabinoidi sintetici, della loro vendita illegale attraverso gli smart shops, dei vari casi di intossicazioni correlati al loro consumo, vengono monitorati e contrastati grazie al Sistema Nazionale di Allerta Precoce e Risposta Rapida per le Droghe del Dipartimento Politiche Antidroga della Presidenza del Consiglio dei Ministri (DPA, NEWS; <http://www.allertadroga>; <http://www.dronet.org/>) attraverso i centri collaborativi del Sistema disposti su tutto il territorio nazionale e delle segnalazioni provenienti sia dall’Italia che dall’Osservatorio Europeo (OEDT).

Le “Spice” vengono consumate mediante inalazione per i loro effetti psicoattivi simili, e sovente più potenti, a quelli indotti dalla Cannabis e talvolta come alternativa ad essa per eludere i controlli di screening tossicologico-forensi. Tuttavia, proprio le analisi forensi hanno identificato all’interno delle miscele delle herbal blend diversi e potenti agonisti sintetici dei recettori cannabinoidi (Auwarter et al., 2009; Uchiyama et al., 2009). Molti di questi appartengono alla grande classe 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, nelle preparazioni sequestrate sono state identificate analiticamente anche molecole a struttura cicloesilfenolica o 3-arilcicloesanolici (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 blend analizzata (EMCDDA 2009).

Il JWH-018 venne sintetizzato per scopi puramente scientifici nel 1995 da John William Huffman, dal quale prende il nome, presso i laboratori della Clemmson University (USA). Il JWH-018 è un potente agonista dei recettori cannabinoidi CB1 e CB2 (Chin et al., 1999; Huffman et al., 2005; Atwood et al., 2010) e produce in vivo effetti simili a quelli dei cannabinoidi naturali come il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC). Infatti, è grazie alla sua elevata affinità per i recettori dei cannabinoidi CB1 ($K_i \sim 9$ nM) e CB2 ($K_i \sim 3$ nM), rispettivamente di circa quattro e dieci volte maggiore rispetto a quella del THC (Showalter et al., 1996; Atwood et al., 2010), che le herbal blend contenenti JWH-018 producono gli stessi effetti della Marijuana ma amplificati e più intensi. Inoltre, i report clinici presentati dal EMCDDA (2009, 2011) e raccolti in Italia in questi ultimi anni dal Sistema di Allerta Precoce (NEWS) del DPA hanno evidenziato la 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 (Lapointe et al., 2011; Every-Palmer, 2011). Studi in vitro su microsomi epatici (Wintermeyer et al., 2010) e su campioni di urine (Sobolesky et al., 2010) hanno dimostrato la formazione di numerosi metaboliti del JWH-018 capaci di legarsi ai recettori CB1 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., 2012). La formazione di metaboliti farmacologicamente attivi impone quindi una più attenta sperimentazione nello studio degli effetti in vivo a breve e lungo termine indotti da JWH-018 e congeneri.

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 (amfetamina e cocaina), la nicotina, l’alcol, e il THC, hanno in comune la proprietà di aumentare la concentrazione extracellulare di dopamina (DA) in un’area terminale del sistema dopaminergico mesolimbico, il nucleo accumbens shell (NAc shell) (Pontieri et al., 1995; Tanda et al., 1997). Inoltre i farmaci d’abuso condividono la proprietà di agire come rinforzi del comportamento di autosomministrazione ed è stato dimostrato che sia il THC che l’agonista sintetico WIN 55.212-2 vengono autosomministrati da scimmie e ratti (Justinova et al., 2003; Lecca et al., 2006). Gli effetti stimolatori acuti degli agonisti dei recettori CB1 (i.e. delta 9-THC, WIN 55.212-2, CP 55,940) sui neuroni DA della VTA in vivo sono noti (French, 1997; French et al., 1997). Il meccanismo d’azione di tali molecole sembra essere pre-sinaptico (Szabo et al., 2002; Lecca et al., 2012) a livello delle terminazioni GABAergiche (Lecca et al., 2011) la cui inibizione determinerebbe la stimolazione del neurone DA della VTA (Melis et al., 2000) e il conseguente aumento della trasmissione DA a livello della shell del NAc (Tanda et al., 1997).

Studi preliminari neurochimici e comportamentali eseguiti nei nostri laboratori hanno mostrato che il JWH-018 stimola preferenzialmente la trasmissione DArgica nel NAc shell di ratto. Inoltre, mediante un modello animale di tossicodipendenza, qual è l'autosomministrazione (AS) endovenosa, abbiamo dimostrato le proprietà di rinforzo del JWH-018 (De Luca et al., IBRO 2011; De Luca et al., SFN 2012).

2.2 Obiettivo

L'obiettivo generale del progetto INSIDE-018 è quello di ampliare le conoscenze scientifiche riguardo la pericolosità dell'uso del cannabinoide sintetico JWH-018 e dei suoi congeneri ampiamente diffusi nelle numerose herbal blends vendute più o meno legalmente, a seconda dello Stato, attraverso internet e in negozi specializzati.

Il raggiungimento dell'obiettivo avverrà tramite l'ottenimento di una completa caratterizzazione farmacologica, attualmente assente in letteratura, degli effetti del JWH-018. L'obiettivo generale sarà raggiunto mediante il completamento e l'implementazione degli studi preliminari effettuati e discussi nelle premesse (vedi 2.1 e 7) volti alla caratterizzazione degli effetti centrali che il JWH-018 induce nel roditore (topo o ratto) sia dopo somministrazione acuta che prolungata. Per la realizzazione dell'obiettivo indicato ci si prefigge di eseguire una serie di studi sperimentali, direttamente o indirettamente collegati tra di essi, attraverso diverse discipline scientifiche (chimica, tossicologia, fisiologia, neurofarmacologia).

In particolare, il progetto si prefigge di raggiungere i seguenti sotto obiettivi:

1. Studiare le proprietà farmacocinetiche del JWH-018.
2. Studiare i principali effetti comportamentali del JWH-018.
3. Studiare gli effetti neurofisiologici del JWH-018 su specifiche popolazioni neuronali.
4. Studiare le proprietà di rinforzo e gratificazione del JWH-018 ed il suo effetto sui meccanismi neurobiologici coinvolti nelle dipendenze.

2.3 Metodo

La realizzazione del progetto comporterà l'utilizzo di un approccio multidisciplinare e di differenti metodiche scelte in base al tipo di sotto obiettivo preso in esame. Considerando il fatto che molte informazioni sul composto sono già state acquisite negli studi precedenti, lo svolgimento delle diverse fasi progettuali potrà avvenire contemporaneamente nelle diverse Unità di Ricerca appartenenti all'Università di Cagliari (UniCa) o all'Università di Ferrara (UniFe).

Di seguito vengono fornite indicazioni precise sulle differenti metodologie che verranno utilizzate per lo svolgimento del progetto. Tutti gli esperimenti proposti saranno condotti in accordo con le linee guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio del CESA (Comitato Etico UniCa) e della CEE (86/609; "Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research"; National Research Council 2003).

1. Studio delle proprietà farmacocinetiche del JWH-018 (UniCa-UR-3)

Le proprietà farmacocinetiche del JWH-018 saranno studiate in ratti impiantati con un catetere nella vena giugulare. Il giorno seguente l'impianto, la soluzione contenente il composto oppure il veicolo verrà somministrata attraverso il catetere e.v. Successivamente e ad intervalli di tempo prestabiliti (10, 20, 30, 60, 120 min, 4, 6, 8 ore) verranno effettuati prelievi di sangue venoso. Le concentrazioni di JWH-018 presenti nel plasma ottenuto dopo i prelievi verranno analizzate dall'UR-3 mediante LC/MS o GC/MS. Mediante tale apparecchiatura l'UR-3 determinerà la concentrazione del JWH-018 con un'infallibile sensibilità e accuratezza (Caboni et al., 2004).

2. Studio dei principali effetti comportamentali del JWH-018 (UniFe-UR-4)

Per meglio caratterizzare gli effetti centrali del JWH-018, verranno eseguiti esperimenti per la valutazione degli effetti indotti sulla temperatura corporea, sulla nocicezione, sull'aggressività, sull'attività motoria, sulla memoria a breve e lungo termine nel topo.

Valutazione della temperatura corporea

Per valutare i potenziali effetti di ipertermia o ipotermia indotti dal JWH-018, la temperatura corporea dell'animale sarà misurata mediante una sonda (2 mm diametro) che viene inserita per 20 mm nel retto del topo e lasciata in posizione fino allo stabilizzarsi della temperatura (circa 10 sec; Ruzza et al., 2012). Il test sarà effettuato misurando la temperatura basale dell'animale e ripetuto 30 min dopo la somministrazione del JWH-018.

Valutazione del dolore allo stimolo termico

Per valutare gli effetti sulla nocicezione indotti dal JWH-018 sarà impiegato il test del ritiro della coda (Tail Withdrawal Test, Calò et al., 1998). I topi sono alloggiati in un supporto cilindrico e la metà distale della coda viene immersa in acqua a 48°C. Si misura il tempo di latenza, ovvero il tempo di permanenza della coda nell'acqua (il tempo di cut off di 20 s è stato scelto per evitare danni ai tessuti).

Valutazione degli effetti sul comportamento aggressivo

Per valutare l'azione pro- o anti-aggressivante causata dal JWH-018, sarà utilizzato il test del "Resident-Intruder" condizionato da isolamento del topo (Pinna et al., 2008). Il modello si basa sulla valutazione del comportamento aggressivo che il topo residente (Resident) evidenzia nei confronti di un topo Intruso (Intruder). Questo modello è caratterizzato da una risposta aggressiva intensa sostenuta dallo stress indotto dalla condizione di isolamento (Pinna et al., 2008; Nin et al., 2011) ed è impiegato per valutare gli effetti di sostanze psicoattive sul comportamento aggressivo nel roditore (Mickzeć and O'Donnell, 1978; Pinna et al., 2008).

Valutazione dell'attività motoria

L'effetto del JWH-018 sull'attività motoria verrà valutata mediante una batteria di test comportamentali ampiamente validati e specifici per differenti abilità motorie in condizioni sia statiche (bar test) che dinamiche (drag test e rotarod test) di movimento (Martí et al., 2004, 2005, 2007, 2009). Inoltre, sarà misurata l'attività motoria spontanea nel test dell'open field per valutare eventuali effetti sull'attivazione spontanea della locomozione. La forza muscolare sarà valutata mediante grip strength.

Valutazione delle alterazioni della memoria

Per valutare i potenziali effetti amnesici sia a breve e a lungo termine delle sostanze psicoattive sarà utilizzato il test di riconoscimento di un nuovo oggetto (Novel Object Recognition; Antunes and Biala, 2011). Questo test è ampiamente utilizzato per valutare l'attività cognitiva del roditore ed in particolare la capacità nella memoria di riconoscimento ed è utile per valutare la compromissione della capacità cognitiva indotta da differenti sostanze.

3. Studio degli effetti neurofisiologici del JWH-018 su specifiche popolazioni neuronali (UniCa-UR-2)

Gli effetti neurofisiologici del JWH-018 sui neuroni dopaminergici (DA) dell'area ventrale del tegmento (VTA) appartenenti al circuito mesolimbico verranno studiati mediante registrazioni ex vivo su sezioni cerebrali orizzontali di ratti con la tecnica del whole-cell patch clamp. Inoltre la selettività d'azione sui recettori CB1 centrali coinvolti nelle tossicodipendenze sarà studiata mediante l'utilizzo di topi transgenici in cui i recettori CB1 sono stati knocked out (CB1^{-/-}). Tali topi sono da anni disponibili presso il Dipartimento di Scienze Biomediche in seguito ad una collaborazione col Dott. Giovanni Marsicano, team leader del gruppo "Endocannabinoid and behavioral adaptation" presso il Neurocentre Magendie (Bordeaux) (Melis et al., 2004). Sono previsti anche esperimenti per lo studio di eventuali fenomeni di plasticità sinaptica mediante valutazione di long term potentiation e long term depression.

4. Studio delle proprietà di rinforzo e gratificazione del JWH-018 ed effetto sui meccanismi neurobiologici coinvolti nelle dipendenze (UniCa-UR-4)

Le proprietà di rinforzo e gratificazione del JWH-018 verranno studiate mediante la microdialisi cerebrale in vivo e l'autosomministrazione (AS) nel ratto. Sono previsti diversi gruppi sperimentali in cui la microdialisi cerebrale verrà utilizzata da sola o accoppiata alla AS in modo da comprendere le modificazioni dei livelli extracellulari di dopamina (DA) durante le diverse fasi di AS di JWH-018 (acquisizione, mantenimento, estinzione), gli studi ottenuti saranno paragonati con studi precedentemente ottenuti (Lecca et al., 2006). Inoltre saranno studiate le modificazioni degli effetti prodotti dal JWH-018 dopo la somministrazione di agonisti inversi dei recettori CB1 (SR141716A, AM251).

Esperimenti di autosomministrazione (AS)

Per questi esperimenti saranno utilizzati ratti maschi outbred di ceppo Sprague-Dawley (Harlan, Italy), del peso di 275-300 g e saranno impiantati con un catetere cronico nella vena giugulare destra. Gli animali verranno allenati ad autosomministrarsi il JWH-018 all'interno di apposite gabbie (Coulbourn Instruments, Allentown, NJ, USA) fornite di due fori posti in posizione simmetrica nella parete più corta della gabbia, ad una altezza dal pavimento di 2 cm. Attraverso l'inserimento del muso in uno dei due fori, illuminato e chiamato nose poke attivo, gli animali riceveranno un'infusione endovenosa della soluzione contenente JWH-018 (10 o 20 ug/kg/inf). Le sessioni di AS (1 al giorno della durata di 1 ora, 5 giorni alla settimana) verranno effettuate dalle ore 10 alle 17 inizialmente secondo una schedula FR1 (fixed ratio 1, un'infusione per ogni nose-poke attivo), successivamente, quando la risposta si sarà stabilizzata, la schedula sarà aumentata ad FR3. Inoltre verranno studiati gli effetti della somministrazione degli antagonisti CB1 (SR141716A e AM251, somministrati prima delle sessioni di AS) sul comportamento di AS ed eventualmente si applicherà una schedula operativa a rapporto progressivo.

Esperimenti di microdialisi cerebrale

La microdialisi cerebrale è una tecnica che permette di monitorare le concentrazioni di sostanze presenti nel liquido extracellulare come neurotrasmettitori e neuromodulatori (monoamine, aminoacidi, peptidi, endocannabinoidi). La microdialisi viene effettuata su animali liberi di muoversi ed è accoppiata a sofisticate tecniche HPLC che consentono

una rapida analisi dei dializzati cerebrali e quindi permette di poter studiare allo stesso tempo sia risposte comportamentali che variazioni biochimiche che si verificano a livello neuronale inseguito ad un trattamento farmacologico. La metodica consiste nell'impianto di una sottile fibra da dialisi del diametro di 300 micrometri (facente parte del fascio di migliaia di fibre che compongono un rene artificiale per emodialisi) in specifiche aree cerebrali. La microdialisi sfrutta il principio del gradiente di concentrazione, in base a questo tutti i componenti a basso peso molecolare passano attraverso la membrana semipermeabile che costituisce la fibra dal liquido extracellulare, dove si trovano ad una concentrazione maggiore, al liquido che percola la fibra, ad un flusso costante, dove si trovano ad una concentrazione minore. Questa soluzione viene raccolta e analizzata (De Luca et al., 2007).

Studi in vivo di microdialisi cerebrale nel ratto verranno utilizzati per misurare la stimolazione della trasmissione DArgicanel NAc shell e core e nella corteccia prefrontale, mediata dal legame del JWH-018 (0.25-1.0 mg/kg ip) con i recettori CB1 centrali. I ratti saranno anestetizzati con 300 mg/kg ip di cloralio idrato (Carlo Erba, Italia) ed impiantati con una fibra per microdialisi verticale e concentrica, con una porzione dializzante di 1.5 mm, che verrà posizionata in corrispondenza della shell o del core del NAc o della mPFC (Paxinos e Watson, 1998; De Luca et al., 2007). Il giorno seguente l'intervento, le sonde verranno collegate ad una pompa da infusione e perfuse con una soluzione di Ringer (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂) ad una velocità costante di 1 ul/min. I campioni di dializzato (10 ul) saranno prelevati ogni 10 min e iniettati in un HPLC dotato di un rivelatore coulometrico per quantificare i livelli di DA. Alla fine dell'esperimento, i ratti saranno perfusi intracardialmente con 50 ml di soluzione fisiologica e 150 ml di formaldeide al 10%. Le sonde verranno rimosse e il cervello verrà sezionato mediante un vibratomo in una serie di fette coronali in cui la posizione delle sonde sarà ricostruita facendo riferimento all'atlante di Paxinos e Watson (1998).

2.4 Risultato atteso

I risultati attesi dalla realizzazione del progetto INSIDE-018 sono diversi e riconducibili ad aspetti puramente scientifici e sperimentali, alla divulgazione dei risultati stessi e al successo del network tra le diverse UR.

In particolare, attraverso la realizzazione di questo progetto ed il raggiungimento degli obiettivi predeterminati e precedentemente descritti (vedi 2.2), ci si aspetta di ottenere una caratterizzazione farmacologica esaustiva degli effetti centrali del cannabinoide sintetico JWH-018. Lo studio della farmacocinetica del JWH-018 sarà importante per l'interpretazione dei dati ottenuti mediante lo studio dell'attività comportamentali descritte (attività locomotoria, nocicezione, aggressività, temperatura corporea, memoria) e attraverso l'uso del modello animale di tossicodipendenza prescelto (autosomministrazione, AS). Attraverso lo studio delle attività comportamentali ci si aspetta di osservare modificazioni nella temperatura corporea, dell'attività locomotoria e dei test cognitivi. Per mezzo degli studi elettrofisiologici si prevede che il JWH-018, in modo simile ad altri agonisti CB1 sintetici, come ad es WIN 55,212-2, abbia come effetto quello di diminuire il rilascio di GABA a livello del RMTg. Non è possibile prevedere adesso la sua potenza ed efficacia rispetto all'agonista, tuttavia è possibile aspettarsi che tali effetti siano esclusivamente mediati dall'attivazione dei recettori CB1 che sarebbero localizzati sulle terminazioni GABAergiche dal RMTg al neurone DA della VTA. Attraverso gli studi neurochimici (microdialisi cerebrale) ci si aspetta di confermare la selettività d'azione del JWH-018 (0.25 mg/kg ip) a dosi quattro volte inferiori rispetto a quelle efficaci nel caso di somministrazione di THC (1.0 mg/kg ip) nell'aumento dei livelli extracellulari di dopamina nella shell del NAc rispetto al core e alla mPFC e che tale effetto venga bloccato dal pre-trattamento con un antagonista dei recettori CB1 (SR141716A e AM251; 1 mg/kg ip). Dagli studi di AS ci si aspetta di incrementare il numero di ratti in grado di acquisire e mantenere ed eventualmente estinguere il comportamento di AS per JWH-018. Se si dovesse confermare la mancata estinzione dopo AS di JWH-018, questo potrebbe significare un importante ruolo in vivo di metaboliti farmacologicamente attivi del composto studiato. Se si deciderà di realizzare esperimenti mediante l'accoppiamento di microdialisi alla AS, ci si aspetta di ottenere un quadro più completo sull'importanza delle variazioni del comportamento di AS in funzione delle variazioni extracellulari di DA nelle aree di terminazione DArgica, questo sarà utile per confermare la pericolosità di uso e consumo del JWH-018 come già stabilito per cannabinoidi naturali (THC) e sintetici (WIN 55,212-2) con i quali verrà paragonato.

Infine, ci si aspetta di divulgare le conoscenze acquisite col progetto alla Comunità Scientifica mediante almeno 2 partecipazioni a congressi nazionali ed internazionali e attraverso la pubblicazione di 3 lavori scientifici su riviste, libri e atti di conferenze nel campo della farmacologia, delle neuroscienze e della salute pubblica e in conferenze specifiche dedicate agli operatori nel settore delle dipendenze, e che almeno una fra queste pubblicazioni sarà lavoro comune di tutte le UR partecipanti al progetto.

Uno dei risultati più importanti che ci aspettiamo di ottenere sarà il successo del network di lavoro appositamente predisposto per la realizzazione di questo progetto. La verifica costante dei risultati raggiunti nelle diverse UR, appartenenti a UniCa e UniFe, da parte del responsabile operativo del progetto (Dott.ssa De Luca) ed il confronto con quelli attesi fornirà le indicazioni necessarie a questo scopo. L'interazione efficace e costruttiva tra le diverse UR servirà per l'ottenimento degli obiettivi previsti ma anche come base di partenza per lo sviluppo di nuovi progetti nazionali ed internazionali. Inoltre il successo del network di collaborazioni scientifiche realizzato sarà determinato anche dal grado di interazione raggiunta prima, durante e dopo lo svolgimento del progetto INSIDE-018 con il Sistema Nazionale di Allerta Precoce e Risposta Rapida per le Droghie del DPA al quale ci si aspetta di fornire elementi validi sui quali basare il costante monitoraggio della comparsa sul mercato di nuovi cannabinoidi sintetici e l'attivazione di adeguate misure in merito e dal quale si attingeranno tutte le informazioni necessarie, spesso derivanti dai diversi gradi di allerta, utili per l'interpretazione dei dati ottenuti e per lo svolgimento di esperimenti specifici eventualmente da sviluppare nell'ambito dei sotto obiettivi individuati.

3 Referenti amministrativi

Referenti	Coordinate
Per il DPA: Ufficio Contabile DPA	Tel: 06.67796350 Fax: 06.67796843 Email: ufficiocontabiledpa@governo.it
Per l'Università degli Studi di Cagliari Dott.ssa Francesca Falchi	Tel: 0706754121 Fax: 0706754003 Email: ffalchi@unica.it;

4 Problem analysis and settings

4.1 Problema che si vuole risolvere e/o motivazione per la proposta di progetto

Questo progetto si inquadra nell'urgente esigenza di investigare e comprendere gli effetti prodotti dai cannabinoidi sintetici che costituiscono una tra le principali classi di nuove droghe sintetiche che hanno prepotentemente invaso il mercato mondiale delle nuove sostanze "ricreative" con evidenti effetti devastanti sulla salute soprattutto dei più giovani. Dati recenti (2009-2011), raccolti in Italia dal Sistema Nazionale di Allerta Precoce e Risposta Rapida per le Droghe del DPA (National Early Warning System, NEWS), indicano che sono state intercettate numerose sostanze vendute illegalmente contenenti 153 molecole di nuova sintesi, potenzialmente pericolose per la salute e che 38 di esse erano cannabinoidi sintetici; la presenza del cannabinoide sintetico JWH-018 è stata identificata in circa 20 campioni di *herbal blends* (es. n-Joy, Spice Artic Synergy, Bonzai, Atomic Bomb) (NEWS 2009-2011). Inoltre i report clinici raccolti dal NEWS e presentati dallo European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction nel 2012 hanno registrato 32 casi di intossicazione acuta con ingresso al pronto soccorso per sintomi di lieve o grave entità (mal di testa, vomito e paranoia, fino a tachicardia, convulsioni, panico, psicosi, allucinazioni) correlati all'assunzione di cannabinoidi sintetici contenuti in diverse *herbal blends* all'interno delle quali era spesso presente anche il JWH-018 (NEWS 2011-12; EMCDDA 2012; The first International Conference on Novel Psychoactive Substances, 2012).

Il progetto multidisciplinare preclinico INSIDE-018 prenderà in esame le problematiche relative agli effetti dannosi del JWH-018 con l'obiettivo di comprendere meglio i meccanismi neurobiologici alla base dei suoi effetti acuti e cronici.

4.2 Dimensionamento e rilevanza del problema (frequenza, grado di gravità, misure epidemiologiche ecc.)

Il problema che si intende risolvere mediante lo sviluppo del progetto INSIDE-018 ha una rilevanza mondiale. Infatti, secondo il World Drug Report 2012 la Cannabis è una delle sostanze illecite più consumata al mondo con un numero di consumatori che varia dai 119 ai 224 milioni. Tutti coloro che fanno uso Cannabis, sia occasionalmente che per abitudine, possono essere considerati potenziali consumatori di *herbal blend* vendute come alternativa alla Cannabis e per questo sono esposti al rischio elevato di andare incontro agli effetti dannosi di cannabinoidi sintetici noti, come ad esempio il JWH-018, e di nuova sintesi. Il JWH-018 è stato identificato anche in numerose preparazioni vendute in Italia la cui pericolosità è stata individuata grazie al Sistema Nazionale di Allerta Precoce del DPA (National Early Warning System, NEWS) (NEWS 2011-12; EMCDDA 2012; The first International Conference on Novel Psychoactive Substances, 2012).

5 Obiettivo generale dell'intervento proposto e risultati attesi

L'obiettivo generale del progetto INSIDE-018 è quello ottenere una caratterizzazione farmacologica completa del cannabinoide sintetico JWH-018 e dei suoi congeneri in modo da ampliare le conoscenze scientifiche riguardo alla pericolosità dell'uso e consumo delle *herbal blend* nelle quali i cannabinoidi sintetici, noti o di nuova sintesi, sono frequentemente contenuti come additivi a materiale vegetale di diversa natura e più o meno inerte.

Tale obiettivo generale sarà raggiunto mediante il completamento e l'implementazione degli studi preliminari effettuati e discussi nelle premesse (vedi 2.1 e 7) volti alla caratterizzazione degli effetti centrali che il JWH-018 induce nel roditore (topo o ratto) sia dopo somministrazione acuta che prolungata.

Per la realizzazione dell'obiettivo indicato ci si prefigge di eseguire una serie di studi sperimentali, direttamente o indirettamente collegati tra di essi, attraverso diverse discipline scientifiche (chimica, tossicologia, fisiologia, neurofarmacologia) che verranno attuati da quattro diverse UR appartenenti a UniCa e UniFe.

In particolare, il progetto si prefigge di raggiungere i seguenti sotto obiettivi studiando:

1. Le proprietà farmacocinetiche del JWH-018 (UniCa).
2. I principali effetti comportamentali del JWH-018 (UniFe).
3. Gli effetti neurofisiologici del JWH-018 su specifiche popolazioni neuronali (UniCa).
4. Le proprietà di rinforzo e gratificazione del JWH-018 ed il suo effetto sui meccanismi neurobiologici coinvolti nelle dipendenze (UniCa).

I risultati attesi dalla realizzazione del progetto INSIDE-018 sono diversi e riconducibili ad aspetti puramente scientifici e sperimentali, alla divulgazione dei risultati stessi e al successo del *network* tra le diverse UR.

Risultati scientifici

Il risultato generale che ci si aspetta di ottenere attraverso la realizzazione del progetto è la caratterizzazione degli effetti centrali del cannabinoide sintetico JWH-018 attraverso il raggiungimento degli obiettivi prefissati (vedi 2.2) In particolare, ci si aspetta di ottenere:

1. Un'adeguata conoscenza della farmacocinetica del JWH-018, che sarà di fondamentale importanza per l'interpretazione dei dati ottenuti mediante lo studio dell'attività comportamentale (attività locomotoria, nocicezione, aggressività, temperatura corporea, memoria) e attraverso l'uso del modello animale di tossicodipendenza (autosomministrazione, AS).
2. Dai test comportamentali proposti ci si aspetta di osservare modificazioni nella temperatura corporea, dell'attività locomotoria e dei test cognitivi.
3. Dagli esperimenti di elettrofisiologia ci si prevede che il JWH018, in modo simile agli altri agonisti di sintesi per i recettori CB1, abbia come effetto quello di diminuire il rilascio di GABA a livello del RMTg. Non è possibile prevedere adesso la sua potenza ed efficacia rispetto all'agonista WIN 55,212-2, tuttavia è possibile aspettarsi che tali effetti siano esclusivamente mediate dall'attivazione dei recettori CB1 che sarebbero localizzati sulle terminazioni GABAergiche dal RMTg al neurone DA della VTA. Ciò supporterebbe l'ipotesi che cambiamenti nelle funzioni sinaptiche relative alle cellule DA della VTA, traducibili infine in una "iperdopaminergia", possano alterare e/o regolare il comportamento di consumo di JWH-018.
4. Attraverso gli studi neurochimici ci si aspetta di confermare la selettività d'azione del JWH-018 (0.25 mg/kg ip) nell'aumento dei livelli extracellulari di dopamina nella shell del NAc rispetto al core e alla mPFC e che tale effetto venga bloccato dal pre-trattamento con un antagonista dei recettori CB1 (SR141716A e AM251; 1 mg/kg ip). Dagli studi di AS ci si aspetta di incrementare il numero di ratti in grado di acquisire e mantenere ed estinguere il comportamento di AS per JWH-018. Infine, l'eventuale accoppiamento della microdialisi alla AS permetterà di avere un quadro più completo sull'importanza delle variazioni del comportamento di AS in funzione delle variazioni extracellulari di DA, questo sarà utile per confermare la pericolosità di uso e consumo del JWH-018 come già stabilito per cannabinoidi naturali (THC) e sintetici (WIN 55,212-2) con i quali verrà paragonato.

Divulgazione dei risultati

Ci aspettiamo di riuscire a divulgare le conoscenze acquisite col progetto mediante almeno 2 partecipazioni a congressi nazionali ed internazionali e attraverso la pubblicazione di 3 lavori scientifici su riviste, libri e atti di conferenze nel campo farmacologia, delle neuroscienze, della sanità pubblica e che almeno una fra queste pubblicazioni sarà lavoro comune di tutte le UR partecipanti al progetto.

Network

Uno dei risultati più importanti che ci aspettiamo di ottenere sarà il successo del network di lavoro appositamente predisposto per la realizzazione di questo progetto.

La verifica costante dei risultati raggiunti nelle quattro UR da parte del responsabile operativo del progetto (Dott.ssa De Luca) ed il confronto con quelli attesi fornirà le indicazioni necessarie a questo scopo.

L'interazione efficace e costruttiva tra le diverse UR servirà per l'ottenimento degli obiettivi previsti ma anche come base di partenza per lo sviluppo di nuovi progetti nazionali ed internazionali. Inoltre, ci si aspetta di poter condividere i risultati ottenuti grazie alla realizzazione di INSIDE-018 con il Sistema Nazionale di Allerta Precoce e Risposta Rapida per le Droghe del DPA. D'altro canto, tutte le informazioni già raccolte e divulgate dal NEWS saranno di fondamentale importanza per l'interpretazione dei risultati ottenuti e per lo svolgimento di esperimenti mirati nell'ambito dei sotto obiettivi individuati e descritti.

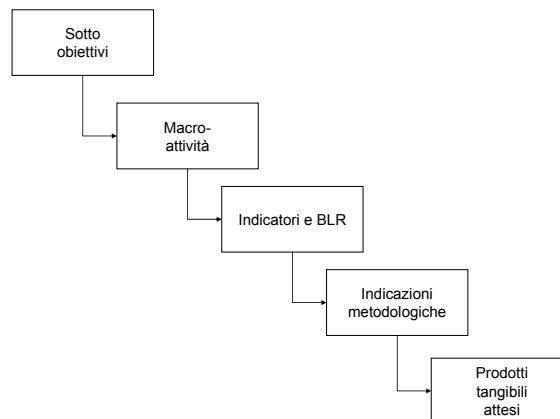
6

Sotto obiettivi specifici

Vengono di seguito elencati i sotto obiettivi specifici, cioè i risultati attesi del progetto; in altre parole ciò che è necessario fare per realizzare l'obiettivo generale del progetto, scomponendo tale obiettivo in sotto obiettivi da raggiungere:

1. Studiare la farmacocinetica del composto JWH-018.
2. Studiare l'effetto del JWH-018 sull'attività motoria, sulla nocicezione, sulla temperatura corporea, sull'aggressività, sulla memoria a breve e lungo termine.
3. Studiare gli effetti neurofisiologici del JWH-018 sui neuroni dopaminergici (DA) dell'area ventrale del tegmento (VTA).
4. Studiare le proprietà di rinforzo e gratificazione del JWH-018 ed il suo effetto sui meccanismi neurobiologici coinvolti nelle dipendenze.

In seguito, questi sotto obiettivi vengono ulteriormente definiti nella componente operativa e chiariti, elencando una serie di specifiche e ulteriori informazioni necessarie per la loro realizzazione, utilizzando il framework logico sotto riportato.



I cannabinoidi sintetici, già a partire dal 2004, sono stati identificati in miscele di varie erbe, *herbal blends*, che vengono vendute attraverso internet e in negozi specializzati (smart shops) (Mc Lachlan, 2009). Le *herbal blends* vengono consumate mediante inalazione per i loro effetti psicoattivi simili a quelli indotti della Cannabis e come alternativa alla marijuana per eludere i controlli di screening tossicologico-forensi. Tuttavia, proprio le analisi forensi hanno identificato all’interno delle miscele di diverse *herbal blends* (come le Spice) diversi e potenti agonisti sintetici dei recettori cannabinoidi (Auwarter et al., 2009). Questi appartengono alla grande classe 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 presenti nelle preparazioni sequestrate (EMCDDA, 2009) anche molecole a struttura cicloesifenolica o 3-arilcicloesanioli (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 sempre presente benché in quantità differenti a seconda del tipo di *herbal blends* analizzata. Il JWH-018 venne sintetizzato per scopi puramente scientifici nel 1995 da John William Huffman, dal quale prende il nome, presso i laboratori della Clemnson University (USA). Il JWH-018 è un potente agonista dei recettori cannabinoidi CB1 e CB2 (Chin et al., 1999; Huffman et al., 2005; Atwood et al., 2010) e produce *in vivo* effetti simili a quelli dei cannabinoidi naturali come il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC). Infatti, è grazie alla sua elevata affinità per i recettori dei cannabinoidi CB1 ($K_i \sim 9$ nM) e CB2 ($K_i \sim 3$ nM), rispettivamente di circa quattro e dieci volte maggiore rispetto a quella del THC (Showalter et al., 1996; Atwood et al., 2010), che le *herbal blend* contenenti JWH-018 producono gli stessi effetti della Marijuana ma amplificati e più intensi. Inoltre, studi recenti descrivono lo sviluppo di fenomeni di astinenza e dipendenza in seguito al consumo di “Spice” (Zimmermann et al., 2009) ed un insieme di effetti collaterali lievi e gravi che vanno da 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 (Sobolesky et al., 2010) hanno dimostrato la formazione di numerosi metaboliti del JWH-018 capaci di legarsi ai recettori CB1 e di mantenere un’attività agonista (Brents et al., 2011; Seely et al., 2012). La formazione di metaboliti farmacologicamente attivi impone quindi una più attenta sperimentazione nello studio degli effetti *in vivo* a breve e lungo termine indotti da JWH-018.

Le sostanze d’abuso, indipendentemente dalla classe farmacologica di appartenenza e dal loro meccanismo d’azione sul sistema nervoso centrale (SNC), possono essere definite 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 THC, hanno in comune la proprietà di aumentare la concentrazione extracellulare di dopamina (DA) in un’area terminale del sistema mesolimbico, il nucleo accumbens shell (NAc shell) (Pontieri et al., 1995; Tanda et al., 1997). Inoltre i farmaci d’abuso condividono la proprietà di agire come rinforzi del comportamento di autosomministrazione ed è stato dimostrato che sia il THC che l’agonista sintetico WIN 55.212-2 vengono autosomministrati da scimmie e ratti (Justinova et al., 2003; Lecca et al., 2006). Gli effetti stimolatori acuti degli agonisti dei recettori CB1 (i.e. delta 9-THC, WIN 55.212-2, CP 55,940) sui neuroni DA della VTA *in vivo* sono noti (French, 1997; French et al, 1997). Il meccanismo d’azione di tali molecole sembra essere pre-sinaptico (Szabo et al, 2002; Lecca et al, 2012) a livello delle terminazioni GABAergiche (Lecca et al, 2011) la cui inibizione determinerebbe la stimolazione del neurone DA della VTA (Melis et al., 2000) e il conseguente aumento della trasmissione DA a livello della shell del NAc (Tanda et al, 1997).

Il progetto INSIDE-018 si basa su una serie di dati preliminari ottenuti mediante l’analisi chimica del contenuto di una confezione di *Spice Silver* (Fig.1), attraverso studi neurochimici di microdialisi cerebrale nel ratto (Fig. 2) e attraverso studi di AS (Fig. 3) nel ratto. I risultati ottenuti nei nostri laboratori hanno confermato che il JWH-018 è stato presente anche nel campione di Spice da noi analizzato, che il composto puro stimola preferenzialmente la trasmissione DArgica nel NAc shell di ratto alla dose di 0.25 mg/kg ip e che dimostra di possedere proprietà di rinforzo in quanto viene autosomministrato dagli animali da esperimento (De Luca et al., IBRO 2011; De Luca et al., SFN 2012). I risultati ottenuti, rappresentati di seguito, indicano anche che le UR appartenenti a UniCa hanno già maturato esperienza nel campo dello studio del JWH-018.

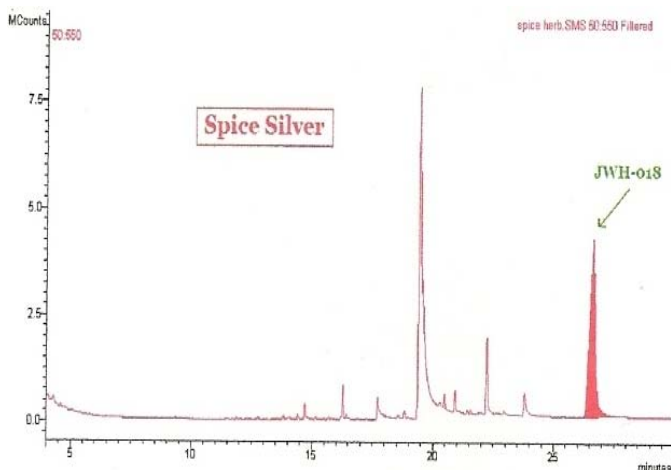


Figura 1 - Analisi qualitativa GC-IT/MS che mostra la presenza del JWH-018 nel campione di Spice analizzato (Spice Silver).

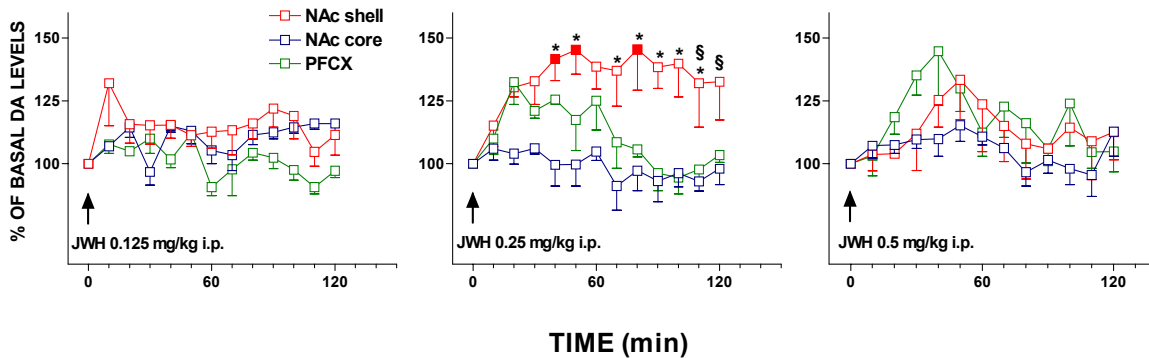


Figura 2 - Effetto della somministrazione acuta di JWH-018 (0.125-0.5 mg/kg ip) sui livelli di DA extracellulare nel NAc shell e core e nella mPFC.

La figura 2 mostra che la somministrazione di JWH-018 (0.25 mg/kg ip) stimola preferenzialmente in maniera significativa la risposta della trasmissione DA in NAc shell (*quadrati rossi*) rispetto al core (*quadrati blu*) e alla mPFC (*quadrati verdi*); questo effetto non si osserva a dosi più basse o più alte. I risultati sono la media \pm EMS dei valori di DA extracellulare espressi come valori percentuali rispetto ai basali. Quadrati pieni $p < 0.05$ rispetto ai basali; * $p < 0.05$ rispetto al core; § $p < 0.05$ rispetto alla mPFC; N= 4 per gruppo; (ANOVA a 2 vie seguito dal *post hoc* di Tukey).

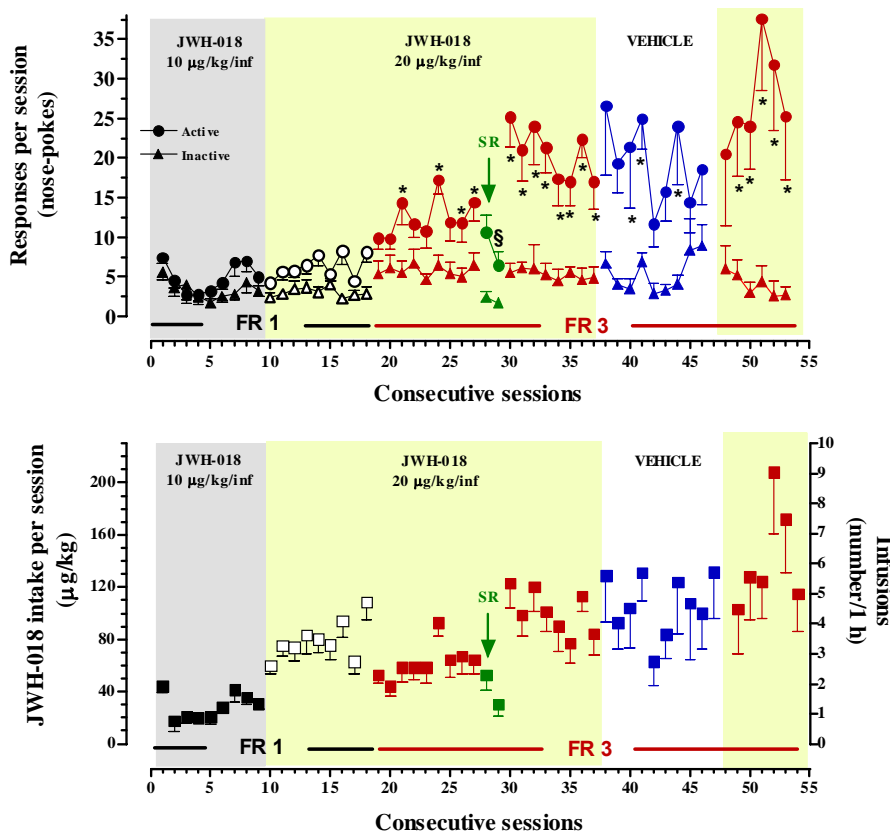


Figura 3
Effetto del JWH-018 in esperimenti di autosomministrazione (AS).

- Il grafico (*pannello superiore*) mostra il numero di risposte (nose-pokes) durante le diverse fasi della AS: acquisizione, estinzione e riacquisizione. Il grafico mostra anche l'effetto della somministrazione del antagonista CB1 SR-141716A. Durante le prime 18 sessioni i ratti sono stati allenati al comportamento di AS di JWH-018 con una schedula a rapporto fisso (FR) 1 (1 nose poke: 1 iniezione i.v.) con una dose di JWH-018, pari a 10 μ g/kg/inf (sessioni 1-9) o 20 μ g/kg/inf (sessioni 10-54) in 12 μ l. A partire dalla sessione 19, i ratti sono stati allenati a ricevere il JWH-018 mediante una schedula FR 3. I risultati sono espressi come media \pm EMS dei nose-pokes attivi (*cerchi*) e inattivi (*triangoli*) (N=16) durante ciascuna sessione giornaliera di SA della durata di 1h; * $p < 0.05$ vs. nose-pokes inattivi; § $p < 0.05$ vs. JWH-018; ANOVA a 2 vie, seguito da LSD *post hoc* test.
- Il grafico mostra anche (*pannello inferiore*) il consumo giornaliero ed il numero di infusioni di JWH-018 durante la AS. I dati sono espressi in μ g/kg di JWH-018 AS (N=16) durante ciascuna sessione giornaliera (asse dell'Y sin) o come numero di infusioni di JWH-018 o di veicolo (asse dell'Y dx).

8 Target (destinatari)

8.1 Target principale

Il target principale del progetto INSIDE-018 è rappresentato dalla Comunità Scientifica che acquisirà nuove conoscenze sul JWH-018 utili per lo studio della prevenzione e del trattamento delle intossicazioni causate dal composto e come base di partenza per lo studio degli effetti e la caratterizzazione farmacologica di altri cannabinoidi sintetici.

8.2 Target secondario

Il target secondario è rappresentato gli operatori del settore delle dipendenze che attraverso questa ricerca possono comprendere meglio i meccanismi di azione delle sostanze assunte dai consumatori/utenti dei servizi. Un altro target è il Sistema Nazionale di Allerta Precoce e Risposta Rapida per le Droghe che avrà a disposizione gli esiti di questo studio in modo da poter individuare le analogie tra le informazioni di allerta fornite o ricevute dalle strutture deputate alla tutela e alla promozione della salute e gli effetti dannosi prodotti dai cannabinoidi sintetici, come JWH-018.

9 Territorio ed ambienti di intervento

9.1 Aree geografiche coinvolte

Le aree geografiche nelle quali verrà svolto il progetto sono situate in Italia. Le UR saranno dislocate a Cagliari (UR 1-3) e a Ferrara (UR 4), i risultati verranno diffusi a livello nazionale e internazionale.

10 Valore aggiunto atteso nell'intervento proposto

Il valore aggiunto atteso dall'intervento proposto attraverso il progetto INSIDE-018 consiste nella sua multidisciplinarietà attraverso la quale sarà possibile studiare il fenomeno da diversi punti di vista grazie ai quali si otterrà una caratterizzazione completa delle proprietà farmacologiche del JWH-018 che a tutt'oggi non trova riscontro nella letteratura scientifica nazionale e internazionale.

Le pubblicazioni scientifiche che verranno prodotte dagli studi descritti nel progetto INSIDE-018 saranno un punto di riferimento per lo studio dei numerosi nuovi cannabinoidi sintetici contenuti nelle *herbal blends* (Spice e congeneri) o in altre preparazioni vendute illegalmente in Italia ed in altri stati dell'UE o degli USA.

11 Sotto obiettivi e indicatori

N°	Sotto obiettivi	Indicatori	Base line result	Prodotto tangibile atteso	Note
1	Studiare la farmacocinetica del composto JWH-018.	Numero di animali (N) con concentrazioni plasmatiche stabili di JWH-018 ai tempi prestabiliti dal protocollo sperimentale (10, 20, 30, 60, 120 min, 4, 6, 8 ore) per il prelievo di sangue venoso.	N ≥ 6	Presentazione a congresso Articolo scientifico	
2	Studiare l'effetto del JWH-018 sull'attività motoria, sulla nocicezione, sulla temperatura corporea, sull'aggressività, sulla memoria a breve e lungo termine.	Numero di animali (N) trattati con JWH-018 che mostrano variazioni statisticamente significative delle attività comportamentali prese in esame rispetto a gli animali di controllo.	N ≥ 8	Presentazione a congresso Articolo scientifico	
3	Studiare gli effetti neurofisiologici del JWH-018 sui neuroni dopaminergici (DA) dell'area ventrale del tegmento (VTA).	Numero di neuroni dopaminergici (N) che rispondono a trattamento con JWH-018.	N ≥ 4	Presentazione a congresso Articolo scientifico	
4	Studiare le proprietà di rinforzo e gratificazione del JWH-018 ed il suo effetto sui meccanismi neurobiologici coinvolti nelle dipendenze.	<p>1) Numero di animali (N) che mostrano incrementi di DA extracellulare in NAc shell significativi rispetto ai valori basali e rispetto ai ratti impiantati in NAc core o mPFC.</p> <p>2) Valore percentuale di animali allenati alla AS di JWH-018 che avrà acquisito, estinto e riacquisito il comportamento di AS e che avrà risposto al trattamento con SR o AM.</p>	<p>1) N ≥ 8</p> <p>2) % ≥ 80%</p>	Presentazione a congresso Articolo scientifico	

12 Sotto obiettivi, Work package e metodi

N Sotto obiettivi

Work Package (pacchetti di attività)

Metodi

1 Studiare la farmacocinetica del composto JWH-018.	WP 1.1 Impianto catetere in vena giugulare	1.1 Chirurgia (UR 1)
	WP 1.2 Somministrazione dose prestabilita di JWH-018	1.2 Iniezione iv (UR 1)
	WP 1.3 Prelievo campioni di sangue	1.3 Prelievo attraverso catetere iv (UR1)
	WP 1.4 Preparazione del campione (estrazione) e analisi contenuto JWH-018	1.4 Analisi GC-IT/MS (UR2)
2 Studiare l'effetto del JWH-018 sull'attività motoria, sulla nocicezione, sulla temperatura corporea, sull'aggressività, sulla memoria a breve e lungo termine.	WP 2.1 Analisi attività locomotoria dopo JWH-018	2.1 Uso gabbie attività locomotoria, Bar Test, Drag Test, Rotarod Test, Open field, Grip Streng (UR4)
	WP 2.2 Analisi nocicezione dopo JWH-018	2.2 Tail Withdrawal Test (UR4)
	WP 2.3 Misurazione ipertermia o ipotermia dopo JWH-018	2.3 Sonda rettale (UR4)
	WP 2.4 Valutazione comportamento aggressivo	2.4 Resident-Intruder Test (UR4)
	WP 2.5 Valutazione alterazione memoria	2.5 Novel Object Recognition (UR4)
3 Studiare gli effetti neurofisiologici del JWH-018 sui neuroni dopaminergici (DA) dell'area ventrale del tegmento (VTA).	WP 3.1 Comparazione della curva dose-risposta del JWH018 con quella di WIN 55,212-2 per calcolarne la potenza ed efficacia	3.1 Registrazione su fettine da neuroni DA del VTA (UR3)
	WP 3.2 Blocco degli effetti elettrofisiologici della IC50 del JWH018 con un CB1 antagonista	3.2 Registrazione su fettine da neuroni DA del VTA (UR3)
	WP 3.3 Studio dell'effetto del JWH-018 su topi ko per i CB1 (CB1-/-)	3.3 Registrazione su fettine da neuroni DA del VTA (UR3)
4 Studiare le proprietà di rinforzo e gratificazione del JWH-018 ed il suo effetto sui meccanismi neurobiologici coinvolti nelle dipendenze.	WP 4.1 Preparazione sonde da microdialisi	4.1 Costruzione probes (UR1)
	WP 4.2 Impianto probe da dialisi	4.2 Chirurgia (UR1)
	WP 4.3 Raccolta e analisi del campione di dializzato	4.3 Raccolta e iniezione manuale; analisi mediante HPLC o UHPLC (UR1)
	WP 4.4 Sacrificio dell'animale da esperimento e prelievo dell'encefalo	4.4 Chirurgia (UR 1)
	WP 4.5 Analisi istologica per verificare la posizione del probe nell'area cerebrale di interesse	4.5 Taglio mediante vibratomo, analisi al microscopio delle sezioni istologiche (UR1)
	WP 4.6 Preparazione cateteri per la somministrazione cronica iv	4.6 Costruzione (UR1)
	WP 4.7 Impianto cateteri in vena giugulare	4.7 Chirurgia (UR 1)
	WP 4.8 Esperimenti di AS (acquisizione, estinzione, riacquisizione; blocco con antagonisti)	4.8 Gabbie per AS munite di nose-pokes (UR1)

13 Risk Assessment e Risk Management

Elenco sintetico delle principali "Attività o condizioni critiche" alle quali prestare particolare attenzione per garantire il corretto svolgimento del progetto.

N°	Attività / Condizione critica	Descrizione del rischio / evento negativo possibile	Probabilità di evenienza del rischio (accadimento)	Gravità conseguenze in caso di accadimento (impatto sul progetto)	Azione preventiva prevista	Azione correttiva prevista
1	Sezione chirurgica	Morte dell'animale	<input checked="" type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input checked="" type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	Adeguate concentrazioni di anestetico	Modificazioni concentrazioni anestetico
2	Microdialisi	Perdita del probe da dialisi	<input checked="" type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input checked="" type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	Particolare attenzione al fissaggio del probe alla teca cranica	Modifica quantità cemento glasionomerico
3	Patch-clamp	Scarsa vitalità cellulare nel preparato	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input checked="" type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input checked="" type="checkbox"/> Molto alta	Monitoraggio concentrazioni Ca++ extracellulare	Applicazione antagonisti glutammatergici
4	Autosomministrazione	Sviluppo di infezioni durante le sessioni di AS	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input checked="" type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input checked="" type="checkbox"/> Molto alta	Somministrazione terapia antibiotica	Somministrazione terapia antibiotica
5	Estrazione del JWH-018 dal sangue	Contaminazione dell'operatore	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input checked="" type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input checked="" type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	Uso di guanti, occhiali, mascherine	



6 Preparazioni sezioni istologiche encefaliche per la localizzazione del probe da microdialisi	Contaminazione dell'operatore con vapori di aldeide formica	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input checked="" type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input checked="" type="checkbox"/> Molto alta	Utilizzo di mascherina ed esecuzione delle sezioni sotto cappa aspirante
---	---	---	---	--

14 Organigramma generale del progetto

Viene di seguito rappresentato l'organigramma generale del progetto INSIDE-018. Esso prevede due livelli: direzione e coordinamento e coordinamento tecnico-operativo.

Il *primo livello* di direzione e coordinamento è rappresentato dal Dipartimento Politiche Antidroga della Presidenza del Consiglio dei Ministri, che si potrà avvalere di un gruppo di lavoro interdisciplinare individuato all'interno dell'ente gestore, il Dipartimento di Scienze Biomediche (DiSB) dell'Università degli Studi di Cagliari.

Il *secondo livello* di coordinamento tecnico-operativo è rappresentato dal DiSB che è l'Ente gestore del progetto INSIDE-018 e ha il compito di armonizzare l'implementazione della attività previste da quattro Unità di Ricerca (UR).

Organizzazione generale

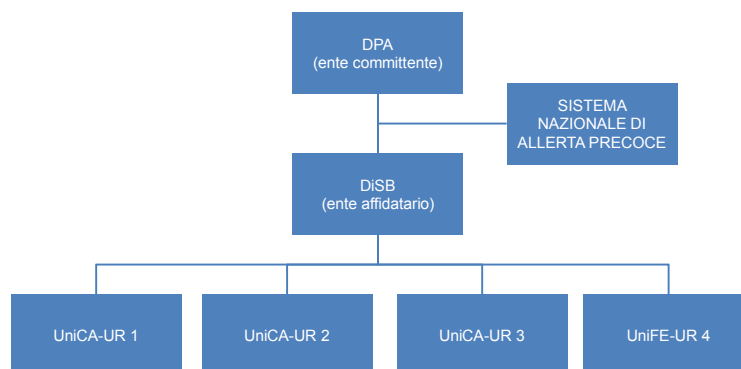
Il progetto verrà organizzato come segue: il DiSB, seguendo le direttive del DPA e avvalendosi di tutte le informazioni necessarie provenienti dal database dal Sistema Nazionale di Allerta Precoce e relative al consumo dei cannabinoidi sintetici in Italia, si comporterà come centro collaborativo del DPA. Dopo aver concordato le linee guida del progetto proposto, il DiSB organizzerà il lavoro suddividendolo tra quattro unità operative di ricerca (UR). Le UR opereranno su ambiti differenti e potranno svolgere gli esperimenti concordati anche contemporaneamente nell'arco temporale previsto dalla durata del progetto. Ciò sarà possibile grazie alla presenza di un background sperimentale di partenza e al fatto che le UR utilizzeranno metodiche differenti.

Organizzazione tra UR

Il progetto è organizzato in modo che ciascuna unità svolga un serie di esperimenti indipendentemente dalle altre ma i risultati ottenuti da ciascuna unità saranno fondamentali per l'interpretazione dei dati e la loro trasmissione al DPA secondo il timeline richiesto dallo stesso. Il responsabile del coordinamento tecnico-operativo (Dr De Luca) si propone di raggiungere gli obiettivi specifici mediante frequenti riunioni per via telematica (TC o skype). Particolare attenzione verrà dedicata alla riunione nelle fasi iniziali del progetto per valutare le basi di partenza. Verrà coordinato il lavoro delle UR partecipanti con frequenti revisioni per valutare i risultati ottenuti e confrontarli con quelli attesi e per coordinare le fasi successive. E' prevista anche una revisione finale di valutazione complessiva dei risultati ottenuti.

I ricercatori appartenenti a ciascuna unità avranno cura di comunicare periodicamente attraverso riunioni telematiche i risultati ottenuti, e le eventuali criticità insorte, al responsabile del coordinamento tecnico-operativo, il quale deciderà se e come modificare lo svolgimento delle attività progettuali per il raggiungimento degli obiettivi previsti e approvati dal DPA. Inoltre il coordinatore tecnico appartenente al DiSB si occuperà di suddividere tra le UR, in base alle reali necessità operative e al budget approvato dal DPA, l'importo erogato dall'ente committente.

Di seguito viene rappresentato l'organigramma schematico:



15 Governance – assegnazione dei compiti principali

Soggetto	Compiti principali
DPA	<ul style="list-style-type: none">Ente CommittenteCoordinamento generaleControllo e verifica del progetto generale sia per la rendicontazione di risultato che della rendicontazione finanziaria
Gruppo di coordinamento tecnico scientifico	<ul style="list-style-type: none">Indirizzamento delle attività di valutazione in progress ed ex postFornitura di supporto tecnico al DPAIndicazioni sulle collaborazioni scientifiche ed operative da attivare
DiSB	<ul style="list-style-type: none">Ente GestoreCoordinamento generaleSvolgimento delle attività scientificheRendicontazione di risultato e Rendicontazione finanziaria all'Ente Gestore

16 Percorso Operativo

16.1 Articolazione in macro fasi e attività

Data di inizio prevista: 01/09/2013 (tale data potrà essere ridefinita in base al ricevimento da parte del DPA della lettera ufficiale di avvio delle attività)

Durata totale prevista: 1 anno 2 anni 3 anni
 Durata totale finanziata: I annualità I e II annualità I, II e III annualità

Fine prevista delle attività finanziarie(salvo proroghe): 30/08/2014 (e comunque dopo 12 mesi dall'avvio delle attività)

Macro Fasi		Descrizione
Studio	WP1 Organizzazione delle attività di ricerca	La prima macro fase è rappresentata dall'organizzazione dell'attività di ricerca tra le diverse UR e dalla valutazione dei dati preliminari precedentemente acquisiti
	WP2 Valutazione dati preliminari	
Realizzazione	WP1 Acquisizione materiali	In queste fasi verranno acquisiti i materiali necessari per la realizzazione del progetto (animali, reagenti, apparecchiature) ed eseguite tutte le procedure sperimentali per la realizzazione degli obiettivi indicati nel progetto.
	WP2 Preparazione animali da esperimento	
	WP3 Studio della farmacocinetica e comportamento	
	WP4 Studio della neurochimica e neurofisiologia	
	WP5 Studio del comportamento di autosomministrazione	
Implementazione	WP1 Raccolta dati e analisi statistica	Queste fasi serviranno per la raccolta e l'analisi statistica dei dati il confronto con quelli preliminari. Sono previsti almeno quattro incontri telematici tra le UR.
	WP2 Incontri telematici	
Verifica	WP1 Verifica raggiungimento risultati attesi	Le fasi di verifica indicate serviranno per valutare i risultati ottenuti e paragonarli con quelli attesi. Il responsabile, confrontandosi con le varie UR mediante riunioni telematiche, verificherà il raggiungimento dei Base Line Results.
	WP2 Verifica raggiungimento BLR	
	WP3 Verifica qualità dati	
	WP4 Incontri telematici	
Messa a regime	WP1 Conclusione studio	Questa è la fase conclusiva dello studio durante la quale i dati ottenuti dalle varie UR verranno utilizzati per la preparazione del report finale. I risultati ottenuti verranno divulgati mediante partecipazione a congressi nazionali ed internazionali e pubblicazioni di articoli scientifici.
	WP2 Divulgazione risultati	

Possibilità di Proroga: SI NO

Possibilità di Rifiinanziamento: SI NO

La possibilità di proroga della durata del progetto è regolamentata dall'Accordo di Collaborazione
 La possibilità di rifiinanziamento è condizionata all'ottenimento di parere positivo da parte del DPA sulle attività svolte e alla disponibilità finanziaria.

16.2 GANTT preventivo

N	Attività	Mesi												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Studio	WP1	Organizzazione delle attività di ricerca	■											
	WP2	Valutazione dati preliminari	■											
Realizzazione	WP1	Acquisizione materiali	■			■	■							
	WP2	Preparazione animali da esperimento		■				■	■					
	WP3	Studio della farmacocinetica e comportamento		■	■	■	■			■	■	■	■	
	WP4	Studio della neurochimica e neurofisiologia		■	■	■	■							
	WP5	Studio del comportamento di autosomministrazione												
ATTIVITÀ DI VALUTAZIONE (MILESTONES)		R= Report												
REPORT DI RISULTATO														
RENDICONTAZIONE FINANZIARIA														



Implementazione	WP1	Raccolta dati e analisi statistica											
	WP2	Incontri telematici											
Verifica	WP1	Verifica raggiungimento risultati attesi											
	WP2	Verifica raggiungimento BLR											
	WP3	Verifica qualità dati											
	WP4	Incontri telematici											
Messa a regime	WP1	Conclusione studio											
	WP2	Divulgazione dati											
ATTIVITÀ DI VALUTAZIONE (MILESTONES)		R= Report											
REPORT DI RISULTATO													
RENDICONTAZIONE FINANZIARIA													

16.3 Agenda Reporting

Sigla Report	Data prevista	Tipo di rapporto
RR1	Dopo 6 mesi	Report in progress, dettagliato, sulla base degli obiettivi e degli indicatori pre-dichiarati riguardante i risultati tecnici ottenuti
RF1	Dopo 6 mesi	Rendicontazione finanziaria primo semestre
RR2	Dopo 12 mesi	Report in progress, dettagliato, sulla base degli obiettivi e degli indicatori pre-dichiarati riguardante i risultati tecnici ottenuti
RF2	Dopo 12 mesi	Rendicontazione finanziaria finale

17 Risorse e piano finanziario

Il budget totale previsto per le attività di progetto è stabilito a favore dell'Ente gestore un finanziamento omnicomprensivo di € 40.000,00 (Quarantamilaeuro/00) per sostenere le spese di realizzazione così come previste e riportate nel piano finanziario del progetto, ripartito secondo le seguenti quote:

BENI E SERVIZI (Inventariabili e di consumo)	€ 20000
PERSONALE A CONTRATTO	€ 15000
MISSIONI	€ 5000
TOTALE	€ 40000

I riparti tra le singole voci sono indicativi
 Sono esclusi finanziamenti a favore di personale dirigente di ruolo.

17.1 Quote di finanziamento previste

Il finanziamento sarà erogato con le seguenti modalità:

- I QUOTA: 50% dopo la registrazione da parte degli organi di controllo del decreto di approvazione della presente Convenzione e del relativo impegno di spesa e il ricevimento della lettera di "avvio attività"
- II QUOTA: 40% a fronte della valutazione positiva da parte del Dipartimento dei risultati raggiunti e della rendicontazione finanziaria relativa alla prima tranche del finanziamento che dovrà dimostrare l'effettiva spesa sostenuta e il completo utilizzo della stessa;
- III QUOTA: 10% dopo la presentazione della rendicontazione finale di risultato e della rendicontazione finanziaria finale e a fronte della valutazione positiva da parte del Dipartimento.

18 Accreditazioni ente gestore

18.1 Precedenti studi e interventi dell'ente gestore

La sezione di Neuropsicofarmacologia del Dipartimento di Scienze Biomediche (Ex Dipartimento di Tossicologia), fa parte di un Centro di Eccellenza per lo studio delle Tossicodipendenze e sta svolgendo degli studi per conto del DPA che vengono indicati di seguito e di cui è responsabile il Prof. G. Di Chiara.

THC-GATE, con l'obiettivo di determinare, in modelli genetici animali, se l'esposizione in età adolescenziale al THC possa incrementare la vulnerabilità all'abuso di oppiacei e alla comparsa di sindromi psichiatriche in individui geneticamente predisposti.

MIRNA, con l'obiettivo di determinare mediante microRNA se siano presenti modificazioni genetiche in aree cerebrali cruciali per lo sviluppo delle dipendenze.

18.2 Pubblicazioni

Caboni P, Sarais G, Vargiu S, **De Luca MA**, Garau VL, Ibba A, Cabras P (2008). LCMSMS determination of rotenone, deguelin, and rotenolone in human serum. *CHROMATOGRAPHIA*, vol. 68, p. 739-745.

Baiguera C, Alghisi M, Pinna A, Bellucci A, **De Luca MA**, Frau L, Morelli M, Ingrassia R, Benarese M, Porrini V, Pellitteri M, Bertini G, Fabene PF, Sigala S, Spillantini MG, Liou HC, Spano PF, Pizzi M. (2012) Late-onset Parkinsonism in NFκB/c-Rel-deficient mice. *Brain*. 2012 Sep;135(Pt 9):2750-65.

Bassareo V, **De Luca MA**, Aresu M, Aste A, Ariu T, Di Chiara G (2003). Differential adaptive properties of accumbens shell dopamine responses to ethanol as a drug and as a motivational stimulus. *Eur J Neurosci*. 17(7):1465-72.

Bimpisidis Z, **De Luca MA**, Pisanu A, Di Chiara G.(2012) Lesion of medial prefrontal dopamine terminals abolishes habituation of accumbens shell dopamine responsiveness to taste stimuli. *Eur J Neurosci*. 2012 Dec 6.

De Luca MA, Bimpisidis Z, Bassareo V, Di Chiara G. Influence of morphine sensitization on the responsiveness of mesolimbic and mesocortical dopamine transmission to appetitive and aversive gustatory stimuli. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 Aug;216(3):345-53. Epub 2011 Feb 22. PubMed PMID: 21340470.

De Luca MA, Solinas M, Bimpisidis Z, Goldberg SR, Di Chiara G. (2012) Cannabinoid facilitation of behavioral and biochemical hedonic taste responses. *Neuropharmacology*. 2012 Jul;63(1):161-8. Epub 2011 Nov 2.

De Luca MA, Bassareo V, Bauer A, Di Chiara G.(2007) Caffeine and accumbens shell dopamine. *J Neurochem*. 2007 Oct;103(1):157-63. Epub 2007 Jul 27. PubMed PMID: 17655660.

Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, **De Luca MA**, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D.(2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*. 47 Suppl 1:227-41. Review.

G Di Chiara, V Valentini, **De Luca MA**, S Fenu (2011). Possibile ruolo dei recettori 5-HT6 nelle dipendenze. *ITALIAN JOURNAL ON ADDICTION*, ISSN: 2239-5652

Lecca S, **Melis M**, Luchicchi A, Ennas MG, Castelli MP, Muntoni AL, et al (2011). Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36(3): 589-602.

Lecca S, **Melis M**, Luchicchi A, Muntoni AL, Pistis M (2012). Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology* 37(5): 1164-1176.

Marti M, Mela F, Veronesi C, Guerrini R, Salvadori S, Federici M, Mercuri NB, Rizzi A, Franchi G, Beani L, Bianchi C, Morari M. Blockade of nociceptin/orphanin FQ receptor signaling in rat substantia nigra pars reticulata stimulates nigrostriatal dopaminergic transmission and motor behavior.(2004) *J Neurosci*. 2004 Jul 28;24(30):6659-66.

Marti M, Trapella C, Viaro R, Morari M. The nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist J-113397 and L-DOPA additively attenuate experimental parkinsonism through overinhibition of the nigrothalamic pathway. *J Neurosci*. 2007

Marti M, Trapella C, Viaro R, Morari M. The nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist J-113397 and L-DOPA additively attenuate experimental parkinsonism through overinhibition of the nigrothalamic pathway. *J Neurosci*. 2007

Valentini V, Piras G, **De Luca MA**, Perra V, Bordi F, Borsini F, Frau R, Di Chiara G.(2012) Evidence for a role of a dopamine/5-HT6 receptor interaction in cocaine reinforcement. *Neuropharmacology*. 2013 Feb;65:58-64. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.08.025. Epub 2012 Sep 7.

18.3 Precedenti incarichi istituzionali

(Titolo, istituzione, anno, durata, portata, specificando se trattasi di titolarità o collaborazione)

Titoli Accademici:

1999 Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (106/110) presso l'Università di Cagliari
2002 Specializzazione in Tossicologia (50/50 e lode) presso l'Università di Cagliari
2006 Dottorato di ricerca in Farmacologia delle Tossicodipendenze presso l'Università di Cagliari

Esperienze professionali:

1999 Titolare di una borsa di studio "Socrates" (Erasmus) presso il Dipartimento di Farmacologia, Università di Santiago di Compostela (Spagna) sotto la responsabilità scientifica del Prof. JA Fontenla
1999-2002 Titolare di una borsa di studio ministeriale per la frequenza della Scuola di Specializzazione in Tossicologia
2001-2001 Tutor per il corso di Farmacologia (titolare Prof. G. Di Chiara), Facoltà di Farmacia, Università di Cagliari
2002 Guest Researcher presso il NIDA (Baltimore, USA) presso i laboratori del Dott. SR Goldberg
2003-2006 Ricercatore a contratto (assegnio di ricerca legge 449/97) presso la Facoltà di Farmacia dell'Università di Cagliari, sotto la responsabilità scientifica della Prof.ssa Micaela Morelli
2004 Guest Researcher presso il NIDA (Baltimore, USA) presso i laboratori del Dott. SR Goldberg
2010 short visit presso l'Universitat Pompeu Fabra (Barcelona) presso i laboratori del Prof. Rafael Maldonado
2012 Diploma di Scuola Nazionale delle Dipendenze del DPA
2006 ad oggi Ricercatore confermato in ruolo presso la Facoltà di Farmacia dell'Università di Cagliari

Incarichi di insegnamento:

AA 2007-2008 Docente incaricato di Tossicologia per il Corso di Laurea in CTF, Fac. Farmacia, UniCa
AA 2008-2010 Docente incaricato di Farmacologia delle sostanze d'abuso per il Corso di Laurea in Tossicologia, Fac. Farmacia, UniCa
AA 2010-2013 Docente incaricato di Tossicologia generale e del farmaco per il Corso di Laurea in Tossicologia, Fac. Farmacia, UniCa

Principali linee di ricerca:

1. Studio delle modificazioni della trasmissione dopaminergica nel sistema mesolimbico e mesocorticale in seguito alla presentazione di stimoli condizionati ai farmaci d'abuso o al cibo ed in seguito alla sensibilizzazione alla morfina.
2. Studio del potenziale d'abuso della caffeina e ruolo dei recettori A1 nelle modificazioni comportamentali indotte dalla caffeina.
3. Studio del meccanismo d'azione degli antipsicotici.
4. Studio del meccanismo d'azione di agonisti ed antagonisti delle tachichinine.
5. Studio in vivo di farmacocinetica e farmacodinamica di nanocarriers per la veicolazione di peptidi al sistema nervoso centrale.
6. Studio delle proprietà di rinforzo degli endocannabinoidi e dei cannabinoidi sintetici

18.4 Partecipazione a ricerche, gruppi di lavoro ecc. (Titolo, istituzione, anno)

2012 Membro comitato organizzatore Congresso Dopamine 2013
2012 Partecipazione Italian School on Addiction
2004 Guest Researcher presso il NIDA (Baltimore, USA) presso i laboratori del Dott. SR Goldberg
2002 Guest Researcher presso il NIDA (Baltimore, USA) presso i laboratori del Dott. SR Goldberg

Affiliazioni:

SINS Società Italiana di Neuroscienze
Centro di Eccellenza sulla "Neurobiologia delle Dipendenze"
INN Istituto Nazionale di Neuroscienze

Riferimenti bibliografici

Antunes M, Biala G. (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 13(2):93-110.

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., and Ferreirós, N. (2009). "Spice" and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *J. Mass Spectrom.* 44, 832-837.

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.

Calò G, Rizzi A, Marzola G, Guerrini R, Salvadori S, Beani L, Regoli D, Bianchi C. (1998) Pharmacological characterization of the nociceptin receptor mediating hyperalgesia in the mouse tail withdrawal assay. *Br J Pharmacol.* 125(2):373-8.

- 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.
- De Luca MA, Bassareo V, Bauer A, Di Chiara G. (2007) Caffeine and accumbens shell dopamine. *J Neurochem.* 103(1):157-63.
- 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.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2009). Understanding the "Spice" Phenomenon. Lisbon: EMCDDA; 2009. Available at: <http://www.emcdda.europa.eu/html.cfm/index90917EN.html> [accessed April 23, 2011].
- Every-Palmer S. (2011) Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: an explorative study. *Drug Alcohol Depend.* 117: 152-157.
- 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>? [accessed June 2, 2011].
- French ED (1997). delta9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. *Neurosci Lett* 226(3): 159-162.
- French ED, Dillon K, Wu X (1997). Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* 8(3): 649-652.
- 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> [accessed April 3, 2011].
- Gavioli EC, Duarte FS, Guerrini R, Calo G, Rae GA, M De Lima TC. (2008) GABA(A) signalling is involved in N/OFQ anxiolytic-like effects but not in nocistatin anxiogenic-like action as evaluated in the mouse elevated plus maze. *Peptides.* 29(8):1404-12.
- 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.
- Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR. Self-administration of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl).* 2003 Sep;169(2):135-40. Epub 2003 Jun 24. PubMed PMID: 12827345.
- Kronstrand, R., Roman, M., Thelander, G., and Eriksson, A. (2011). Unintentional fatal intoxications with mitragynine and o-desmethyltramadol from the herbal blend krypton. *J. Anal.Toxicol.* 35, 242-247.
- Lapoint J, James LP, Moran CL, Nelson LS, Hoffman RS, Moran JH. (2011). Severe toxicity following synthetic cannabinoid ingestion. *Clin Toxicol.* 49: 760-764.
- Lecca D, Cacciapaglia F, Valentini V, Di Chiara G. (2006) Monitoring extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens shell and core during acquisition and maintenance of intravenous WIN 55,212-2 self-administration. *Psychopharmacology* 188(1):63-74.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Ennas MG, Castelli MP, Muntoni AL, et al (2011). Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36(3): 589-602.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Muntoni AL, Pistis M (2012). Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology* 37(5): 1164-1176
- Marti M, Mela F, Veronesi C, Guerrini R, Salvadori S, Federici M, Mercuri NB, Rizzi A, Franchi G, Beani L, Bianchi C, Morari M. (2004) Blockade of nociceptin/orphanin FQ receptor signaling in rat substantia nigra pars reticulata stimulates nigrostriatal dopaminergic transmission and motor behavior. *J Neurosci.* 24(30):6659-66.
- Marti M, Mela F, Fantin M, Zucchini S, Brown JM, Witta J, Di Benedetto M, Buzas B, Reinscheid RK, Salvadori S, Guerrini R, Romualdi P, Candeletti S, Simonato M, Cox BM, Morari M. (2005) Blockade of nociceptin/orphanin FQ transmission attenuates symptoms and neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *J Neurosci.* 25(42):9591-601.
- Marti M, Trapella C, Viaro R, Morari M. (2007) The nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist J-113397 and L-DOPA additively attenuate experimental parkinsonism through overinhibition of the nigrothalamic pathway. *J Neurosci.* 27(6):1297-307.
- Marti M, Viaro R, Guerrini R, Franchi G, Morari M. (2009) Nociceptin/orphanin FQ modulates motor behavior and primary motor cortex output through receptors located in substantia nigra reticulata. *Neuropsychopharmacology* 34(2):341-55.
- McLachlan G. (2009) Taking the spice out of legal smoking mixtures. *Lancet.* 2009 Aug 22;374(9690):600.
- Melis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, Lutz B, Marsicano G, Di Marzo V, Gessa GL, Pistis M. (2004) Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci.* 24(47):10707-15.
- Miczek KA, O'Donnell JM. Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. (1978) *Psychopharmacology* 57(1):47-55.
- 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.

Nin MS, Martinez LA, Pibiri F, Nelson M, Pinna G. (2011) Neurosteroids reduce social isolation-induced behavioral deficits: a proposed link with neurosteroid-mediated upregulation of BDNF expression. *Front Endocrinol* 2: 1-12.

Nadler JJ, Moy SS, Dold G, Trang D, Simmons N, Perez A, Young NB, Barbaro RP, Piven J, Magnuson TR, Crawley JN. (2004) Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes Brain Behav.* 3(5):303-14.

Paxinos and Watson (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates* (IV ed) Academic Press.

Pinna G, Agis-Balboa RC, Pibiri F, Nelson M, Guidotti A, Costa E. (2008) Neurosteroid biosynthesis regulates sexually dimorphic fear and aggressive behavior in mice. *Neurochem Res.* 33(10):1990-2007.

Pontieri, F.E. et al (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 USA*,92: 12043-12308 .

Schneir, A. B., Cullen, J., and Ly, B.T. (2011). "Spice" girls: synthetic cannabinoid intoxication. *J. Emerg. Med.* 40, 296–299.

Seely KA, Brents LK, Radomska-Pandya A, Endres GW, Keyes GS, Moran JH, Prather PL. (2012) A Major Glucuronidated Metabolite of JWH-018 Is a Neutral Antagonist at CB1 Receptors. *Chem Res Toxicol.* 2012 Mar 15. [Epub ahead of print]

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.

Szabo B, Siemes S, Wallmichrath I. Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur J Neurosci.* 2002 Jun;15(12):2057-61.

Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G. (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, Jun 27;276(5321):2048-50.

Uchiyama N, Kikura-Hanajiri R, Ogata J, Goda Y. (2010) Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Sci Int.* May 20;198(1-3):31-8.

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.

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.