

# Allegato A:

## METODI SPERIMENTALI

Al fine di elaborare un profilo completo degli effetti biologici e delle alterazioni fisiopatologiche provocate dall'assunzione delle NS-Drugs, selezionate e proposte dal N.E.W.S., le differenti Unità impiegheranno delle metodologie sperimentali complementari e coordinate in maniera modulare secondo lo schema riportato (Fig 1). Gli studi comportamentali (Unità 1, 2, 3) precederanno temporalmente gli studi di neuroimaging (Unità 1), neurodegenerazione (Unità 2), di neurochimica (Unità 2) e di elettrofisiologia (Unità 4).

In particolare, gli studi comportamentali saranno a loro volta eseguiti in modo da identificare primariamente le dosi di NS-Drugs in grado di alterare l'attività comportamentale generale (gross behaviour), la temperatura corporea, la nocicezione e l'attività motoria (moduli 1 e 2, Unità 1; tab 1). In questo modo saranno identificate le dosi che interferendo con questi parametri funzionali e comportamentali potrebbero interferire con gli studi successivi riguardanti lo studio di funzioni cerebrali più complesse quali la memoria, l'ansia, l'aggressività, la socialità, ed il comportamento di disperazione (moduli 3, 4, 5 e 6 Unità 1; tab 1). Infine, mediante somministrazioni ripetute (studio cronico, Fig 2) di NS-Drugs a dosi definite nei moduli sperimentali precedenti saranno intrapresi studi comportamentali al fine di identificare gli effetti di NS-Drugs su abuso, dipendenza, tolleranza, astinenza (Unità 2 e 3). I risultati più rilevanti degli studi cronici saranno oggetto di valutazione mediante analisi di neuroimaging (Unità 1) e neurodegenerazione (Unità 2).

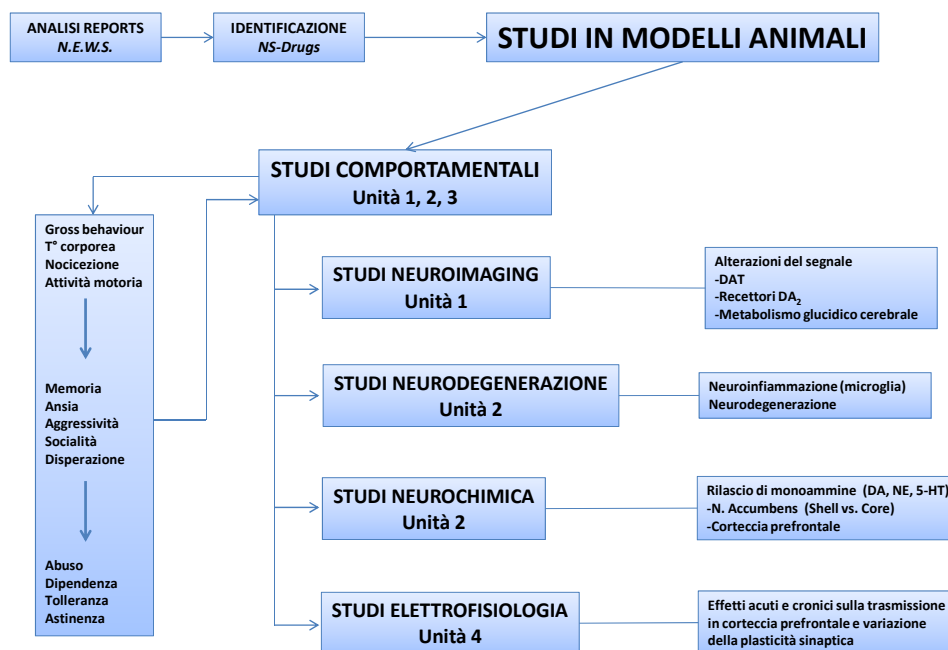


FIGURA 1

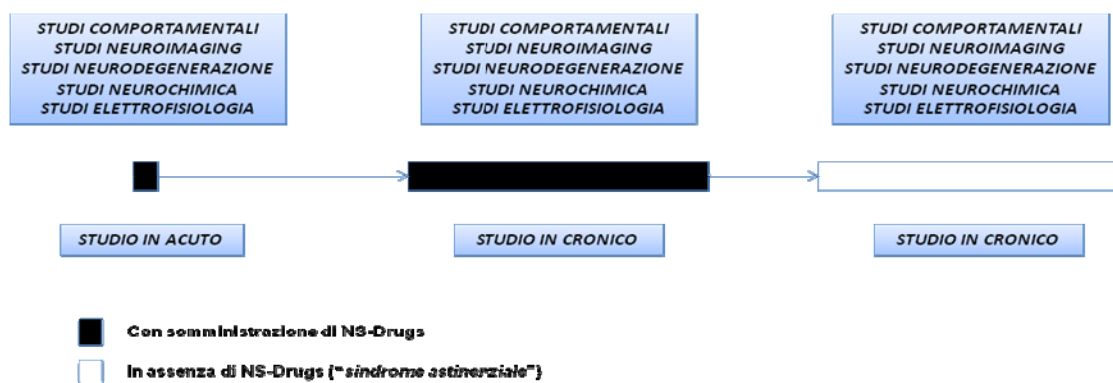


Figura 2 Schema per lo studio cronico

## UNITA' 1 Ferrara (responsabile dott. M. Marti)

L'unita si occuperà degli studi COMPORTAMENTALI (dott. Marti), di NEUROIMAGING (dott. Uccelli e dott. Di Domenico) e di SINTESI E PREPARAZIONE CHIMICA (dott. Trapella)

L'UNITA' 1 essendo direttamente coinvolta nello screening rapido degli effetti delle NS-Drugs si propone di studiare 8-12 composti l'anno, 16-20 composti in due anni. Le NS-Drugs che avranno evidenziato effetti biologici e fisiopatologici rilevanti negli studi dell'UNITA'1 saranno considerati in maniera più approfondita negli studi delle altre UNITA'.

### STUDI COMPORTAMENTALI (dott. M. Marti)

#### 1) VALUTAZIONE DEL COMPORTAMENTO GENERALE DELL'ANIMALE (Gross behaviour)

Con questo test si valuta l'effetto di un trattamento acuto con la sostanza in esame sul comportamento dell'animale. Si tratta di un test preliminare utilizzato per avere una indicazione rapida sul suo profilo farmacologico e tossicologico e sugli eventuali dosaggi da utilizzare negli esperimenti successivi. Verranno monitorati i seguenti segni comportamentali:

**Attività locomotoria:** aumento dell'attività e' indice di effetto psicostimolante, una diminuzione effetto deprimente (open field).

**Grooming:** e' segno di attivazione del sistema dopaminergico centrale.

**Head twitches** e' segno di attività serotonergica (ad es. attivazione dei recettori 5-HT2) tipico degli allucinogeni (Canal et al., 2010).

**Sniffing, Licking, Rearing, Biting or Gnawing**, segno di attività dopaminergica.

**Self-injury**, segno di stimolazione massiccia di recettori dopaminergici.

**Coda alla Straub**, segno di stimolazione oppioide nel topo.

**Effetti sul sistema autonomo:** occhi (ptosi palpebrale), escrezioni ed secrezioni (feci, urina, saliva), pilo erezione, colore della pelle (vasodilatazione, vasocostrizione)

- forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo isolato)
- dosi testate: 3 dosi + veicolo
- numero totale di animali: 24 topi
- tempo richiesto: 2-7 giorni

- Canal et al., (2010) *Psychopharmacology*, 209: 163-174.

#### 2) VALUTAZIONE DELLA TEMPERATURA CORPOREA.

Per valutare i potenziali effetti di ipertermia o ipotermia indotti dalle NS-Drugs la temperatura corporea dell'animale sarà misurata mediante una sonda (2 mm diametro) che viene, preventivamente lubrificata, 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 della NS-Drugs.

- forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)

-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 topi  
-tempo richiesto: 2-3 giorni

-Ruzza C. et al., (2012) *Neuropharmacology*, 62: 1999-2009.

### 3) VALUTAZIONE DEL DOLORE ALLO STIMOLO TERMICO.

Per valutare gli effetti sulla nocicezione indotti dalle NS-Drugs 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).

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 topi  
-tempo richiesto: 14 giorni

-Calò G et al., (1998) *British Journal of Pharmacology*, 125: 373-378.

### 4) VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' MOTORIA E DELLA FORZA.

Gli effetti delle sostanze psicoattive 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 (Marti et al., 2004, 2005, 2007, 2008, 2009). Inoltre, sarà misurata l'attività motoria spontanea nel test dell'open field per valutare eventuali effetti sull'attivazione spontanea della locomozione tipica delle sostanze psicostimolanti (es. amfetamina e cocaina). La forza muscolare sarà valutata mediante grip strength.

**Bar test:** Valuta il grado di acinesia, cioè il tempo impiegato a iniziare un movimento. Ciascun topo viene posto su un tavolo e le zampe anteriori sono poste alternativamente su blocchi di legno a tre altezze crescenti (1.5, 3 e 6 cm). Viene registrato il tempo (in secondi) speso da ciascuna zampa sul blocco (tempo di immobilità: cut-off di 20 sec). L'acinesia viene calcolata come tempo totale speso sui differenti blocchi.

**Drag test:** Misura l'abilità dell'animale di bilanciare la postura del corpo con le zampe anteriori in risposta ad uno stimolo dinamico imposto esternamente. Esso fornisce informazioni riguardo il tempo impiegato a iniziare ed eseguire un movimento (bradicinesia). Ciascun topo viene sollevato per la coda, lasciando le zampe anteriori sul tavolo, e trascinato all'indietro ad una velocità costante di circa 20 cm/sec per una distanza fissa (100 cm). Il numero di passi effettuati da ciascuna zampa anteriore viene registrato da due distinti osservatori. Per ogni animale vengono raccolte da cinque a sette misurazioni.

**Rotarod test:** Misura differenti parametri motori quali la coordinazione motoria, la capacità di locomozione (acinesia/bradicinesia), l'equilibrio, il tono muscolare e la motivazione a correre. Gli animali vengono posti su un cilindro rotante e testati a velocità crescenti (solitamente da 5 a 45 rpm; 180 sec ciascuna). La performance totale viene calcolata sommando i secondi trascorsi da ciascun animale sul rotarod alle diverse velocità.

**Open field:** Valuta l'effetto di sostanze ad attività psicostimolante attivanti la locomozione spontanea (es. cocaina, amfetamine). Gli animali saranno videoregistrati per 60 min e l'attività motoria analizzata off-line.

**Grip strength:** Valuta l'effetto delle sostanze sulla forza muscolare misurata mediante sull'utilizzo di una speciale griglia dalla quale l'operatore cerca di staccare l'animale che, spontaneamente o a causa di sostanze tossiche, si ancora alla struttura descritta. La griglia è connessa ad un dinamometro digitale che misura i grammi forza di trazione.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 topi  
-tempo richiesto: 14 giorni

-Marti M, et al., (2004) *The Journal of Neuroscience*, 24: 6659-6666.

-Marti M, et al., (2005) *The Journal of Neuroscience*, 19:25:9591-9601.

-Marti M, et al., (2007) *The Journal of Neuroscience*, 7:27:1297-1307.

-Marti M, et al., (2008) *The Journal of Neurochemistry*, 107:1683-1696.

-Marti M, et al., (2009) *Neuropsychopharmacology*, 34:341-355.

### 5) 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. Questo test si basa sulla tendenza spontanea dei roditori di dedicare più tempo ad esplorare un nuovo oggetto rispetto ad un oggetto familiare. La scelta di esplorare maggiormente il nuovo oggetto riflette l'apprendimento e la memoria verso l'oggetto già conosciuto. Il test viene condotto in un'arena a campo aperto (dimensione: 50 cm x 50 cm x 30 cm) in plexiglas con pareti e fondo scuri, con due diversi tipi di oggetti. Entrambi gli oggetti sono generalmente uguali in altezza e volume, ma sono diversi per forma e aspetto. Durante la fase di adattamento, gli animali sono posti ad esplorare l'arena vuota. Ventiquattro ore dopo il test di adattamento, gli animali sono posti nell'arena con due oggetti identici e posti a una distanza uguale. Due o 24 ore dopo i topi sono posti ad esplorare l'arena alla presenza dell'oggetto familiare ed un oggetto nuovo per testare la memoria di riconoscimento sia a breve (2 ore dopo) che a lungo termine (24 ore dopo). Il tempo trascorso esplorando ogni oggetto e la discriminazione dello stesso, misurati in valore percentuale sono registrati. Questo test è utile per valutare la compromissione della capacità cognitiva indotta da differenti sostanze.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 topi  
-tempo richiesto: 14 giorni

-Antunes M and Biala G (2011) *Cognitive Processing*, DOI 10.1007/s10339-011-0430-z.

#### 6) VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SUL COMPORTAMENTO D'ANSIA

Per valutare l'effetto dalle sostanze sul comportamento d'ansia sarà utilizzato il test del Labirinto elevato (**Elevated Plus Maze**; Gavioli et al., 2008). Il test del Labirinto viene ampiamente utilizzato per valutare l'effetto ansiogenico o ansiolitico di sostanze ad azione centrale nel roditore. L'apparato è a forma di labirinto a croce, elevato al di sopra del pavimento, con due braccia opposte chiuse, due braccia opposte aperte ed una zona centrale aperta. I topi sono liberi di esplorare il labirinto. Il loro comportamento è registrato per mezzo di una videocamera montata sopra il labirinto e analizzato utilizzando un sistema di monitoraggio video. Il topo in condizioni normali preferisce stazionare nelle braccia chiuse del labirinto. Pertanto, la sua maggiore permanenza nelle braccia aperte evidenzia un'azione ansiolitica del trattamento.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 topi  
-tempo richiesto: 14 giorni

-Gavioli EC et al., (2008) *Peptides*, 29, 1404-12.

#### 7) VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SUL COMPORTAMENTO AGGRESSIVO

Per valutare l'azione pro- o anti-aggressivante causata dalle sostanze psicoattive in esame, 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; Schuler Nin et al., 2011) ed è impiegato per valutare gli effetti di sostanze psicoattive sul comportamento aggressivo nel roditore (Mickzec and O'Donnell 1978; Pinna et al 2008).

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 topi  
-tempo richiesto: 21 giorni

-Mickzec KA and O'Donnell JM (1978) *Psychopharmacology*, 57: 47-55.

-Pinna G et al., (2008) *Neurochemistry Research*, 33: 1990-2007.

-Schuler Nin M et al., (2011) *Frontiers in Endocrinology*, 2: 1-12.

#### 8) VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SUL COMPORTAMENTO SOCIALE

Per valutare l'effetto causato dalle sostanze presenti nelle NS-Drugs sul comportamento sociale, sarà utilizzato il test delle tre camere (**Three-Chamber test**; Nadler et al., 2004) e quello della dominanza sociale nel test del tubo (**Tube Dominance test**; Rodriguiz et al., 2004).

**Three-Chamber test** : valuta la memoria sociale del topo ed il suo interesse a socializzare con nuovi individui. Infatti, i roditori preferiscono normalmente passare il loro tempo in gruppo, assieme con un altro roditore (socialità) ed indagare più tempo sulla presenza di un nuovo animale "sconosciuto" presente nell'ambiente rispetto ad uno già familiare (novità sociale). Sulla base di

queste indicazioni etologiche, il test delle tre camere permette di indagare l'effetto di sostanze in grado di indurre un deficit di socializzazione, promuovere l'isolamento sociale (sintomo negativo della schizofrenia e di alcune sostanze psicoattive).

Il test si svolge in tre sessioni con l'apertura successiva delle tre camere. Dopo l'adattamento nella camera vuota, il soggetto incontra un individuo nuovo, mai incontrato, all'interno di una gabbietta in una camera (Mouse 1, fig A), mentre l'altra gabbietta nella camera opposta è ancora vuota (questa fase è detta di socialità). Successivamente, il soggetto è posto nell'apparato dove incontra sia il Mouse 1, già esplorato e conosciuto, che il nuovo individuo (Mouse 2, fig A) mai visto (questa è la fase di novità sociale). Il tempo trascorso annusando ogni gabbietta, il tempo trascorso in ciascuna camera, e il numero di attraversamenti in ogni camera sono contati.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 topi  
-tempo richiesto: 14 giorni

-Nadler et al., (2004). *Genes, Brain and Behavior*, 3: 303-314.

**Tube Dominance test:** valuta la dominanza sociale del topo e la sua motivazione a conquistare questo spazio, attraverso l'attuazione di un comportamento agonistico di tipo aggressivo che tuttavia non esita in attacchi violenti e lesivi nei confronti dell'avversario. In questo test, due topi sono collocati alle due estremità di un tubo di plexiglass bianco (3,7 cm. di diametro interno, 30,5 cm. di lunghezza) e rilasciati simultaneamente. Gli animali interagiscono al centro del tubo dove inizialmente sono separati da due setti di plexiglass che vengono rimossi simultaneamente. L'animale più dominante e che mostra maggiore aggressività forza il suo avversario fuori dal tubo. Il confronto finisce quando un topo esce completamente dal tubo. Il topo che rimane nel tubo è designato come vincitore (punteggio 1), mentre il topo che si è ritirato è il perdente (punteggio 0). Oltre a questi parametri si valuta anche il tempo che il topo impiega a vincere ed il comportamento agonistico evidenziato. Questo comprende i movimenti propriamente aggressivi di ispezione ano-genitale, di ispezione laterale dell'avversario e di coda a sonaglio. Mentre i movimenti di spinta (pushing) costituiscono un comportamento di agonismo non aggressivo.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 topi  
-tempo richiesto: 14 giorni

-Rodriguez et al., (2004). *Behavioural Brain Research*, 148: 185-198.

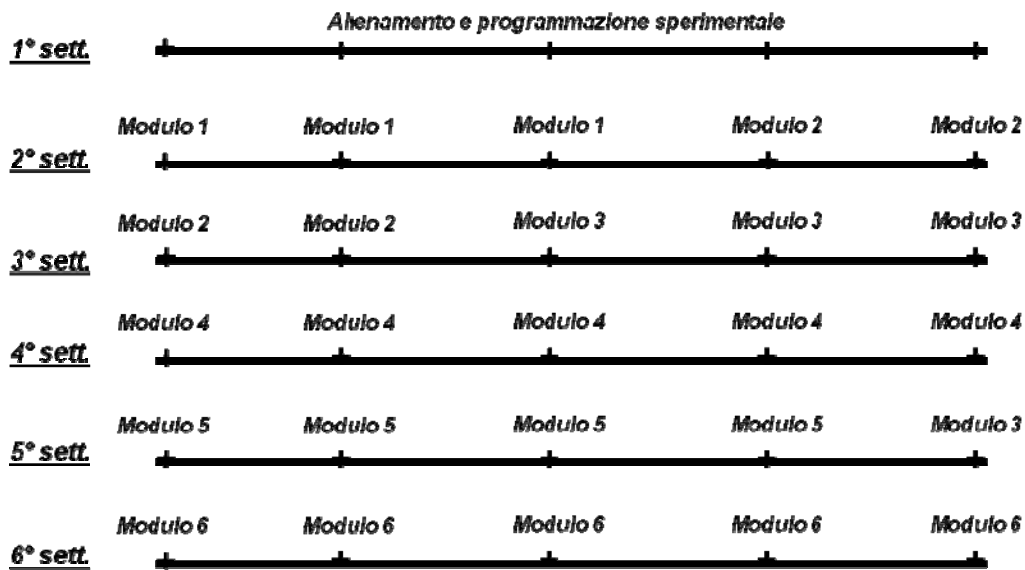
#### 9) VALUTAZIONE DELLA MOTIVAZIONE E TEST DI "DISPERAZIONE COMPORTAMENTALE".

Per valutare l'effetto delle NS-Drugs sulla capacità motivazionale del topo e sul suo comportamento di "arrendevolezza" e "disperazione" verrà utilizzato il test di sospensione per la coda (Tail Suspension Behavioural Despair Test; Porsolt et al., 2001). Il protocollo prevede di imporre una posizione obbligata all'animale semplicemente sospendendolo per la coda (tempo massimo di sospensione 6 min). Il topo inizialmente cerca di fuggire dalla posizione di sospensione, impegnandosi in movimenti vigorosi e poi, dopo pochi minuti, diviene immobile. L'immobilità indica che il topo comprende l'impossibilità di poter sfuggire, evidenziando un comportamento di rassegnazione e perdita di speranza. L'immobilità è quindi associata ad una forma di "disperazione comportamentale."

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 topi  
-tempo richiesto: 7 giorni

-Porsolt RD et al., (2001) *Curr Protoc Neurosci. Chapter 8:Unit 8.10A.*

## DISEGNO SPERIMENTALE



**Modulo 1:** Gross behaviour + open field

**Modulo 2:** T<sup>o</sup> corporea + nocicezione (*tail withdrawal*) + attività motoria (*bar. drag and rotarod test, grip strength*)

**Modulo 3:** Aggressività (*resident-intruder test*) + attività motoria (*bar. drag and rotarod test*)

**Modulo 4:** Memoria a breve e a lungo termine (*novel object recognition*)

**Modulo 5:** Ansia (*elevated plus maze*) + comportamento di disperazione (*tail suspension despair test*)

**Modulo 6:** Comportamento sociale (*three chamber test e tube dominance test*)

Tabella 1

### STUDI DI NEUROIMAGING (dott. Uccelli e dott. Di Domenico)

La Sezione di Medicina Nucleare dell'Università di Ferrara dispone di un tomografo YAP-(S)PET equipaggiato con un sistema CT, dedicato esclusivamente a studi su animali; questa macchina ha infatti caratteristiche adatte allo scopo. In particolare, l'elevata sensibilità dello strumento permette di stimare variazioni di attività, in un organo di interesse, su intervalli di tempo ridotti e la risoluzione spaziale altresì elevata (3mm per la SPECT e 2mm per la PET) è in grado di distinguere organi di dimensioni millimetriche.

Il tomografo permette di effettuare indagini sia in modalità PET (tomografia ad emissione di positroni) che SPECT (tomografia ad emissione di fotone singolo), queste indagini forniscono una informazione di tipo *funzionale* relativamente agli organi in esame, unitamente alle indicazioni di tipo *morfologico* permesse dalla presenza della CT.

Lo scanner permette di ottenere risultati quali/quantitativi e morfologici; in altre parole si possono estrarre, direttamente dalle immagini ricostruite, le informazioni su eventuali variazioni di attività in un particolare organo target.

Il tomografo YAP-(S)PET verrà utilizzato per valutare l'azione delle nuove sostanze psicoattive a livello del sistema dopaminergico di modelli animali mediante l'impiego di tre diversi radiotraccianti:

- (1) il DaTscan, ovvero ioflupano marcato con I-123 che permetterà la visualizzazione dei trasportatori della dopamina localizzati sulla membrana pre-sinaptica e quindi il re-uptake della dopamina,
- (2) la iodobenzamide (IBMZ) marcata con I-123 per fare l'imaging dei recettori dopaminergici post-sinaptici D2,
- (3) il fluorodesossiglucosio (FDG) marcato con F-18 per studiare il metabolismo glucidico cerebrale.

Lo studio, condotto su quattro diversi gruppi di animali (non trattati, trattati in acuto, trattati in cronico e trattati in cronico ma sottoposti a spiazzamento con opportuno antagonista per indurre una sindrome astinenziale) sarà condotto seguendo il seguente protocollo:

- agli animali, precedentemente anestetizzati, verrà somministrato il radiofarmaco mediante iniezione retrobulbare; successivamente verranno posizionati su un lettino stereotassico per assicurare la simmetria delle immagini e specifici punti di riferimento spaziale.

- Acquisizione tomografica centrata sulla testa dell'animale che avrà un inizio ed una durata diversa in base al tracciante utilizzato.
- Ricostruzione dei dati utilizzando anche la tecnica di sottrazione dello scatter.
- Ricostruzione e analisi delle immagini.

La dose di sostanza psicoattiva impiegata negli studi di neuroimaging sarà unica e selezionata in base ai risultati più significativi ottenuti negli studi comportamentali.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
 -dosi testate: 1 dose + veicolo  
 -numero totale di animali: 6 topi  
 -tempo richiesto: 14 giorni

### **STUDI DI SINTESI E PREPARAZIONE CHIMICA (dott. Trapella)**

Il laboratorio di sintesi organica del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche è attrezzato con tutti gli strumenti necessari alla sintesi organica, per esempio sono presenti due cappe chimiche per le reazioni, 2 rotavapor con pompa meccanica ed un rotavapor con pompa da vuoto ad 1 mBar dotato di un refrigerante criostatico a dito freddo. Il laboratorio dispone anche di un sistema di cromatografia a media pressione per la separazione di medie/grosse quantità di sostanze (da 100mg a 50gr). Dal punto di vista strumentale abbiamo la possibilità di utilizzare i seguenti strumenti:

- 1) Spettrometro di Massa ESI ZMD 2000 Waters; utilizzabile per la caratterizzazione veloce di molecole organiche fino ad un peso molecolare di 2000da.
- 2) Spettrometro di Massa ESI-Q-TOF dotato di nano-HPLC Agilent 6520 series; questo strumento permette la separazione analitica e la caratterizzazione attraverso la massa esatta di molecole con peso molecolare da 250 a 20.000Da, la possibilità di ottenere la massa esatta permette anche una prima caratterizzazione della molecola come specie unica. Inoltre l'utilizzo del nano-HPLC permette la separazione anche di quantità femtomolari di analita.
- 3) Spettrometro NMR Varian 400MHz; la caratterizzazione ultima delle molecole pulite viene effettuata tramite spettrometria di risonanza magnetica nucleare (NMR), la possibilità di ottenere sia lo spettro del protone che del carbonio 13, sia tutta una serie di spettri eterocorrelati (1H-13C, 1H-1H) permette di definire in maniera sicura la struttura delle molecole organiche.
- 4) HPLC Preparativo Waters Delta Prep 4000; Nel caso le quantità di sostanza siano molto basse si può ricorrere alla tecnica dell'HPLC preparativo per separare piccole quantità (30mg) di sostanze ed una volta pulito l'analita in oggetto potrà essere sottoposto a tutte le analisi precedentemente descritte per ottenerne la struttura finale.

Dal punto di vista della sintesi di molecole organiche ci sono tutte le expertise per poter sintetizzare diversi tipi di composti che potranno essere poi utilizzati come standard analitici di confronto nelle vari tecniche analitiche.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
 -dosi testate: Diverse dosi in dipendenza dalla sostanza.  
 -tempo richiesto: 15 giorni

### **UNITA' 2 Cagliari (responsabile dott. M.A. De Luca)**

L'unità si occuperà degli studi NEUROCHIMICI (dott. De Luca), di NEUROTOSSICITA' E NEUROINFIAMMAZIONE (dott. A. Carta) e di ANALISI CHIMICA E TOSSICOLOGICA (dott. Caboni)

L'UNITA' 2 si propone di studiare almeno 4-6 composti l'anno (NS-Drugs selezionate in base agli studi dell'UNITA' 1), 8-12 composti in due anni.

### **STUDI NEUROCHIMICI (dott. M.A. De Luca)**

I farmaci d'abuso, indipendentemente dalle caratteristiche chimiche della classe d'appartenenza e del 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.

La caratteristica comune dei diversi farmaci d'abuso è la loro capacità di stimolare la trasmissione dopaminergica (DAergica) mesocorticolimbica in particolari aree cerebrali, tra cui il nucleus accumbens (NAc), causando un'attivazione d'intensità costante o addirittura crescente in seguito alla loro ripetuta esposizione. Il risultato di questa proprietà disadattativa sui meccanismi centrali della gratificazione è l'acquisizione di abnormi proprietà di rinforzo da parte degli stimoli e delle risposte associate all'esposizione ai farmaci stessi.

Tutte le più importanti sostanze d'abuso dagli analgesici narcotici, agli psicostimolanti (amfetamina e cocaina), alla nicotina, all'alcol, ai barbiturici e al  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo, principio attivo della Cannabis, hanno in comune la proprietà di aumentare la concentrazione extracellulare di dopamina in un'area terminale del sistema mesolimbico, il nucleo accumbens e in particolare nella sua parte ventro-mediale, la shell (Pontieri et al., 1996; Tanda et al., 1997).

Per questo motivo è molto importante valutare se una NS-Drugs sia in grado di modificare i livelli extracellulari di monoammine (DA, NA, 5-HT) in aree di terminazione dopaminergica coinvolte nei meccanismi neurobiologici delle dipendenze (shell e core del NAc, mPFC).

Una metodica adeguata al monitoraggio dei livelli extracellulari è la micro dialisi 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 e peptidi). 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 perfonde la fibra (ad un flusso costante) dove si trovano ad una concentrazione minore.

La valutazione del potenziale d'abuso delle NS-Drugs verrà effettuata ediante microdialisi cerebrale in vivo su ratti liberi di muoversi impiantati con un proba da dialisi nelle aree cerebrali di interesse. I campioni di dializzato verranno raccolti prima e dopo la somministrazione della NS-Drugs e verranno analizzati mediante HPLC o UHPLC per la determinazione delle concentrazioni extracellulari di monoammine (DA, NA, 5-HT). (De Luca et al., 2007).

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 40 ratti  
-tempo richiesto: 30 giorni

-De Luca MA, et al., (2007) *J Neurochemistry*, 103: 157-163.

-Pontieri, F.E. et al (1995) *PNAS*, 92: 12043-12308.

-Tanda G, et al., (1997) *Science*, 276: 2048-2050.

## **STUDI DI NEUROTOSSICITA' E NEUROINFIAMMAZIONE (dott. A.R. Carta)**

La pericolosità delle NS-Drugs non si limita al loro potenziale d'abuso ma anche al grave danno neuronale e reazioni neuro infiammatorie potenzialmente neurotossiche che possono verificarsi in seguito al loro consumo anche occasionale. Per questo motivo l'Unità 2 si occuperà anche della valutazione della neurotossicità delle NS-Drugs attraverso l'analisi del potenziale pro-infiammatorio dei composti mediante markers di microglia attivata (citochine) e astroglia su sezioni di tessuto o con Western Blot con metodiche di immunostochimica in fluorescenza (Carta et al., 2011), inoltre la valutazione del possibile danno neuronale verrà eseguito mediante markers neuronali generici o per specifiche popolazioni cellulari (TH, GAD ecc.)

Inoltre il consumo di sostanze d'abuso può causare alterata responsività neuronale. E' importante quindi valutare l'attività di specifiche aree cerebrali (NAc shell/core, mPFC) per la quale si rendono necessarie le metodiche presenti in questa Unità quali l'ibridizzazione in situ per la quantificazione dell'espressione genica di markers specifici di responsività neuronale (immediatamente early genes quali *cfos*, *zif-268*; *GAD 67*, *recettori dopaminergici*) (Carta et al. 2005).

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa o principio attivo)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 24 ratto  
-tempo richiesto: 30 giorni

-Carta AR et al., (2005) *European Journal Neuroscience*. 21: 1196-1204



## ANALISI CHIMICA E TOSSICOLOGICA (dott.P. Caboni)

L'Unità 2 si occuperà anche di preparazione e derivatizzazione di campioni di NS-Drugs per l'analisi mediante spettrometri di massa (GC/MS) a singolo quadrupolo, GC/MS a trappola ionica, a triplo quadrupolo LC/MS in modalità ESI, APCI, ad alta risoluzione a quadrupolo munito di detector Q-TOF e interfacciato con un HPLC nano e sistema di iniezione a Microchip, HPLC con detector a fluorescenza, DAD e HPLC Ionico.

-tempo richiesto: 1 molecola/14 giorni

## UNITA' 3 Camerino (responsabile dott.ssa Laura. Soverchia)

L'unita' si occuperà degli studi COMPORTAMENTALI (dott.ssa L. Soverchia e dott. S. Stopponi)

L'UNITA' 3 si propone di studiare almeno 4-6 composti l'anno (NS-Drugs selezionate in base agli studi dell'UNITA' 1), 8-12 composti in due anni.

Attraverso i test comportamentali di GROSS BEHAVIOUR, WITHDRAWAL SIGNS TEST, CONDITIONED PLACE PREFERENCE (CPP) e' possibile avere una buona indicazione, anche se preliminare, sulla possibilità di abuso della sostanza in esame in tempi molto ristretti (30-45 giorni). I test sopra elencati possono essere eseguiti anche direttamente mediante l'utilizzo della sostanza sottoforma di compressa senza necessitare dei principi attivi isolati.

Con il successivo test di SELF ADMINISTRATION siamo invece in grado di accertare il grado di passibilità di abuso di una sostanza. Il test, oltre a richiedere il principio attivo isolato ha bisogno di tempi piu' lunghi (90 giorni) per la realizzazione.

**Studi di "GROSS BEHAVIOUR".** Con questo test si valuta l'effetto di un trattamento acuto con la sostanza in esame sul comportamento dell'animale. Si tratta di un test preliminare utilizzato per avere una indicazione rapida sul suo profilo farmacologico e tossicologico e sugli eventuali dosaggi da utilizzare negli esperimenti successivi. Verranno monitorati i seguenti segni comportamentali:

**Attività locomotoria:** aumento della attività e' indice di effetto psicostimolante. Diminuzione dell'effetto deprimente.

**Grooming:** e' segno di attivazione del sistema dopaminergico centrale

**Head shakes e Wed Dog Shakes** e' segno di attività serotonergica (ad es. attivazione dei recettori 5-HT2) tipico degli allucinogeni.

**Sniffing, Licking, Rearing, Biting or Gnawing,** segno di attività dopaminergica .

**Self-injury,** segno di stimolazione massiccia di recettori dopaminergici.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa)

-dosi testate: 3 dosi + veicolo

-numero totale di animali: 24 ratti

-tempo richiesto: 7 giorni

*Elliott PJ and Iversen SD. (1986) Brain Research. 38: 68-76.*

*Diaz-Véliz G, et al., (1997) Pharmacology Biochemistry and Behavior. 57: 687-692*

**Test di "WITHDRAWAL".** l'uso protratto di alte dosi di una sostanza d'abuso, alla sua immediata sospensione, porta all'insorgenza di una sintomatologia astinenziale fisica e psichica. Essa è accompagnata dalla ricerca spasmodica e compulsiva della sostanza e quindi dalla ricaduta. Nell'animale da laboratorio è possibile indurre dipendenza ed astinenza utilizzando modelli di somministrazione prolungata (2-4 settimane) di elevate quantità di sostanza d'abuso. Segue l'instaurarsi della dipendenza fisica. Alla sospensione del trattamento, i ratti presentano una sindrome d'astinenza conclamata. L'animale in astinenza presenta comportamenti fisici caratteristici per le diverse sostanze di abuso. Fra di essi vi sono segni quali vocalizzazione, rigidità e tremore della coda, retrazione limbica ventro-mediale (VMLR), piloerezione, spasmi muscolari, anomalie nella postura, teeth chattering, wet dog shakes. A seconda che si presenti astinenza ed in base ai sintomi si può avere indicazione sul potenziale di abuso di una sostanza e sull'appartenenza ad una classe rispetto ad una altra (per es. psicostimolanti o oppiacei, o cannabinoidergici, etc)

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa)

-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 40 ratti  
-tempo richiesto: 24 giorni

*Ruggeri, B., et al., (2010). Alcohol Clinical Experimental Research 34, 90-97.*  
*Cippitelli A. et al., (2011) PLoS One. 6:e28142.*

**Studi di "CONDITIONED PLACE PREFERENCE (CPP).** Si tratta di un modello sperimentale usato per studiare il potere gratificante di una sostanza e quindi di prevederne il suo potenziale di abuso. In questo paradigma sperimentale l'animale e' allenato a prendere la sostanza in un ambiente (caratterizzato da determinati stimoli visivi e tattili) mentre riceve veicolo in un altro ambiente (caratterizzato da stimoli visivi e tattili diversi). Alla fine di questa fase di condizionamento gli verra' chiesto di scegliere liberamente fra i due ambienti. Come conseguenza dell'esperienza gratificante con la sostanza di abuso esso tendera' spontaneamente a preferire l'ambiente in cui e' stato allenato a ricevere la sostanza piuttosto che il suo veicolo. Numerosi studi hanno dimostrato che tutti i farmaci di abuso (oppiacei, nicotina, cocaina, cannabinoidi, etc) sono in grado di evocare CPP negli animali da laboratorio. Per questo motivo questo modello sperimentale viene considerato predittivo dei poteri di rinforzo e quindi del potenziale d'abuso di una sostanza.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (direttamente sottoforma di compressa)  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 40 ratti  
-tempo richiesto: 20 giorni

*Sanchis-Segura C and Spanagel R, (2006) Addiction Biology. 11: 2-38.*  
*Ciccocioppo R, et al., (2000) European Journal Pharmacology. 404: 153-159.*

**AUTOSOMMINISTRAZIONE:** il modello animale per lo studio delle proprietà di rinforzo delle sostanze d'abuso considerato piu' rilevante in termini di predittività è l'auto-somministrazione. Numerosi studi sperimentali hanno, infatti, dimostrato che le sostanze abusate dall'uomo provocano effetti percepiti dagli animali come rinforzanti e gratificanti, tanto da indurli a "lavorare" (premere una leva) per auto-somministrarsi la sostanza. Il potenziale d'abuso viene determinato attraverso una procedura composta da diverse fasi. Ad una fase di acquisizione (l'animale impara ad associare la premuta della leva alla disponibilità della sostanza), seguirà una fase di mantenimento finalizzata al raggiungimento di un comportamento operante di auto-somministrazione stabile e costante nel tempo. Tutte le sostanze che mantengono l'autosomministrazione negli animali da laboratorio sono potenzialmente passibili di abuso nell'uomo.

-forma farmaceutica: NS-Drugs (principio attivo; PA). Se il PA e' liposolubile questa tecnica potrebbe essere di limitato utilizzo perche' potrebbe essere difficile solubilizzare il PA in veicoli utilizzabili per via endovenosa  
-dosi testate: 3 dosi + veicolo  
-numero totale di animali: 40 ratti  
-tempo richiesto: 180 giorni

*Kallupi, M. et al., (2010) PNAS, U S A 107, 19567-19572.*  
*Sanchis-Segura C and Spanagel R, (2006) Addiction Biology. 11: 2-38.*

## **UNITA' 4 Genova (responsabile dott. R. Tonini)**

L'unita si occuperà degli studi **ELETTROFISIOLOGICI** (dott. Tonini)

**L'UNITA' 4 si propone di studiare almeno 4-6 composti l'anno (NS-Drugs selezionate in base agli studi dell'UNITA' 1), 8-12 composti in due anni.**

L'esposizione alle NS-Drugs può influenzare i circuiti neuronali della corteccia prefrontale (PFC).

La valutazione neurofisiologica delle alterazioni a livello della neurotrasmissione e plasticità sinaptica a lungo termine nella PFC rappresenta un metodo di analisi in grado di fornire una rapida interpretazione degli effetti di classi specifiche di molecole contenute nelle NS-Drugs sull'attività neuronale, contribuendo alla comprensione dei meccanismi cellulari alla base degli effetti cognitivi di queste sostanze .

L'analisi elettrofisiologica verrà condotta su fettine di cervello ex-vivo, per valutare se ed in che modo classi specifiche di molecole presenti nelle NS-Drugs interferiscono con processi neurofisiologici a livello dei circuiti della PFC. Ci focalizzeremo sulle proprietà della neurotrasmissione e plasticità sinaptica a lungo termine (LTP e LTD) che dipendono dall'interazione di cascate intracellulari

indotte da neuromodulatori endogeni (endocannabinoidi e dopamina) con la via di segnalazione attivata dai recettori per il glutammato NMDA.

Tale interazione potrebbe essere modificata in seguito all'esposizione acuta e/o cronica alle NS-Drugs, sia da classi di molecole appartenenti alla famiglia dei cannabinodi, attraverso un effetto diretto sulla plasticità dipendente dagli endocannabinoidi, sia da molecole in grado di alterare i livelli di dopamina e l'attivazione dei recettori NMDA (composti stimolanti). Dato che le proprietà della neurotrasmissione e plasticità sinaptica nella PFC sono state caratterizzate in passato (protocolli sperimentali per l'induzione dei fenomeni di plasticità), la valutazione di questi parametri potrebbe fornire una rapida interpretazione degli effetti delle smart drugs sull'attività neuronale di questa regione cerebrale.

Verranno effettuate delle registrazioni elettrofisiologiche ex-vivo su fettine di cervello di topo contenenti la corteccia prefrontale, valutando:

- 1) se l'esposizione ACUTA di classi specifiche di molecole presenti nelle NS-Drugs interferisce con la neurotrasmissione basale e/o sull'induzione ed il mantenimento di LTP/LTD.
- 2) se l'esposizione CRONICA in vivo di classi specifiche di molecole presenti nelle NS-Drugs induce fenomeni neuroadattativi di lunga durata che interferiscono con la plasticità sinaptica. Gli esperimenti verranno condotti almeno 24 ore dopo l'ultima somministrazione della sostanza da testare, allo scopo di evitare possibili interferenze della sostanza stessa con la neurotrasmissione, valutando quindi solo gli effetti di natura neuroadattativa. Per valutare gli effetti neurofisiologici associati allo sviluppo di sindrome astinenziale, gli esperimenti verranno condotti almeno una settimana dopo l'ultima somministrazione della sostanza da testare.

## Metodologia

Lo studio elettrofisiologico verrà effettuato su sezioni coronali di cervello, a livello della porzione mediale della corteccia prefrontale (mPFC). Registreremo, mediante la tecnica dei potenziali di campo eccitatori extracellulari, l'attività di scarica neuronale (population spike, PS) a livello dello strato V della mPFC (L-V). Le fibre afferenti verranno attivate attraverso un elettrodo di stimolazione localizzato nello strato II (L-II). La stimolazione specifica del L-II garantisce l'attivazione delle sinapsi del L-V dove sono situati i neuroni che proiettano nei nuclei profondi del cervello. LTP ed LTD nella mPFC verranno indotti mediante i seguenti protocolli di stimolazione: LTP, 10 treni di impulsi ciascun treno formato da 5 pulsii alla frequenza di 100 Hz (Lu et al., 2009); LTD, treni di impulsi a 10 Hz per 10 minuti (Lafourcade, 2007).

## La eCB-LTD

-forma farmaceutica:	NS-Drugs (Principio attivo)
-dosi testate:	3 dosi + veicolo
-numero totale di animali:	10 ratti
-tempo richiesto:	45 giorni per lo studio della plasticità sinaptica (LTP e LTD)

*Lu H et al., (2009), Journal of Neuroscience: 12664-12674*

*Lafourcade M, et al., (2007). PLoS One: e709*