



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
"TERAPIE AVANZATE E FARMACOLOGIA
SPERIMENTALE"**

CICLO XXXVI

COORDINATRICE/COORDINATORE Prof. Varani Katia

Variazioni delle risposte neuro-comportamentali e della trasmissione degli endocannabinoidi nei topi dopo la somministrazione ripetuta di JWH-018: sviluppo di un modello *in vivo* di demenza e correlazione cliniche.

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14

Dottoranda/o

Dott. Tirri Micaela

Tutore

Prof. Zuliani Giovanni

Co-Tutore

Prof. Marti Matteo

Anni 2020/2023

INDICE

INTRODUZIONE	3
CAPITOLO 1: La demenza senile	7
1.1. Demenze neurodegenerative	8
1.1.1. <i>Demenza d' Alzheimer</i>	8
1.1.2. <i>Demenza vascolare</i>	9
1.1.3. <i>Demenza a corpi di Lewy</i>	10
1.1.4. <i>Demenza fronto-temporale</i>	11
1.2. Demenza non neurodegenerativa	12
CAPITOLO 2: Sistema Endocannabinoide	14
2.1. <i>Endocannabinoidi e proteine che li sintetizzano e degradano</i>	15
2.2. <i>Recettori cannabinoidi</i>	16
2.3. <i>Effetti dei cannabinoidi sulla cognizione</i>	18
2.4. <i>Studio del ECS per lo sviluppo di migliori strategie diagnostiche e terapeutiche</i>	19
CAPITOLO 3: Cannabis e Cannabinoidi Sintetici	21
3.1. <i>Cannabis</i>	21
3.1.1. <i>Evidenze cliniche</i>	21
3.2. <i>Cannabinoidi sintetici</i>	22
3.2.1. <i>Evidenze precliniche</i>	24
CAPITOLO 4: Scopo della tesi	26
CAPITOLO 5: Materiali e Metodi	28
5.1. <i>Animali</i>	28
5.2. <i>Sostanze utilizzate</i>	28
5.3. <i>Procedura sperimentale e protocolli utilizzati</i>	29
5.3.1. <i>Primo studio in vivo</i>	32
5.3.2. <i>Secondo studio in vivo</i>	37
5.3.3. <i>Terzo studio in vivo</i>	41
5.4. <i>Studi clinici</i>	44
5.5. <i>Analisi statistica</i>	44
CAPITOLO 6: Risultati	46
6.1. <i>Primo studio in vivo</i>	46
6.2. <i>Secondo studio in vivo</i>	56
6.3. <i>Terzo studio in vivo</i>	60
6.3.1. <i>Studi preclinici:</i>	60
6.3.2. <i>Studi clinici:</i>	67
DISCUSSIONE	68

<i>Primo studio in vivo</i>	69
<i>Secondo studio in vivo</i>	72
<i>Terzo studio in vivo</i>	75
<i>Studio clinico</i>	81
Conclusione	83
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	84

INTRODUZIONE

L'aspettativa di vita è uno tra i fattori correlati alla sopravvivenza più comunemente utilizzato per valutare la salute generale di una data popolazione (Luy et al., 2020). Nel 2022, secondo i dati ricavati da un report dell'ONU, il “World Population Prospects” (che valuta le popolazioni globali attraverso una serie di statistiche e proiezioni demografiche e sociali), il numero totale di persone con età pari o superiore ai 65 anni, era 771 milioni e risultava essere circa 3 volte superiore rispetto a quanto registrato nel 1980. Inoltre, è stato ipotizzato che la popolazione più anziana dovrebbe raggiungere i 994 milioni entro il 2030 e 1,6 miliardi entro il 2050 (UN DESA, 2022). Questo consistente aumento delle aspettative di vita cui si è assistito soprattutto nel ventunesimo secolo, ha senza dubbio avuto un notevole impatto economico sulla società, non solo per l'aumento della spesa pubblica, ma anche per l'allarmante e conseguenziale aumento della spesa per l'assistenza sanitaria (Ulloa-Aguirre, 2016; Henderson et al., 2021). Difatti, un'attenta valutazione dei dati sopracitati, porta inevitabilmente a considerare, oltre le diverse cause di variazioni a livello delle dinamiche demografiche mondiali (es. dati inerenti fertilità e migrazione), anche il probabile aumentato del tasso di mortalità e dell'incidenza, della prevalenza e delle conseguenti perdite funzionali (o eventuali disabilità) sviluppate tra la popolazione (Kim et al., 2022). Nel particolare, significativo sarà soprattutto il parallelo e progressivo aumento della prevalenza d'anzianità e il tasso d'incidenza di varie patologie croniche correlate ad essa (Cummings et al., 2016). L'invecchiamento umano difatti, colpisce l'intero organismo con una serie di sintomi caratteristici quali delirio, incontinenza, fragilità ossea e muscolare, che sono altamente prevalenti e multifattoriali nelle condizioni di salute delle persone anziane, associati nell'insieme generalmente sotto il termine di “sindrome geriatrica” (Inouye et al., 2007). Tuttavia, la sindrome provocata da un progressivo deterioramento delle funzioni cognitive e le relative invalidità correlate, rappresenta una tra le disabilità più importanti cui un individuo può andare incontro durante l'invecchiamento (OECD, 2014; Bruti et al., 2016; Isaev et al., 2018; Lopez and Kuller, 2019), con un tasso di incidenza variabile proprio in rapporto all'età (Hall et al., 2005). Definita come *demenza senile* infatti, essa induce gli individui al decadimento delle prestazioni comunemente svolte durante l'arco di una giornata, a seguito della compromissione in primo luogo della memoria, ma anche della capacità di linguaggio e di calcolo, della risoluzione dei problemi, di esporre un giudizio e persino delle abilità visuo-spaziali (Ljubenkov et al., 2016). Nel 2012, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) persistette nel sensibilizzare i governi ad affrontare tale

problematica in maniera consapevole, promuovendo la possibilità di stilare piani nazionali per la lotta contro le malattie neurodegenerative connesse all'invecchiamento (europarl.europa.eu). Regno Unito, Francia, Norvegia, Stati Uniti e Corea del Sud, furono i primi a mettere a punto piani e/o strategie specifiche, soprattutto in virtù dei casi registrati - sempre più crescenti- di esordio precoce (Prince et al., 2013), definiti “Early-onset dementia” (EOD; Vieira et al., 2013). Tuttavia, basandosi su uno studio di Hofman e colleghi (Hofman et al., 1991), e tenendo in considerazione una serie di dati raccolti dal 1988 al 1991, l’“European Concerted Action on Epidemiology and Prevention of Dementia Group” (EURODEM), aveva già largamente documentato la rilevanza e l'entità della prevalenza della demenza in Europa, che raddoppiava quasi ogni 5 anni, colpendo più del 30% degli anziani con età superiore agli 85 anni (cordis.europa.eu). Ad oggi l'Italia è uno dei paesi europei a più alto tasso di anzianità (età uguale o superiore a 65 anni; dati.istat.it) e le persone affette da demenza sono circa 1.1 milioni (Price et al., 2013; epicentro.iss.it). Nel nostro paese, ciò colloca la demenza senile come una delle malattie a più forte impatto sia economico -si pone al terzo posto come costo nei Paesi industrializzati, dopo le malattie cardiovascolari e i tumori (epicentro.iss.it)- che socio-sanitario, assistenziale e psicologico (Cacioppo and Cacioppo, 2013). Dal momento che la prevalenza dei casi di demenza in Italia si prevede che aumenti sino a colpire circa 1.5 milioni di individui entro il 2025 (Bruno et al., 2018), un Piano Nazionale Italiano per la Demenza è stato approvato già nel 2014, per supportare e migliorare lo stile di vita dei pazienti affetti da tale malattia e delle loro famiglie; tuttavia, i primi reali finanziamenti per stanziare il progetto risalgono al 2021 (Ancidoni et al., 2023). Risultano inoltre rilevanti, tramite correlazione tra studi clinici ed epidemiologici emersi su pazienti affetti da demenza senile, una forte attinenza dei soggetti ad avere una scarsa rete sociale, e quanto questo possa essere un fattore di rischio molto importante nel decorso della suddetta sindrome (Preuss et al., 2009; Shankar et al., 2013; Levin and Vasenina, 2019; Lara et al., 2019); anche se in realtà sembra che sia la percezione della solitudine in sé -più che l'isolamento sociale vero e proprio- ad avere maggiore impatto negativo sul paziente, a livello cognitivo (Holwerda et al., 2012). Pertanto, molti pazienti tendono nel tempo a manifestare anche altri disturbi neuropsichiatrici, quali depressione, insonnia e allucinazioni (Steffens et al., 2006). Di contro, andrebbe chiarito che ad oggi non si può affermare con certezza che vi sia un diretto rapporto fra demenza senile e tali disturbi; difatti, le alterazioni psicologiche che coinvolgono la sfera dell'umore hanno cause, conseguenze, manifestazioni cognitive e comportamentali differenti (Bennet and Thomas, 2014; Rubin, 2018). Ciò nonostante, la depressione si presenta spesso in comorbilità in pazienti affetti da demenza

senile (Baruch et al., 2019). Attualmente, non sono ancora disponibili valide terapie per fermare il decorso neurodegenerativo della demenza (Ippoliti et al., 2023). Eppure, dal momento che insieme al declino comportamentale e psicologico tipicamente indotto dalla demenza senile, si mostrano sintomi caratteristici -quali episodi psicotici, aggressività e agitazione- tra i trattamenti farmacologici in uso, vi sono per lo più: inibitori delle colinesterasi (es. donepezil, rivastigmina e galantamina), mementina (antagonista del recettore NMDA), ansiolitici, antidepressivi ed antipsicotici (prescritti off-label). Questi, vengono prescritti in mono- o poli-terapia a seconda del grado di declino cognitivo che caratterizza il singolo paziente (leggera, media o severa demenza senile; Tisher et al., 2019; Marcinkowska et al., 2020; Ippoliti et al., 2023). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che, pur in assenza di una terapia farmacologica definita, un leggero miglioramento dei sintomi depressivi in pazienti affetti da demenza avviene anche tramite assistenza psicologica, associata a programmi definiti del ciclo del sonno, dell'esercizio fisico, artistico e/o musicoterapia (Baruch et al., 2019). Tuttavia, gli scarsi trattamenti farmacologici disponibili impongono una razionale ricerca di nuove terapie non solo sintomatiche, ma anche possibilmente preventive nella progressione della malattia (Tisher et al., 2019; Marcinkowska et al., 2020).

In linea con quanto detto, un nuovo bersaglio di indagine fisiopatologica nella demenza senile è rappresentato dal sistema endocannabinoide (ECS), e diversi sono infatti gli studi degli ultimi decenni che supportano il suo coinvolgimento nel rallentamento dello sviluppo di molti disturbi neurodegenerativi, sia in modello animale che umano (Maroof et al., 2013; Ibeas Bih et al., 2015; Basavarajappa et al., 2017; Hillard et al., 2018), e per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici (Koppler et al., 2008).

Nonostante sia confermato che la cannabis offre sollievo sintomatico da diversi disturbi neurodegenerativi (Scotter et al., 2010), altri studi riportano che l'intossicazione acuta ma anche quella dovuta ad un utilizzo prolungato da cannabis, provochi forti cambiamenti nello stato mentale soggettivo degli individui, con effetti negativi sul rendimento neuropsicologico (quale l'apprendimento, l'attenzione e la memoria di lavoro; deficit nelle abilità verbali, nel riconoscimento visivo, un ritardo nel richiamo visivo, e nei compiti di memoria prospettica a breve e a lungo intervallo; Kalant, 2004; Gonzalez, 2007; Gerra et al., 2010).

Nonostante la cannabis sia una tra sostanze d'abuso attualmente più utilizzata e presente da più tempo in Europa, il fenomeno dell'uso di droghe illegali è cambiato molto negli ultimi

anni (EMCDDA, 2023). Infatti, lo sviluppo di Nuove Sostanze Psicoattive (NSP) ha preso sempre più avvento e la loro comparsa sul mercato illecito, essendo molto pericolosi e soprattutto poco conosciuti anche dagli stessi consumatori, ha implementato un'imminente individuazione della loro potenzialità tossicologiche (EMCDDA, 2009). Nel particolare, la crescente popolarità d'uso di Cannabinoidi Sintetici (SCBs) -che insieme ai nuovi stimolanti sintetici, rappresentano il più grande gruppo di NPS attualmente monitorate dal sistema di allarme rapido dell'UE- con il concomitante aumento della registrazione di casi di decessi nel 2020 (soprattutto in Germania, Ungheria Turchia) e i dati ricavati attraverso "l'European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs" (ESPAD)-ha monitorato una maggiore prevalenza di consumo di SCBs tra i giovani (studenti di 15-16 anni) di sesso maschile rispetto a quello femminile (ESPAD, 2019)- determina tuttora un'emergenza per la salute pubblica (Bukke et al., 2021; EMCDDA, 2022).

In quest'ottica, tramite il presente lavoro di Dottorato, si è voluto ottenere uno studio di tipo traslazionale che correli le informazioni tra le osservazioni nell'uomo e quelle nell'animale, mediante l'integrazione di studi clinici e preclinici. In particolare, soffermandosi sul potenziale d'abuso di SCBs e le possibili conseguenze sul ECS, si è verificato se l'utilizzo sub-cronico di tali sostanze, anche per un breve periodo (da giovani-adulti) nell'arco della vita, possa rappresentare una concausa nella fisiopatogenesi della demenza senile e se la disregolazione del ECS sia specifica nei vari sottotipi di demenza senile.

CAPITOLO 1: La demenza senile

Il riconoscimento della demenza senile come vera e propria diagnosi medica, ha un decorso complesso (Cipriani et al., 2011). Considerata come una mera compromissione delle funzioni cerebrali superiori a seguito dell'invecchiamento, quali la memoria, la gestione delle routine quotidiane e il linguaggio, il termine *demenza* ha etimologia latina (*demens - entis*, composto da: *de-* con valore privativo e *mens*, mente; Halpert, 1983). Negli anni '90 si susseguirono una serie di studi e dibattiti nel tentativo di fornire una definizione univoca della sindrome, che dettasse un confine fra invecchiamento "normale" e invecchiamento "patologico" (Clarfield, 1990; Nascher, 1916; Tinetti and Fried, 2004; Cohen, 2014). Infatti, nel 1997 l'Associazione Psichiatrica Americana (APA) pubblicò una serie di disposizioni per il trattamento di pazienti colpiti da vari tipi di demenza senile (APA, 1997), e ha rappresentato a lungo la guida clinica più completa disponibile per i medici che si prendono cura di pazienti affetti da tale sindrome (Schindler e Cucio, 2000).

Attualmente, la "demenza senile" è un termine generico che si riferisce ad una serie di condizioni cliniche che indicano due grandi categorie di malattie: quelle neurodegenerative, chiamate "irreversibili o primarie" e non neurodegenerative, potenzialmente "reversibili o secondarie" (Reith e Mühl-Benninghaus, 2015). Nel primo caso, dunque clinicamente, la demenza può essere riconosciuta come conseguenza di disturbi di diversi circuiti neuronali cerebrali, e comporta una totale perdita del tono neuronale in specifiche localizzazioni dell'encefalo, tale da conferirgli una peculiarità polimorfa che permette una scrupolosa classificazione in una specifica malattia neurodegenerativa (Keenan et al., 2016; Blamire et al., 2018). Seguendo tale dicotomia, Gale e colleghi individuarono le forme più frequenti di demenza neurodegenerativa, e dunque quelle caratterizzate da una compromissione della cognizione del paziente, tale da indurlo ad un declino delle capacità quotidiane, che sono associabili a: malattia di Alzheimer, demenza vascolare, demenza a corpi di Lewy e demenza frontotemporali; mentre la "Mild neurocognitive disorder" o "Mild Cognitive Impairment" è l'unica forma di demenza non neurodegenerativa, che può verificarsi anche a seguito di una carenza vitaminica, ipotiroidismo, abuso cronico di alcol, disfunzione cognitiva correlata alla chemioterapia, ad infezioni (come il virus dell'immunodeficienza umana - HIV), alla presenza di masse intracraniche (ad esempio, ematomi subdurali o tumori cerebrali), oppure a seguito di lesioni cerebrali traumatiche e malattie psichiatriche (Gale et al., 2018). Tuttavia, la demenza si verifica anche in pazienti con morbo di Parkinson, morbo di Huntington, paralisi sopranucleare progressiva, malattia di Creutzfeldt-Jakob, sindrome

di Gerstmann-Sträussler-Scheinker, altre malattie prioniche, e neurosifilide (Gale et al., 2018).

I pazienti possono presentarne più di un tipo delle forme sopra descritte, definendo la cosiddetta “demenza mista”, rappresentando casi particolarmente problematici (Schreiter et al., 2008; Schneider, 2022).

1.1. Demenze neurodegenerative

1.1.1. Demenza d' Alzheimer

Il morbo di Alzheimer (AD) è la più comune forma di demenza senile, figurando circa tra il 60 e l'80% di tutti i casi registrati (Rostagno, 2022). Rappresenta la causa di morte più significativamente imputabile ad un elevato numero di anziani, oltre che una delle malattie a maggiore impatto economico sul sistema sanitario mondiale (Oboudiyat et al., 2013).

È largamente riconosciuto che il Dott. Alois Alzheimer, neuropatologo e clinico tedesco, scoprì la malattia che porta il suo nome a seguito dello studio clinico-patologico di una donna 51enne, affetta appunto da demenza (Ramirez-Bermudez, 2012). Tuttavia, dopo più di 100 anni da tale scoperta e nonostante la mole di articoli scientifici che la riguardano, i complessi meccanismi molecolari che innescano e inducono la progressione dell'AD, non sono ancora ben chiari (Serý et al., 2013). La valutazione neuropatologica su base morfologica, dunque l'identificazione di aggregati proteici patologici, di placche extracellulari ("drusen") e grovigli neurofibrillari intracellulari localizzati in specifiche selezioni cerebrali, furono fondamentali nell'alimentare la ricerca patofisiologia della suddetta demenza, fornendo modelli patologici che solidificavano sempre più gli schemi di stadiazione dell'AD (Trejo-Lopez et al., 2022).

Tra le diverse vie multifattoriali cui la malattia può verosimilmente manifestarsi all'esordio, vi sono certamente delle anomalie vascolari, cambiamenti mitocondriali dannosi, stress ossidativo, ridotto utilizzo del glucosio da parte del cervello e neuro-infiammazione (Hrelia et al., 2020). Fatta eccezione di una piccola percentuale di casi di AD, che sono correlati a mutazioni genetiche in tre geni dominanti -che codificano per APP (proteina del precursore dell'amiloide), PSEN1 (presenilina 1) e PSEN2 (presenilina 2)- tipicamente associati a forme di esordio precoce della malattia (prima dei 65 anni; Karch and Goate, 2015), la deposizione di β -amiloide ($A\beta$) nel parenchima cerebrale e nel sistema vascolare cerebrale, insieme all'accumulo di una forma anormale della proteina tau (chiamata grovigli tau) all'interno dei neuroni e la loro graduale perdita della capacità di sinapsi, sembrano essere i principali cambiamenti cerebrali (Alzheimer's disease facts and figures, 2022), identificati come target

neuropatologici principali nella fisiopatologia dell'AD (Serý et al., 2013; Long and Holtzman, 2019).

L'AD è una malattia caratterizzata da un esordio lento, ma un decorso veloce. Infatti, spesso i pazienti affetti da tale malattia e anche i familiari, non sono realmente consapevoli dell'avvento della stessa, considerando i primi sintomi come semplici ed episodici deficit nella capacità di memorizzare nuove informazioni causato dall'invecchiamento; successivamente, si ritrovano ad affrontare però tutti i progressivi cambiamenti cognitivi e comportamentali dell'anziano. La difficoltà mostrata nel ricordare le conversazioni, nomi o eventi pseudo-recenti, è quasi spesso un sintomo d'esordio precoce, insieme ad apatia e depressione. I sintomi più tardivi invece, includono una capacità di comunicazione alterata, disorientamento, confusione, incapacità nell'esprimere un giudizio, una variazione degli atteggiamenti consueti (abitudini e quotidianità; Grøntvedt et al., 2018).

1.1.2. Demenza vascolare

La demenza vascolare (VaD), insieme alla demenza a corpi di Lewy, è una delle forme più comuni di demenza dopo l'AD, con un'incidenza di circa il 15% dei casi registrati (O'Brien and Thomas, 2015; Taylor et al., 2020) e risulta essere la causa di morte nella maggior parte dei pazienti (Wolters and Ikram, 2019). Hachinski e colleghi (Hachinski et al., 1974), furono i primi a suggerire che la VaD fosse il risultato di lesioni ischemiche multiple in pazienti che presentavano fattori di rischio vascolari, quale ad esempio l'ipertensione. Tuttavia, tale definizione della malattia è verosimilmente restrittiva, in quanto non tiene in debita considerazione le disabilità più comunemente associate alla progressione della demenza (la compromissione della memoria, della capacità di linguaggio, delle abilità visuo-spaziali e il rallentamento psicomotorio). Difatti, considerando l'importanza vitale dell'apporto sanguigno cerebrale per l'integrità strutturale e funzionale del cervello (Obermeier et al., 2013), non sorprende che le alterazioni nei vasi sanguigni cerebrali abbiano un profondo impatto sulle funzioni cognitive. Ne consegue una serie di limitazioni nella classificazione della nosologia, rendendo l'individuazione della VaD significativamente borderline nel quadro complesso delle sintomatologie tipiche alla demenza (Iadecola, 2013).

La VaD è caratterizzata infatti da un declino cognitivo sviluppato in tarda età in cui componenti vascolari, come l'aterosclerosi, arterio(lo)sclerosi, (micro)infarti e angiopatia amiloide, svolgono un ruolo importante. Dunque, può essere il risultato di lesioni ischemiche o emorragiche del tessuto in una particolare regione del cervello, che si traduce in danno cognitivo clinicamente significativo (Bir et al., 2021). Infatti, uno studio descrive come la

VaD possa manifestarsi dopo un singolo o più ictus, sviluppandosi in una celere progressione, fino a causare la morte del paziente; oppure in individui senza ictus clinici, ma avere una progressione graduale (Hullette et al., 1997). Numerosi sono anche gli studi che dimostrano come una ridotta perfusione cerebrale a seguito di un arresto cardiaco, aritmie, insufficienza cardiaca o ipotensione, possa produrre disfunzioni cerebrali e generare deficit cognitivi transitori o permanenti (Marshall, 2012; Iadecola, 2013; Justin et al., 2013; Stefansdottir et al., 2013).

La VaD viene pertanto differenziata dalle altre demenze, puramente per l'aggiunta di una componente vascolare al fondamentale sistema di classificazione eziologica di neurodegenerazione amiloide/tau già introdotto nell'AD (paragrafo 2.1.1.; Wolters and Ikram, 2019). Uno studio sulla salute cardiovascolare, il *Cardiovascular Health Study Cognition Study* (CSH-CS), eseguito su oltre 3068 adulti sani che hanno acconsentito ad una visita clinica annua per un periodo totale di 10 anni (Fitzpatrick et al., 2004), ha registrato che il 12% di tutti i casi di demenza era riconducibile a VaD. Tra questi, il 27% era VaD "puro", ovvero non associato ad altre forme di demenza; mentre il 63% dei pazienti, ha esibito diversi profili di malattia cerebrovascolare associata ad altri tipi di demenza (Lopez et al., 2005), principalmente AD (Zlokovic, 2011). Tuttavia, il link alla base di tale associazione non è ancora stato identificato (O'Brien and Thomas, 2015). Infatti, studi sperimentali hanno valutato la sinergia funzionale e patogena tra neuroni, glia e cellule vascolari (Iadecola, 2010; Quaegebeur et al., 2011; Zlokovic, 2011), fornendo un nuovo quadro per riconoscere come le alterazioni nei vasi sanguigni cerebrali potrebbero contribuire alla disfunzione neuronale sottostante il deterioramento cognitivo e confermando dunque, il ruolo dei fattori vascolari nella salute cognitiva.

1.1.3. Demenza a corpi di Lewy

La demenza a corpi di Lewy (LBD) fu identificata per la prima volta nel 1912, dal neurologo tedesco Dr Friedrich Lewy -da cui prende il nome- che studiava la neuropatologia della malattia di Parkinson (Sanford, 2008). Come anticipato precedentemente la LBD, insieme alla VaD, sono le seconde più comuni cause di neurodegenerazione da demenza dopo l'AD (O'Brien and Thomas, 2015; Taylor et al., 2020). Rappresenta la diagnosi del 5–25% dei pazienti clinicamente affetti da demenza (Vann Jones and O'Brien, 2014; O'Brien and Thomas, 2015), ma anche la forma di demenza più comune (~80%) dei pazienti affetti da morbo di Parkinson (Hely et al, 2008). È proprio per questo motivo che ad oggi, si tende a differenziare la LBD “pura” da quella correlata alla Parkinson (PD; Matar et al., 2020).

Tuttavia, è interessante notare che i risultati di diverse autopsie rivelano la presenza dei corpi di Lewy in circa il 10-15% di tutti i cervelli esaminati in individui con età superiore ai 60 anni, nonostante l'assenza di sintomi e/o diagnosi confermata per suddetta malattia (Dickson et al., 2008). Questo, potrebbe indicare che probabilmente la LBD abbia un iniziale periodo asintomatico, oppure che qualche aggregazione tipica dei corpi di Lewy possa essere considerata come una normale variante correlata in qualche modo all'avanzamento d'età (Sanford, 2018).

Clinicamente, la LBD viene definita come l'aggregazione in corpi unici (di Lewy), di oligomeri proteici overespressi di α -sinucleina, che si depositano principalmente nel citoplasma dei neuroni. Tale aggregazione e successiva deposizione, può indurre a danni mitocondriali e frammentazione, fino a causare l'attivazione della cascata di apoptosi e morte cellulare (Bezard and Dehay, 2022), generando i sintomi clinicamente evidenti (Sanford, 2018).

A differenza delle altre forme di demenza senile, il cui sintomo predominante è un deficit di memoria, il paziente affetto da LBD presenta un quadro sintomatico caratterizzato da: sproporzionata percezione visuo-spaziale e disturbi motori che possono causare spesso cadute, allucinazioni visive, attenzione fluttuante, disturbi del sonno e una variazione nella funzione cognitiva (instabilità nell'elaborazione delle funzioni esecutive; Connors et al., 2018; Taylor et al., 2020; Elder et al., 2022). Inoltre, tali pazienti mostrano spesso una spiccata sensibilità agli antipsicotici (Connors et al., 2018).

1.1.4. Demenza fronto-temporale

La Demenza fronto-temporale (FTD) con un'incidenza del 3-26% dei casi registrati, è la terza forma più comune di demenza senile, dopo AD, LDB e VaD, ma la principale nei casi di demenza precoce (pazienti con età inferiore ai 65 anni; Vieira et al., 2013). È di rilevante importanza sapere che ~ 20% dei casi di FTD è dovuto a una mutazione genetica, mentre ~ 40% dei pazienti affetti da tale forma di demenza, mostrano una storia familiare con la demenza senile, con una malattia psichiatrica o altri sintomi motori senza un chiaro modello di eredità (Rohrer and Warren, 2011; Seelar et al., 2011).

Clinicamente, la FTD è caratterizzata da cambiamenti macroscopici quali atrofia dei lobi temporali frontali e anteriori, e cambiamenti microscopici legati a microvacuolazione e perdita di capacità sinaptica e neuronale (Younes and Miller, 2020). Tuttavia, anche la sindrome cortico-basale (CBS) e la sindrome della paralisi sopra-nucleare progressiva (PSP-

S), così come la degenerazione cortico-basale (CBD), sono patologiche associate a FTD (Seeley, 2017).

A differenza delle forme di demenza già descritte, la FTD è un disturbo eterogeneo con fenotipi clinici distinti, che sono associati a più entità neuropatologiche (Olney et al., 2017). In linea generale, si può assumere che i deficit in cui i pazienti affetti da FTD incorrono, comprendano per lo più: cambiamenti nel comportamento (inerenti la personalità dei soggetti; spesso è riscontrata una maggiore disinibizione, altre volte apatia), nel linguaggio, nel controllo esecutivo e spesso nei sintomi motori. Tuttavia, tali sintomi, si distinguono nettamente in tre varianti cliniche: la *demenza frontotemporale comportamentale*, è più associata a deficit comportamentali ed esecutivi precoci; l'*afasia progressiva primaria non rilevante*, è prevalentemente caratterizzata da deficit progressivi del linguaggio, incapacità a parlare (spesso associata a balbuzie) e del corretto utilizzo della grammatica; e l'*afasia progressiva primaria semantico-variante*, caratterizzata invece da un progressivo deficit della memoria semantica e la denominazione in riferimento a persone o oggetti (Gorno-Tempini et al., 2011; Rascovsky et al., 2011; Bang et al., 2015).

Con il progredire della FTD, i sintomi descritti nelle tre varianti cliniche possono tuttavia convergere, poiché una degenerazione inizialmente focale, diventa più diffusa e si diffonde persino a riguardare sempre più ampie regioni dei lobi frontale e temporale. Pertanto, i pazienti tenderanno a sviluppare nel tempo un danno cognitivo globale, insieme a deficit motori, simil parkinsoniani. Infine, i pazienti che si trovano nella fase terminale della malattia avranno sempre più difficoltà a mangiare, muoversi e deglutire. La morte di solito accade circa 8 anni dopo l'insorgenza dei primi sintomi ed è in genere causata da polmonite o altre infezioni secondarie (Bang et al., 2015).

1.2. Demenza non neurodegenerativa

A differenza delle demenze neurodegenerative, che vengono classificate come disturbi invalidanti per i soggetti che ne sono affetti, la “Mild cognitive impairment” (MCI) permette agli individui di mantenere preservata la propria indipendenza, nonostante i cambiamenti clinicamente significativi acquisiti in uno o più domini cognitivi, riconosciuti nella diagnosi proposta dall'APA attraverso il “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders” (DSM; Sachdev et al., 2014). Secondo l'attuale 5^a edizione, si differenzia una *MCI amnestica*, il cui danno è relativamente circoscritto a variazioni dello stato di memoria del paziente, dalla *MCI non amnestica*, il cui danno è relativo invece più alla sfera cognitiva e

riguarda alterazioni dello stato d'attenzione, il funzionamento esecutivo e il linguaggio (American Psychiatric Association, 2013).

Attualmente la MCI viene definita come quello stato intermedio tra l'invecchiamento normale -inteso come rallentamento psicomotorio, diminuzione della massa muscolare, diminuzione dell'acuità visiva e uditiva, rallentamento nella capacità d'attenzione e ad apprendere nuove informazioni, nella fluenza verbale e nel tempo di reazione- e la demenza senile (Jongsiriyanyong e Limpawattana, 2018).

La prevalenza di tale condizione clinica negli adulti di età superiore ai 60 anni, è di circa il 7-25%, va aumentando proporzionalmente all'età e spesso anche in base al livello di istruzione dei singoli soggetti, con una maggiore prevalenza negli uomini rispetto alle donne (Langa and Levine, 2014; Peterson et al., 2018). Il tasso annuale di progressione da MCI alla demenza, è invece di ~5-17% (Prestia et al., 2013; Ganguli et al., 2013).

Tra i principali criteri di diagnosi della MCI vi sono anzitutto un colloquio conoscitivo con il paziente circa la propria storia clinica e i più preoccupanti cambiamenti nella cognizione, nella funzione motoria e nella normale attività quotidiana; cruciale risulta essere anche un approfondito colloquio con informatori del paziente (familiari e/o badanti, assistenti sanitari) al fine di rilevare altri indizi clinici fondamentali per effettuare al meglio la diagnosi, e l'aggiunta di test di screening cognitivi appropriati (Peterson et al., 1999; Nelson and O'Connor, 2008; Jongsiriyanyong and Limpawattana, 2018).

In questo contesto, diversi studi hanno già evidenziato l'importanza clinica della diagnosi di MCI come marker predittivo di evoluzione patologica in una demenza neurodegenerativa specifica, al fine di comprendere al meglio la patogenesi stessa della demenza senile (Dickerson et al., 2007; Woolf et al., 2016; Jongsiriyanyong and Limpawattana, 2018).

CAPITOLO 2: Sistema Endocannabinoide

Il Sistema Endocannabinoide (ECS) è costituito da una fitta rete neuromodulatoria, un sistema di segnalazione complesso e diffuso, che non solo è coinvolto nello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC), ma è anche presente in tutto il corpo e partecipa a diverse vie di segnalazione intracellulare, svolgendo un ruolo importante nella messa a punto di molti processi cognitivi e fisiologici (Fig.1; Crocq, 2020; Lu and Mackie, 2021; Rana et al., 2021), quali il controllo motorio, la regolazione dell'omeostasi, l'alimentazione, la percezione del dolore, le funzioni sessuali, la neuroprotezione, il sistema immunitario e le funzioni endocrine (Ameri, 1999; Correa et al., 2005; Wang et al., 2006; Stasiulewicz et al., 2020). Studi recenti, evidenziano che il ECS possa influenzare anche la routine del ritmo circadiano (Goycolea, 2021).

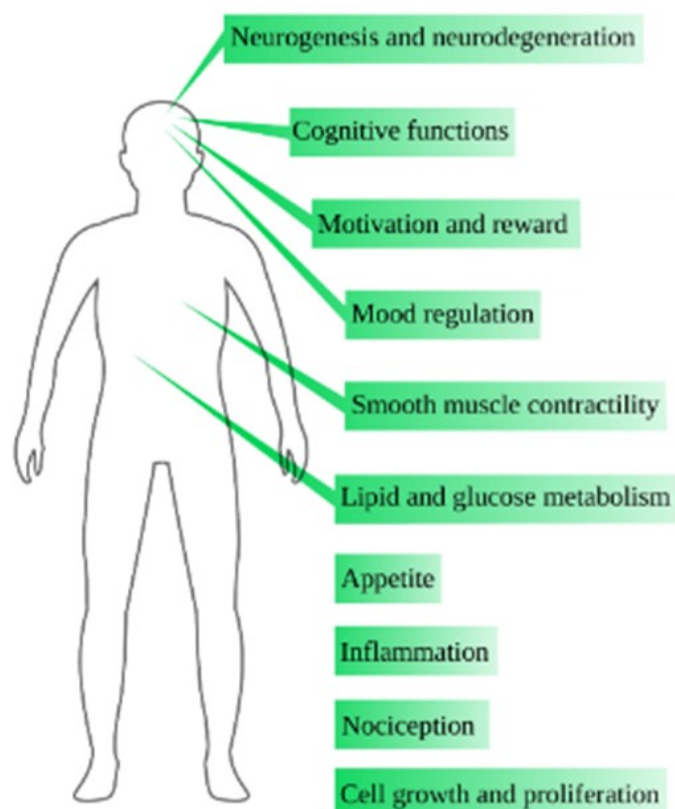


Figura 1: Processi fisiologici e funzioni cui il ECS partecipa (Stasiulewicz et al., 2020)

I componenti principali dell'ECS sono: i cannabinoidi endogeni (endocannabinoidi), le proteine che trasportano, sintetizzano e degradano gli endocannabinoidi, e i recettori cannabinoidi (Lu and Mackie, 2021).

2.1. Endocannabinoidi e proteine che li sintetizzano e degradano

I due messaggeri lipidici endogeni del ECS maggiormente studiati (Fig.2), derivano da acidi grassi polinsaturi, e sono strutturalmente identificati come N-arachidonoiletanolamide (AEA) e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG; Bukke et al., 2021).

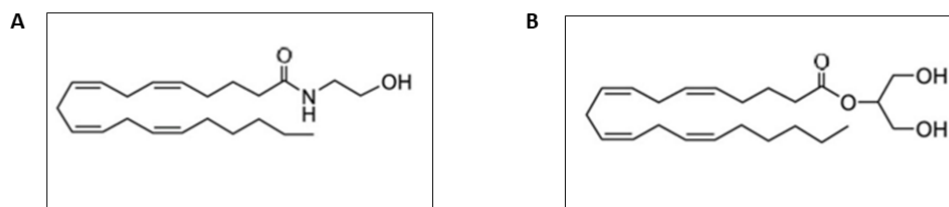


Figura 2: Strutture chimiche dell' N-arachidonoiletanolamide (A) e il 2-arachidonoilglicerolo (B), due endocannabinoidi (Bukke et al., 2021).

Vengono prodotti all'occorrenza dai neuroni –a seguito di depolarizzazione della membrana e aumento intracellulare dei livelli di Ca^{2+} - e dalle cellule immunocompetenti in periferia (cellule B, cellule T, monociti/macrofagi), e una volta svolta la loro funzione, vengono velocemente metabolizzati (Onaivi et al., 2006). Tuttavia, AEA e 2-AG vengono sintetizzati, trasportati ed inattivati in maniera diversa l'uno dall'altro (Fig.3; Lu and Anderson, 2017; Zou and Kumar, 2018). In breve, l'AEA è catalizzata dalla N-acil-fosfatidiletanolamina (NAF), mediante specifica fosfolipasi D (NAPE-PLD; Pacher et al., 2006). D'altra parte, il 2-AG viene invece prodotto dal diacilglicerolo (DAG), mediante lipasi (DAGL) α o β , sebbene la maggior parte, se non tutta la trasmissione sinaptica mediata da 2-AG nel cervello adulto, sia generata dal DAGL α (Murataeva et al., 2014). Per via della loro natura lipidica, AEA e 2-AG dopo il rilascio nello spazio intracellulare, non sono in grado di diffondersi liberamente come altri neurotrasmettitori, ma segregano ed interagiscono con superfici idrofobe, compresi i domini fosfolipidici e proteine, come l'albumina sierica (Nicolussi and Gertsch, 2015); tuttavia, il meccanismo alla base del loro trasporto non è ancora del tutto noto, nonostante alcuni studi ipotizzino diversi modelli (Kano et al., 2009). Tra quelli più accreditati, vi è certamente quello secondo cui entrambi gli endocannabinoidi, principalmente 2-AG, attraversino prontamente la membrana e viaggino in modo retrogrado per attivare i recettori CB_1 situati nei terminali presinaptici. Questi, una volta attivati, inibiranno a loro volta il rilascio del neurotrasmettore (NT) mediante soppressione dell'afflusso del Ca^{2+} (Kaczocha and Haj-Dahmane, 2022). Inoltre, il 2-AG è anche in grado di attivare i recettori CB_1 situati negli astrociti, portando al rilascio di glutammato. Il 2-AG restante nella fessura sinaptica, viene assorbito nei terminali presinaptici -attraverso un meccanismo ancora poco chiaro- e degradato in acido arachidonico (AA) e glicerolo, dalla

monoacilglicerolo lipasi (MAGL). D'altra parte, AEA, viene sintetizzato nel terminale postsinaptico e va ad attivare il recettore CB₁ intracellulare e altri obiettivi non appartenenti al ECS, come ad esempio il “transient receptor potential vanilloid 1” (TRPV1). Una volta terminata la sua funzione, viene degradata in AA ed etanolamina (EtNH₂), ad opera dell'ammide idrolasi degli acidi grassi (FAAH), che si trova principalmente nei terminali postsinaptici (Zou and Kumar, 2018).

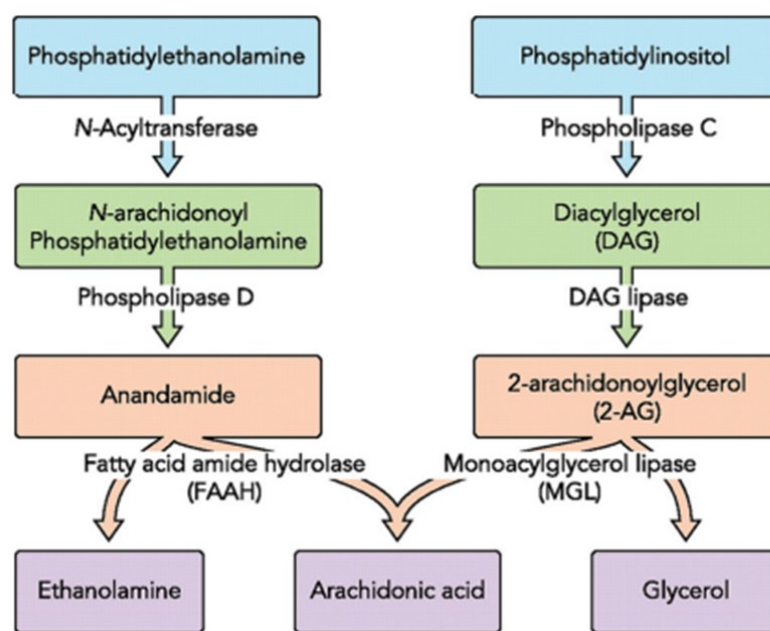


Figura 3: Sintesi e degradazione di AEA e 2-AG (Lu and Anderson, 2017).

2.2. Recettori cannabinoidi

Nonostante diversi studi abbiano suggerito l'esistenza di presunti recettori orfani dei cannabinoidi -i cosiddetti recettori non-CB₁/CB₂ (Mackie and Stella, 2006; Brown, 2007)- i più noti responsabili della mediazione del segnale cannabinoide ad oggi, sono i CB₁ e i CB₂ (Matsuda et al., 1990). I recettori CB₁ sono maggiormente espressi principalmente nel SNC, in particolare nella corteccia, nell'ippocampo, nei gangli della base e nel cervelletto; mentre i recettori CB₂ negli organi periferici con funzione immunitaria, come leucociti, milza, tonsille, timo e testicoli (Brown et al., 2002; Howlett et al., 2002; Chen et al., 2010). Tuttavia, alcuni studi hanno identificato anche la presenza dei recettori CB₂ oltre che CB₁, nel cervello (Sickle et al., 2005) ed altri, hanno suggerito che il CB₁ è espresso anche in diversi tessuti periferici tra cui milza, polmone e cuore (Bonz et al., 2003; Feng et al., 2014). Inoltre, è stato

anche dimostrato che i recettori CB₂ svolgono differenti ruoli in una varietà di altri sistemi, tra cui quelli cardiovascolare e respiratorio, l'osso, il tratto gastrointestinale (GI) e il fegato (Onaivi et al., 2006; Maccarrone, 2008).

Entrambi i due recettori cannabinoidi (CB_r), appartengono alla categoria dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs; Ye et al., 2019). È stato però dimostrato, che mediano differenti meccanismi d'azione (Fig.4); difatti, entrambi sono accoppiati alla proteina Gi/o per inibire l'attività dell'adenilato ciclastasi (AC) che porta ad una diminuzione dei livelli di cAMP. Tuttavia, i recettori CB₁ sono in grado di accoppiarsi anche alle proteine G_s, che invece stimolano la produzione di cAMP (Bonhaus et al., 1998; Pertwee, 2006) in modo ligando-specifico (Bonhaus et al., 1998; Lu and Anderson, 2017; Ye et al., 2019) e dunque l'attivazione della protein chinasi A (PKA; Ye et al., 2019). D'altro canto, i recettori CB₂, attraverso la loro subunità Gβγ, sono anche noti per essere accoppiati alla protein chinasi C (PKC), la quale porta a sua volta all'attivazione della MAPK e alla fosforilazione della chinasi regolata dal segnale extracellulare (ERK), modulando dunque una via di trasduzione del segnale complessa, che regola diversi processi cellulari nei tessuti maturi e in via di sviluppo (Turcotte et al., 2016). Inoltre, l'attivazione del recettore CB₂, induce anche il rilascio di Ca²⁺ intracellulare dal reticolo endoplasmatico -quindi un corrispettivo aumento del Ca²⁺ mitocondriale- attraverso l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) e la produzione dell'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃; Zoratti et al., 2003).

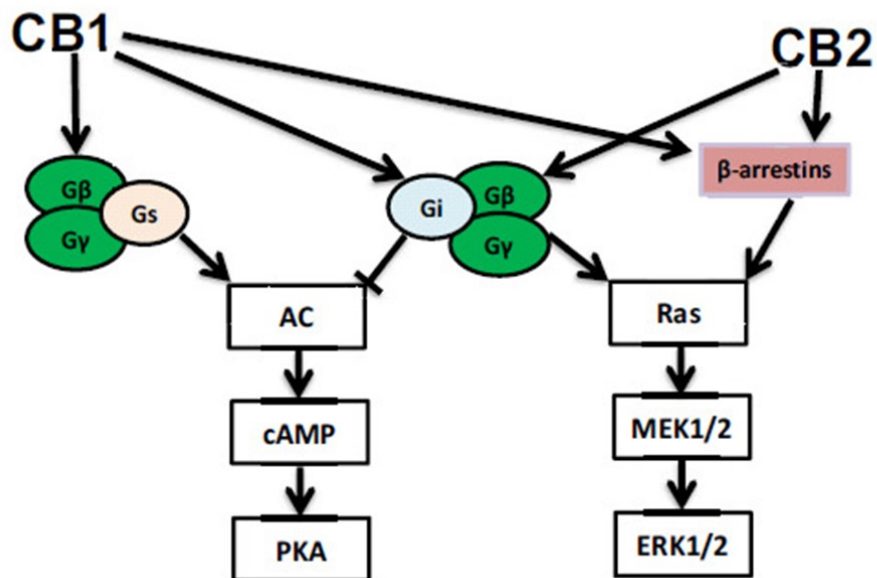


Figura 4: Rappresentazione schematica delle le principali vie di segnalazione intracellulare dei recettori endocannabinoidi (Ye et al., 2019).

2.3. Effetti dei cannabinoidi sulla cognizione

L'ampia densità e distribuzione dei CBR, risulta indicativa della numerosità dei processi fisiologici sopra elencati, nei quali il ECS è direttamente coinvolto, sia a livello periferico che centrale. Difatti, l' ECS regola molteplici meccanismi di omeostasi e plasticità sinaptica (Kano et al., 2009), inclusa la neurogenesi, il perfezionamento delle connessioni neuronali e della trasmissione sinaptica (Katona and Freund, 2021), oltre che nei processi d'addiction, mediante i classici meccanismi di gratificazione e di rinforzo (Cooper and Haney, 2009); ma è anche coinvolto nell'attività motoria, esercitando un effetto bifasico -basse dosi inducono un'attivazione motoria, mentre dosi elevate sfociano in una sua graduale soppressione, fino all'insorgenza di catalessia (Drews et al. 2005; Rodvelt et al. 2007; Polissidis et al. 2010; Ossato et al., 2015; Canazza et al., 2016)- in maniera dose-dipendente (Romero et al., 1995) e nella regolazione del comportamento alimentare, mediante le già citate proprietà stimolanti l'appetito (Williams and Kirkham, 1999). Tuttavia, considerando il focus di tale progetto di Dottorato, valuteremo nello specifico l'importante ruolo del ECS nella motivazione e nella cognizione (Mechoulam and Parker, 2013). È difatti risaputo che l'uso acuto e cronico di cannabis porta a danni cognitivi (Gonzalez et al., 2017; Bogaty et al., 2018). In particolare, l'uso regolare di cannabis può alterare la funzione cerebrale, specialmente le reti che interessano la memoria, l'attenzione e l'abilità cognitiva (Kim et al., 2019), sia nell'uomo che negli animali (Riedel and Davies 2005; Marsicano and Lafenetre. 2009; Akirav, 2011; Bilel et al., 2023). Oltre ai deficit nel funzionamento cognitivo, è ben documentato anche l'impatto dei concomitanti cambiamenti causati dall'intossicazione acuta da cannabinoidi, nei sistemi neurochimici glutamatergici, GABAergici e colinergici nell'ippocampo, ognuno dei quali è stato implicato per altro nella funzione della memoria (Lichtman et al., 2002; Bilel et al., 2023). Diversi studi hanno inoltre valutato l'impatto funzionale dell'uso cronico di cannabis sia negli adulti che negli adolescenti (Lorenzetti et al., 2016; Yanes et al., 2018; Sagar and Gruber, 2019). In particolare, studi condotti su animali e sull'uomo, hanno evidenziato che l'uso pesante e regolare di cannabis durante l'età adolescenziale, è associato ad esiti cognitivi negativi più gravi e persistenti rispetto all'uso durante l'età adulta, suggerendo che il cervello dell'adolescente può essere particolarmente vulnerabile agli effetti dell'esposizione alla cannabis (Lubman et al., 2015). Diversi studi, quali quelli sulla memoria (Kanayama et al., 2004; Becker et al., 2010; Jager et al., 2010), sull'attenzione (Abdullaev et al., 2010), sulla capacità decisionale (Cousijn et al., 2013) e di controllo (Behan et al., 2014), condotti su adolescenti hanno mostrato modelli anormali di attivazione funzionale (Burggren et al., 2018). Tuttavia, è da sottolineare che diversi fattori, quali le differenze di genere e le

variazioni genetiche possono influenzare questi effetti (Crane et al., 2013; Cosker et al., 2018). Inoltre, è stato confermato che i cambiamenti nella struttura ippocampale dovuti all'uso pesante di cannabis, a partire dall'adolescenza, persistono in età adulta anche dopo l'astinenza per diversi decenni (Burggren et al., 2018).

2.4. Studio del ECS per lo sviluppo di migliori strategie diagnostiche e terapeutiche

Nel paragrafo precedente, si è sottolineato quanto l'ampia densità e distribuzione dei CBr sia fondamentale per lo svolgimento di diverse processi fisiologici, sia a livello periferico che centrale. Pertanto, la presenza dei recettori CB₁ nel sistema nervoso centrale (SNC), insieme all'impatto della sua modulazione sulle funzioni cognitive mediante attivazione endogena e/o con la somministrazione esogena di cannabinoidi, suggerisce l'importanza dello studio del ECS come target farmacologico per lo sviluppo di nuovi farmaci, per il trattamento e la comprensione dei ruoli fisiologici di questo stesso sistema in vari disturbi mentali (Rana et al., 2021) e malattie neurodegenerative (Gaston and Friedman, 2017; Basavarajappa et al., 2017; Baruch et al., 2019; Cooray et al., 2020). La neurodegenerazione è principalmente definita come la perdita progressiva del tono neuronale nel cervello, sebbene non limitato al SNC (Agrawal, 2020), e ciò comporta un deterioramento delle capacità cognitive, una disfunzione nello svolgimento delle attività quotidiane e vari disturbi comportamentali (Talarico et al., 2019). Tuttavia, è da evidenziare che AD, PD e sclerosi laterale amiotrofica (SLA), non sono le uniche malattie che possono portare alla perdita del tono neuronale; difatti, anche malattie vascolari come ischemia e ictus emorragico in diverse aree del cervello, così come infezioni o danni cranici causati da incidenti, possono indurre un danno neurodegenerativo simile a quello manifestato anche in diverse forme di demenza (Valeri and Mazzon, 2021).

Nell'ambito delle demenze neurodegenerative, tra le teorie della patogenesi dell'AD, la più popolare suggerisce che la deposizione della proteina Amiloide- β (A β) in specifiche aree del cervello, sia uno degli eventi fondamentali di una serie di cambiamenti a lungo termine che conducono ad una massiva perdita neuronale e della neurotrasmissione, con il manifestarsi dei sintomi classici di questa forma di demenza (deficit della memoria, cognitivi e motori; van der Stelt et al., 2006). A ciò vanno aggiunte inevitabilmente le evidenze ottenute tramite studi condotti sul cervello umano post-mortem di pazienti affetti da AD, i quali hanno dimostrato che il modello di espressione recettoriale del ECS è alterato (Benito et al., 2003), mostrando una sovraregolazione e nitrosilizzazione dei recettori CB₁ e CB₂ che sembra interessare la microglia (Ramirez et al., 2005; Maroof et al., 2014), stessa area cerebrale di deposizione della proteina A β , la quale scatena una risposta neuro-infiammatoria locale

(Harkany et al., 1999). Una serie di studi *in vitro* ha evidenziato che i livelli di endocannabinoidi sono significativamente aumentati come conseguenza del danno tossicologico subito nel cervello, ma non ci sono cambiamenti nell'espressione recettoriale di CB₁, mentre vi è un significativo aumento dell'espressione di CB₂ nelle cellule della microglia, lasciando spazio all'ipotesi di un'attivazione appunto della risposta antinfiammatoria (Ramirez et al., 2005; Maresz et al., 2005). Altri dati post-mortem ricavati dai pazienti affetti da AD, smentiscono tuttavia il dato precedente, dimostrando che i livelli di AEA e il suo precursore lipidico, sembrano essere diminuiti in corteccia frontale e temporale (Jung et al., 2012). D'altro canto, la degenerazione ippocampale e i deficit cognitivi relativi indotta dall'accumulo di A β , causano una maggiore sintesi di 2-AG, favorendo dunque ancora una volta, l'ipotesi che il danno neuronale regoli in qualche modo la sintesi degli endocannabinoidi (van der Stelt et al., 2006). Pertanto, la produzione degli endocannabinoidi e la conseguente attivazione dei CBr, potrebbe essere tradotta come un tentativo stesso da parte del CNS di auto proteggersi contro i danni arrecati a principio della patogenesi da AD (Maroof et al., 2014).

Contemporaneamente, anche diversi studi *in vivo*, si sono incentrati sul ruolo dell'ECS nella fisiopatogenesi dell'AD, sfruttando la somministrazione di A β direttamente nel CNS come tecnica sperimentale (Benito et al., 2007), analizzando approfonditamente il processo di perdita di memoria cui gli animali vanno incontro, essendo uno dei primordiali e più frequenti sintomi cui i pazienti incorrono. Difatti, considerando che gli effetti “memory-disrupting”, ovvero disturbi della memoria, sono caratteristici dell'assunzione di cannabinoidi esogeni (Barbieri et al., 2016; Barbieri et al., 2022), è ragionevole considerare che il blocco selettivo di CB₁ possa avere un ruolo fondamentale nel migliorare la memoria a seguito dell'esposizione ad A β (Marzola et al., 2003).

Altro punto degno di nota, riguarda la trasmissione colinergica. Difatti, l'acetilcolina (ACh) è risaputo essere uno dei principali neurotrasmettitori nel cervello –con ruoli chiave in una serie di processi, comprese le funzioni di memoria ed esecutive- mediante attivazione dei due recettori muscarinico e nicotinico. In pazienti affetti da AD, l'espressione dei recettori nicotinici dell'ACh (nAChR presinaptici) pare essere ridotta. Infatti, è stato suggerito che A β sia in grado di legarsi direttamente a tali recettori, con alta affinità, inattivandoli (Schliebs and Arendt, 2011). Inoltre, è stato dimostrato che il Δ^9 -THC può inibire l'attività acetilcolinesterasica e limitare l'amiloidogenesi, migliorando così la trasmissione colinergica e ritardando dunque la progressione della malattia (Campbell and Gowran, 2007).

CAPITOLO 3: Cannabis e Cannabinoidi Sintetici

3.1. Cannabis

Ad oggi, spesso al termine Cannabis viene comunemente attribuita un'accezione "negativa", associando il suo uso ad un contesto prettamente specifico, ovvero nell'ambito delle tossicodipendenze. Ciò è dovuto principalmente alla sua popolarità nel mercato illecito delle sostanze psicoattive. Tuttavia, il consumo di cannabis per scopi ricreativi può essere datato ad oltre 2500 anni fa (Donahue, 2019) e tutt'oggi viene illegalmente abusata da più del 7.7% della popolazione mondiale di età compresa tra i 15 e i 64 anni (Protti et al., 2019; EMCDDA, 2022). Difatti, dati recenti mostrano che più di 48 milioni di uomini e circa 31 milioni di donne hanno fatto uso di cannabis almeno una volta nella loro vita e tra queste persone, 15.8 milioni dichiarano di averla utilizzata nell'ultimo anno (EMCDDA, 2022). In realtà, *Cannabis* è il nome botanico comune delle Cannabacee, una famiglia di piante che comprende più di 700 varietà, classificate in tre differenti specie: *sativa*, *ruderalis* ed *indica* (Pattnaik et al., 2022). La *Cannabis sativa* o *canapa*, è tra le tre specie di piante quella che fin dal passato è stata parecchio coltivata, soprattutto per usi tessili, ma che successivamente fu sempre più popolare come sostanza d'abuso, a causa degli effetti psicotropi causati dalla presenza del Δ^9 -THC.

3.1.1. Evidenze cliniche

Nei primi anni del 1960, a seguito di indagini circa la struttura e la stereochimica del Δ^9 -THC, sempre più cannabinoidi sintetici (CBs) iniziarono ad essere prodotti, allo scopo di studiare la farmacologia dei recettori su cui agiscono e per indagare circa i loro potenziali effetti terapeutici (Mills et al., 2015). Eppure, la cannabis sativa contiene più di 500 componenti bioattivi (Basavarajappa et al., 2017), che includono principalmente fitocannabinoidi (Pertwee, 2014; Ahmed et al., 2015), terpeni (Elsohly and Slade, 2005), polifenoli, flavonoidi, acidi grassi, oli e cere (Pattnaik et al., 2022), i quali però non hanno alcuna proprietà psicoattiva (Amin and Ali, 2019). Fitocannabinoidi –classificati in tricyclici, bicyclici e altri (Bukke et al., 2021)- e terpeni, sono i componenti della cannabis che hanno mostrato avere più interesse scientifico per la loro azione terapeutica come agenti stimolanti l'appetito, dunque per il trattamento di anoressia, cancro o infezione da virus dell'immunodeficienza umana e sindrome da immunodeficienza acquisita (HIV/ AIDS; Jatoi et al., 2002; Abrams et al., 2003); inoltre, i suoi effetti antiemetici possono essere utili per i pazienti in chemioterapia per il trattamento del cancro (Herman et al., 1979; Hutcheon et al., 1983), oltre che fornire sollievo sintomatico dal dolore neuropatico cronico in caso di cancro

stesso, HIV/AIDS, fibromialgia, artrite reumatoide (Wilsey et al., 2008; Lynch and Campbell, 2011; Wilsey et al., 2013; Wang et al., 2021; Petzke et al., 2022) e sclerosi multipla (Wade et al., 2004; Rog et al., 2005). Inoltre, la cannabis si è mostrata avere promettenti attività terapeutiche anche nel trattamento di alcune malattie neurodegenerative (come AD e morbo di Parkinson) e di diversi disturbi neurologici (schizofrenia, depressione, ansia, insonnia, epilessia e convulsioni; Kogan e Mechoulam, 2007; Ortiz-Medina et al., 2018; Arzimanoglou et al., 2020). Data la rilevanza terapeutica sopra citata, non sorprende che negli ultimi 20 anni, il controllo dell'utilizzo di cannabis a scopo auto-medicale e ricreativo sia stato completamente o parzialmente controllato in alcuni paesi o regioni (come in Canada, alcuni stati degli Stati Uniti, Georgia, Uruguay, Sudafrica e Australia; Williams et al., 2017; Pattnaik et al., 2022), nonostante vi è ancora una notevole carenza di studi clinici ben controllati e randomizzati, in doppio cieco, per fornire chiarezza sull'efficacia del Δ^9 -THC e cannabidiolo (CBD, un altro fitocannabinoido) come agenti terapeutici (Amin and Ali, 2019). Tuttavia, la cannabis medica (o marijuana medicinale) è stata legalizzata in molti paesi (Ebbert et al., 2018), Italia compresa (Di Luca et al., 2020). Infatti ad oggi, le preparazioni a base di erbe di cannabis per uso medico sono disponibili in commercio sotto forma di vaporizzatori, spray e capsule orali, decotti e oli (Brunetti et al., 2020). Tra i prodotti più diffusi a base di solo THC, vi sono il Nabilone (Cesamet®; Valeant Pharmaceuticals, Irvine, CA, USA) e il Dronabinol (Marinol®; Solvay Pharmaceuticals, Marietta, GA, USA), entrambi utilizzati principalmente come soppressori della nausea e del vomito associati alla chemioterapia (Bukke et al., 2021), e solo il secondo, per trattare l'anoressia associata alla perdita di peso in pazienti con AIDS (Abuhasira et al., 2018); mentre il Sativex® (GW Pharmaceuticals, Cambridge, UK) ha un rapporto 1:1 tra THC e CBD, e viene principalmente utilizzato per le sue proprietà antispasmodiche e analgesiche (Consroe et al., 1997). Infine, l' Epidiolex® (GW Pharmaceuticals, Cambridge, UK) per uso orale, contenente dosi elevate di CBD e concepito per contrastare le convulsioni (ema.europa.eu).

3.2. Cannabinoidi sintetici

Quanto detto circa l'utilizzo della cannabis medicata, ha tuttavia aumentato la ricerca e di conseguenza anche la disponibilità sul mercato di tal prodotto, ma soprattutto il suo uso massiccio da parte di una buona fetta della popolazione adulta (Williams et al., 2017). Contemporaneamente, l'acquisto legale di prodotti derivati dalla cannabis -come cioccolata, caramelle gommose a forma di orsi e leccalecca- sta attirando sempre più alla sperimentazione anche un profilo di utilizzatori di età molto più giovane, e ha infatti aumentato l'incidenza di reazioni avverse nei bambini (Lavi et al., 2016). Inoltre, abbastanza

preoccupante, risulta essere il fatto che nel 2021 un maggior numero di paesi ha segnalato prodotti a base di cannabis adulterati con SCBs pericolosi, che rappresentavano rischi per la salute dei consumatori (EMCDDA, 2022). In quest’ottica, non sorprende che in poco tempo i SCBs abbiano acquistato sempre più popolarità tra individui che ne abusavano per le loro proprietà psicoattive, divenendo velocemente una tra le classi di NSP più vendute nel mercato illecito delle sostanze stupefacenti (EMCDDA, 2022), come dimostra la figura sottostante (Fig.5).

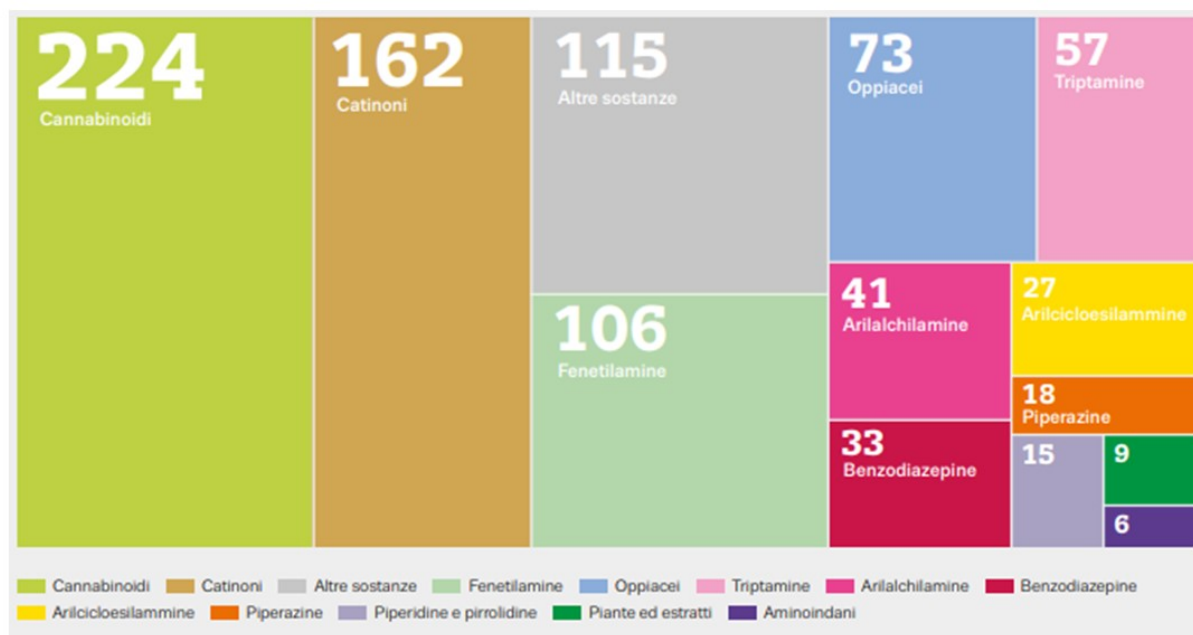


Figura 5: Numero di NPS per categoria, monitorate dal sistema di allerta precoce dell’UE (EMCDDA, 2022).

Insieme agli stimolanti sintetici, rappresentano una tra le classi di composti di sintesi che sono chimicamente i più largamente diversificati, ed agiscono mediante azione diretta sul ECS, innescando una pleora di effetti che somigliano, ma sono molto più intensi, a quelli indotti dalla cannabis (Roque-Bravo et al., 2023). Il motivo, risiede nella loro maggiore affinità recettoriale; difatti, uno studio *in vitro* ha suggerito che, mentre il THC agisce come agonista parziale sul recettore CB₁, i cannabinoidi sintetici e molti loro metaboliti agiscono come agonisti pieni e sono caratterizzati da una potenza maggiore (Tai et al., 2017). Ciò spiegherebbe la loro maggiore tossicità, e dunque il manifestarsi di effetti tossici più gravi, oltre al fatto che nella cannabis è presente il CBD, con proprietà ansiolitiche e antipsicotiche, non presente nelle miscele dei SCBs (Fattore and Fratta, 2011). Tuttavia, è da tener presente che gli effetti tossicologici e avversi non possono essere interamente predetti, in quanto variano a seconda della via di somministrazione scelta, della dose assunta, ma soprattutto dall’eventuale “polydrug” -contemporanea assunzione di altre droghe, compreso l’alcol- oltre che della vulnerabilità individuale (Baumann et al., 2014).

Tuttavia, a differenza della cannabis o più precisamente del suo componente psicoattivo ricercato dagli abusatori (il Δ^9 -THC), che come già anticipato è ampiamente controllato e regolamentato, la maggior parte dei SCBs sono venduti liberamente nel mercato delle droghe illecite, riuscendo ad eludere la legislazione vigente. Un ulteriore punto di forza dell'attuale popolarità dei SCBs è difatti la facile accessibilità via internet di queste molecole -acquistate con nomi diversi come "Spice, K2, Blaze, Orange" e molti altri- vendute nel dark web con indicazione specifica di "non destinate al consumo umano", ma come *Sali da bagno* o prodotti da collezione (Alves et al., 2020) e la mancanza di test standard di rilevabilità di queste sostanze in campioni di sangue o urine (Fattore and Fratta, 2011; Luethi and Liechti, 2020). Pertanto, sono costantemente necessarie indagini sugli effetti farmaco-tossicologici dei SCBs emergenti, al fine di offrire un contributo considerevole per migliorare la salute pubblica a livello mondiale.

3.2.1. Evidenze precliniche

I SCBs agiscono come agonisti pieni del recettore CB₁, verso cui dimostrano avere elevate affinità di legame, spesso 100 volte superiore rispetto al Δ^9 -THC (Wiley et al., 2013, 2016; Vigolo et al., 2015; Banister et al., 2015; Uttl et al., 2018; Theunissen et al., 2021), e causando gli effetti desiderati più noti menzionati dagli utilizzatori abituali di queste sostanze, quali rilassamento, euforia e disinibizione (Le Boisselier et al. 2017). Tuttavia, i SCBs possono anche indurre effetti sia altamente più potenti che effettivamente tossici rispetto alla cannabis, quali mal di testa, vomito, paranoia e attacchi di panico, tachicardia, convulsioni e allucinazioni (Lapoint et al., 2011; Every-Palmer et al., 2011), e talvolta possono indurre morte per overdose (Winstock e Barratt 2013; Trecki et al. 2015). Nell'ultimo decennio, diversi nuovi SCBs sono emersi sul mercato illecito del web (OEDT,2009;2021); sono sintetizzati sulla base di quattro modelli con un nucleo N-indolico, indazolico o carbazolico, immobilizzato da diversi sostituenti (Malaca et al., 2022). Il Naftalen-1-il-(1-pentilindol-3-il)metanone, comunemente noto come JWH-018, è stato uno dei primi composti SCBs apparsi sul mercato illecito, identificato da indagini forensi tra i principi psicoattivi di "Spice" (OEDT, 2009) e tutt'oggi, come suggerito da recenti report di intossicazioni, è ancora ampiamente utilizzato (Theunissen et al., 2021).

Molteplici sono gli studi *in vivo* che hanno già rivelato gli effetti in acuto indotti da JWH-018, i quali vengono riassunti nel cosiddetto "effetto tetraide", caratterizzato da ipotermia, analgesia, ipolocomozione e acinesia (Wiley et al., 2012; Macri et al., 2013; Vigolo et al., 2015). Tali effetti, risultano essere molto più potenti rispetto quelli indotti dal Δ^9 -THC (Vigolo et al., 2015; Ossato et al., 2015; Canazza et al., 2016) e questo composto altera anche

le risposte sensorimotorie nei topi (Ossato et al., 2015; Canazza et al., 2016). Inoltre, i recenti studi metabolici hanno anche dimostrato che altri SCBs, come nel caso del JWH-175, possono essere rapidamente bioattivati in JWH-018 nel sangue dei topi, suggerendo così che gli effetti *in vivo* di tale molecola siano probabilmente dovuti alla formazione del JWH-018 (Tirri et al., 2022). Da un punto di vista traslazionale, questo rappresenta un aspetto molto importante non solo come allarmante incidenza sulla salute pubblica, data la continua immissione di NPS sul mercato delle droghe illecite, ma riflette anche la grande e costante attenzione che deve essere posta allo studio di molecole considerate "vecchie" (come nel caso del JWH-018) sia per scopi clinici, che tossicologici e forensi. Tuttavia, tutti gli studi summenzionati sugli effetti *in vivo* delle SCBs sono stati per lo più valutati a seguito di una somministrazione acuta. Meno note risultano essere la valutazione degli effetti indotti da somministrazioni ripetute.

In un recente studio di Pintori e colleghi, è stato dimostrato che la somministrazione ripetuta di una bassa dose di JWH-018, induce effetti comportamentali e biochimici anche dopo 7 giorni dall'ultima somministrazione della sostanza (Pintori et al., 2021). Ciò suggerisce che la somministrazione prolungata di tale molecola, può indurre effetti neuroplastici di lunga durata nel cervello dei roditori. Un altro studio, ha valutato gli effetti comportamentali indotti dall'esposizione ripetuta (7 giorni) in topi maschi adulti di JWH-018 a dosi elevate (6 mg/kg), sacrificandoli 15 giorni dopo l'ultima somministrazione per una valutazione biochimica e molecolare (Bilel et al., 2023). Bilel e colleghi, hanno così dimostrato che il trattamento ripetuto con JWH-018 induce agitazione psicomotoria nei topi, ma allo stesso tempo produce variazioni nella loro interazione sociale, nella memoria e nelle abilità cognitive.

CAPITOLO 4: Scopo della tesi

La tematica in oggetto di questo studio di Dottorato, ricopre una grande rilevanza clinica e sociale; circa un milione sono difatti gli italiani colpiti da demenze di varia forma, e di questi circa 600.000 sono affetti da Alzheimer. Ad oggi, le poche terapie sintomatiche disponibili (inibitori delle colinesterasi e memantina), impongono una razionale ricerca di nuove terapie, anche possibilmente preventive nella progressione della malattia. In quest'ottica, il sistema endocannabinoide (ECS), è stato recentemente identificato come nuovo bersaglio di indagine fisiopatologica, dati i notevoli effetti terapeutici dell'utilizzo della cannabis medica. Tuttavia, vari studi riportano che l'intossicazione acuta e cronica da cannabis, provochi forti cambiamenti nello stato mentale soggettivo degli individui, con effetti negativi sul rendimento neuropsicologico (quale l'apprendimento, l'attenzione e la memoria di lavoro; deficit nelle abilità verbali, nel riconoscimento visivo, un ritardo nel richiamo visivo, e nei compiti di memoria prospettica a breve e a lungo intervallo). Pertanto, è plausibile ipotizzare che un uso cronico di cannabis, disregolando il segnale endocannabinoide, possa rappresentare una concausa nella fisiopatogenesi della demenza. Questa problematica è stata fortemente complicata dal crescente consumo di Nuove Sostanze Psicoattive (NPS), in particolare dai cannabinoidi sintetici, composti più potenti della cannabis ed in grado di causare gravi effetti collaterali "atipici", quali convulsioni, aggressività, agitazione psicomotoria, profonda perdita della memoria (anche per ore) e danni cardiovascolari.

Pertanto, al fine di ottenere uno studio di tipo traslazionale che correli le informazioni tra le osservazioni nell'uomo e quelle nell'animale, il progetto di Dottorato è stato condotto mediante studi clinici e preclinici.

Gli studi clinici, hanno previsto l'utilizzo di campioni sierici ricavati da soggetti maschi e femmine (età media: 76 anni) affetti da demenza di varie tipologie. L'obiettivo è stato quello di valutare le variazioni dei livelli dei principali endocannabinoidi (AEA e 2-AG) del ECS e tentare di individuare dei modelli definiti di variazioni che identifichino una specifica forma di demenza.

Gli studi preclinici, che hanno occupato la gran parte dello svolgimento di questo progetto di Dottorato, sono stati eseguiti allo scopo di valutare se l'utilizzo cronico di nuovi Cannabinoidi Sintetici (SCBs) possa indurre sintomatologie e deficit simili a quelli indotti da demenza e se il loro utilizzo, anche per un breve periodo nell'arco della vita, possa rappresentare un'ulteriore fattore di rischio nella patogenesi della demenza stessa. In

particolare, sono stati avviati una serie di studi pilota che hanno permesso di individuare se, alla dose efficace testata, vi sia correlazione tra i sintomi manifestati *in vivo* ed eventuale disregolazione del sistema ECS a seguito della somministrazione protratta di una specifica sostanza. Pertanto, sono stati valutati gli effetti farmaco-tossicologici *in vivo* (nel modello murino) indotti dalla somministrazione in acuto e protratta (per 7 giorni consecutivi) del JWH-018, uno dei più noti ed utilizzati SCBs. A seguito di un periodo definito di wash-out, sono state anche valutate eventuali variazioni comportamentali e i livelli degli endocannabinoidi (AEA e 2-AG) nel plasma; infine, a seguito del sacrificio delle cavie, si è valutata l'eventuale variazione della densità recettoriale (CB₁ e CB₂), i livelli dei cannabinoidi endogeni e degli enzimi che badano alla loro sintesi (NAPE-PDL e DAGL α) e degradazione (FAAH e MAGL), in striato e ippocampo.

In conclusione, soffermandosi dunque sul potenziale d'abuso dei SCBs e le possibili conseguenze sul ECS, nel presente lavoro di Dottorato, si è verificato se l'utilizzo ripetuto di tale sostanza, anche per un breve periodo nell'arco della vita, possa rappresentare una concausa nella fisiopatogenesi della demenza senile.

CAPITOLO 5: Materiali e Metodi

5.1. *Animali*

In accordo con l'art. 4 c.2 del D.L. 116/92, questo studio è stato eseguito su topi maschi CD-1® (modello murino ICR, giovani adulti di 3-4 mesi di età con un peso compreso tra 35-40 grammi), non volendosi avvalere di animali con uno sviluppo neurologico più evoluto.

I topi sono stati allevati e stabulati presso il Laboratorio centralizzato per la Ricerca Preclinica (LARP) dell'Università di Ferrara (Via Fossato di Mortara, 70; 44121, Ferrara, Italia). Qui, venivano radunati in gruppi di cinque -divisi ovviamente in base al sesso, poco dopo la nascita- all'interno di gabbie IVC (individually ventilated cages; superficie del pavimento/animale: 80 cm²; altezza minima del recinto: 12 cm) e sono sottoposti a condizioni controllate di luce (alternanza luce-buio di metà giornata: 12 ore di luce, dalle 6.30 alle 18.30, e 12 ore di buio, dalle 18.30 del pomeriggio alle 6.30 del giorno successivo), di temperatura (20-22°C) e di umidità (45-55%). Gli animali hanno inoltre accesso libero a cibo ed acqua (dieta 4RF25, GLP, Mucedola, Settimo Milanese, Milano).

Tutti i test sono stati condotti durante il giorno, dalle 8.00 alle 16.00 circa, con le stesse condizioni ambientali presenti nello stabulario e sono conformi alla direttiva del Consiglio della Comunità Europea (2010/63/UE), che modifica la precedente normativa 86/609/CEE. La direttiva citata è approvata dal Comitato Etico dell'Università di Ferrara e dal Ministero della Salute Italiano (223/2021-PR).

I test sono stati eseguiti adottando le misure adeguate sia per ridurre al minimo il numero di animali utilizzati che lo stress ed il dolore al quale sono stati sottoposti. Inoltre, a causa di possibili dimorfismi sessuali correlati alla patologia della demenza (Clinton et al., 2007), questo studio è stato eseguito solo su topi maschi. Il numero totale di animali utilizzati per lo svolgimento della tesi è di 113 topi.

5.2. *Sostanze utilizzate*

Le sostanze utilizzate per lo svolgimento degli studi preclinici in questo progetto di dottorato, sono il delta-9-tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) e il Naftalen-1-il-(1-pentilindol-3-il)metanone (JWH-018), entrambe regolarmente acquistate presso LCG Standards S.r.l. (LGC Standards, Milano, Italia). Prima di essere somministrate intraperitonealmente, entrambe le due sostanze in esame, sono state disciolte in etanolo assoluto (concentrazione finale pari al 5%) e Tween 80 (concentrazione finale pari al 2%). Il tutto è stato portato a volume aggiungendo opportuna quantità di soluzione salina (NaCl 0,9%) e somministrato

ad ogni topo per un volume totale pari a 4 µL/g. Tween 80, etanolo e soluzione salina sono state utilizzate anche come veicolo.

La scelta della dose utilizzata (0.01 e 6 mg/Kg) e gli effetti *in vivo*, sono stati definiti sulla base di precedenti studi di “Safety pharmacology” eseguiti presso i nostri laboratori (Canazza et al., 2016; Bilel et al., 2019).

5.3. Procedura sperimentale e protocolli utilizzati

Lo studio preclinico eseguito in questi tre anni di Dottorato di Ricerca, è il frutto di un piano sperimentale (Fig.6) ideato in modo tale da essere suddiviso in differenti studi pilota che hanno condotto ognuno a differenti risultati, ma che nel complesso permetteranno di ottenere un quadro definito che sostenga l'ipotesi originale che l'uso ripetuto di cannabinoidi sintetici, anche per un breve periodo di tempo, alteri la trasmissione cannabinoide endogena con conseguenti sintomi di detrimento cerebrale (con particolare riferimento all'invecchiamento dell'animale).

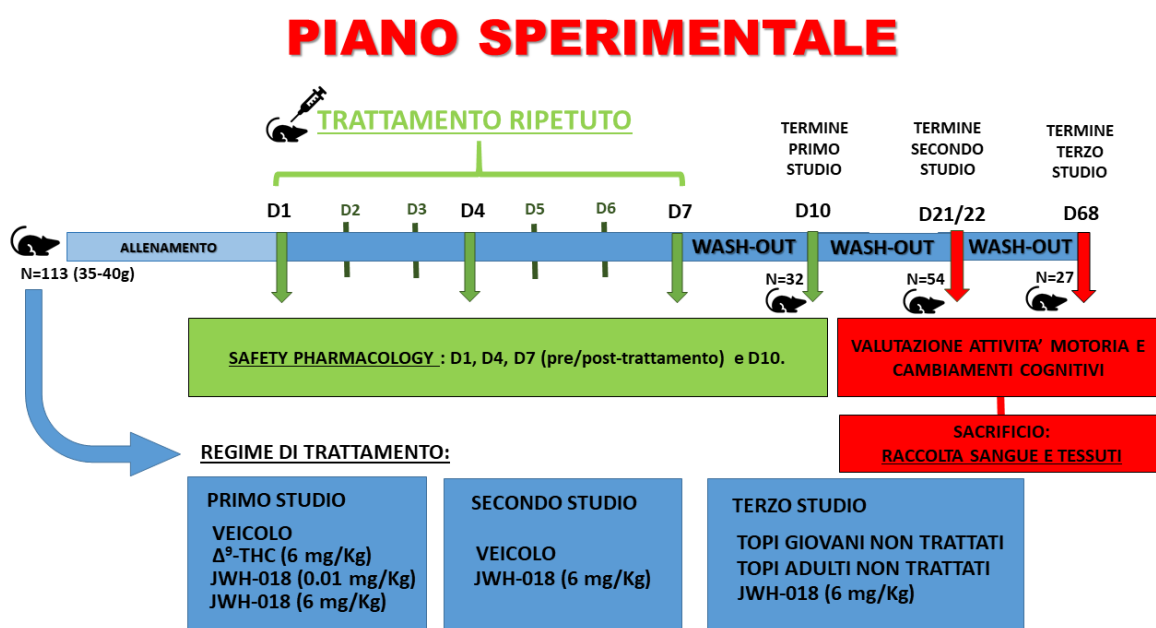


Figura 6: Piano sperimentale eseguito durante il Dottorato di Ricerca.

Pertanto, nel tentativo di fornire adeguatamente i dettagli di ogni protocollo sperimentale utilizzato, di seguito le metodiche verranno suddivise in base al susseguirsi dei tre differenti studi realizzati:

- Un primo studio in cui lo scopo era quello di valutare gli effetti comportamentali, sensori-motori e motori della somministrazione ripetuta per 7 giorni del cannabinoide sintetico JWH-018 a due differenti dosaggi (0.01 e 6 mg/Kg),

ponendolo a confronto non soltanto con quelli indotti dal più conosciuto Δ^9 -THC, ma valutandoli anche in relazione ad un controllo basale svolto prima di ogni iniezione giornaliera, al fine di verificare sia l'effetto primario delle sostanze che eventuali effetti persistenti (Fig.7).

PIANO SPERIMENTALE PRIMO STUDIO:

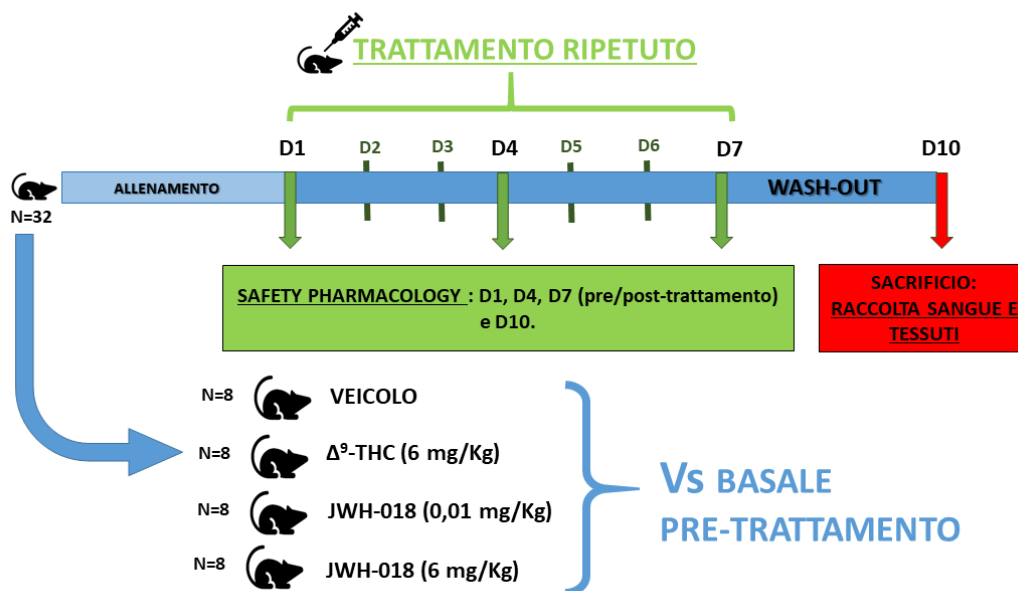


Figura 7: Protocollo sperimentale primo studio in vivo.

Da notare, che l'attività basale dei topi è stata valutata anche al giorno 10 (post wash-out), quindi tre giorni dopo l'ultima somministrazione, al fine di verificare se la somministrazione ripetuta per 7 giorni, avesse potuto modificare nel tempo la risposta comportamentale dell'animale.

- Un secondo studio, si è incentrato maggiormente sulle variazioni a livello motorio e cognitivo, a seguito della somministrazione protratta di 7 giorni della molecola in oggetto di studio e un periodo di wash-out pari a ~21/22 giorni. A seguito del sacrificio degli animali, si è provveduto ad eseguire il prelievo di sangue e tessuto cerebrale, per valutare eventuali variazioni nella densità recettoriale (CB_1 e CB_2), nei livelli di AEA e 2-AG, e negli enzimi che badano alla loro sintesi (NAPE-PDL e DAGL α) e degradazione (FAAH e MAGL), in striato e ippocampo (Fig.8).

PIANO SPERIMENTALE SECONDO STUDIO:

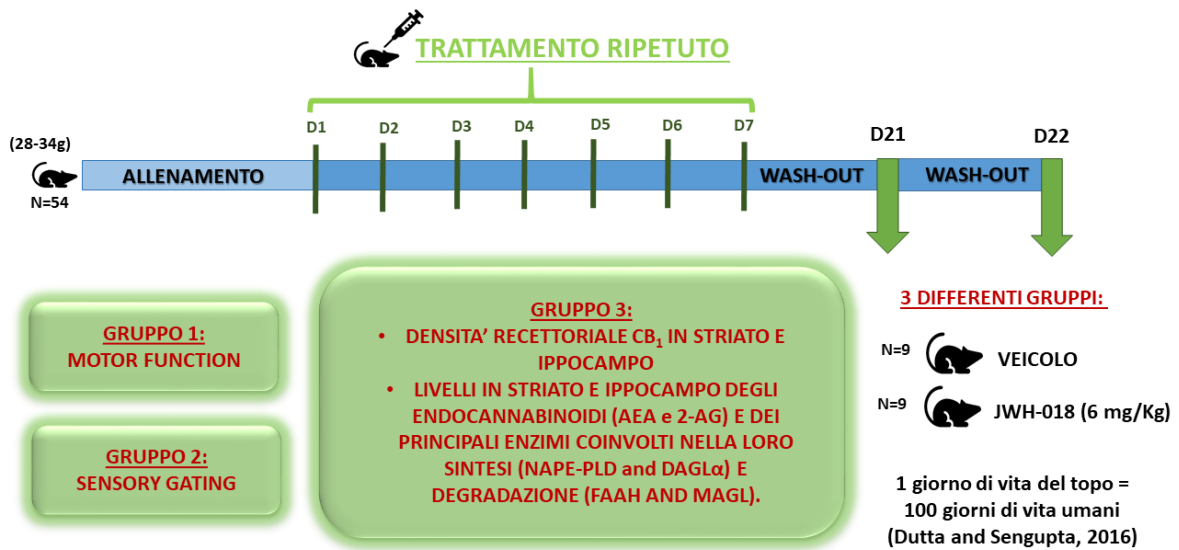


Figura 8: Protocollo sperimentale secondo studio in vivo.

- Un terzo studio invece, si è incentrato nella ricerca a lungo termine delle variazioni esclusivamente comportamentali e cognitive (Fig.9). Questa volta, sempre a seguito della somministrazione protratta per 7 giorni di JWH-018, si è provveduto ad effettuare un periodo di wash-out molto più lungo, circa di 2 mesi. Tenendo in considerazione il lavoro di Dutta e Sengupta (2016), la sperimentazione è stata avviata in una fase di crescita dei topi (3/4 mesi di vita) per cui traslazionalmente si ricade nel pieno del periodo dell'adolescenza umana (18 anni). In questo lavoro, Dutta e il collega spiegano come un giorno di vita del topo coinciderebbero all'incirca a 100 giorni di vita umana. Pertanto, sette giorni consecutivi di somministrazione di JWH-018, corrisponderebbero ad un utilizzo continuativo di circa 2 anni di suddetta sostanza. Allo stesso modo, un periodo di wash-out di 60 giorni per il topo, corrisponderebbero a circa 17 anni umani (Dutta e Sengupta, 2016). La scelta del periodo di wash-out è stata effettuata tenendo in considerazione il fatto che i topi hanno una vita precoce, più breve e molto più accelerata, rispetto agli umani; pertanto, si è ritenuto opportuno valutare le alterazioni comportamentali, cognitive e di variazione dei livelli del ECS dopo un intervallo di tempo adatto a ricadere in un periodo di vita in cui nei topi si anticipasse la senescenza, ovvero i 10 mesi di vita (Dutta and Sengupta, 2016).

PIANO SPERIMENTALE TERZO STUDIO:

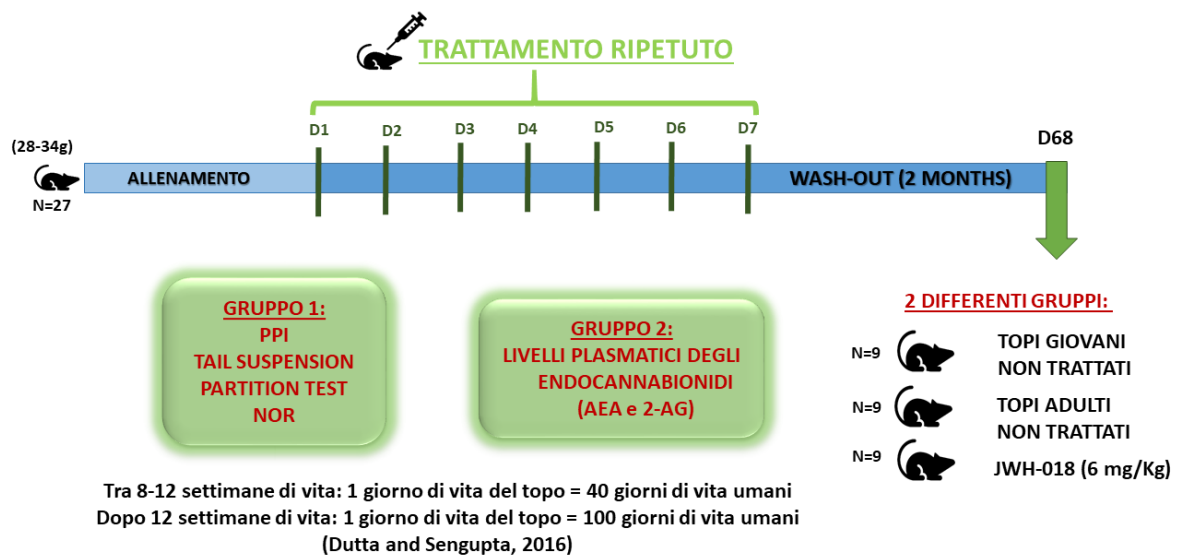


Figura 9: Protocollo sperimentale terzo studio in vivo.

5.3.1. Primo studio in vivo

Il protocollo sperimentale utilizzato in questo primo studio *in vivo*, segue le direttive proposte dalla “Safety Pharmacology” che prevedono, come test che valutano gli effetti sul sistema nervoso centrale, quelli suggeriti da Irwin (FOB: Functional Observation Battery), aggiornati con tecnologie recenti (S7A, 2001).

Secondo tali linee guida, l’osservazione del comportamento dell’animale viene registrato e valutato attraverso i risultati ottenuti da una serie di test che verranno ciclicamente ripetuti a 5-30-60-120-180-240-300 minuti dall’iniezione della sostanza in esame. I dati ottenuti, verranno in seguito confrontati con un ciclo di controllo effettuato prima dell’iniezione stessa. Ogni ciclo può essere diviso in tre fasi caratterizzate da un aumento progressivo della manipolazione dell’animale. Una particolare attenzione che permette di accrescere l’attendibilità dei dati raccolti aumentando in modo progressivo lo stress inflitto all’animale attraverso la manipolazione.

Un ciclo viene terminato in circa 35 minuti, quindi i dati raccolti e legati ad un determinato tempo sono da considerare nell’intorno di +/- 10 minuti, specialmente per i tempi 30/60 minuti.

5.3.1.1. Frequenza Respiratoria

Il protocollo sperimentale per la rilevazione della frequenza respiratoria, prevede il monitoraggio dell’animale mentre si trova all’interno dell’apposita gabbia d’osservazione (290x220x140 mm), sveglio e in stato di libero movimento. L’animale sarà registrato

mediante l'utilizzo di una telecamera (B/W USB; Ugo Basile, Italia) posta sopra la gabbia di osservazione. Un operatore esperto che non conosce i trattamenti farmacologici analizzerà successivamente i video offline. L'analisi, fotogramma per fotogramma, permette di valutare al meglio il numero di atti respiratori del topo al minuto, i quali in condizioni basali si aggirano intorno i 257 ± 11 atti al minuto (brpm). Il test viene ripetuto a 0, 10, 35, 65, 85, 125, 185, 245 e 305 minuti dopo la somministrazione.

5.3.1.2. Valutazione delle funzioni sensoriali

Per quanto riguarda la valutazione dei riflessi sensoriali, essi possono essere suddivisi in:

- **Riflessi Visivi:**

La risposta visiva è valutata mediante due test che indagano se la capacità del topo di catturare informazioni visive esterne, sia quando è fermo (visual object test) che in movimento (visual placing test), può variare a seguito della somministrazione di una sostanza (Ossato et al., 2015).

- Il visual object test consiste nel verificare se il topo è in grado di percepire l'avvicinarsi progressivo di un oggetto (frontalmente e lateralmente) al suo campo visivo. I segni tipici di un animale che gode di buona salute, quindi in grado di discriminare e percepire il segnale esterno, prevedono l'avvicinamento della testa all'oggetto, portando le zampe anteriori in posizione di "difesa" o, al contrario, arretrando. Per la risposta visiva frontale, viene utilizzata una barra orizzontale bianca (Fig.10, sinistra) e la procedura viene ripetuta 3 volte, assegnando un punto per ogni volta che l'animale risponde all'avvicinamento dell'oggetto.

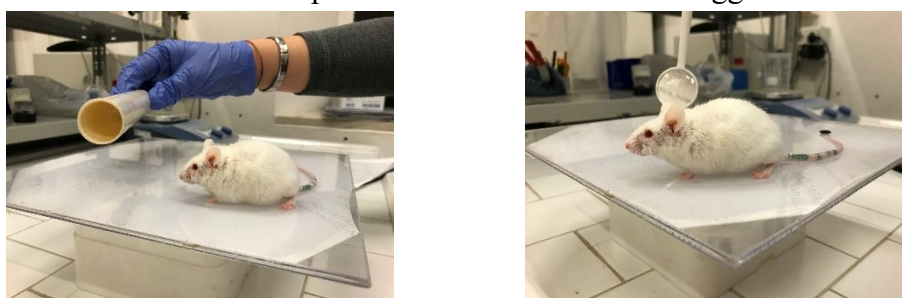


Figura 10: Valutazione dei riflessi visivi mediante: visual front object reflex (sinistra); visual side object reflex (destra).

Per la risposta visiva laterale, viene utilizzato un classico specchietto da dentista che viene avvicinato dalle spalle del topo verso il suo campo visivo, creando un arco orizzontale (Fig.10, destra). La risposta positiva alla visione dell'oggetto, prevede

un movimento da parte dell'animale, ruotando la testa verso l'oggetto o ritirandola. La risposta visiva laterale viene condotta bilateralmente ed il test viene dunque ripetuto 3 volte per occhio. Il punteggio assegnato sarà comunque di 1 per ogni riflesso osservato.

Il valore totale del visual object test (frontale e laterale), viene calcolato sommando i punteggi ottenuti in entrambi i test (punteggio complessivo 9). La valutazione della risposta all'avvicinamento dell'oggetto è stata eseguita a 0, 10, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minuti dopo l'iniezione.

- Il visual placing test invece, viene effettuato sollevando il topo per la coda e avvicinandolo al pavimento ad una velocità costante di 10 cm/s, mentre viene registrato da una telecamera (Canazza et al., 2016). L'analisi dei video, permette di valutare l'inizio della reazione del topo, mentre si avvicina al pavimento e la distanza perpendicolare fra gli occhi dell'animale stesso ed il pavimento. Avvalendosi di un di un righello elettronico, a questo punto è stata misurata tale distanza (per topi non trattati, circa $18 \pm 4,7$ mm). La valutazione della risposta al visual placing è stata eseguita a 0, 15, 35, 70, 125, 185, 245 e 305 minuti dopo l'iniezione.

• *Riflessi Tattili*

La risposta tattile di ogni topo è stata verificata attraverso stimolazione delle vibrissae, dei padiglioni e del riflesso corneale del topo, mediante l'utilizzo di un ago da gavaggio, come in precedenza descritto da altri studi comportamentali eseguiti presso i nostri laboratori (Ossato et al. 2015; Bilel et al. 2020).

- Per quanto riguarda il test dei padiglioni auricolari (Pinna reflex), si sfiorano i padiglioni (destra e sinistro), una volta internamente, una volta esternamente; per un totale di 4 volte.
- Nel test delle vibrissae (Vibrissae reflex), dove si sfiorano appunto le vibrisse (destra e sinistro), dunque 2 tocchi per lato.
- Nel test del riflesso corneale (Corneal reflex), si tocca delicatamente la cornea del topo mediante l'ago e si valuta la risposta, attribuendo un valore di: 3 punti se chiude la palpebra e sposta il viso; 2 se chiude solo la palpebra; 1 se sposta solo il viso. I valori indicati sono questa volta riferiti a ciascun occhio, pertanto il valore totale per un topo sano è di 6.

- *Riflessi Acustici*

L'acoustic test misura il riflesso dei topi in risposta ad uno stimolo acustico prodotto dall'operatore alle spalle dell'animale (Koch, 1999). In particolare, vengono valutate le reazioni a quattro differenti stimoli acustici per intensità e frequenza (Ossato et al. 2015):

- Snap: schiocco delle dita;
- Click: mediante strumento metallico;
- Acuto: tramite audiometro che riproduce un suono acuto-sonorizzato ad alta frequenza posizionato intorno ai 5.0-5.1 kHz
- Grave: tramite audiometro che riproduce un suono sordo-grave a bassa frequenza posizionato intorno ai 125-150 Hz.

Ciascun di questi test viene ripetuto 3 volte, dando valore 1 se presente il riflesso, 0 se non presente, per un totale di 3. La reattività acustica dell'animale è rappresentata come sommatoria dei punti ottenuti nei quattro test: snap + click + acuto + grave.

5.3.1.3. Valutazione della temperatura corporea

Per valutare al meglio gli effetti delle sostanze somministrate sulla termoregolazione, vengono registrate entrambe le risposte dei cambiamenti nella temperatura interna (rettale) ed esterna (attraverso il manto ventrale). Per la temperatura interna è stata utilizzata una sonda (1 mm di diametro) che viene delicatamente inserita, dopo aver opportunamente lubrificato con vaselina liquida, nel retto del topo (a circa 2 cm; Vigolo et al. 2015). La sonda è collegata ad un termometro digitale (Cole Parmer, modello 8402). Per la temperatura superficiale invece, viene utilizzato un termometro infrarosso digitale (Microlife, FR-1DZ1) che viene puntato a 1 cm dalla superficie dell'addome del topo (Vigolo et al. 2015).

Entrambe le temperature (superficiale ed interna) dei topi sono state misurate a 0, 30, 50, 85, 140, 200, 260 e 320 min post-iniezione.

5.3.1.4. Valutazione della soglia del dolore

I test della valutazione della soglia del dolore dei topi vengono valutati attraverso due differenti test: il tail pinch, che valuta la risposta al dolore meccanico, e il tail withdrawal, che invece valuta la risposta al dolore termico (Arfè et al., 2021).

- Il tail pinch test, prevede l'utilizzo di sonda rigida speciale collegata ad un dinamometro digitale (ZP-50 N, IMADA, Giappone), che viene delicatamente posto sulla porzione distale della coda del topo, e lì viene applicata una pressione

progressiva (Vigolo et al. 2015). Nel momento in cui il topo percepirà dolore, tenderà a flettere la coda, e in quel momento l'operatore deve smettere di applicare pressione alla coda. Lo strumento digitale è in grado di salvare automaticamente il picco massimo di peso supportato (g/ forza). Per evitare danni ai tessuti del topo, è stato impostato un cut-off (500 g/ forza). Il test viene ripetuto tre volte, e il valore finale preso in considerazione, sarà la media delle tre prove eseguite.

- Il tail withdrawal test, prevede di inserire il topo in un cilindro di plastica scuro ed immergere metà della coda in acqua calda (~48-51°C). Nel momento in cui il topo percepirà dolore, tenderà autonomamente a tentare di uscire la coda dall'acqua, o comunque a muoverla nel tentativo di liberarsi. L'osservatore, munito di cronometro, segnalerà il tempo di latenza (in secondi) che la coda resterà immersa in acqua (Vigolo et al. 2015). Anche in questo caso, per evitare danni ai tessuti del topo, è stato impostato un cut-off (15 s).

I test di valutazione della nocicezione indotta dalla somministrazione della sostanza, vengono eseguiti a 0, 35, 55, 90, 145, 205, 265 e 325 minuti post-iniezione.

5.3.1.5. Valutazione della forza muscolare

Il grip strength test valuta la forza muscolare scheletrica dei topi attraverso un dinamometro (ZP-50 N, IMADA), collegato tramite un trasduttore di forza isometrico ad una griglia (5x5 cm; Bilel et al. 2020). Per l'esecuzione di questo test, i topi sono trattiene dall'operatore per le code e vengono adagiati sulla griglia, dandogli il tempo necessario per afferrarla mediante le zampe anteriori. A questo punto, i topi vengono delicatamente tirati indietro, sempre dalla coda, fino a quando non lasciano la presa dalla griglia. Lo strumento digitale è in grado di salvare automaticamente il picco massimo di forza esercitata, espressa in grammo forza (g/forza). La media di tre repliche, viene utilizzata come risultato finale del test. Il grip strength test viene effettuato a 0, 15, 35, 70, 125, 185, 245, e 305 minuti post-iniezione.

5.3.1.6. Valutazione della capacità motoria

Le alterazioni indotte sulle abilità motorie dei topi, a seguito della somministrazione di sostanze stupefacenti, possono essere valutate attraverso l'utilizzo di differenti tipi di test. Tuttavia, all'interno dei protocolli di Safety Pharmacology, i più accreditati risultano l'accelerod, il drag (Vigolo et al., 2015; Ossato et al., 2015) e il bar test.

- L'accelerod test, permette di valutare differenti parametri motori, ovvero la coordinazione motoria, la presenza di acinesia e/o bradicinesia, l'equilibrio, il tono

muscolare e la motivazione a correre. Prevede l'utilizzo di un cilindro rotante che meccanicamente aumenta la velocità in modo costante (0-60 rotazioni/minuto, in 5 minuti totali). La performance degli animali viene valutata calcolando il tempo che essi trascorrono sull'accelerod senza cadere (sono ammesse per ciascun topo al massimo 3 cadute). Il tempo trascorso sul cilindro viene infatti registrato dall'operatore, attraverso l'utilizzo di un cronometro. La prova accelerod è stata eseguita a 0, 40, 60, 95, 150, 210, 270 e 330 min post-iniezione.

- Il drag test, permette di valutare l'abilità dell'animale nel bilanciare la postura del corpo con le zampe anteriori, in risposta ad uno stimolo dinamico esterno. L'esecuzione di tale test, prevede che ciascun animale venga sollevato per la coda dall'operatore (lasciando le zampe anteriori appoggiate alla superficie), e viene trascinato all'indietro -per una distanza fissa di 100 cm- ad una velocità costante di circa 20 cm/sec. Il numero di passi effettuati da ciascuna zampa anteriore è conteggiato da due distinti osservatori e per ogni animale si effettuano 5 misurazioni. Il valore finale preso in considerazione, sarà la somma delle prove eseguite.
- Il bar test, permette di avere un'indicazione dell'intensità dello stato di catalessi cui un animale può incorrere a seguito della somministrazione di una data sostanza (Sanberg et al., 1988). Consiste nel porre gli arti anteriori del topo su una barra di plastica (altezza 6 cm) e verrà calcolato il tempo trascorso sulla barra (immobilità cut off: 20 s), ovvero il tempo speso dall'animale in una posizione insolita e dunque, la registrazione del tempo necessario al topo per correggere questa postura. Il tempo totale speso sulla barra è conteggiato da due distinti osservatori e per ogni animale si effettuano tre prove consecutive (tempo massimo totale di catalessi: 60 s; Canazza et al. 2016; Bilel et al. 2020; Arfè et al., 2021). Il test bar è stato eseguito a 0, 20, 40, 70, 140, 195, 260 e 310 minuti post-iniezione.

5.3.2. Secondo studio *in vivo*

Come già anticipato, il protocollo sperimentale utilizzato in questo secondo studio *in vivo*, è stato ideato al fine di andare a valutare, alle stesse condizioni sperimentali del primo studio -somministrazione ripetuta per sette giorni del cannabinoide in esame, con un periodo di wash-out pari a 15 giorni- eventuali ripercussioni sullo stato cognitivo degli animali e sulle loro abilità motorie. Infine, a seguito del sacrificio degli animali, eseguito attraverso l'utilizzo della ghigliottina, si è provveduto ad eseguire il prelievo del tessuto cerebrale. Striato e ippocampo, sono stati rapidamente sezionati, pesati, congelati in azoto liquido e conservati a -80 °C.

5.3.2.1. Esperimenti in vivo

- **Valutazione del gating sensoriale**

La risposta acustica di startle è una risposta predittiva della misura del gating sensoriale di un topo ed è ottenuta mediante improvvisi e intensi stimoli acustici che portano all'attivazione della muscolatura scheletrica e facciale in pochi millisecondi, intesa come riflesso non controllato dell'animale, ovvero una sua reazione di difesa. Tale riflesso può essere modulato da alcuni parametri: le emozioni come la paura che potenzia lo startle o la gioia che lo attenua; oppure processi d'apprendimento non associativi, come ad esempio il periodo di gating empiricamente calcolato (compreso tra 30-500 ms), sia nel ratto che nell'uomo (Kumari and Sharma, 2002), in cui si smorza la responsività agli eventi sensoriali.

Lo Startle Reflex System consiste di tre/quattro contenitori di plexiglass (90 x 45 x 50 mm) alloggiati all'interno di altrettante camere insonorizzate (Ugo Basile, Milano, Italia), provviste di ricambio d'aria mediante ventilazione. In ogni camera, i contenitori sono montati su una piastra accelerometrica collegata ad un convertitore analogico-digitale. Il rumore di fondo e gli stimoli acustici vengono erogati da due altoparlanti (ANL-925C) per camera posti 7 cm sopra il contenitore di plexiglass in modo da avere al loro interno una differenza di solo 1 dB.

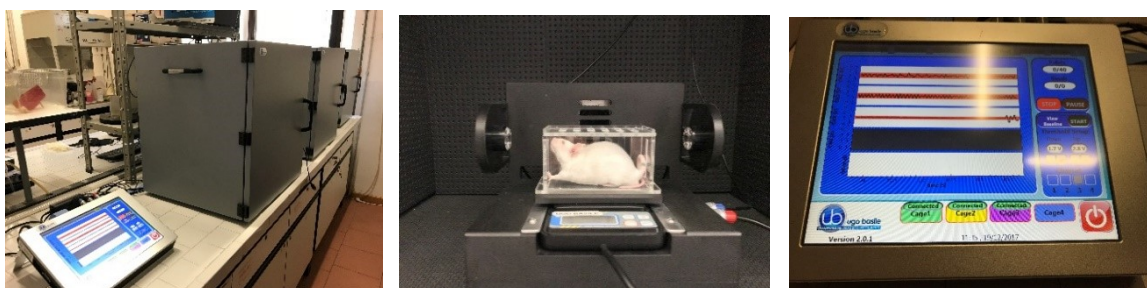


Figura 11: Pre-pulse inhibition

Il test consiste in un trial che prevede l'erogazione di uno startle (solo un pulso) e di pre-pulsi (pre- pulso + pulso) in modo randomizzato. Il pulso avrà un'ampiezza di 120-dB per una durata di 40-ms. Il Pre-pulso + pulso invece, hanno una sequenza di segnale che consiste di: 20-ms di pre-pulso, 80-ms di solo rumore di fondo, e dopo altri 40-ms degli startle di 120-dB (in principio 100-ms). Vi è una media di 15 s tra i due trial (range = da 9 a 21 s). Questi startle iniziano dopo un periodo di 10-min chiamato *abituazione* che può essere visto come una breve finestra temporale in cui ogni forma sensoriale viene filtrata, affinché si riduca la risposta dell'animale allo stimolo minaccioso.

Una sessione completa del test è composta da 40 trials tra pulso da solo e pre-pulso + pulso (a tre intensità diverse: 68-dB, 75-dB e 85-dB) erogati in ordine random.

L'intero test di PPI ha una durata di 20 minuti. L'ammontare della inibizione del pre-pulso (PPI) è espressa come la percentuale di diminuzione d'ampiezza della reattività allo startle, causata dalla presenza del pre-pulso (% PPI).

- ***Valutazione della capacità motoria***

La valutazione della capacità motoria dei topi durante questo trial sperimentale è stata eseguita attraverso l'utilizzo di differenti test. Il drag e l'accelerod test, sono già stati dettagliatamente descritti tra i metodi sperimentali appartenenti alla Safety Pharmacology (vedi sezione 5.3.1.6.). Pertanto, di seguito verrà descritto invece il metodo di registrazione della variazione dell'attività locomotoria spontanea dei topi.

L'esecuzione di questo test, prevede che quattro animali siano posti in gabbie di plastica quadrata (60 x 60 cm), situate in una stanza dal rumore e dalla luce attenuata, e l'attività motoria -distanza percorsa (m), il tempo trascorso nella zona centrale e periferica (sec), il numero di volte in cui passa dalla zona centrale a quella periferica (n. di cambi d'area), le rotazioni del corpo animale (n. delle rotazioni), la velocità massima e media di marcia (m/sec)- sono state registrate ogni 5 minuti e monitorate per 240 minuti, attraverso il sistema ANY-maze (Ugo Basile, versione 4.99g Beta) di video monitoraggio (Ossato et al., 2015; Canazza et al., 2016; Ossato et al., 2017; Bilel et al., 2020). Le gabbie sono state accuratamente pulite con una soluzione di etanolo diluita (5%) e lavate con acqua tra ogni ciclo di prova.

5.3.2.2. *Esperimenti in ex-vivo*

- ***Quantificazione di AEA e 2-AG cerebrale mediante metodo UPLC-MS/MS***

La quantificazione di AEA e 2-AG è stata eseguita utilizzando uno spettrometro di massa con trappola ionica lineare a triplo quadrupolo (QTRAP 5500; Sciex, Darmstadt, Germania) accoppiato con un sistema separativo in cromatografia liquida ad alta pressione UHPLC (Agilent 1200 Infinity; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), seguendo metodi recentemente convalidati (Casati et al., 2020). I composti sono stati separati su una colonna Kinetex UHPLC XB-C18 (100 x 2,1 mm , diametro interno 2,6 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) utilizzando un'eluizione a gradiente lineare con acqua allo 0,1% di acido formico come fase mobile A e metanolo/acetone nitrile (5:1; v/v) come fase mobile B. In breve, sono

stati estratti 125 μ L di tessuto omogeneizzato seguendo una procedura di estrazione liquido-liquido (4 mL di diclorometano/isopropanolo 8:2; v/v), dopo una precipitazione proteica con acetonitrile freddo (1 mL). Il surnatante è stato separato e portato a secco sotto un leggero flusso di azoto. Il residuo è stato ricostituito con 60 μ l di metanolo e ne è stata iniettata un'aliquota da 3 μ l nel sistema UHPLC/MS-MS per la determinazione dei lipidi. L'acquisizione ed il trattamento dei dati sono stati effettuati utilizzando rispettivamente il software Analyst 1.6.2 e MultiQuant 2.1.1 (Sciex, Darmstadt, Germania).

- ***Studi di binding recettoriale su CB₁***

Sezioni coronali spesse (20 μ m) sono state tagliate su un criostato e montate scongelate su fettine ricoperte di gelatina. I vetrini sono stati incubati per 2,5 ore a 37 °C con 10 nm [3H] CP-55,940 (Perkin Elmer Life Sciences, Milano, Italia) in tampone legante [50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5% albumina sierica bovina (BSA)]. Le sezioni sono state poi lavate per 1 ora a 4 °C in un tampone contenente Tris-HCl da 50 mM a pH 7,4 con l'1% di BSA-buffer e risciacquate per 3 ore alle stesse condizioni. Sono stati poi immersi in tampone sempre di Tris-HCl da 50 mM (pH 7,4) per 5 minuti e poi in acqua distillata. Una volta essiccate, le sezioni sono state esposte ad un film di Kodak Biomax MR (Perkin Elmer Life Sciences, Milano, Italia) per 14 giorni, per generare autoradiogrammi la cui intensità è stata valutata misurando i livelli di grigio, utilizzando il sistema Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics, Silver Spring, USA). Ogni area di entrambi i lati del cervello è stata tracciata utilizzando l'atlante cerebrale del topo Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 2007). Il livello di grigio delle misurazioni densitometriche, calcolate dopo la sottrazione della densità di fondo del film, è stato determinato utilizzando lo standard di trizio per il legame dei recettori (3H Microscales, Amersham Pharmacia Biotech) come precedentemente riportato da Zamberletti e colleghi (Zamberletti et al., 2012).

- ***Analisi western blot degli enzimi endocannabinoidi***

Striato ed ippocampo di ogni singolo topo, sono stati omogeneizzati utilizzando un buffer freddo contenente saccarosio 0,32 M e una soluzione a pH 7,4 di Hepes a 1mM, EGTA a 0,1 mM e PMSF a 0,1 mM, in presenza di una serie completa di inibitori della proteasi e un cocktail di inibitore della fosfatasi. La frazione sinaptosomale è stata preparata come precedentemente descritto da Caffino e colleghi (Caffino et al., 2017). Le proteine totali sono state misurate nell'intero omogenato e nella frazione sinaptosomale grezza dal Bio-Rad

Protein Assay, utilizzando l'albumina sierica bovina come standard di calibrazione (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia).

I livelli di espressione di ogni singola proteina sono stati normalizzati utilizzando il proprio controllo del carico di β -actina, che è stato rilevato valutando la densità di banda a 43kDa. Per valutare l'espressione dell'enzima endocannabinoide, sono stati rilevati anticorpi legati con una fotocamera GBOX XT (Syngene, Cambridge, UK). La densità ottica delle bande è stata quantificata utilizzando il software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) e normalizzata in β -actina. Per consentire il confronto tra diverse macchie, la densità delle bande è stata espressa in percentuale del veicolo.

5.3.3. Terzo studio *in vivo*

Come precedentemente anticipato, il terzo studio *in vivo* si è incentrato nella ricerca a lungo termine delle variazioni comportamentali e cognitive, valutandole sempre a seguito della somministrazione protratta per 7 giorni della molecola in esame, ma effettuando un periodo di wash-out di circa 2 mesi.

Seguendo quanto riportato in un lavoro di Kosel e colleghi (Kosel et al., 2020) -i quali considerando i sintomi comportamentali e psicologici della demenza (BPSD-like) su diversi modelli di topo affetti da Alzheimer (AD) hanno suggerito che l'isolamento sociale e i comportamenti depressivi-simili aumentano con la neuropatologia progressiva, così come l'aumento d'ansia, d'agitazione (iperattività) o apatia generale- ed un recente lavoro di Bilel e colleghi (Bilel et al., 2023) –nel quale sono stati segnalati evidenti disturbi psicotici *in vivo* a seguito della somministrazione a lungo termine di cannabinoidi sintetici- è stato ideato un modello sperimentale che prevedesse l'esecuzione dei seguenti test comportamentali : PPI (vedi sezione 5.3.2.1), tail suspension, Novel Object Recognition (NOR) e partition.

- ***Tail Suspension***

Il tail suspension test (TS), letteralmente il test della sospensione della coda, è stato eseguito secondo quanto riportato in precedenza in letteratura (Barbieri et al., 2016). In breve, il test consiste nell'isolare sia acusticamente che visivamente i topi (gli uni dagli altri), sospendendoli a 50 cm sopra il pavimento mediante l'utilizzo di un nastro adesivo, posto a circa 1 cm dalla punta della coda. La posizione d'immobilità del topo è stata originariamente conosciuta come *disperazione comportamentale* (Porsolt et al., 1977), basandosi sul presupposto che gli animali rinuncino alla possibilità di fuggire. Il tempo d'immobilità di ogni topo è stato registrato durante un periodo totale di 6 minuti (Barbieri et al., 2016), solo

quando restavano completamente e passivamente appesi immobili. Tutti gli esperimenti sono stati registrati attraverso il sistema di monitoraggio video ANY-maze (Ugo Basile, versione applicativa 4.99g Beta) e analizzati off-line da un osservatore in cieco.

- ***Novel Object Recognition (NOR)***

Il Novel Object Recognition (NOR), letteralmente il test di riconoscimento di nuovi oggetti, è stato scelto perché rappresenta un compito di 'pura' memoria di lavoro, interamente basato sul comportamento esplorativo spontaneo dei roditori verso gli oggetti (Ennaceur et al., 1997). Come precedentemente riportato in letteratura (Barbieri et al., 2016), il test è diviso in tre fasi: *habituation*, familiarizzazione e scelta. La prima fase, consiste in una sorta di allenamento a cui i topi vengono sottoposti per 3 giorni, condotta collocando ciascun animale in una camera in plastica PVC scura (60 cm x 60 cm x 40 cm). I topi vengono lasciati liberi di esplorare per 20 minuti al giorno. Durante l'*habituation*, nessun oggetto viene inserito all'interno della camera NOR. Ventiquattro ore dopo l'ultima sezione di *habituation*, ha inizio la fase di familiarizzazione in cui vengono introdotti i primi oggetti (identici A, A), posizionandoli nel campo visivo del topo, sugli angoli della camera NOR a circa 6 cm dalle pareti. I topi vengono collocati al centro della parete opposta agli oggetti e sono lasciati liberi per esplorarli per un tempo totale di 15 minuti. Un'ora dopo, uno dei due oggetti familiari (A) viene sostituito con uno nuovo (B), che deve essere diverso da A per forma, dimensione e colore. Ogni topo, viene così reinserto in camera NOR e lasciato libero di esplorare nuovamente gli oggetti (questa volta A e B) per un totale di 5 minuti. A questo punto, ha inizio la terza ed ultima fase: la scelta. L'esplorazione verrà definita come il tempo (in secondi) durante il quale il topo entra in contatto con l'oggetto (A o B) o si dirige verso di esso a una distanza di 2 cm. Girare intorno all'oggetto non verrà considerato un comportamento esplorativo. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando il sistema ANY-maze (Ugo Basile, applicazione versione 4.99g Beta) e successivamente analizzati da un osservatore in cieco sia per quanto riguarda il trattamento che su qualunque fosse tra i due l'oggetto nuovo (A o B). La preferenza dell'oggetto nuovo è stata quantificata come indice di riconoscimento (RI), calcolato come: $(\text{nuovo B} - \text{familiare A}) / (\text{nuovo B} + \text{familiare A})$. Utilizzando questa metrica, i punteggi che si avvicinano a zero non riflettono alcuna preferenza (compromissione della memoria di riconoscimento), i valori positivi riflettono la preferenza per l'oggetto nuovo (buona memoria di riconoscimento), mentre i numeri negativi riflettono la preferenza per il familiare (compromissione della memoria di riconoscimento). Gli oggetti da discriminare per l'esecuzione del test da parte dei topi erano

diversi per forma (quadrato e cilindro), dimensione e colore (giallo chiaro, rosa e blu). Inoltre, il peso dell'oggetto era tale che non poteva essere spostato dai topi.

Gli animali che spendono meno di 10 secondi a esplorare gli oggetti, sono stati esclusi dallo studio e rimpiazzati con altri.

- ***Partition***

Il partition test, valuta l'attività comportamentale di topi maschi collocati in una camera in plastica PVC scura (60 cm x 60 cm x 40 cm), in reazioni ad altri simili collocati nel settore limitrofo della stessa camera, divisa a metà mediante un plexiglass trasparente (Kudryavtseva, 2003). L'esperimento è stato eseguito utilizzando il sistema ANY-maze (Ugo Basile, applicazione versione 4.99g Beta) e analizzati off-line da un osservatore in cieco sia al trattamento che al gruppo di topi usati come veicolo. Nel particolare, sono state prese in considerazione: il numero di volte in cui il topo si avvicina alla partizione, il tempo totale speso vicino la partizione (prestando attenzione alle volte in cui si muoveva lungo di essa, annusava, toccava o graffiava il plexiglass) e il tempo medio speso durante ogni singola escursione in prossimità della partizione. Questo perché secondo la letteratura (Kudriavtseva, 1987), la durata di permanenza dei topi vicino la partizione è indice del livello di stimolazione sociale che possiede nei confronti dell'altro suo simile e che la risposta comportamentale globale sia dominata dalle risposte agli stimoli feromonal, i quali sono indispensabili nella comunicazione tra topi (Zinkevich and Vasilieva, 2001).

- ***Quantificazione di AEA e 2-AG plasmatico mediante UHPLC/MS-MS***

La quantificazione di AEA e 2-AG è stata eseguita utilizzando uno spettrometro di massa con triplo quadrupolo accoppiato ad un sistema separativo di cromatografia liquida ad alta pressione (UHPLC Acquity- TQD XEVO; Waters Milford, Massachusetts, U.S.A.) I composti sono stati separati su una colonna WATERS HSS C18 (150 x 2,1 mm, diametro interno 1,8 µm) utilizzando un'eluizione in gradiente con acqua allo 0,1% di acido formico come fase mobile A e acetonitrile allo 0,1% di acido formico come fase mobile B (da 100% al 5% di A in 4 minuti, tale percentuale è mantenuta per un minuto, per poi tornare al 100% di A in un minuto; l'iniezione successiva è sempre eseguita a colonna equilibrata). 150 µL di plasma sono stati additivati con 100 µL di HClO₄ 0,3 M freddo e 100 µL di ACN sempre a freddo per permettere la precipitazione della componente cellulare residua. La soluzione è stata centrifugata (14000 rpm) ad una temperatura costante (4 °C) per 30 minuti e in seguito, 1 µL è stato iniettato nel sistema UHPLC/MS-MS per la determinazione dei lipidi. La curva

di taratura è stata costruita nello stesso identico modo, per tenere conto dell'effetto matrice e del fattore di diluizione dei campioni originari. L'acquisizione ed il trattamento dei dati sono stati effettuati utilizzando il software in dotazione con la strumentazione, MassLynx.

5.4. Studi clinici

Successivamente agli studi preclinici, segue uno clinico mediante l'utilizzo di campioni forniti dal Prof. Giovanni Zuliani, che comprendevano pazienti affetti da diverse tipologie di demenza e soggetti con funzioni cognitive nella norma (dopo approfondita valutazione neuropsicologica) e senza alcuna dipendenza funzionale. Il plasma dei soggetti di età media di ~ 76 anni (di sesso maschile e femminile), è stato prelevato durante le prime ore del mattino, a digiuno, e immediatamente conservato a a -80°C. I campioni sono stati suddivisi per gruppo in relazione alla specifica demenza (un totale di 4 gruppi: controllo, Alzheimer, demenza mista e MCI), con relativi dati clinico-demografici-laboratoristici. Un totale di 1.5mL di plasma per paziente è bastato per la quantificazione di AEA e 2-AG mediante UHPLC/MS-MS, utilizzando il procedimento sperimentale sopra riportato per i campioni animali. Questo, al fine di valutare anzitutto se i livelli plasmatici dei due endocannabinoidi principali variano in funzione di una forma di demenza specifica, ma anche verificare se vi sia traslazionalmente una correlazione con i dati preclinici ottenuti.

5.5. Analisi statistica

L'analisi statistica di tutti i test comportamentali eseguiti *in vivo* è stata effettuata su dati assoluti mediante analisi di misura ripetuta unidirezionale della varianza (ANOVA ad una via), seguita dal test post-hoc di Tukey per confronti multipli.

Tuttavia, nelle risposte sensorimotorie e di attività motoria, i dati sono espressi diversamente in relazione al test preso in considerazione: come unità arbitrarie (*visual object, acoustic e tactile response*) o percentuale del basale (*visual placing response, drag e accelerod test*). L'antinocicezione (*pinch*) e l'acinesia, sono espressi come percentuale dell'effetto massimo ottenuto $\{E_{max}\% = [(test - \text{latenza di controllo}) / (\text{cut-off} - \text{controllo})] \times 100\}$.

I dati della PPI vengono espressi come percentuale dell'ampiezza della reattività allo startle a seguito di un Pre-pulso. L'analisi statistica è stata effettuata con ANOVA ad una via, seguita dal test di Turkey per i confronti multipli.

I dati molecolari ottenuti in *ex vivo*, sono presentati come percentuale di topi di controllo e sono stati analizzati mediante unpaired T-student test.

Infine la correlazione (r) tra l'aumento dei livelli plasmatici di 2-AG e l'effetto inibitorio mostrato *in vivo* indotti dalla somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg; i.p.) nei topi, è stata valutata tramite il test di correlazione XY.

I valori rappresentano la media di circa \pm SEM di 9 animali per gruppo di trattamento e sono espressi in istogrammi. Le significatività sono specificate nelle didascalie delle figure (capitolo 6).

Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il programma GraphPad Prism 8.0 software (San Diego, CA, USA).

CAPITOLO 6: Risultati

Il presente studio ha valutato gli effetti farmacologici e comportamentali della somministrazione protratta di Δ^9 -THC e/o JWH-018 per sette giorni consecutivi, a differenti dosaggi, valutando i risultati a lungo termine dopo un periodo di wash-out differente a seconda del protocollo sperimentale preso in esame.

6.1. Primo studio in vivo

In tutti i topi trattati con veicoli, le risposte ottenute in tutti i test della *Safety Pharmacology*, non sono cambiate (Fig. 10-18) e l'effetto è simile a quello osservato in animali non trattati (dati non mostrati).

- *Variazione della frequenza respiratoria*

Il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg) non ha alterato le risposte basali della frequenza respiratoria dei topi da D1 a D10 (Fig. 11A), ma JWH-018 (6 mg/Kg) ha indotto un effetto inibitorio dal primo giorno di somministrazione (Fig. 11B). Questa risposta inibita della frequenza respiratoria tende a svanire durante i successivi giorni di trattamento.

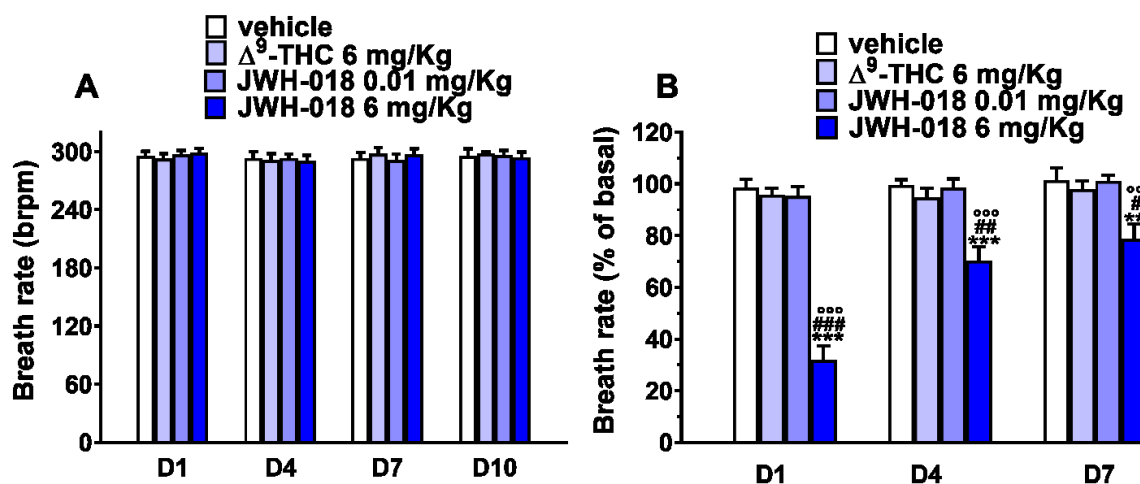


Figura 11: Frequenza respiratoria basale (A) ed effetto di Δ^9 -THC (6 mg/Kg i.p.) e JWH-018 (0,01-6 mg/Kg i.p.) sulla frequenza respiratoria (B). I dati sono espressi come frequenza respiratoria al minuto (A) e percentuale della risposta basale (B), e rappresentano la SEM media di 8 animali per ogni trattamento. L'analisi statistica è stata eseguita da ANOVA ad una via, seguita dal test di Tukey per il confronto multiplo (A-B). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) versus vehicle; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (6 mg/Kg); ° $p < 0.01$, °° $p < 0.001$ JWH-018 (0.01 mg/Kg) versus JWH-018 (6 mg/Kg).

- *Variazione delle risposte visive*

Il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg) altera le risposte basali degli animali a D10 (Fig. 12A). Analogamente, il trattamento ripetuto di Δ^9 -THC e JWH-018 ha indotto nei topi una diminuzione della risposta acuta al *visual placing* fin dal primo giorno di somministrazione (Fig. 12B). La ridotta risposta visiva sembra essere più profonda dopo il trattamento in acuto di JWH-018 a 6 mg/Kg rispetto al dosaggio più basso somministrato (0.01 mg/Kg) o del Δ^9 -THC. Inoltre, l'effetto tende a diminuire durante gli altri sei giorni di trattamento. D'altro canto, la risposta dell'avvicinamento dell'oggetto sembra essere fortemente diminuita solo con il trattamento ripetuto di JWH-018 a 6 mg/Kg, sebbene ci sia una leggera differenza nella risposta tra i topi trattati con JWH-018 a 6 mg/Kg e Δ^9 -THC dopo sette giorni di somministrazione (Fig.12D; D7). Nonostante ciò, le risposte basali dei topi al *visual object* sembrano essere alterate a tre giorni di wash-out dopo un trattamento ripetuto di entrambe le sostanze, a tutti e due i dosaggi (Fig.12C, D10).

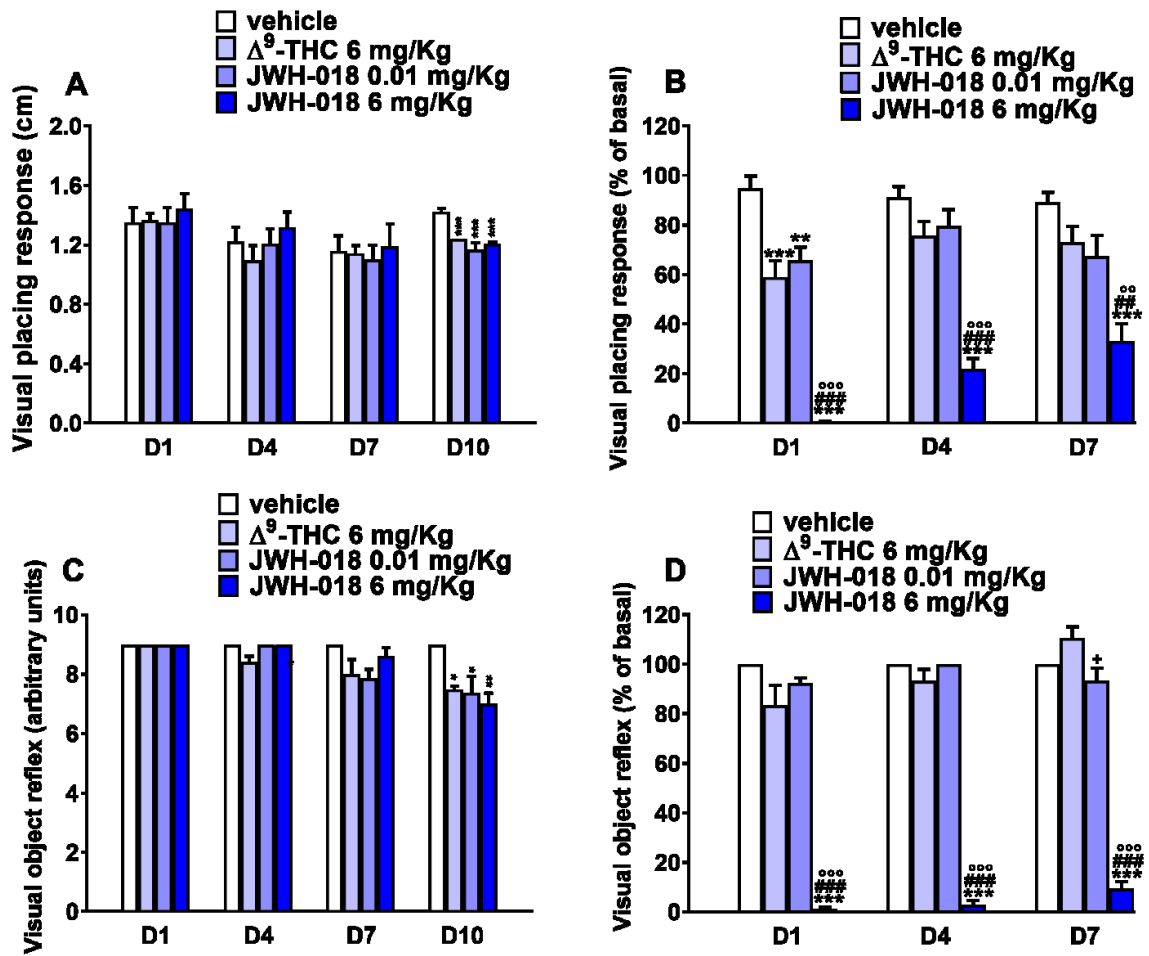


Figura 12: Risposta visiva basale (A e C) ed effetto di Δ^9 -THC (6 mg/Kg i.p.) e JWH-018 (0,01-6 mg/Kg i.p.) sul visual placing (B) e sul visual object test (D). I dati sono espressi in centimetri (A e C) e in percentuale della risposta basale (B e D), e rappresentano la SEM media di 8 animali per ogni trattamento. L'analisi statistica è stata eseguita da ANOVA ad una via, seguita dal test di Tukey per il confronto multiplo (A-D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) versus vehicle; + $p < 0.05$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (0.01 mg/Kg); ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (6 mg/Kg); °° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$ JWH-018 (0.01 mg/Kg) versus JWH-018 (6 mg/Kg).

- *Variazione delle risposte tattili*

Il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg), non ha alterato le risposte tattili basali degli animali da D1 a D10 (Fig. 13A, C ed E). Tuttavia, JWH-018 (6 mg/ Kg) in acuto ha indotto nei topi una diminuzione della risposta tattile dal primo giorno di somministrazione (Fig. 13B, D e F). L'efficacia del trattamento ripetuto con JWH-018 varia a seconda dello stimolo tattile preso in considerazione: mentre per il riflesso alle vibrissae, l'effetto appare profondo il primo giorno di trattamento, ma scompare durante gli altri sei giorni di somministrazione (Fig.13B), per cornea e padiglioni, persiste rispettivamente a D4 (Fig.13D) e D7 (Fig.12F). Vale la pena notare che il riflesso ai padiglioni, appare diminuito anche dopo il trattamento in acuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) a D1 (Fig.13F). Tuttavia, questa risposta riflessa ridotta è stata notevolmente più lieve di quella indotta da JWH-018 allo stesso dosaggio, ma sicuramente più efficace di JWH a 0.01 mg/Kg.

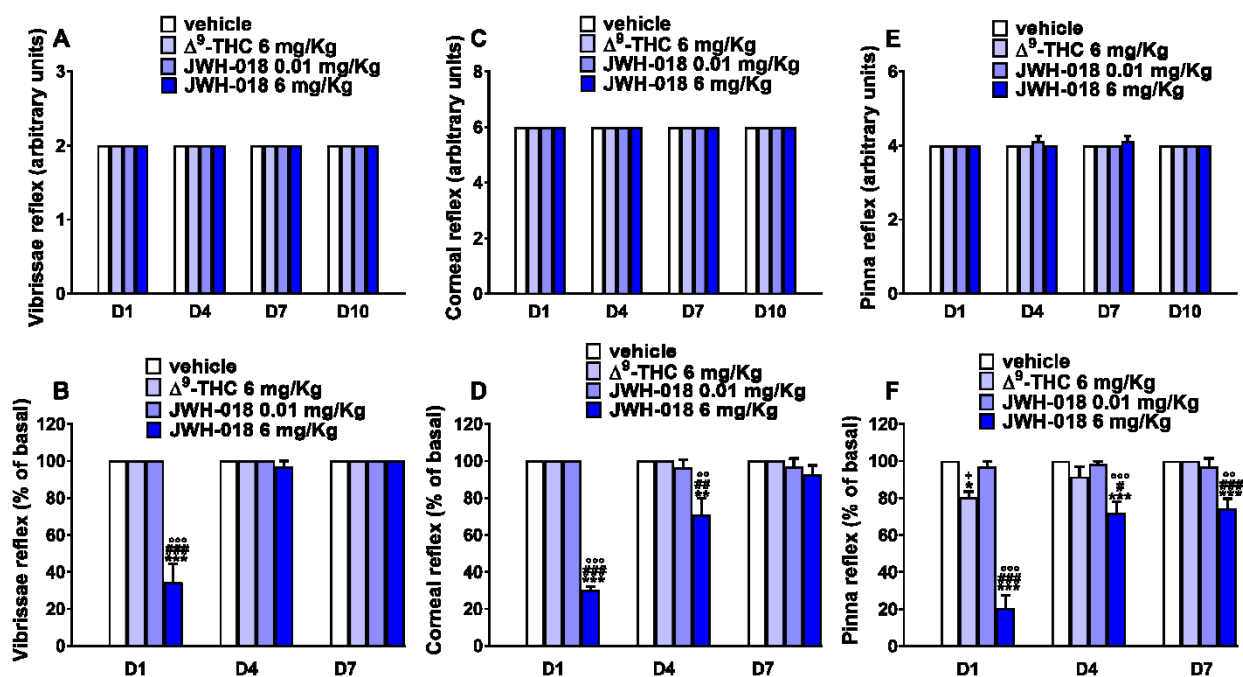


Figura 13: Risposta tattile basale (A, C ed E) ed effetto di Δ^9 -THC (6 mg/kg i.p.) e JWH-018 (0,01-6 mg/kg i.p.) sulle vibrissae (B), cornea (D) e padiglioni (F). I dati sono espressi come unità arbitrarie (A, C ed E) e percentuale della risposta basale (B, D e F), e rappresentano la SEM media di 8 animali per ogni trattamento. L'analisi statistica è stata eseguita da ANOVA ad una via, seguita dal test di Tukey per il confronto multiplo (A-F). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) versus vehicle; + $p < 0.05$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (0.01 mg/Kg); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (6 mg/Kg); °° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$ JWH-018 (0.01 mg/Kg) versus JWH-018 (6 mg/Kg).

- *Variazione della risposta acustica*

Il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg) non ha alterato le risposte acustiche basali degli animali da D1 a D10 (Fig. 14A). Tuttavia, il trattamento ripetuto con JWH-018 al dosaggio di 6 mg/Kg, ha indotto nei topi una diminuzione della risposta acustica dal primo giorno di somministrazione e l'effetto tende a svanire durante gli altri sei giorni di trattamento (Fig. 14B).

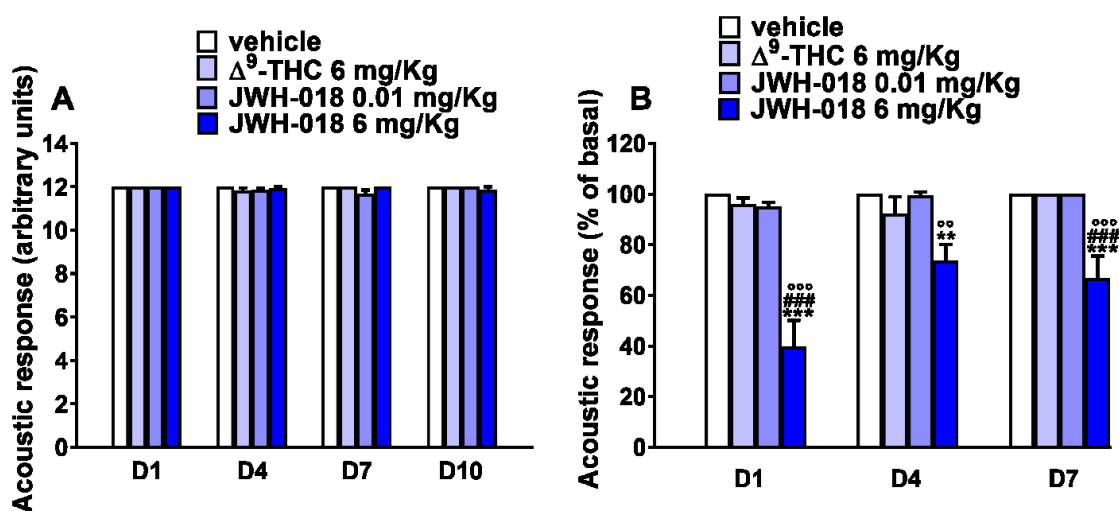


Figura 14: Risposta acustica basale (A) ed effetto di Δ^9 -THC (6 mg/kg i.p.) e JWH-018 (0,01-6 mg/kg i.p.) sul test di risposta acustica (B). I dati sono espressi in unità arbitrarie (A) e in percentuale della risposta basale (B), e rappresentano la SEM media di 8 animali per ciascun trattamento. L'analisi statistica è stata eseguita da ANOVA unidirezionale seguita dal test di Tukey per il confronto multiplo (A-B). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) versus vehicle; ### $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (6 mg/Kg); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ JWH-018 (0.01 mg/Kg) versus JWH-018 (6 mg/Kg).

- *Variazione della temperatura*

Il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg) non ha alterato né la temperatura interna né quella esterna basale dei topi da D1 a D10 (Fig.15A e C). Tuttavia, il trattamento ripetuto di Δ^9 -THC e JWH-018 al dosaggio di 6 mg/Kg, ha indotto nei topi una grave ipotermia interna in acuto, che tende a svanire durante gli altri sei giorni di trattamento (Fig.15B). D'altro canto, il trattamento acuto JWH-018 a 6 mg/Kg sembra indurre un leggero effetto ipotermico sulla temperatura esterna nei topi e rimane costante durante i giorni di trattamento successivi (Fig.15D).

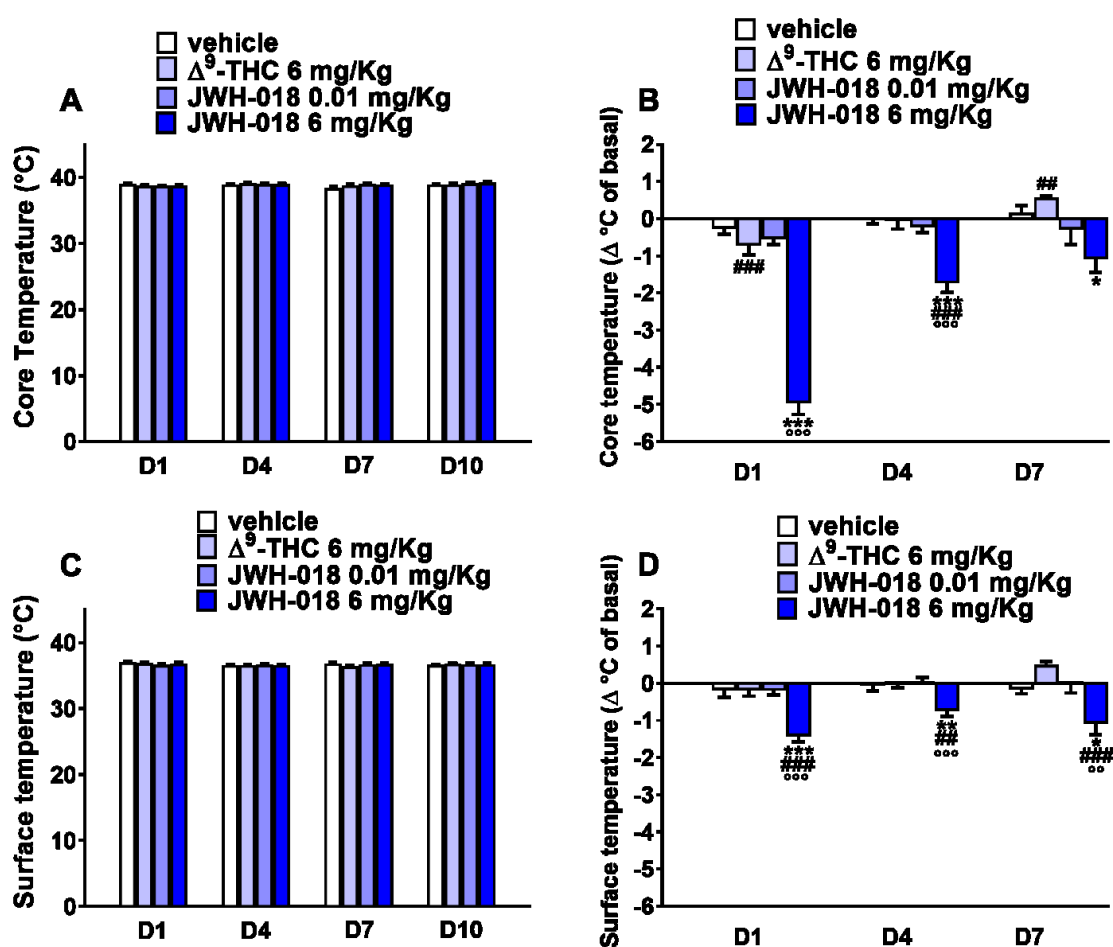


Figura 15: Temperatura corporea interna(A) ed esterna(C) basale ed effetto di Δ^9 -THC (6 mg/kg i.p.) e JWH-018 (0,01-6 mg/kg i.p.) sulla temperatura interna (B) ed esterna (D). I dati sono espressi come temperatura in gradi Celsius ($^{\circ}$; A e C) e percentuale della risposta basale (B e D), e rappresentano il SEM medio di 8 animali per ogni trattamento. L'analisi statistica è stata eseguita da ANOVA ad una via, seguita dal test di Tukey per il confronto multiplo (A-D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) versus vehicle; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (6 mg/Kg); °° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$ JWH-018 (0.01 mg/Kg) versus JWH-018 (6 mg/Kg).

- *Variazione della risposta nocicettiva*

Il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg) non ha alterato le risposte nocicettive basali degli animali da D1 a D10 (Fig.16A e C). Tuttavia, sia Δ^9 -THC che JWH-018 al dosaggio di 6 mg/Kg in acuto, hanno indotto nei topi un aumento della risposta algica che è risultata essere maggiore al *tail pinch test* il primo giorno di trattamento, rispetto ai seguenti giorni di somministrazione (Fig.16B). Allo stesso modo, il trattamento ripetuto di JWH-018 a 6 mg/Kg sul *tail withdrawal test* ha indotto un aumento della risposta algica nei topi solamente al primo giorno di somministrazione (Fig.16D, D1).

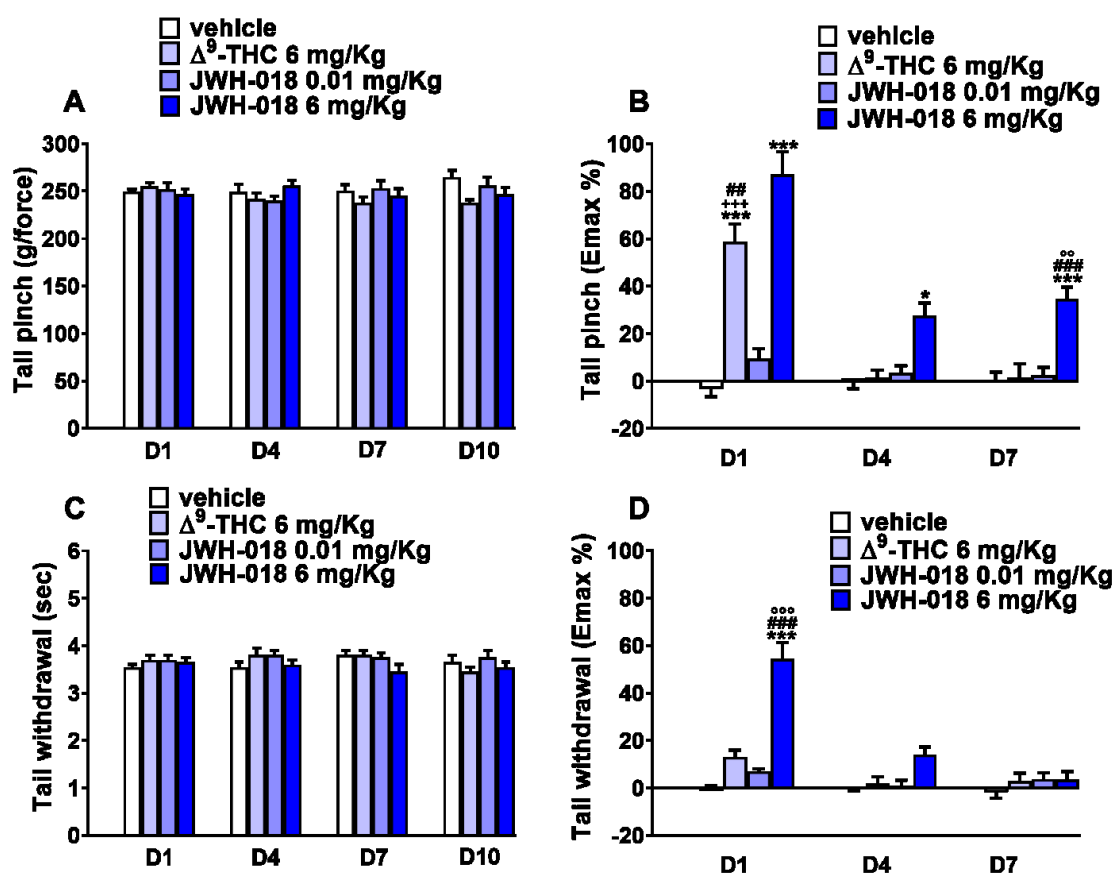


Figura 16: Risposta basale nocicettiva (A e C) ed effetto di Δ^9 -THC (6 mg/kg i.p.) e JWH-018 (0,01-6 mg/kg i.p.) al tail pinch (B) e tail withdrawal (D) test. I dati sono espressi come picco massimo di peso sostenuto dal topo (g/forza; A), secondi di latenza temporale (C) e percentuale di effetto massimo (Emax %; B e D), e rappresentano il SEM medio di 8 animali per ogni trattamento. L'analisi statistica è stata eseguita da ANOVA ad una via, seguita dal test di Tukey per il confronto multiplo (A-D). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) versus vehicle; +++ $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (0.01 mg/Kg); ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (6 mg/Kg); °° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$ JWH-018 (0.01 mg/Kg) versus JWH-018 (6 mg/Kg).

- *Variazione della forza muscolare*

Il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg) non ha alterato le risposte di forza muscolare basale dei topi da D1 a D10 (Fig.17A). Analogamente, anche i trattamenti ripetuti non hanno indotto alcuna variazione nella risposta dopo la somministrazione, con l'eccezione di JWH-018 a 6 mg/Kg al settimo giorno di somministrazione (Fig.17B, D7), che induce un leggero aumento della forza muscolare dei topi.

- *Induzione di uno stato acinetico*

Il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg) non ha alterato nei topi il tempo totale basale trascorso immobili sulla barra da D1 a D10 (Fig.17C). Al contrario, il trattamento con JWH-018 (6 mg/Kg) in acuto, ha indotto nei topi uno stato di acinesia che li ha portati ad un notevole aumento del tempo trascorso sulla barra durante il test fin dal primo giorno di trattamento (Fig.17D, D1). Durante le successive somministrazioni, tale effetto acinetico persiste, ma tende a diminuire (Fig. 17D).

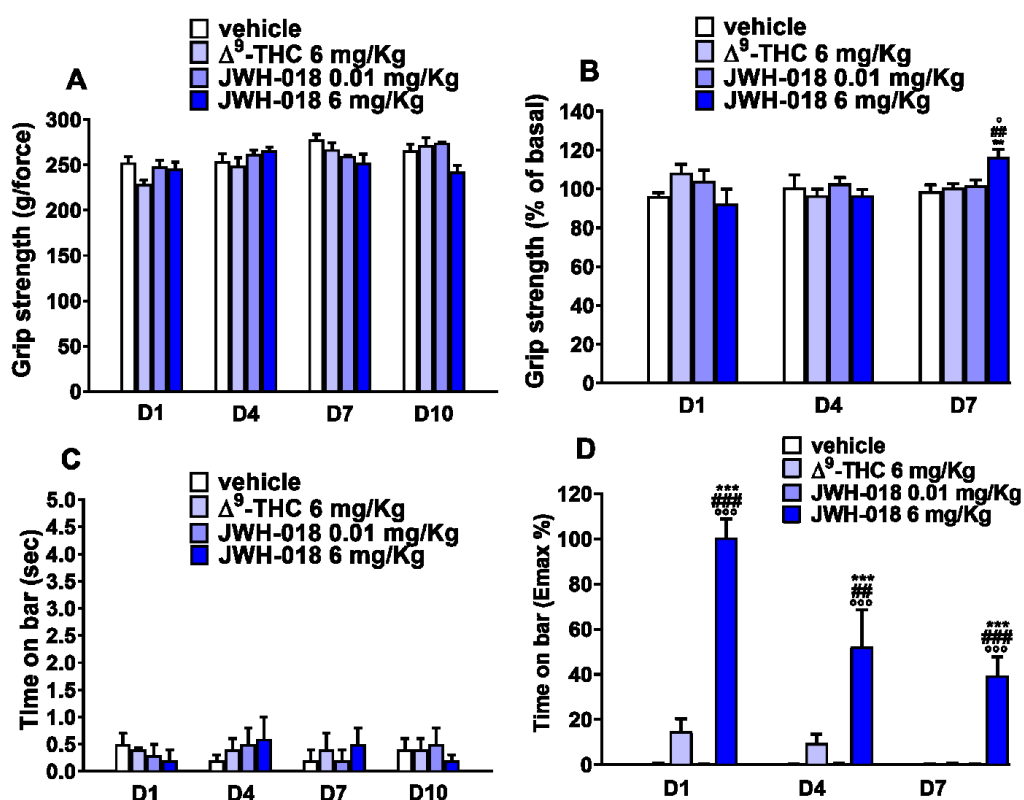


Figura 17: Forza muscolare basale (A), tempo d'immobilità al bar test (C), e l'effetto di Δ^9 -THC (6 mg/ kg i.p.) e JWH-018 (0,01-6 mg/ kg i.p.) sulla forza muscolare (B) e bar (D) test. I dati sono espressi come forza muscolare scheletrica (g/forza; A), secondi d'immobilità trascorsi sulla barra (sec; C), percentuale della risposta basale (B) e percentuale dell'effetto massimo (Emax %; D), e rappresentano il SEM medio di 8 animali per ogni trattamento. L'analisi statistica è stata eseguita da ANOVA unidirezionale seguita dal test di Tukey per il confronto multiplo (A-D). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) versus vehicle; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (6 mg/Kg); ° $p < 0.05$, °°° $p < 0.001$ JWH-018 (0.01 mg/Kg) versus JWH-018 (6 mg/Kg).

- *Variazione dell'attività motoria indotta*

A differenza di tutti i risultati già presentati, il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg) alterano le risposte basali dell'attività motoria dei topi (Fig. 18A e C). Infatti, per quanto riguarda l'*accelerod test*, le risposte dell'attività motoria dei topi basali sembrano essere alterate da D4 a D7 (Fig. 18A). Da notare inoltre che, anche dopo tre giorni di wash-out dalla fine del trattamento ripetuto di JWH-018 alla dose di 6 mg/Kg per sette giorni, si registra una risposta basale dei topi alterata (Fig. 18A, D10). Per quanto riguarda il *drag test* invece, i valori basali che hanno subito una variazione nella risposta all'attività motoria dopo un trattamento ripetuto con Δ^9 -THC (6 mg/Kg) e JWH-018 (0.01 e 6 mg/Kg) sono quelli registrati al quarto (Fig. 18C, D4) e al decimo giorno (Fig. 18C, D10).

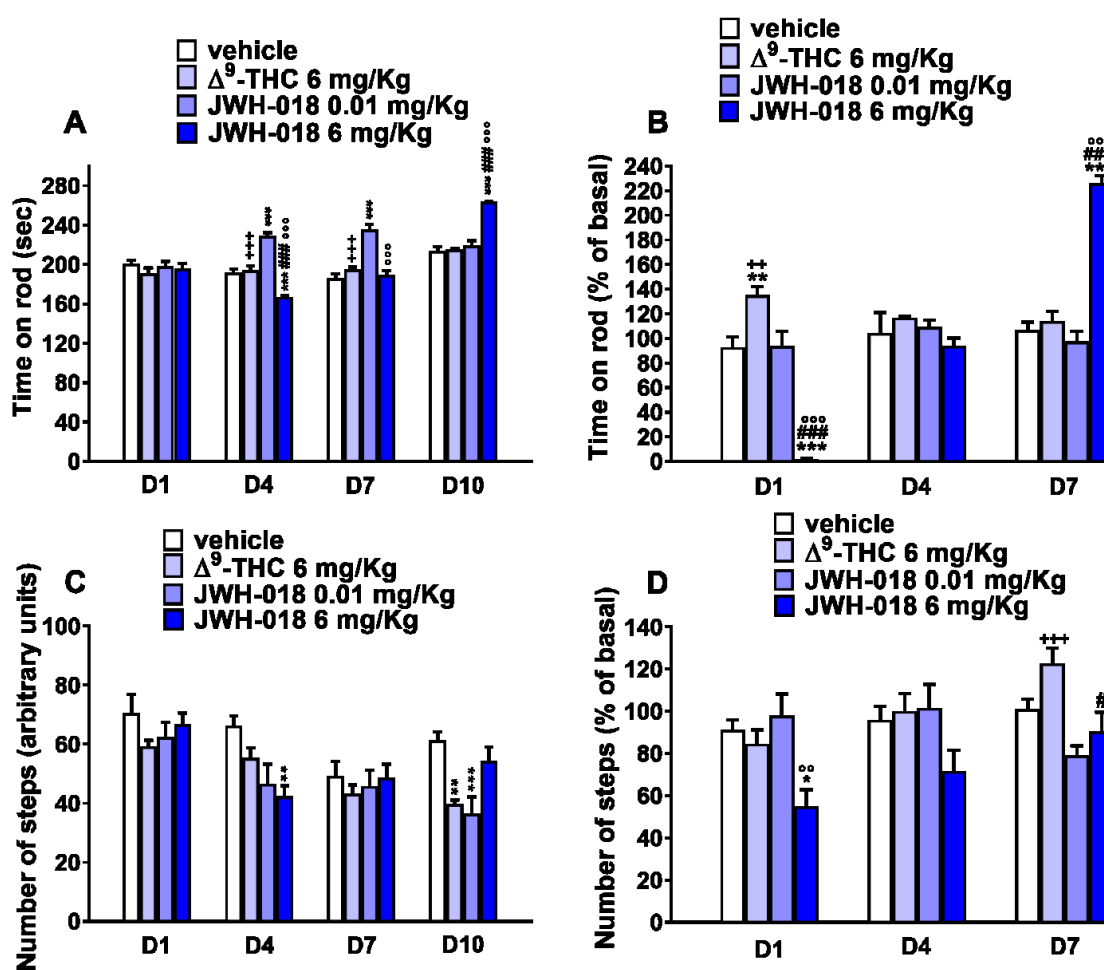


Figura 18: Attività motoria basale (A e C) ed effetto di Δ^9 -THC (6 mg/kg i.p.) e JWH-018 (0,01-6 mg/kg i.p.) all'*accelerod* (B) e al *drag* (D) test. I dati sono espressi in secondi spesi sul rotarod (A), unità arbitrarie (C) e percentuale della risposta basale (B e D), e rappresentano il SEM medio di 8 animali per ogni trattamento. L'analisi statistica è stata eseguita da ANOVA ad una via, seguita dal test di Tukey per il confronto multiplo (A-D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) versus vehicle; ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (0.01 mg/Kg); # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ Δ^9 -THC vs. JWH-018 (6 mg/Kg); °° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$ JWH-018 (0.01 mg/Kg) versus JWH-018 (6 mg/Kg).

Tuttavia, il trattamento di Δ^9 -THC (6 mg/Kg) in acuto, ha indotto nei topi un aumento dell'attività motoria all'*accelerod test* al primo giorno (Fig. 18B, D1), che tende a diminuire durante gli altri sei giorni di trattamento. Contrariamente, il trattamento ripetuto di JWH-018 (6 mg/Kg) ha indotto nei topi una diminuzione totale dell'attività motoria all'*accelerod test* al primo giorno di somministrazione (Fig. 18B, D1), ma questo effetto tende a capovolgersi rapidamente in iper-stimolazione. D'altra parte, il trattamento ripetuto di JWH-018 a 6 mg/Kg ha indotto nei topi una variazione dell'attività motoria al *drag test* visibile al primo giorno di somministrazione ma che tende a diminuire con le somministrazioni successive (Fig. 18D).

6.2. Secondo studio in vivo

• *Variazione della risposta allo startle e PPI test*

La somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) ha inibito, rispetto al gruppo di topi trattati con veicolo, sia l'ampiezza della risposta allo startle (Fig.19A) che quella alla PPI (Fig.19B), sedici giorni dopo la fine del trattamento (D23). Infatti, l'analisi statistica ha rilevato una significativa diminuzione dell'intensità del prepulso rispettivamente a 68 dB (~19%), 75 dB (~24%) e 85 dB (~15%).

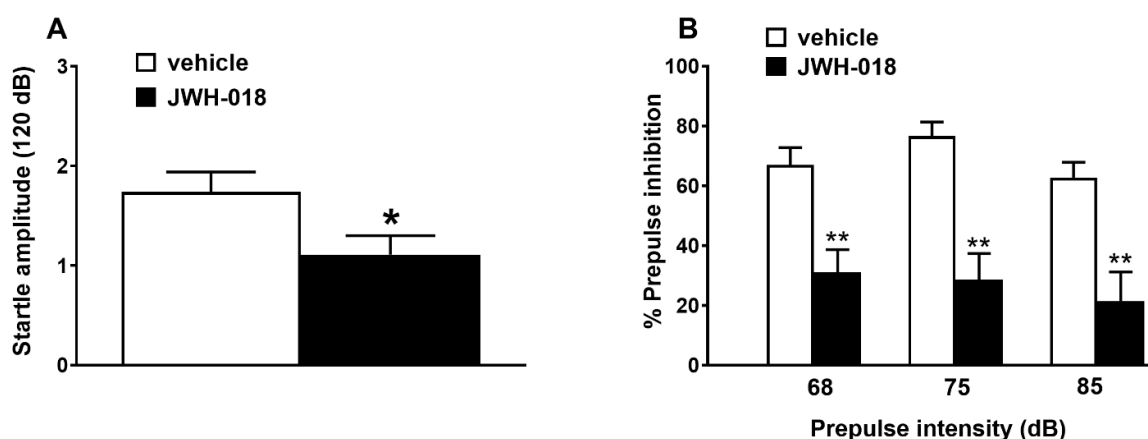


Figura 19: Effetti della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) per sette giorni, sulla pre-pulse inhibition (PPI) dei topi, espressi in istogrammi. Sono evidenti gli effetti a tre intensità diverse (68 -75 – 85 dB) dopo 23 giorni di wash-out. La PPI è espressa come una diminuzione percentuale dell'ampiezza della reattività allo startle a seguito di un pre-pulso e i valori rappresentano la media di circa \pm SEM di 9 animali per trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata con ANOVA ad una via, seguita dal test di Turkey per i confronti multipli. Sono considerate significative tutte le variazioni con $*p<0.05$ e $**p<0.01$ diverse dal veicolo.

• *Variazione dell'attività motoria spontanea*

La somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) per sette giorni, dopo 16 giorni di wash out, ha prodotto una facilitazione transitoria dell'attività motoria spontanea dei topi durante i primi 5 minuti post-iniezione, rispetto al veicolo (Fig.20A).

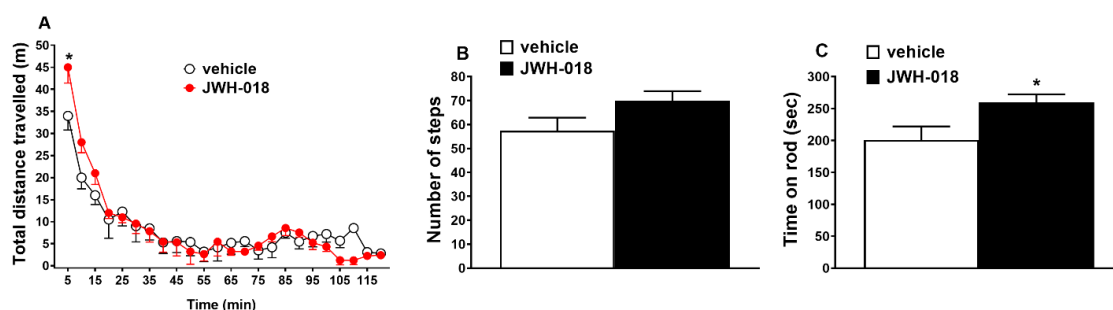


Figura 20: Effetti della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) per sette giorni, sulla distanza totale percorsa (A), drag (B) e accelerod (C) test. Nell'open field (A), espresso in curva dose risposta, l'analisi statistica è stata effettuata con ANOVA a due vie, seguita dal test di Bonferroni per i confronti multipli e sono considerate significative tutte le variazioni con $*p<0.05$ diverse dal veicolo. Per il drag (B) e accelerod (C) test invece, espressi in istogrammi, l'analisi statistica è stata effettuata mediante unpaired T-test e sono considerate significative tutte le variazioni con $*p<0.05$ diverse dal veicolo. Tutti i valori rappresentano la media di circa \pm SEM di 9 animali per trattamento.

Inoltre, nei topi trattati con JWH-018 si è registrato anche un aumento del numero di entrate nella zona centrale e periferica della gabbia, con un maggiore tempo di permanenza nella zona centrale e un aumento del numero di rotazione del corpo degli animali (Tab.1). Contrariamente, la velocità massima e media di camminata registrata durante l'esplorazione della cella è rimasta costante.

*Tabella 1: Effetto a lungo termine della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/ kg) sull'attività motoria spontanea dei topi. I dati sono espressi (vedi materiale e metodi) come: tempo trascorso dai topi nella zona centrale e periferica (in sec), le entrate nella zona centrale e periferica (n. di ingressi), le rotazioni del corpo dell'animale (n. delle rotazioni), e la velocità massima e media di marcia (m/sec) e rappresentano la media di circa \pm SEM 9 animali per ogni trattamento. I dati sono relativi solamente ai primi 15 minuti di registrazione, dal momento che è stato registrato un aumento dell'attività spontanea. L'analisi statistica è stata effettuata con ANOVA unidirezionale seguita dal test di Bonferroni per confronti multipli. L'analisi statistica è stata eseguita con il programma Prism software (GraphPad Prism, USA). **P < 0.01 e ***P < 0.001 contro veicolo.*

Effetti		Sostanze	
		Veicolo	JWH-018
Area centrale	Numero di ingressi	26.3 \pm 2.6	48.9 \pm 4.5***
	Tempo tot (sec)	29.4 \pm 2.9	69.90 \pm 5.9***
Area periferica	Numero di ingressi	26.7 \pm 2.8	50.3 \pm 3.8**
	Tempo tot (sec)	872.0 \pm 1.5	838.6 \pm 8.4**
Rotazioni del corpo	Numero di rotazioni	34.4 \pm 2.6	66.2 \pm 3.4***
Velocità massima	(m/sec)	0.298 \pm 0.006	0.312 \pm 0.008
Velocità media	(m/sec)	0.087 \pm 0.005	0.098 \pm 0.004

- ***Variazione dell'attività motoria indotta***

La somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg), ha indotto al *drag test* un leggero aumento del numero di passaggi eseguiti con le zampe anteriori dei topi, che tuttavia non risulta statisticamente rilevante (Fig.20B). Al contrario, all' *accelerod test* è visibile una facilitazione delle prestazioni motorie (Fig.20C).

- **Quantificazione di AEA e 2-AG**

Come mostra la figura sottostante, la somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) ha indotto un significativo e notevole aumento dei livelli di entrambi i messaggeri lipidici endogeni nello striato di topi trattati rispetto ai controlli: AEA (Fig.21A) e 2-AG (Fig.21B).



Figura 21: Effetto a lungo termine della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) sul contenuto di endocannabinoidi (AEA e 2-AG) nello striato, espresso in istogrammi. I dati rappresentano la SEM media di 9 topi per gruppo. L'analisi statistica è stata effettuata mediante unpaired T-test. Sono considerate significative tutte le variazioni con $***p < 0.001$ vs veicolo.

- **Densità recettoriale CB₁ in striato e ippocampo**

La figura sottostante mostra invece l'effetto del trattamento ripetuto con JWH-018 (6 mg/Kg) sulla densità del recettore CB₁ misurato mediante saggi autoradiografici di legame nello striato (Fig.22A) e nell'ippocampo (Fig.22B). Non sono stati osservati cambiamenti nella densità del recettore CB₁ nello striato. Contrariamente, la densità CB₁ risulta essere significativamente ridotta, di circa il 23% nell'ippocampo rispetto ai controlli.

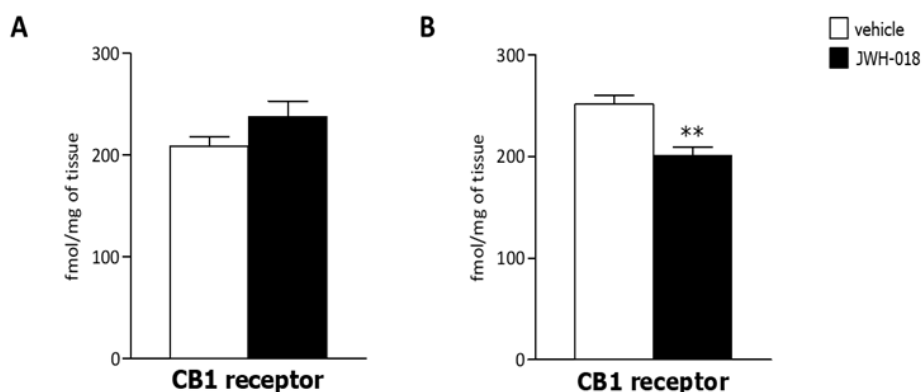


Figura 22: Effetto a lungo termine della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) sulla densità del recettore CB₁ nello striato (A) e nell'ippocampo (B) misurato mediante saggi di legame autoradiografico. I dati rappresentano la SEM media di 9 topi per gruppo). L'analisi statistica è stata effettuata mediante unpaired T-test. Sono considerate significative tutte le variazioni con $**p < 0.01$ vs veicolo.

- ***Livelli proteici dei principali enzimi sintetici e degradanti di AEA e 2-AG***

Il trattamento ripetuto di JWH-018 (6 mg/Kg) ha indotto differenti effetti sui livelli proteici dei principali enzimi sintetici e degradanti di AEA (NAPE-PLD e FAAH, rispettivamente) e 2-AG (DAGL e MAGL, rispettivamente) nello striato (Fig.23A e B) e ippocampo (Fig.23C e D). Difatti, nello striato è aumentata sia l'espressione di FAAH (~45.7%) che quella di MAGL (~73.6%), senza influenzare tuttavia i livelli proteici degli enzimi sintetici. Al contrario, nell'ippocampo non sono stati osservati cambiamenti nei livelli proteici di tutti e quattro gli enzimi.

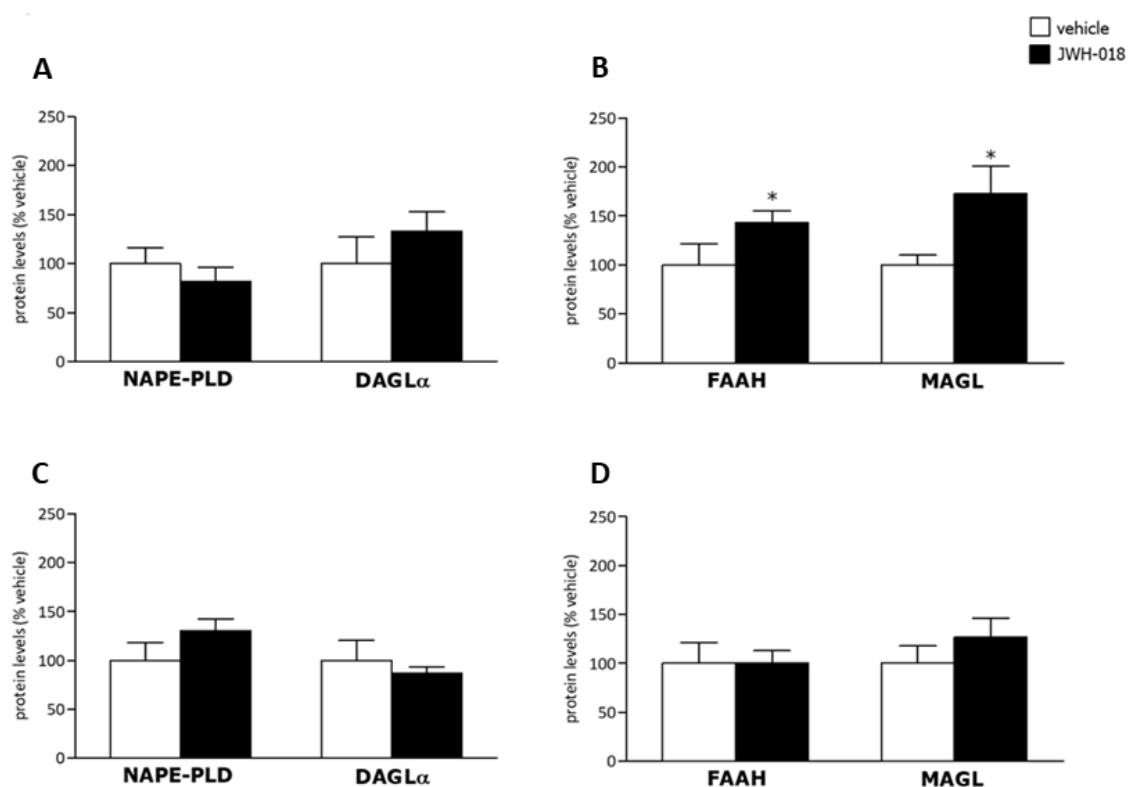


Figura 23: Effetto a lungo termine della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) sui livelli proteici dei principali enzimi endocannabinoidi sintetici (NAPE-PLD e DAGL α) e degradanti (FAAH e MAGL) misurati mediante analisi Western blot dei lisati proteici totali ottenuti dallo striato (A e B) e dall'ippocampo (C e D). I dati rappresentano la media di circa \pm SEM 9 topi per gruppo. L'analisi statistica è stata effettuata mediante unpaired T-test e sono considerate significative tutte le variazioni con * $p < 0.05$ vs veicolo.

6.3. Terzo studio in vivo

6.3.1. Studi preclinici:

- **Variatione della risposta allo startle e PPI test**

La somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) per sette giorni consecutivi, rispetto ai due gruppi di topi non trattati (giovani e adulti), ha prodotto un'inibizione sia dell'ampiezza della risposta allo startle (Fig.24A) che quella alla PPI (Fig.24B) a circa due mesi dal termine del trattamento. Infatti, l'analisi statistica ha rilevato una significativa diminuzione dell'intensità del prepulso rispettivamente a 68 dB, 75 dB e 85 dB sia in confronto al gruppo di topi non trattati invecchiati (rispettivamente pari a ~42%, ~20% e ~40%) che al gruppo di topi giovani non trattati (rispettivamente pari a ~70%, ~45% e ~60%).

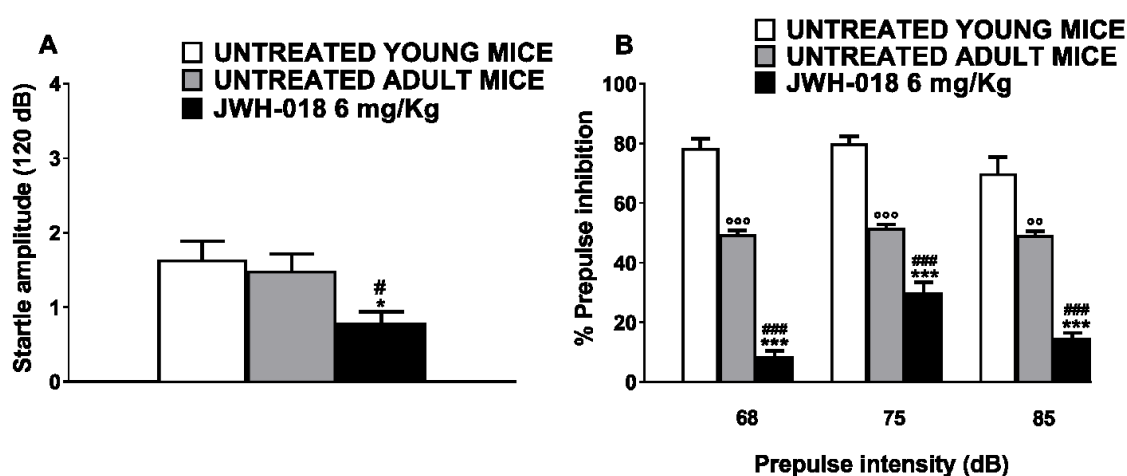


Figura 24: Effetti della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) per sette giorni, sulla pre-pulse inhibition (PPI) dei topi, espressi in istogrammi. Sono evidenti gli effetti a tre intensità diverse (68 -75 - 85 dB) dopo 60 giorni di wash-out. La PPI è espressa come una diminuzione percentuale dell'ampiezza della reattività allo startle a seguito di un pre-pulso e i valori rappresentano la media di circa \pm SEM di 9 animali per trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata con ANOVA ad una via, seguita dal test di Turkey per i confronti multipli. Sono considerate significative tutte le variazioni con * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) diverse dal gruppo di topi lasciati ad invecchiare senza alcun trattamento; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$ di JWH-018 diverse dal gruppo di topi giovani non trattati, e °° $p < 0.01$ e °°° $p < 0.001$ di topi lasciati ad invecchiare senza alcun trattamento diverse dal gruppo di topi giovani non trattati.

- **Variazione della risposta al Tail Suspension**

La somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) nei topi ha indotto una riduzione significativa del tempo di mobilità solamente rispetto al gruppo di topi giovani non trattati, con relativa diminuzione dei movimenti di fuga e del tremolio del corpo (Fig.25).

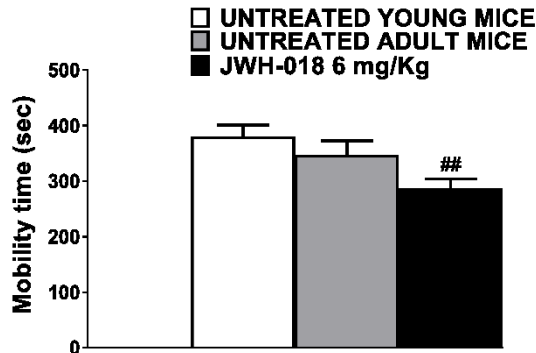


Figura 25: Effetti della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) per sette giorni sui topi al suspension test, espressi in istogrammi. I valori rappresentano la media di circa \pm SEM di 9 animali per trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata con il programma Prism software (GraphPad Prism, USA), mediante unpaired T-test. Sono considerate significative tutte le variazioni con ^{##} $p < 0.01$ JWH-018 (6 mg/Kg) diverso dal gruppo di topi giovani non trattati.

- **Variazione della risposta al Novel Object Recognition (NOR) test**

La somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) ha mostrato un significativo deterioramento della capacità di discriminazione dell'oggetto nuovo (Fig.26A), rispetto entrambi i due gruppi di topi non trattati (giovani e adulti). Tuttavia, è visibile anche una differenza nella capacità di discriminazione dell'oggetto anche tra i due gruppi di topi non trattati (giovani e adulti).

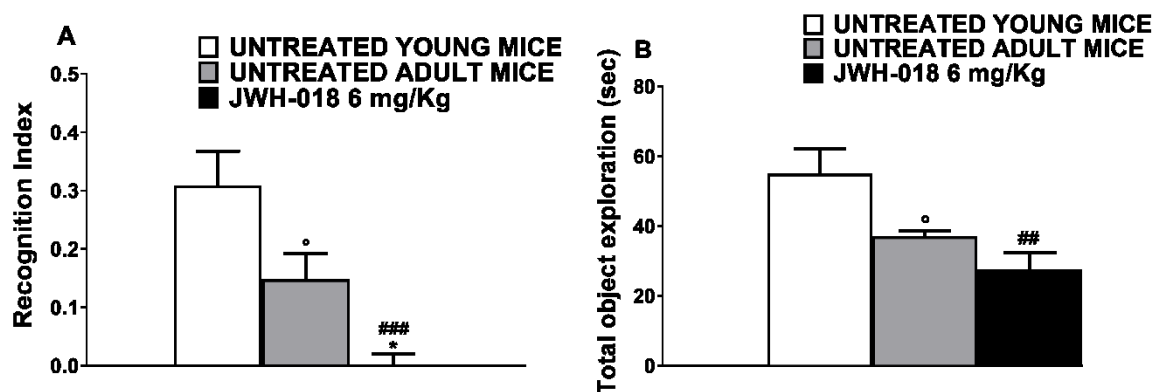


Figura 26: Effetti della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) per sette giorni sui topi al NOR test, espressi in istogrammi. I valori rappresentano la media di circa \pm SEM di 9 animali per trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata con il programma Prism software (GraphPad Prism, USA), mediante unpaired T-test. Sono considerate significative tutte le variazioni con ^{*} $p < 0.05$ JWH-018 (6 mg/Kg) diverse dal gruppo di topi lasciati ad invecchiare senza alcun trattamento, ^{##} $p < 0.01$ e ^{###} $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) diverse dal gruppo di topi giovani non trattati e ^o $p < 0.05$ del gruppo di topi giovani non trattati diverso dal gruppo di topi lasciati ad invecchiare senza alcun trattamento.

Inoltre, anche il tempo totale di esplorazione degli oggetti è stato significativamente ridotto sia nei topi non trattati ma lasciati invecchiare, che nei topi trattati con JWH-018 rispetto il gruppo di topi giovani non trattati (Fig.26B).

- **Variazione della risposta al partition test**

La somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) ha mostrato una variazione del livello di interazione sociale dei topi rispetto il gruppo di topi non trattati giovani, espressa come una significativa diminuzione del tempo totale speso vicino la partizione (Fig.27). Tuttavia, è visibile anche una variazione del livello di interazione sociale anche tra i due gruppi di topi non trattati (giovani e adulti).

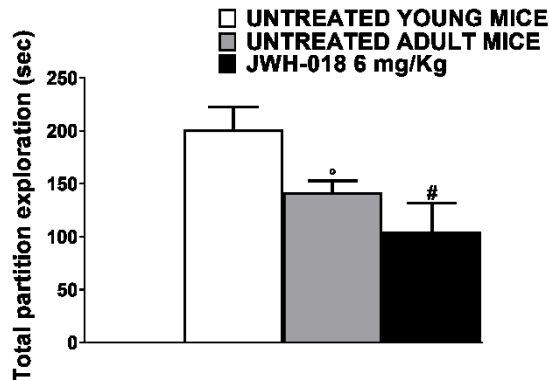


Figura 27: Effetti della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) sull'interazione sociale dei topi, espressi in istogrammi. I valori rappresentano la media di circa \pm SEM di 9 animali per trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata con il programma Prism software (GraphPad Prism, USA), mediante unpaired T-test. Sono considerate significative tutte le variazioni con $\#p < 0.05$ JWH-018 (6 mg/Kg) diverso dal gruppo di topi giovani non trattati e $^{\circ}p < 0.05$ del gruppo di topi giovani non trattati diverso dal gruppo di topi lasciati ad invecchiare senza alcun trattamento.

Allo stesso tempo, risultano diminuiti anche il numero di volte in cui il topo si avvicina alla partizione e il tempo medio speso durante ogni singola escursione in prossimità della partizione (Tab.2).

Tabella 2: Effetto della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/kg) sull'interazione sociale dei topi. I dati sono espressi (vedi materiale e metodi) come numero di volte in cui il topo si avvicina alla partizione e il tempo medio speso durante ogni singola escursione in prossimità della partizione (sec) e rappresentano la media di circa \pm SEM 9 animali per ogni trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata con il programma Prism software (GraphPad Prism, USA), mediante unpaired T-test. Sono considerate significative tutte le variazioni con $^{**}p < 0.01$ JWH-018 (6 mg/Kg) diverse dal gruppo di topi lasciati ad invecchiare senza alcun trattamento e $^{\#}p < 0.05$ JWH-018 (6 mg/Kg) diverse dal gruppo di topi giovani non trattati.

Effetti	Sostanze		
	Topi giovani non trattati	Topi adulti non trattati	JWH-018 (6 mg/Kg)
Numero di avvicinamenti	49.5 \pm 10	47.5 \pm 7.13	26.8 \pm 3.96 [#]
Tempo medio (sec)	4.98 \pm 0.56	4.96 \pm 0.03	4.07 \pm 0.28 ^{**}

Quantificazione di 2-AG nel plasma

Come mostra la figura sottostante, la somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) ha indotto un significativo e notevole aumento dei livelli plasmatici di 2-AG sia rispetto al gruppo di topi non trattati lasciati invecchiare, che quelli giovani (Fig.28). Tuttavia, è possibile notare una variazione dei livelli plasmatici dell'endocannabinoide anche tra i due gruppi di topi non trattati, invecchiati e giovani.

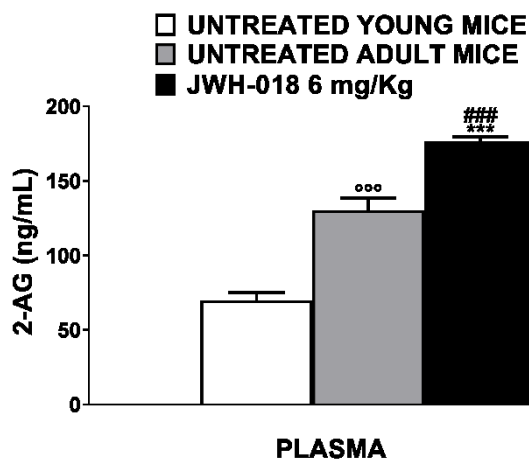


Figura 28: Effetto a lungo termine della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) sulla concentrazione plasmatica di endocannabinoidi (2-AG), espresso in istogrammi. I dati rappresentano la SEM media di 9 topi per gruppo. L'analisi statistica è stata effettuata mediante unpaired T-test. Sono considerate significative tutte le variazioni con *** $p < 0.001$ JWH-018 (6 mg/Kg) diverse dal gruppo di topi lasciati ad invecchiare senza alcun trattamento; ### $p < 0.001$ di JWH-018 diverse dal gruppo di topi giovani non trattati, e *** $p < 0.001$ di topi lasciati ad invecchiare senza alcun trattamento diverse dal gruppo di topi giovani non trattati.

- *Andamenti di contenuto di 2-AG e AEA nel plasma*

La somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) ha indotto un significativo e notevole aumento dei livelli plasmatici di 2-AG (Fig.28) che coincidono inevitabilmente ad un leggero aumento dell'area sottostante la curva (Fig.29A). Nonostante non sia stato possibile fornire un valore in termini di concentrazione, le variazioni dei livelli di AEA espressi come area sottostante la curva (AUC), è possibile notare una variazione del suo contenuto rispetto a entrambi i due gruppi di topi non trattati, invecchiati e giovani (Fig.29B).

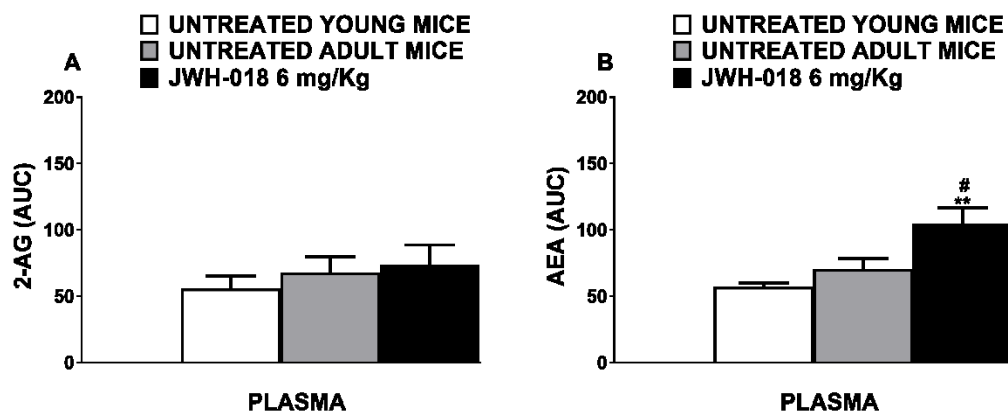


Figura 29: Effetto a lungo termine della somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg) sul contenuto plasmatico di endocannabinoidi (2-AG, pannello A e AEA, pannello B), espresso in istogrammi come area sottostante la curva (AUC). I dati rappresentano la SEM media di 9 topi per gruppo. L'analisi statistica è stata effettuata mediante unpaired T-test. Sono considerate significative tutte le variazioni con $**p < 0.01$ JWH-018 (6 mg/Kg) diverse dal gruppo di topi lasciati ad invecchiare senza alcun trattamento; e $\#p < 0.05$ di JWH-018 diverse dal gruppo di topi giovani non trattati.

- **Correlazione con i livelli di 2-AG nel plasma**

Al fine di indagare se l'aumento dei livelli di 2-AG nel plasma causato dalla somministrazione ripetuta di JWH-018 nei topi fosse proporzionale all'effetto inibitorio mostrato *in vivo*, abbiamo considerato di valutare la correlazione tra questi parametri (Fig.30). Il trattamento ripetuto con JWH-018 chiaramente mostra differenti effetti correlati con l'aumento dei livelli plasmatici dell'endocannabinoide, come dimostra la figura sottostante.

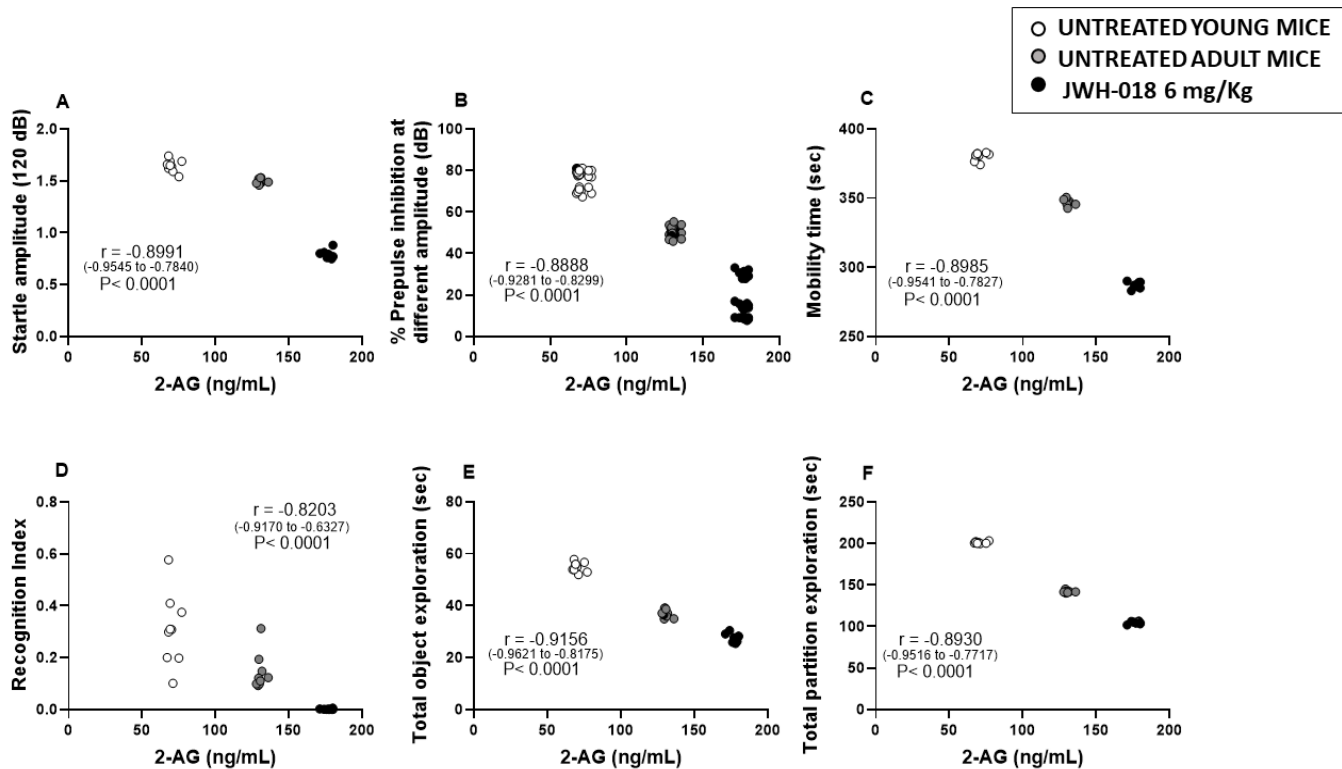


Figura 30: Correlazione tra l'aumento dei livelli plasmatici di 2-AG registrati a seguito dalla somministrazione ripetuta di JWH-018 (6 mg/Kg; i.p.) per sette giorni e un wash-out pari a due mesi (D60), e: Starle acoustic (pannello A); Pre-Pulse Inhibition (pannello B); Mobility time (pannello C); Recognition Index (pannello D); Total Object exploration (pannello E); Total Partition exploration (pannello F). I dati sono espressi come SEM media (n = 9/gruppo). L'analisi statistica è stata eseguita mediante correlazione XY, che ha rivelato una correlazione (r) differente per $P < 0.0001$.

6.3.2. Studi clinici:

- **Variazione di segnale nel CBS**

Come mostra la tabella sottostante, l'analisi dei campioni di sangue dei pazienti affetti da differenti forme di demenza senile, ha mostrato un significativo e notevole aumento dei livelli plasmatici di AEA (espresso come area sottostante la curva) rispetto ai soggetti con funzioni cognitive nella norma (Tab.3).

*Tabella 2: Analisi HPLC-MS/MS dei campioni di sangue di pazienti affetti da differenti forme di Demenza Senile. I dati rappresentano la SEM media di 4 campioni per forma, ripetuti 6 volte ciascuno. L'analisi statistica è stata effettuata mediante unpaired T-test. Sono considerate significative tutte le variazioni con *p<0.05 diverse dal controllo; ###p<0.001 di demenza mista diverse da Alzheimer, e °p<0.05 di demenza mista diverse da MCI.*

CAMPIONE	MEDIA AUC
Controllo	320.3618 ± 67.64106
Alzheimer	294.8038 ± 6.51106
Demenza Mista	555.6958 ± 8.347504 ^{*###°}
MCI	664.051 ± 107.4292 [*]

DISCUSSIONE

Per decenni la ricerca scientifica si è sempre più concentrata sull'impatto dell'uso clinico della cannabis. Successivamente, anche i derivati sintetici del Δ^9 -THC hanno acquisito maggiore interesse dal punto di vista scientifico per la loro azione terapeutica, sia come agenti stimolanti l'appetito -per il trattamento di anoressia, cancro o HIV/AIDS (Jatoi et al., 2002; Abrams et al., 2003)- che per i suoi effetti antiemetici (Grimison et al., 2020) che per la loro capacità di fornire sollievo sintomatico dal dolore neuropatico cronico (Wilsey et al., 2008; Lynch and Campbell, 2011; Wilsey et al., 2013; Wang et al., 2021; Petzke et al., 2022). Recentemente, si è inoltre dimostrato che la cannabis possiede efficaci attività terapeutiche anche nel trattamento della sintomatologia e della progressione di alcune malattie neurodegenerative (come AD e morbo di Parkinson) e di diversi disturbi neurologici spesso correlati alle demenze stesse (quali schizofrenia, depressione, ansia, insonnia, epilessia e convulsioni; Ortiz-Medina et al., 2018; Arzimanoglou et al., 2020), suggerendo che il sistema endocannabinoide potrebbe essere alla base della fisiopatologia delle Demenze senili. Di contro, il massiccio ricorso ai SCBs da parte di individui che li assumevano per le loro proprietà psicoattive, ha fatto sì che gli stessi diventassero una tra le classi di NSP più vendute nel mercato illecito delle sostanze stupefacenti (EMCDDA, 2022). In quest'ottica, gli effetti positivi e negativi indotti dall'assunzione a scopo ricreativo di cannabinoidi sintetici -acuti o cronici che siano- sono ancora da chiarire, soprattutto quelli inerenti le prestazioni neurocognitive.

A tal fine, il presente studio di Dottorato è stato basato prevalentemente sulla ricerca preclinica, ideando un progetto sperimentale definito (Fig.6) in modo tale da valutare gli effetti indotti *in vivo* dalla somministrazione di JWH-018 (6 mg/Kg; i.p.) per sette giorni consecutivi, a seguito di differenti periodi di wash-out -primo studio **(i)**: 3 giorni; secondo studio **(ii)**: 15 giorni; terzo studio **(iii)**: 53 giorni- su diversi parametri. In particolare, i risultati ottenuti sono di seguito schematizzati in:

(i) alterazione a breve termine delle risposte sensoriali, sensori-motorie, fisiologiche e motorie; incrementata analgesia e acinesia; sospetto sviluppo di tolleranza.

(ii) variazione del gating sensoriale; transitoria facilitazione dell'attività motoria spontanea con insorgenza di atteggiamenti tipicamente stereotipici (rotazione del corpo in senso orario) e ansiogeni; ridotta densità recettoriale CB₁ nell'ippocampo; alterazione dei livelli di AEA e 2-AG, e dei loro enzimi degradanti (FAAH e MAGL).

(iii) variazione a lungo termine del gating sensoriale; comportamento depressivo-simile; danneggiamento della memoria di lavoro; ridotta socievolezza; aumentata concentrazione plasmatica di 2-AG.

Successivamente agli studi preclinici, segue uno clinico mediante l'utilizzo di campioni -siero stoccato alla prima valutazione clinica a -80°C, con relativi dati clinico-demografici-laboratoristici (> 70 variabili)- forniti dal Prof. Giovanni Zuliani, che comprendevano pazienti affetti da diverse tipologie di demenza (Alzheimer, mista e MCI) e soggetti con funzioni cognitive nella norma (dopo approfondita valutazione neuropsicologica) senza alcuna dipendenza funzionale. I risultati hanno permesso di ottenere un chiaro trend di aumento dei livelli plasmatici di AEA (espresso come area sottostante la curva) differente a seconda della specifica forma di demenza.

Questo studio nel complesso, ha permesso di ottenere *in vivo* un quadro definito che sostiene l'ipotesi originale che l'uso ripetuto di SCBs, anche per un breve periodo di tempo, induce degli effetti che sono potenzialmente correlabili ai sintomi comportamentali e psicologici tipicamente riconducibili alla MCI, condizione clinica che precede comunemente lo sviluppo della demenza. Allo stesso tempo, i dati clinici ottenuti dalle analisi dei pazienti affetti da diverse tipologie di demenza, mostrano chiaramente un aumento dei livelli di endocannabinoidi e, considerando che *in vivo* la somministrazione ripetuta di SCBs ha mostrato un aumento notevole del loro contenuto, è verosimilmente possibile che l'utilizzo di SCBs possa essere a lungo termine concausa nella fisiopatologia della demenza stessa.

Primo studio in vivo

Questo studio ha principalmente evidenziato un effetto di tolleranza a seguito della somministrazione ripetuta sia di Δ^9 -THC che JWH-018, entrambi somministrati intraperitonealmente alla dose di 6 mg/Kg. Inoltre, i risultati dimostrano chiaramente un'alterazione della capacità sensorimotoria basale (risposte visive) e motoria (rotarod e drag) nei topi, osservata dopo il periodo di wash-out (3 giorni). Inoltre, risultano confermati i già conosciuti effetti "tetrad" tipici della somministrazione acuta di cannabinoidi sintetici, ovvero l'anti-nocicezione, l'ipotermia, l'iper- e/o l'ipo-locomozione e la catalessi, ampiamente studiati nei roditori (Canazza et al., 2015; Bilel et al., 2019; Moore e Weerts, 2022).

Tutte le risposte inibitorie sono maggiori il primo giorno di somministrazione e tendono a diminuire durante gli altri sei giorni di trattamento, mostrando dunque il sopracitato effetto di sviluppo di tolleranza. Diversi studi preclinici (Bass e Martin 2000; Rubino et al., 2000;

Di Marzio et al., 2000; Pan et al., 2014; Tai et al., 2015; Elmore e Baumann, 2018; Nealon et al. 2019) e clinici (D'Souza et al. 2008; Vandrey et al. 2012), hanno infatti evidenziato che l'uso prolungato di cannabinoidi induce tolleranza, dipendenza e astinenza. In particolare, è possibile notare come l'incidenza all'effetto di tolleranza possa essere probabile sia in assuntori cronici di elevate dosi di cannabis (Ramaekers et al., 2022), che in consumatori dosi inferiori di "Spice" (Vandrey et al., 2012). In linea con questa evidenza, altri studi dimostrano che gli effetti di tolleranza al trattamento a lungo termine dei cannabinoidi per le risposte ai test che valutano l'analgesia (Gonzales et al., 2005; Pan et al., 2014), l'ipotermia (Gonzales et al., 2005; Tai et al., 2015; Elmore e Baumann, 2018) e l'inibizione motoria (Gonzales et al., 2005; Tai et al., 2015; Elmore e Baumann, 2018; Bilel et al., 2023), sono sviluppati tipicamente nell'intervallo di 3-7 giorni (Gonzales et al., 2005). Inoltre, contrariamente a quanto affermato da uno studio precedente (Deadwyler et al., 1995), anche altri effetti come la memoria, l'ansia, la dominanza sociale e sintomi psicotico-simili (Bilel et al. 2023), possono manifestarsi a seguito di un trattamento ripetuto con dosi elevate di JWH-018. Tuttavia, i nostri risultati hanno dimostrato che la tolleranza sviluppata è diversa a seconda non solo del tipo di sostanza somministrata, ma anche del parametro farmacotossicologico esaminato. Infatti, per quanto riguarda il Δ^9 -THC l'effetto di tolleranza appare completo solo per alcuni test (temperatura interna, visual placing, pinna, drag, rotarod e pinch test). Per quanto riguarda il JWH-018 invece, l'effetto di tolleranza appare completa nella maggior parte dei test (tattile, acustico, frequenza respiratoria, drag test, bar test, tail withdrawal e temperatura interna) e parziale in pochi (visual placing, rotarod e pinch test). D'altra parte, le risposte visive d'avvicinamento dell'oggetto (Fig.12D) e della temperatura esterna (Fig.15D), non sono invece modificate dalla somministrazione ripetuta. In linea con i risultati ottenuti in questo elaborato, uno studio eseguito su topi ha già evidenziato come la tolleranza a seguito del trattamento ripetuto con Δ^9 -THC e JWH-018 sia differente a seconda del parametro farmaco-tossicologico esaminato (Tai et al., 2015). Ad ogni modo, è ben noto che gli effetti della somministrazione acuta dei SCBs siano principalmente mediati dai recettori CB₁, i quali sono altamente espressi nei circuiti designati al controllo delle risposte sensori-motorie (striato dorsomediale, corteccia visiva, nucleo cocleare dorsale e corteccia somato-sensoriale; Hemelt e Keller, 2008; Gomez-Nieto et al., 2014; Ossato et al., 2015; Canazza et al., 2016; Corli et al., 2022) e motorie (cervelletto e gangli della base; Funada et al., 2020; Corli et al., 2022), così come quelle fisiologiche (ipotalamo anteriore pre-ottico e tronco cerebrale; Rawls et al., 2002; Pfitzer et al., 2004) e nocicettive (regioni medie e posteriori del cervello; Woodhams et al., 2017). Coerentemente, il pre-trattamento con

l'antagonista CB₁ NESS-0327, ha impedito l'insorgenza di tutte le risposte alterate osservate nei topi (dati non mostrati). I risultati di questo primo studio pertanto, confermano il coinvolgimento dei recettori CB₁ nelle alterazioni causate dai SCBs (Canazza et al., 2015; Bilel et al., 2019; Corli et al., 2022). Globalmente, questi dati suggeriscono che tali regioni del Sistema Nervoso Centrale (CNS), potrebbero essere soggette a meccanismi di tolleranza evidenziati a partire dal quarto giorno di questa sessione sperimentale, rivelando così l'importanza di comprendere al meglio i meccanismi alla base non solo degli effetti acuti, ma anche del consumo prolungato di tali sostanze. Infatti, la somministrazione cronica di SCBs e del Δ^9 -THC nei roditori (Rubino et al., 2000; Bilel et al., 2023) e Δ^9 -THC negli umani (Ramaekers et al., 2022), può provocare desensibilizzazione e downregulation dei recettori CB₁ nel SNC. Studi precedenti hanno già evidenziato che JWH-018 può indurre rapidamente una significativa internalizzazione dei recettori CB₁ nelle cellule ipocampali umane (Atwood et al., 2010).

In definitiva, questi risultati evidenziano il profilo ad alto rischio dei SCBs (relativamente nuovi e meno conosciuti), che possono causare effetti avversi imprevedibili se assunti a dosi elevate (psychonautwiki.org). Infatti, gli utenti che ricercano gli effetti manifestati durante le prime due assunzioni, potrebbero inconsapevolmente ritrovarsi nella condizione di dover aumentare i dosaggi d'assunzione, nel tentativo appunto di riscontrare sempre lo stesso effetto, ed incorrere così in effetti avversi imprevedibili e pericolosi, anche dovuti a dei cambiamenti neurofisiologici indotti dal consumo ripetuto della stessa sostanza. Altro punto degno di nota riscontrato nei risultati di questo primo studio, risulta essere l'alterazione basale della capacità sensorimotoria (risposte visive) e motoria (rotarod e drag) nei topi, osservata dopo il periodo di wash-out. In uno studio, Huestegge e colleghi, hanno suggerito che l'alterazione della capacità di coordinamento visuo-motorio rappresenti un'importante caratteristica riscontrata nei consumatori cronici di cannabis durante lo svolgimento di attività quotidiane specifiche (come la percezione visuo-spaziale e la lettura; Huestegge et al., 2009). Per quanto riguarda le risposte visive, è opportuno specificare però che gli animali sono sottoposti a condizioni diverse durante i due test comportamentali (vedi 5.3.1.2.): durante il *placing* test, l'animale reagisce all'avvicinamento al pavimento per opera dell'operatore; durante l'*object* test invece, l'animale è libero di muoversi ed è l'operatore che avvicina una barra in plastica al suo campo visivo. Pertanto, nel *visual placing test* i topi devono integrare altre abilità alla capacità visiva in sé, quali le funzioni tattili (vibrissae) e quelle vestibolari, traducendo tutte le risposte dell'animale nel corretto posizionamento degli arti per procedere alla caduta (Lambert et al., 2016; Corli et al., 2023). Di conseguenza,

questo dimostra come il danno delle risposte basali coinvolga sia le abilità sensoriali che quelle motorie. A conferma della persistenza delle alterazioni nelle capacità psicomotorie nei topi -che in genere si interrompono dopo il consumo acuto- sono state osservate simili alterazioni visuo-motorie anche in utilizzatori cronici, a seguito dell'interruzione dell'abuso della sostanza (Broyd et al., 2016). Inoltre, ulteriori studi hanno evidenziato che la somministrazione prolungata di JWH-018 può alterare i livelli di glutammato e dopamina nel SNC (Bilel et al., 2023), in linea con l'evidenza umana (Mason et al., 2021) e con i risultati ottenuti in questo studio.

Un'altra importante implicazione da considerare, è che certamente i risultati ottenuti confermando la capacità dei SCBs di interrompere principalmente le risposte sensorimotorie e motorie, siano in linea con le alterate abilità psicomotorie registrate tra i conducenti coinvolti nei casi di guida sotto l'influenza di droghe (DUID; Musshoff et al., 2014; Karinen et al., 2014; Ji Kwon and Han, 2019; Oraziotti et al., 2022). Infatti, un recente studio condotto da Wickens e colleghi ha sottolineato l'impatto sul comportamento dei conducenti (sessantuno partecipanti) dopo aver fumato solo cannabis. Sono stati osservati una serie di errori di guida autoriferiti, errori e violazioni, disagio psicologico e impulsività dei conducenti, che li hanno indotti a cercare una riduzione della velocità media. Inoltre, questo studio ha anche identificato un'associazione tra personalità, differenze individuali e gli effetti acuti della droga (Wickens et al., 2022). È quindi intuitivo che la cooperazione di diverse funzioni sensorimotorie, cognitive e psicomotorie, è indispensabile per una corretta gestione del veicolo e l'uso di sostanze come i SCBs, può influenzare tutte queste funzioni più strettamente della cannabis (Oraziotti et al., 2022).

Secondo studio in vivo

I risultati di questo secondo studio evidenziano chiaramente che l'esposizione ripetuta a JWH-018, nonostante i giorni di wash-out (15) successivi alla somministrazione, causa degli effetti cognitivi (variazione del gating sensoriale) e comportamentali (transitoria facilitazione dell'attività motoria spontanea con insorgenza di atteggiamenti tipicamente stereotipici e ansiogeni), verosimilmente attribuibili all'alterata neuroplasticità (ridotta densità recettoriale CB₁ nell'ippocampo) e alla certificata alterazione dei componenti del ECS (alterazione dei livelli di AEA e 2-AG nello striato, e dei loro enzimi degradanti FAAH e MAGL in ippocampo).

In linea con quanto riporta la letteratura esistente circa la somministrazione in acuto del JWH-018 (Bilel et al., 2019), anche la sua somministrazione ripetuta (Bilel et al., 2023)

induce un'alterazione del gating sensoriale nei topi, osservabile attraverso una riduzione della risposta allo startle (Fig.19A) e al pre-pulso (Fig.19B) per tutte le sue diverse intensità di segnale (68, 75 e 85 dB), e nonostante i giorni successivi di wash-out. Per anni il ruolo di principale modulatore del gating sensorimotorio nei topi è stato ricoperto dal recettore 5-HT_{2A} (Sipes e Geyer, 1997). Tuttavia, il JWH-018 non è particolarmente affine e potente su tale recettore serotoninergico (Wiley et al., 2016). D'altro canto, è già stato dimostrato il ruolo potenziale dei recettori CB₁ nella modulazione del rilascio di neurotrasmettitori (quali dopamina, serotonina e glutammato; Howlett et al. 2005; Ossato et al., 2017; Bilel et al., 2023) implicati nella psicosi e nella schizofrenia (Sawa e Snyder, 2003), suggerendo così che i SCBs possano modulare indirettamente una varietà di recettori correlati ad essa (D₂, 5-HT_{2A} e NMDA; Wilson et al. 2019; Bilel et al., 2023). Dunque, si può ipotizzare che il JWH-018 a lungo termine, possa avere la capacità di indurre deficit di elaborazione delle informazioni e disturbi sensoriali responsabili degli effetti psicotici anche negli esseri umani (Every-Palmer, 2010, 2011; Celofiga et al., 2014). Difatti, diversi sono i casi clinici che documentano episodi di estrema agitazione psicomotoria, irritabilità ed effetti psicotici (compresi allucinazioni e paranoia), registrati a seguito dell'assunzione di alte dosi di Δ^9 -THC (Tounebize et al., 2017) e SCBs (Winstock et al., 2013; Brewer e Collins, 2014). Ciò risulta essere in linea anche con i risultati ottenuti mediante i test eseguiti per la valutazione locomotoria nei topi (Fig.20). Già in acuto, l'effetto comportamentale *in vivo* mediato dal JWH-018 (Ossato et al., 2017) risulta simile all'azione psicostimolante della cocaina (Zombeck et al., 2010) e delle anfetamine (Proietti Onori et al., 2014). Precedenti studi di microdialisi *in vivo* infatti, hanno già dimostrato che JWH-018 aumenta la trasmissione della dopamina (DA) nel NAc (De Luca et al., 2015; 2016). Coerentemente, uno studio condotto da Ossato e colleghi (2017), ha dimostrato che l'attività locomotoria nei topi a seguito della somministrazione di JWH-018 risulta facilitata attraverso meccanismi CB₁ e DA-dipendenti. Difatti, tale facilitazione motoria viene completamente prevenuta mediante pre-trattamento con un'antagonista CB₁ e dal blocco simultaneo dei recettori dopaminergici D₁ e D₂ (Ossato et al., 2017). Inoltre, nei risultati ottenuti ed esposti in questo elaborato, la somministrazione ripetuta di JWH-018 ha provocato nei topi anche l'insorgenza di atteggiamenti tipicamente stereotipici (rotazione continua del corpo in senso orario) e un aumento del tempo trascorso nella zona centrale dell'arena in cui è stato effettuato l'esperimento. Questo, riflette anzitutto la moderata agitazione psicomotoria, precedentemente discussa e già documentata in letteratura (Vigolo et al., 2015; Ossato et al., 2017); in secondo luogo, il manifestarsi di un atteggiamento ansiogeno, potrebbe essere attribuibile alla già nota, seppur scarsa, affinità di

JWH-018 per il recettore serotoninergico 5HT_{2B} (Waley et al., 2016). Uno studio condotto da Valjent e colleghi, ha evidenziato che i cannabinoidi puri nel topo variano gli stati d'ansia in modo bifasico (ansigeno e ansiolitico), in relazione a diversi fattori, quali la dose somministrata, il sito e la via di somministrazione; difatti, il Δ^9 -THC somministrato intraperitonealmente alla dose di 0.3 mg/Kg, sembra mostrare un effetto ansiolitico, mentre alla dose di 5 mg/Kg, produce una risposta ansigena (Valjent et al., 2002). Lo stesso effetto, è stato dimostrato anche a seguito della somministrazione di due differenti SCBs, il CP55,940 e il WIN55,212-2 (Patel e Hillard, 2006). In conclusione, tali dati suggeriscono un potenziale link tra l'utilizzo di cannabinoidi e il manifestarsi di atteggiamenti tipicamente ansiosi/depressivi. Recenti evidenze infatti, suggeriscono che l'uso di cannabis durante l'adolescenza sia associato al manifestarsi di sintomi depressivi maggiori (Kaasbøll et al., 2018). Tuttavia, bisogna sempre considerare gli effetti della vulnerabilità individuale genetica; questo perché le variabili genetiche e ambientali possono facilmente influenzare le risposte indotte dall'uso di NPS (Mazdai et al., 2022). A tal proposito, uno studio ha dimostrato che l'uso di cannabis aumenta il rischio d'incidenza dei sintomi depressivi, solamente in presenza dell'allele corto del genotipo 5-HTTLPR (Ottens e Engels, 2013). Inoltre, i dati ottenuti in questo secondo studio mostrano anche che la somministrazione ripetuta di JWH-018 ha indirettamente prodotto delle alterazioni a lungo termine in striato e ippocampo, verosimilmente responsabili degli effetti comportamentali appena discussi. In particolare, i livelli dei principali endocannabinoidi (AEA e 2-AG) e degli enzimi che li degradano (FAAH e MAGL) sembrano essere aumentati, rispettivamente in striato e ippocampo. L'aumento di tali enzimi, inevitabilmente porta ad una riduzione dei livelli di endocannabinoidi, che conseguenzialmente induce anche un ridotto controllo sul rilascio di neurotrasmettitori, tra cui appunto la dopamina. Questo, potrebbe rappresentare un'ulteriore spiegazione dell'aumento moderato dell'attività motoria (Ossato et al., 2017). Allo stesso tempo, è già stato dimostrato che una diminuita densità ippocampale dei recettori CB₁ nei topi trattati ripetutamente è indicativa dell'instaurarsi di un comportamento tipicamente ansigeno nei roditori (Haller et al., 2002; Marco e Laviola, 2012). A conferma di ciò, due studi hanno già dimostrato che sia i ratti (Pintori et al., 2021) che topi (Bilel et al., 2023) esposti al trattamento cronico con JWH-018, presentano un atteggiamento più ansioso. Quindi, possiamo ipotizzare che l'agitazione psicomotoria registrata durante questa sessione sperimentale, possa essere anche correlata allo stato ansioso generato, e dunque sia dovuta proprio alle alterazioni recettoriali CB₁ (Barbieri et al., 2016) indotte dalla somministrazione ripetuta.

Terzo studio in vivo

I risultati preclinici del terzo studio, dimostrano chiaramente un peggioramento degli effetti cognitivi e comportamentali già evidenziati durante gli studi eseguiti il secondo anno di ricerca del presente progetto. Difatti nei topi, l'esposizione ripetuta a JWH-018 per sette giorni consecutivi, nonostante il più lungo periodo di wash-out (~ 2 mesi), ha causato degli effetti cognitivi (variazione del gating sensoriale e variazione della memoria di lavoro) e comportamentali (insorgenza di atteggiamenti depressivo-simili e alterazioni nella normale attività sociale), verosimilmente correlabili agli aumentati livelli plasmatici di 2-AG (Fig.30). In particolare, in questo studio i topi trattati con JWH-018, sono stati confrontati con gruppi di topi non trattati aventi la stessa età e un gruppo di topi più giovani. I risultati dimostrano come gli effetti di deterioramento cognitivo e comportamentale, blandamente evidenziati tra i due gruppi di topi non trattati e dunque imputabili al normale invecchiamento, siano maggiori a seguito del trattamento ripetuto.

Come già ampiamente discusso, il trattamento ripetuto con JWH-018, anche a circa due mesi dal termine della sua somministrazione, induce nei topi un'alterazione del gating sensoriale al PPI test (Fig.24) e una compromissione della memoria di lavoro -espressa come indice di riconoscimento (RI; Fig.26A) e esplorazione totale dell'oggetto (TOE; Fig.26B)- al Novel Object test. Dunque, sembra essere confermato il ruolo potenziale dei recettori CB₁ nella fisiopatologia di disturbi depressivo-correlati (Witkin et al., 2005), psicosi e schizofrenia (Sawa e Snyder, 2003). Difatti, la somministrazione nei topi di JWH-018 già in acuto sembra essere indicativa di una riduzione della capacità di apprendimento e memoria, e potrebbe essere spiegata da un concomitante aumento dei livelli di endocannabinoidi -in linea con i risultati riportati in questo elaborato- e una soppressione del BDNF nell'ippocampo (Li et al., 2019). Proprio quest'ultimo, svolge un ruolo chiave noto sia nel riconoscimento (Mottarlini et al., 2020) che nella memoria spaziale (Pouliat et al., 2021). Coerentemente, anche la somministrazione prolungata di JWH-018 ha indotto una riduzione significativa del BDNF e della via intracellulare mediata da esso nell'ippocampo, oltre che alterazioni delle capacità cognitive nei topi, nonostante un periodo di wash-out prolungato (Bilel et al., 2023). A conferma di ciò, studi precedenti eseguiti su roditori, hanno evidenziato come l'uso di un antagonista del recettore CB₁, anche in co-somministrazione con farmaci tipicamente antipsicotici, sia stato utile per il contenimento dei deficit cognitivi tipici del modello schizofrenico (Black et al., 2011). Altri studi preclinici, hanno mostrato inoltre che l'uso cronico di SCBs provoca anche una variazione di altre funzioni esecutive (quali attenzione, processo decisionale e ansia), che inducono inesorabilmente un deterioramento

della funzione cognitiva, esercitando conseguenzialmente un controllo sul comportamento (Pattij et al., 2008; Castaneto et al., 2014; Livny et al., 2018). Traslazionalmente, uno studio di Cohen e colleghi, in cui vengono messe a confronto le abilità di memoria di lavoro, le capacità cognitive e quelle di memoria a lungo termine tra gli utilizzatori cronici di Δ^9 -THC e SCBs, ha dimostrato che queste prestazioni sono notevolmente più scarse negli abusatori dei composti sintetici (Cohen et al., 2017). Inoltre, in linea con i risultati ottenuti nel presente lavoro, altri studi suggeriscono che il neuroadattamento nel cervello indotto dall'utilizzo cronico di cannabis, potrebbe anche essere potenzialmente collegato alla disfunzione neurocognitiva nei consumatori anche quando sono sobri (Pope et al., 2001; Bosker et al., 2013; Lorenzetti et al., 2016; Broyd et al., 2016; Ramaekers et al., 2022). D'altro canto, i risultati ottenuti sia al Tail suspension test (Fig.25) che al Partition test (Fig.27) sono indicativi dell'insorgenza di atteggiamenti depressivo-simili nei topi. Uno studio condotto da Sagredo e colleghi (2006) eseguito su ratti, ha evidenziato che la somministrazione cronica di Δ^9 -THC ha indotto un marcato aumento del contenuto di 5-HT in corteccia frontale, ma non ha variato il contenuto di 5HIAA (suo metabolita intraneuronale). Ciò ha dato origine a una diminuzione del rapporto 5HIAA/5HT, il quale suggerisce una possibile riduzione dell'attività dei terminali serotonergici che raggiungono questa area corticale. La rilevanza di queste osservazioni indica che cambiamenti nella trasmissione serotonergica potrebbero essere implicati nello sviluppo della depressione (Sagredo et al., 2006). Infatti, è largamente riconosciuto che il sistema serotonergico è uno tra i più complessi ed estesi nel SNC dei mammiferi (Hainer et al., 2015), così come che il ruolo della 5-HT sia implicato in una vasta gamma di processi fisiologici e comportamenti (Lesh e Waider, 2012), e sempre più evidenze dimostrano la comorbidità tra alterazioni del ritmo circadiano e l'insorgenza di stati ansiogeno/depressivi (Daut e Fonken, 2019). Pertanto, considerando che nei roditori i recettori della 5-HT, così come quelli della DA, sono co-localizzati con i recettori CB₁ sui neuroni in varie regioni cerebrali (Hermann et al., 2002), si può ipotizzare che la somministrazione ripetuta di JWH-018 abbia indirettamente indotto delle alterazioni nella neurotrasmissione serotonergica, producendo l'insorgenza di atteggiamenti depressivo-simili nei topi. Uno studio clinico ha infatti dimostrato come l'esposizione cronica alla cannabis induca una diminuita efficienza nella promozione del sonno e una difficoltà nel mantenimento di tale stato a seguito dell'interruzione del suo utilizzo, sottolineando quanto questo possa sabotare i tentativi di disintossicazione degli utilizzatori e aumentandone il rischio di ricaduta (Monti e Pandi-Perumal, 2022). Nei roditori, i nuclei mesencefalici del raphe -composti rispettivamente da quello dorsale e mediano- rispondono a vari tipi di stress

(Hale et al., 2012): fisico (es. forced swim test), psicologico (test tipici di caratterizzazione di stati d'ansia e di isolamento sociale o l'immobilizzazione) e metabolico (es. ipoglicemia). Ciò, risulta perfettamente in linea con i dati ottenuti sia al Partition test (Fig.27) che al Tail Suspension test (Fig.25), nonostante il primo test, indichi chiaramente la tendenza dei topi trattati ripetutamente ad isolarsi e non voler interagire con i loro simili, e i risultati del secondo test siano meno imponenti. Infatti, il TS valuta i movimenti di fuga degli animali che, anche se è difficile attribuirli ad uno stato di stress e ansia indotto dalla somministrazione ripetuta della sostanza o se imputabili all'agitazione psicomotoria indotta nei topi, suggerisce comunque un'importante alterazione della neuroplasticità coinvolta nelle funzioni comportamentali e cognitive degli animali. Infatti, contrariamente all'esposizione ripetuta, il trattamento acuto con JWH-018 induce un aumento del tempo di immobilità a 2h e 24 h di trattamento nei topi; effetto che pare essere completamente prevenuto mediante il pre-trattamento con un'antagonista CB₁ (Barbieri et al., 2016). Pertanto, considerando i dati ottenuti l'anno precedente circa la ridotta densità CB₁ recettoriale a livello ippocampale, e le evidenze in letteratura secondo cui questo sia indicativo dell'instaurarsi di un atteggiamento ansiogeno nei roditori (Haller et al., 2002; Marco e Laviola, 2012), possiamo ipotizzare che questi risultati possono avere ampie implicazioni: dall'insorgenza di uno stato di ansia e depressione, fino alla schizofrenia. Ciò, potrebbe contribuire a spiegare, almeno parzialmente, la comorbilità tra questi disturbi, per altro spesso tipicamente osservati in pazienti affetti da demenza, i quali infatti dichiarano di avere una scarsa rete sociale (Preuss et al., 2009; Shankar et al., 2013; Levin and Vasenina, 2019; Lara et al., 2019), e quanto la percezione della solitudine in sé (Holwerda et al., 2012) impatti negativamente su di loro, fino al manifestarsi anche di disturbi neuropsichiatrici maggiormente invalidanti, quali depressione, insonnia e allucinazioni (Steffens et al., 2006).

Come già anticipato, i risultati di questo terzo studio mostrano anche un aumento dei livelli plasmatici di 2-AG nei topi (Fig.28), confermando le sempre più numerose evidenze che dimostrano una forte correlazione tra ECS e diverse condizioni cliniche, tra le quali anche malattie mentali (Kruk-Slomka et al., 2019; Rana et al., 2021) e neurodegenerative (Gaston and Friedman, 2017; Basavarajappa et al., 2017; Baruch et al., 2019; Cooray et al., 2020). In particolare, l'aumento mostrato, sembra essere correlabile agli effetti *in vivo* appena discussi (Fig.30); pertanto, in linea con studi precedenti, è plausibile che la variazione dei livelli di endocannabinoidi sia una diretta conseguenza dei deficit cognitivi e mnemonici (Li et al., 2019), associabili all'instaurazione di atteggiamenti ansiogeno tipici e di isolamento sociale nei topi trattati ripetutamente con JWH-018. In uno studio di Long e colleghi, è stato

dimostrato come il 2-AG endogeno moduli una serie di processi comportamentali classicamente associabili alla farmacologia dei cannabinoidi. In particolare, la somministrazione di un antagonista potente e selettivo del MAGL (lipasi responsabile della degradazione del 2-AG) nei topi, ha indotto effetti comportamentali CB₁-dipendenti, quali analgesia, ipotermia e ipomotilità (Long et al., 2009). Allo stesso modo, uno studio eseguito su ratti, ha mostrato come la somministrazione sub-cronica di tre diversi tipi di inibitori selettivi dell'uptake degli endocannabinoidi e di un inibitore selettivo del FAAH (lipasi responsabile della degradazione dell'AEA), inducano un aumento dei livelli basali dei principali endocannabinoidi, visibile anche 12 ore dopo l'ultima somministrazione, con un aumento statisticamente maggiore dei livelli basali di 2-AG (de Lago et al., 2005). Inoltre, è noto che la somministrazione acuta di JWH-018 abbia indotto un aumento della concentrazione ippocampale degli endocannabinoidi principali nei topi e che tale effetto sia stato completamente prevenuto dal pre-trattamento con l'AM251, antagonista recettoriale CB₁. Tuttavia in questo studio, contrariamente dai risultati ottenuti, la variazione quantitativa di AEA indotta in acuto, sembra essere maggiore rispetto quella che interessa il 2-AG e dal momento che i livelli basali di AEA in genere sono notevolmente più bassi in confronto a quelli del 2-AG (rispettivamente, pmol/g e nmol/g), Li e colleghi avevano ipotizzato che probabilmente l'AEA fosse più sensibile alle alterazioni indotte nell'espressione dei suoi enzimi metabolici rispetto il 2-AG (Li et al., 2019). Coerentemente, anche la somministrazione ripetuta di JWH-018 ha indotto nei topi un aumento striatale dei livelli dei due endocannabinoidi, nonostante il periodo di wash-out (Fig.21). Considerando l'ulteriore aumento del periodo di wash-out di questo terzo studio (53 giorni vs 15 del secondo) e che ancora una volta, i livelli di 2-AG sono notevolmente più alti rispetto l'AEA, risulta chiaro che le mancate evidenze relative l'AEA in questo studio, siano imputabili ad un problema di sensibilità dello strumento, il quale rileva la presenza dell'endocannabinoide, non come valore di concentrazioni, ma come area sottostante la curva. Per tale motivo, sono state prese in considerazione le AUC di entrambi i due endocannabinoidi (Fig.29); tenendo conto che ad un blando aumento del contenuto di 2-AG espresso in AUC corrisponde un notevole aumento della concentrazione plasmatica dello stesso espresso in ng/mL, è plausibile che lo stesso accada per l'AEA, per il quale non si è riusciti a ottenere una quantificazione in ng/mL. A conferma di ciò, studi eseguiti su ratti dimostrano che il trattamento ripetuto con Δ^9 -THC riduce i livelli di AEA nello striato (Di Marzo et al., 2000). D'altro canto, uno studio interessante condotto da Hill e colleghi, correla l'aumento dei livelli di 2-AG a seguito di uno stress indotto, ad un parallelo aumento del segnale glucocorticoide e anche all'attivazione

del sistema nervoso simpatico, con conseguente rilascio molto rapido delle catecolamine nella circolazione. Le stesse, si legano agli α -recettori adrenergici, sia a livello della vascolarizzazione che in molti organi periferici (Hill et al., 2009). È risaputo che l'attivazione degli α -adrenorecettori porta a sua volta all'attivazione della fosfolipasi C, attraverso accoppiamento alle proteine Gq, e ciò coincide con l'inizio della biosintesi stessa di 2-AG (Bisogno, 2008). Dato che i CB₁ sono presenti anche sui terminali nervosi simpatici e la loro attivazione da parte degli endocannabinoidi provoca inibizione di norepinefrina (Ishac et al., 1996), è plausibile che l'aumento sierico di 2-AG indotto da un fattore di stress, sia generato dunque dall'attivazione simpatica. Questa ipotesi è in accordo con il ruolo che uno stress acuto e cronico può avere sull'aumento e/o la diminuzione dei livelli di endocannabinoidi attraverso la regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (Gorzalka et al., 2008; Steiner e Wotjak, 2008; Micale e Drago, 2018; Sher, 2019). Per altro, nell'uomo tale interazione tra ECS e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, sembra giocare un ruolo fondamentale nell'instaurarsi dei cosiddetti “suicidal behavior” (SB), ovvero l'idealizzazione del suicidio (Herranz-Herrer et al., 2020). Infine, va sottolineato il fatto che in questo terzo studio, a differenza del secondo, come matrice è stato utilizzato plasma e non tessuto cerebrale. Ciò, implica un approccio preparativo all'analisi diverso (vedi *materiali e metodi*) e inevitabilmente, anche i risultati ottenuti risulteranno differenti; infatti, siero e plasma, pur essendo le più comuni matrici scelte per questo tipo di analisi (Kirkwood et al., 2016; Acquaro Junior et al., 2019; Chu et al., 2020), monitorano un livello di endocannabinoidi definito *circolante* (dall'inglese: “circulating ECs”; Coccaro et al., 2018; Dickens et al., 2020) che necessariamente sarà inferiore rispetto a quello tissutale centrale. Inoltre, studi precedenti hanno evidenziato che cambiamenti nella concentrazione degli endocannabinoidi sono dipendenti non solo da tessuti/organi utilizzati, ma anche dallo stadio della malattia e dal tempo trascorso a seguito di stimoli nocivi che possano aver avuto un impatto negativo sulla progressione della malattia stessa (Toczek e Malinowska, 2018). Infatti, è possibile che gli endocannabinoidi che non sono immagazzinati in vescicole secretorie, siano soggetti a cambiamenti associati alla malattia e che i loro livelli tissutali, e conseguenzialmente quelli circolanti, riflettano i cambiamenti corrispondenti al loro sistema di trasmissione (Di Marzio, 2008).

Altro aspetto degno di nota in questo terzo studio, risulta certamente il confronto tra i due gruppi non trattati di animali, giovani (3 mesi d'età) e adulti (6 mesi di età). Diversi studi suggeriscono che il segnale mediato dai CB₁ abbia un ruolo centrale nel processo di invecchiamento (Nidadavolu et al., 2022). Difatti, la delezione genetica del CB₁ sembra

accelerare il processo d'invecchiamento (anticipando sia i deficit cognitivi che quelli di memoria e apprendimento) a seguito di infiammazione e perdita neuronale ippocampale (Bilkei-Gonzo et al., 2005,2012; Albayram et al., 2011). A conferma di ciò, diversi studi hanno evidenziato cambiamenti strutturali dei componenti nel sistema endocannabinoide già durante l'adolescenza, sia nell'uomo (Long et al., 2012) che nei ratti (Lee et al., 2013). In linea con la letteratura, i risultati ottenuti mostrano chiaramente che il gruppo di topi non trattati lasciati ad invecchiare abbia una minore capacità cognitiva (PPI) rispetto al gruppo non trattato giovane, accompagnata da una memoria di lavoro compromessa (Novel Object) e una maggiore tendenza ad isolarsi e a non voler interagire con i loro simili (Partition). Molto meno però è riportato in letteratura circa i cambiamenti relativi i livelli degli endocannabinoidi durante l'invecchiamento. Difatti, contrariamente a quanto riportato in un lavoro di Piyanova e colleghi (2015), secondo cui topi invecchiati (12-15 mesi d'età) risultano avere un decremento di ~ 33.3% dei livelli di 2-AG ippocampali (nmol/g di tessuto) rispetto ai topi giovani (3 mesi d'età), nei risultati riportati in questo elaborato, i livelli plasmatici di 2-AG sembrano invece essere aumentati. Va tuttavia evidenziata anzitutto la differenza d'età dei topi utilizzati in questo studio di ricerca (6 mesi), la quale sembra essere un periodo caratterizzato da cambiamenti notevolmente indicativi d'invecchiamento nei topi. In uno studio in cui viene testata la capacità di memoria e di apprendimento dei topi in diversi periodi della loro vita (2, 4, 6, 9 e 12 mesi di età), i 6 mesi vengono riportati come avvio del graduale declino delle performance mnemoniche (Nidadavolu et al., 2022). Per cui, è plausibile che i risultati ottenuti in un gruppo di topi con età compresa tra i 12-15 mesi di vita, siano differenti rispetto al gruppo di topi di età pari ai 6 mesi. Per altro, studi precedenti su ratti hanno già rivelato che durante l'invecchiamento il rapporto tra le attività enzimatiche di sintesi e degradazione degli endocannabinoidi è basso (Pascual et al., 2013), e che lo stesso avviene nei topi cui è stato somministrato un SCB, anche a seguito dell'interruzione del suo utilizzo (Bilel et al., 2023). Nel complesso, i nostri risultati ci portano a concludere che questi enzimi svolgono un ruolo cruciale nella regolazione dei livelli di AEA e 2-AG durante l'invecchiamento.

In conclusione, i risultati preclinici rivelano che l'esposizione ripetuta a JWH-018 pur seguita da un periodo di sospensione a lungo termine della sostanza in questione (53 giorni), delinea un quadro sintomatico caratterizzato da un'evidente deficit sociale, cognitivo e mnemonico dei topi, attribuibile a vere e proprie variazioni nella regolare funzione del ECS. Difatti, è stato chiaramente evidenziato come la variazione della trasmissione cannabinoide endogena, sia fortemente correlata ai conseguenti sintomi di detrimento cerebrale (con particolare

riferimento all'invecchiamento dell'animale), inducendo alterazioni in vari domini cognitivi (memoria, funzione esecutiva e probabile velocità di elaborazione). Tale alterazioni, sono altresì correlabili a probabili variazioni nelle funzioni cerebrali strutturali (variata neuroplasticità) che potrebbero suggerire una maggiore propensione allo sviluppo di neuropatologie in utenti cronici e pesanti.

Studio clinico

Nonostante la mancata quantificazione dei livelli endocannabinoidi di AEA e 2-AG espressa in ng/mL nei campioni sierici clinici a disposizione per questo progetto di Dottorato, un'attenta valutazione delle aree sottostanti le curve (AUC), ha permesso di dimostrare un chiaro trend di aumento delle due molecole in questione. Anche in questo caso, la scelta del tipo di campione e la sensibilità dello strumento utilizzato, potrebbero aver influito sul risultato ottenuto. Ad ogni modo, il trend d'aumento registrato risulta essere differente a seconda della specifica neurodegenerazione presa in esame e comunque risulta in linea con i risultati ottenuti *in vivo*. Ciò, permette di ipotizzare che l'utilizzo di SCBs in età giovane adulta, possa contribuire a indurre cambiamenti strutturali e di neurotrasmissione tali, da rappresentare verosimilmente un fattore di rischio nella fisiopatologia della demenza.

In passato, è già stata certificata la presenza dei due principali endocannabinoidi nella circolazione periferica dell'uomo e la raccolta del siero, oltre ad essere il più semplice e meno invasivo metodo d'analisi clinica, ha già permesso di dimostrare che variazioni delle loro concentrazioni sono spesso correlate a differenti variabili emotive (Hill et al., 2008). Un'interessante studio di Fagundo e colleghi (2013), ha evidenziato un possibile dimorfismo tra uomo e donna circa differenze strutturali del ECS che possono rappresentare un'ulteriore fattore di variabilità in termini di trasmissione. Difatti, mentre l'uomo pare avere una maggiore densità recettoriale CB₁, nella donna è stato registrato una maggiore efficienza d'attività dello stesso recettore. Inoltre, in questo stesso studio, l'aumento dei livelli circolanti di 2-AG sembra essere correlato ad un'alterata flessibilità cognitiva e un'inibita capacità di risposta ad una serie di test eseguiti per la valutazione delle funzioni esecutive, sottolineando l'importanza della comprensione della disregolazione del ECS (anche e soprattutto in relazione ad abuso/dipendenza di sostanze e particolari condizioni cliniche quali depressione, obesità e disturbi alimentari), al fine di contribuire allo sviluppo di nuovi trattamenti e approcci farmacologici (Fagundo et al., 2013). Su questa stessa linea, in una recente review, Alcaraz-Silva e colleghi (2023), sulla base di un'attenta ricerca online, identificano e analizzano una serie di articoli (studi di base e clinici) pubblicati su PubMed inerenti il ruolo dei recettori dei cannabinoidi, di AEA, 2-AG, e degli enzimi associati alla

loro sintesi e degradazione, in relazione a patologie che coinvolgono la sfera dell'umore, quali depressione e ansia (Alcaraz-Silva et al., 2023). Tuttavia, in letteratura sono sorprendentemente pochi gli studi che valutano il ruolo del sistema circadiano e del sonno nell'endotrasmissione cannabinoide, considerando che entrambi i due sistemi giocano un ruolo fondamentale nel metabolismo, nell'alterazione dello stato dell'umore e nel comportamento dei mammiferi. Uno studio di Perron e colleghi (2001), ha evidenziato che l'interruzione dell'assunzione di THC comporta un'inversione del ritmo circadiano (Perron et al., 2001) ed altri studi, hanno dimostrato una variazione diurna nel recettore CB₁ e dei livelli di proteine, così come di AEA e 2-AG, nel cervello (Martinez-Vargas et al., 2013; Martinez-Vargas et al., 2003; Rueda-Orozco et al., 2008; Valenti et al., 2004) e nel fegato di ratto (Bazwinsky-Wutschke et al., 2017). Un recente studio di Hanlon (2020), ha esaminato il profilo di concentrazione giornaliero di AEA e 2-AG nel siero umano. In questo modo, è stato dimostrato che il 2-AG ha un livello monofasico giornaliero ma che le sue concentrazioni possono subire delle modificazioni in relazione ad alterazioni dello stato del sonno; al contrario, la concentrazione di AEA nell'arco nelle 24 ore è fluttuante e bifasica, registrando due picchi massimi (uno diurno e uno notturno) ed uno minimo, definito *nadir*, a metà mattinata (Hanlon, 2020). Ciò riflette inevitabilmente l'importanza del momento del prelievo in studi di correlazione dei livelli degli endocannabinoidi nella comprensione di qualsiasi patologia.

Conclusion

I risultati ottenuti mediante sperimentazione animale effettuata durante questi tre anni di Dottorato di Ricerca, mostrano chiaramente che il trattamento ripetuto con JWH-018 (6 mg/Kg; i.p.) per sette giorni consecutivi, provoca già a breve termine delle notevoli alterazione delle risposte comportamentali, del gating sensoriale, un sospetto sviluppo di tolleranza, e un'alterazione del ECS, che poi a seguito di un periodo prolungato di wash-out, peggiorano fino a provocare un deterioramento cognitivo, un comportamento depressivo ed un'alterazione della capacità sociale nei topi, che sono potenzialmente correlabili ai sintomi comportamentali e psicologici tipicamente riconducibili alla MCI, condizione clinica che precede comunemente lo sviluppo di una DD specifica. Difatti, diversi studi hanno già evidenziato l'importanza clinica diagnostica della MCI, in quanto possibile marker predittivo di evoluzione patologica in una demenza neurodegenerativa specifica (Dickerson et al., 2007; Woolf et al., 2016; Jongsiriyanyong e Limpawattana, 2018). Dal punto di vista clinico invece, la valutazione del contenuto plasmatico di AEA e 2-AG ha permesso di individuare un aumento dei loro livelli in confronto al controllo che risulta essere diverso a seconda della differente forma di demenza senile esaminata. Pertanto, correlando quanto ottenuto sia nel clinico che nel preclinico, traslazionalmente il presente studio di Dottorato dimostra come l'utilizzo di un cannabinoide sintetico in giovani adulti, anche per un breve e circoscritto periodo nell'arco della vita, possa verosimilmente rappresentare una potenziale minaccia per l'uomo nell'invecchiamento normale -inteso come rallentamento psicomotorio, diminuzione della massa muscolare, diminuzione dell'acuità visiva e uditiva, rallentamento nella capacità d'attenzione e ad apprendere nuove informazioni, nella fluenza verbale e nel tempo di reazione- tale da essere probabilmente concausa nella fisiopatologia della demenza senile stessa.

In conclusione, sebbene negli ultimi anni si siano raggiunti notevoli progressi scientifici circa la rilevanza funzionale dell'uso dei cannabinoidi come terapia palliativa/curativa di determinate malattie, una serie di questioni rimangono ancora in sospeso (Tudorancea et al., 2022). Da qui, l'utilità di implementare gli studi preclinici come incoraggiamento ad un migliore approccio traslazionale agli studi, al fine di avvalorare o meno il potenziale terapeutico di questa classe di molecole, ponendo particolare attenzione agli effetti avversi e di tolleranza che potrebbero manifestarsi al loro utilizzo in cronico.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

2022 Alzheimer's disease facts and figures. (2022). *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 18(4), 700–789. <https://doi.org/10.1002/alz.12638>

Abdullaev, Y., Posner, M. I., Nunnally, R., & Dishion, T. J. (2010). Functional MRI evidence for inefficient attentional control in adolescent chronic cannabis abuse. *Behavioural brain research*, 215(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.023>

Abrams, D. I., Hilton, J. F., Leiser, R. J., Shade, S. B., Elbeik, T. A., Aweeka, F. T., Benowitz, N. L., Bredt, B. M., Kosel, B., Aberg, J. A., Deeks, S. G., Mitchell, T. F., Mulligan, K., Bacchetti, P., McCune, J. M., & Schambelan, M. (2003). Short-term effects of cannabinoids in patients with HIV-1 infection: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Annals of internal medicine*, 139(4), 258–266. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-139-4-200308190-00008>

Abuhasira, R., Shbiro, L., & Landschaft, Y. (2018). Medical use of cannabis and cannabinoids containing products - Regulations in Europe and North America. *European journal of internal medicine*, 49, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.01.001>

Acquaro Junior, V. R., Gómez-Ríos, G. A., Tascon, M., Costa Queiroz, M. E., & Pawliszyn, J. (2019). Analysis of endocannabinoids in plasma samples by biocompatible solid-phase microextraction devices coupled to mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 1091, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.002>

Acuna Goycolea C. (2021). The Effect of Cannabinoids on the Brain's Circadian Clock. *Advances in experimental medicine and biology*, 1297, 143–146. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61663-2_10

Agrawal, M. Chapter 26—Molecular basis of chronic neurodegeneration. In *Clinical Molecular Medicine*; Kumar, D., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 447–460.

Ahmed, S. A., Ross, S. A., Slade, D., Radwan, M. M., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2015). Minor oxygenated cannabinoids from high potency Cannabis sativa L. *Phytochemistry*, 117, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.04.007>

Akirav I. (2011). The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 34. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00034>

Albayram, O., Alferink, J., Pitsch, J., Piyanova, A., Neitzert, K., Poppensieker, K., Mauer, D., Michel, K., Legler, A., Becker, A., Monory, K., Lutz, B., Zimmer, A., & Bilkei-Gorzo, A. (2011). Role of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27), 11256–11261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016442108>

Alcaraz-Silva J, Feingold D, Viana-Torre G, Budde H, Imperatori C, Machado S, Murillo-Rodríguez E. The Endocannabinoid System as a Biomarker for Diagnostic and Therapeutic Applications in Depression and Anxiety. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2023;22(3):417-430. doi: 10.2174/1871527321666220405114402. PMID: 35382720.

- Alves, V. L., Gonçalves, J. L., Aguiar, J., Teixeira, H. M., & Câmara, J. S. (2020). The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties. A review. *Critical reviews in toxicology*, 50(5), 359–382. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1762539>
- Ameri A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in neurobiology*, 58(4), 315–348. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00087-2](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00087-2)
- American Psychiatric Association, DSM-5 Task Force. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™ (5th ed.)*. American Psychiatric Publishing, Inc.. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Amin, M. R., & Ali, D. W. (2019). Pharmacology of Medical Cannabis. *Advances in experimental medicine and biology*, 1162, 151–165. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_8
- Ancidoni A, Lacorte E, Bacigalupo I, Lombardo F, Vanacore N. Italy's actions on dementia. *Lancet Neurol*. 2023 Feb;22(2):111. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00521-X. PMID: 36681442.
- APA, 1997. "Practice guideline for the treatment of patients with Alzheimer's disease and other dementias of late life. American Psychiatric Association." *The American journal of psychiatry* vol. 154,5 Suppl (1997): 1-39. doi:10.1176/ajp.154.5.1
- Arfè, R., Bilel, S., Tirri, M., Frisoni, P., Serpelloni, G., Neri, M., Boccuto, F., Bernardi, T., Foti, F., De-Giorgio, F., & Marti, M. (2021). Comparison of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and the "date rape" drug GHB: behavioral toxicology in the mouse model. *Psychopharmacology*, 238(8), 2275–2295. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05852-5>
- Arzimanoglou, A., Brandl, U., Cross, J. H., Gil-Nagel, A., Lagae, L., Landmark, C. J., Specchio, N., Nabbout, R., Thiele, E. A., Gubbay, O., The Cannabinoids International Experts Panel, & Collaborators (2020). Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1684/epd.2020.1141>
- Atwood, B. K., Huffman, J., Straiker, A., & Mackie, K. (2010). JWH018, a common constituent of 'Spice' herbal blends, is a potent and efficacious cannabinoid CB receptor agonist. *British journal of pharmacology*, 160(3), 585–593. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00582.x>
- Bang J, Spina S, Miller BL. Frontotemporal dementia. *Lancet*. 2015 Oct 24;386(10004):1672-82. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00461-4. PMID: 26595641; PMCID: PMC5970949.
- Banister, S. D., Stuart, J., Kevin, R. C., Edington, A., Longworth, M., Wilkinson, S. M., Beinat, C., Buchanan, A. S., Hibbs, D. E., Glass, M., Connor, M., McGregor, I. S., & Kassiou, M. (2015). Effects of bioisosteric fluorine in synthetic cannabinoid designer drugs JWH-018, AM-2201, UR-144, XLR-11, PB-22, 5F-PB-22, APICA, and STS-135. *ACS chemical neuroscience*, 6(8), 1445–1458. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.5b00107>
- Barbieri, M., Ossato, A., Canazza, I., Trapella, C., Borelli, A. C., Beggiato, S., Rimondo, C., Serpelloni, G., Ferraro, L., & Marti, M. (2016). Synthetic cannabinoid JWH-018 and its

halogenated derivatives JWH-018-Cl and JWH-018-Br impair Novel Object Recognition in mice: Behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology*, 109, 254–269. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.027>

Barbieri, M., Tirri, M., Bilel, S., Arfè, R., Corli, G., Marchetti, B., Caruso, L., Soukupova, M., Cristofori, V., Serpelloni, G., & Marti, M. (2022). Synthetic cannabinoid JWH-073 alters both acute behavior and in vivo/vitro electrophysiological responses in mice. *Frontiers in psychiatry*, 13, 953909. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.953909>

Baruch N, Burgess J, Pillai M, Allan CL. Treatment for depression comorbid with dementia. *Evid Based Ment Health*. 2019 Nov;22(4):167-171. doi: 10.1136/ebmental-2019-300113. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31558560.

Basavarajappa BS, Shivakumar M, Joshi V, Subbanna S. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *J Neurochem*. 2017 Sep;142(5):624-648. doi: 10.1111/jnc.14098. Epub 2017 Jul 5. PMID: 28608560; PMCID: PMC5669051.

Bass CE, Martin BR (2000) Time course for the induction and maintenance of tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Drug Alcohol Depend* 60:113–119. [https://doi.org/10.1016/S0376-8716\(99\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0376-8716(99)00150-7)

Baumann, M. H., Solis, E., Jr, Watterson, L. R., Marusich, J. A., Fantegrossi, W. E., & Wiley, J. L. (2014). Baths salts, spice, and related designer drugs: the science behind the headlines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(46), 15150–15158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3223-14.2014>

Bazwinsky-Wutschke I, Zipprich A, Dehghani F. Daytime-Dependent Changes of Cannabinoid Receptor Type 1 and Type 2 Expression in Rat Liver. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 24;18(9):1844. doi: 10.3390/ijms18091844. PMID: 28837063; PMCID: PMC5618493.

Becker, B., Wagner, D., Gouzoulis-Mayfrank, E., Spuentrup, E., & Daumann, J. (2010). The impact of early-onset cannabis use on functional brain correlates of working memory. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 34(6), 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.03.032>

Behan, B., Connolly, C. G., Datwani, S., Doucet, M., Ivanovic, J., Morioka, R., Stone, A., Watts, R., Smyth, B., & Garavan, H. (2014). Response inhibition and elevated parietal-cerebellar correlations in chronic adolescent cannabis users. *Neuropharmacology*, 84, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.027>

Benito C, Núñez E, Pazos MR, Tolón RM, Romero J. The endocannabinoid system and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2007 Aug;36(1):75-81. doi: 10.1007/s12035-007-8006-8. Epub 2007 Sep 5. PMID: 17952652.

Benito, C., Núñez, E., Tolón, R. M., Carrier, E. J., Rábano, A., Hillard, C. J., & Romero, J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(35), 11136–11141. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-35-11136.2003>

Bennett S, Thomas AJ. Depression and dementia: cause, consequence or coincidence? *Maturitas*. 2014 Oct;79(2):184-90. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.05.009. Epub 2014 May 29. PMID: 24931304.

Bezard, E., & Dehay, B. (2022). Maladie de Parkinson - Le rôle de la synucléine [Aggregation and spread of synuclein in Parkinson's disease]. *Medecine sciences : M/S*, 38(1), 45–51. <https://doi.org/10.1051/medsci/2021241>

Bilel, S., Tirri, M., Arfè, R., Ossato, A., Trapella, C., Serpelloni, G., Neri, M., Fattore, L., & Marti, M. (2020). Novel halogenated synthetic cannabinoids impair sensorimotor functions in mice. *Neurotoxicology*, 76, 17–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.10.002>

Bilel, S., Zamberletti, E., Caffino, L., Tirri, M., Mottarlini, F., Arfè, R., Barbieri, M., Beggiato, S., Boccuto, F., Bernardi, T., Casati, S., Brini, A. T., Parolaro, D., Rubino, T., Ferraro, L., Fumagalli, F., & Marti, M. (2023). Cognitive dysfunction and impaired neuroplasticity following repeated exposure to the synthetic cannabinoid JWH-018 in male mice. *British journal of pharmacology*, 10.1111/bph.16164. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/bph.16164>

Bilkei-Gorzo, A., Drews, E., Albayram, Ö., Piyanova, A., Gaffal, E., Tueting, T., Michel, K., Mauer, D., Maier, W., & Zimmer, A. (2012). Early onset of aging-like changes is restricted to cognitive abilities and skin structure in *Cnr1*^{-/-} mice. *Neurobiology of aging*, 33(1), 200.e11–200.e2.0E22. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.07.009>

Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Valverde, O., Otto, M., Michel, K., Sastre, M., & Zimmer, A. (2005). Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15670–15675. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504640102>

Bisogno T. (2008). Endogenous cannabinoids: structure and metabolism. *Journal of neuroendocrinology*, 20 Suppl 1, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01676.x>

Black, M. D., Stevens, R. J., Rogacki, N., Featherstone, R. E., Senyah, Y., Giardino, O., Borowsky, B., Stemmelin, J., Cohen, C., Pichat, P., Arad, M., Barak, S., De Levie, A., Weiner, I., Griebel, G., & Varty, G. B. (2011). AVE1625, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, as a co-treatment with antipsychotics for schizophrenia: improvement in cognitive function and reduction of antipsychotic-side effects in rodents. *Psychopharmacology*, 215(1), 149–163. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2124-0>

Blamire AM. MR approaches in neurodegenerative disorders. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2018 Oct;108:1-16. doi: 10.1016/j.pnmrs.2018.11.001. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30538047.

Bogaty, S. E. R., Lee, R. S. C., Hickie, I. B., & Hermens, D. F. (2018). Meta-analysis of neurocognition in young psychosis patients with current cannabis use. *Journal of psychiatric research*, 99, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.01.010>

Bonhaus, D. W., Chang, L. K., Kwan, J., & Martin, G. R. (1998). Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 287(3), 884–888.

- Bonz, A., Laser, M., Küllmer, S., Kniesch, S., Babin-Ebell, J., Popp, V., Ertl, G., & Wagner, J. A. (2003). Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 41(4), 657–664. <https://doi.org/10.1097/00005344-200304000-00020>
- Brewer, T. L., & Collins, M. (2014). A review of clinical manifestations in adolescent and young adults after use of synthetic cannabinoids. *Journal for specialists in pediatric nursing : JSPN*, 19(2), 119–126. <https://doi.org/10.1111/jspn.12057>
- Brown A. J. (2007). Novel cannabinoid receptors. *British journal of pharmacology*, 152(5), 567–575. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707481>
- Brown, S. M., Wager-Miller, J., & Mackie, K. (2002). Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochimica et biophysica acta*, 1576(3), 255–264. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(02\)00341-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00341-x)
- Broyd, S. J., van Hell, H. H., Beale, C., Yücel, M., & Solowij, N. (2016). Acute and Chronic Effects of Cannabinoids on Human Cognition-A Systematic Review. *Biological psychiatry*, 79(7), 557–567. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.12.002>
- Brunetti, P., Pichini, S., Pacifici, R., Busardò, F. P., & Del Rio, A. (2020). Herbal Preparations of Medical Cannabis: A Vademecum for Prescribing Doctors. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(5), 237. <https://doi.org/10.3390/medicina56050237>
- Bruno G, Mancini M, Bruti G, Dell'Agnello G, Reed C. Costs and Resource Use Associated with Alzheimer's Disease in Italy: Results from an Observational Study. *J Prev Alzheimers Dis*. 2018;5(1):55-64. doi: 10.14283/jpad.2017.31. PMID: 29405234.
- Bruti G, Cavallucci E, Mancini M, Bitossi A, Baldereschi M, Sorbi S. A systematic review of the quality of studies on dementia prevalence in Italy. *BMC Health Serv Res*. 2016 Oct 26;16(1):615. doi: 10.1186/s12913-016-1871-y. PMID: 27784338; PMCID: PMC5081842.
- Bukke VN, Archana M, Villani R, Serviddio G, Cassano T. Pharmacological and Toxicological Effects of Phytocannabinoids and Recreational Synthetic Cannabinoids: Increasing Risk of Public Health. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Sep 24;14(10):965. doi: 10.3390/ph14100965. PMID: 34681189; PMCID: PMC8541640.
- Burggren, A. C., Siddarth, P., Mahmood, Z., London, E. D., Harrison, T. M., Merrill, D. A., Small, G. W., & Bookheimer, S. Y. (2018). Subregional Hippocampal Thickness Abnormalities in Older Adults with a History of Heavy Cannabis Use. *Cannabis and cannabinoid research*, 3(1), 242–251. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0035>
- Cacioppo JT, Cacioppo S. Older adults reporting social isolation or loneliness show poorer cognitive function 4 years later. *Evid Based Nurs*. 2014 Apr;17(2):59-60. doi: 10.1136/eb-2013-101379. Epub 2013 Jun 8. PMID: 23749730.
- Caffino L, Piva A, Giannotti G, Di Chio M, Mottarlini F, Venniro M, Yew DT, Chiamulera C, Fumagalli F. Ketamine Self-Administration Reduces the Homeostasis of the Glutamate Synapse in the Rat Brain. *Mol Neurobiol*. 2017 Nov;54(9):7186-7193. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0231-6>.

- Campbell, V. A., & Gowran, A. (2007). Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids?. *British journal of pharmacology*, 152(5), 655–662. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707446>
- Canazza, I., Ossato, A., Trapella, C., Fantinati, A., De Luca, M. A., Margiani, G., Vincenzi, F., Rimondo, C., Di Rosa, F., Gregori, A., Varani, K., Borea, P. A., Serpelloni, G., & Marti, M. (2016). Effect of the novel synthetic cannabinoids AKB48 and 5F-AKB48 on "tetrad", sensorimotor, neurological and neurochemical responses in mice. *In vitro and in vivo pharmacological studies. Psychopharmacology*, 233(21-22), 3685–3709. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4402-y>
- Casati S, Giannasi C, Minoli M, Niada S, Ravelli A, Angeli I, Mergenthaler V, Ottria R, Ciuffreda P, Orioli M, Brini AT. Quantitative Lipidomic Analysis of Osteosarcoma Cell-Derived Products by UHPLC-MS/MS. *Biomolecules*. 2020; 10(9):1302. <https://doi.org/10.3390/biom10091302>
- Celofiga, A., Koprivsek, J., & Klavz, J. (2014). Use of synthetic cannabinoids in patients with psychotic disorders: case series. *Journal of dual diagnosis*, 10(3), 168–173. <https://doi.org/10.1080/15504263.2014.929364>
- Chen, X. P., Yang, W., Fan, Y., Luo, J. S., Hong, K., Wang, Z., Yan, J. F., Chen, X., Lu, J. X., Benovic, J. L., & Zhou, N. M. (2010). Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to G(s) and G(i). *British journal of pharmacology*, 161(8), 1817–1834. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01006.x>
- Chu, L., Li, N., Deng, J., Wu, Y., Yang, H., Wang, W., Zhou, D., & Deng, H. (2020). LC-APCI+-MS/MS method for the analysis of ten hormones and two endocannabinoids in plasma and hair from the mice with different gut microbiota. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 185, 113223. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113223>
- Cipriani G, Dolciotti C, Picchi L, Bonuccelli U. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci*. 2011 Apr;32(2):275-9. doi: 10.1007/s10072-010-0454-7. Epub 2010 Dec 11. PMID: 21153601.
- Clarfield AM. Dr. Ignatz Nascher and the birth of geriatrics. *CMAJ*. 1990 Nov 1;143(9):944-5, 948. PMID: 2224727; PMCID: PMC1452466.
- Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McLaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of disease*, 28(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.013>
- Coccaro, E. F., Hill, M. N., Robinson, L., & Lee, R. J. (2018). Circulating endocannabinoids and affect regulation in human subjects. *Psychoneuroendocrinology*, 92, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.03.009>
- Cohen AB. Nascher's Geriatrics at 100. *J Am Geriatr Soc*. 2014 Dec;62(12):2428-9. doi: 10.1111/jgs.13155. PMID: 25516038; PMCID: PMC4270078.
- Connors, M. H., Quinto, L., McKeith, I., Brodaty, H., Allan, L., Bamford, C., Thomas, A., Taylor, J. P., & O'Brien, J. T. (2018). Non-pharmacological interventions for Lewy body

- dementia: a systematic review. *Psychological medicine*, 48(11), 1749–1758. <https://doi.org/10.1017/S0033291717003257>
- Consroe, P., Musty, R., Rein, J., Tillery, W., & Pertwee, R. (1997). The perceived effects of smoked cannabis on patients with multiple sclerosis. *European neurology*, 38(1), 44–48. <https://doi.org/10.1159/000112901>
- Cooper, Z. D., & Haney, M. (2009). Actions of delta-9-tetrahydrocannabinol in cannabis: relation to use, abuse, dependence. *International review of psychiatry (Abingdon, England)*, 21(2), 104–112. <https://doi.org/10.1080/09540260902782752>
- Cooray, R., Gupta, V., & Suphioglu, C. (2020). Current Aspects of the Endocannabinoid System and Targeted THC and CBD Phytocannabinoids as Potential Therapeutics for Parkinson's and Alzheimer's Diseases: a Review. *Molecular neurobiology*, 57(11), 4878–4890. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02054-6>
- Corli G., Tirri M., Arfè R., Bilel S., Marchetti B., Gregori A., Di Rosa F., Vincenzi F., De-Giorgio F., Borea P.A., et al. Behavioral and binding studies on the quinolinyl ester indoles 5F-PB22 (5F-QUPIC) and BB-22 (QUCHIC) in the mouse model. *Emerg. Trends Drugs Addict. Health*. 2022;2:100039. doi: 10.1016/j.etched.2022.100039.
- Corli, G., Tirri, M., Bilel, S., Giorgetti, A., Bernardi, T., Boccuto, F., Borsari, M., Giorgetti, R., & Marti, M. (2023). Ethanol enhances JWH-018-induced impairment of sensorimotor and memory functions in mice: From preclinical evidence to forensic implication in Driving Under the Influence of Drugs. *Drug and alcohol dependence*, 247, 109888. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2023.109888>
- Correa, F., Mestre, L., Molina-Holgado, E., Arévalo-Martín, A., Docagne, F., Romero, E., Molina-Holgado, F., Borrell, J., & Guaza, C. (2005). The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 5(7), 671–675. <https://doi.org/10.2174/1389557054368790>
- Cosker, E., Schwitzer, T., Ramoz, N., Ligier, F., Lalanne, L., Gorwood, P., Schwan, R., & Laprévotte, V. (2018). The effect of interactions between genetics and cannabis use on neurocognition. A review. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 82, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.11.024>
- Cousijn, J., Wiers, R. W., Ridderinkhof, K. R., van den Brink, W., Veltman, D. J., Porrino, L. J., & Goudriaan, A. E. (2013). Individual differences in decision making and reward processing predict changes in cannabis use: a prospective functional magnetic resonance imaging study. *Addiction biology*, 18(6), 1013–1023. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2012.00498.x>
- Crane, N. A., Schuster, R. M., & Gonzalez, R. (2013). Preliminary evidence for a sex-specific relationship between amount of cannabis use and neurocognitive performance in young adult cannabis users. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS*, 19(9), 1009–1015. <https://doi.org/10.1017/S135561771300088X>
- Crocq M. A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system^[SEP]. *Dialogues in clinical neuroscience*, 22(3), 223–228. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocq>

Cummings J, Aisen PS, DuBois B, Frölich L, Jack CR Jr, Jones RW, Morris JC, Raskin J, Dowsett SA, Scheltens P. Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025. *Alzheimers Res Ther.* 2016 Sep 20;8:39. doi: 10.1186/s13195-016-0207-9. PMID: 27646601; PMCID: PMC5028936.

Daut, R. A., & Fonken, L. K. (2019). Circadian regulation of depression: A role for serotonin. *Frontiers in neuroendocrinology*, 54, 100746. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.04.003>

de Lago, E., Petrosino, S., Valenti, M., Morera, E., Ortega-Gutierrez, S., Fernandez-Ruiz, J., & Di Marzo, V. (2005). Effect of repeated systemic administration of selective inhibitors of endocannabinoid inactivation on rat brain endocannabinoid levels. *Biochemical pharmacology*, 70(3), 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.05.011>

De Luca, M. A., Bimpisidis, Z., Melis, M., Marti, M., Caboni, P., Valentini, V., Margiani, G., Pintori, N., Polis, I., Marsicano, G., Parsons, L. H., & Di Chiara, G. (2015). Stimulation of in vivo dopamine transmission and intravenous self-administration in rats and mice by JWH-018, a Spice cannabinoid. *Neuropharmacology*, 99, 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.08.041>

De Luca, M. A., Castelli, M. P., Loi, B., Porcu, A., Martorelli, M., Miliano, C., Kellett, K., Davidson, C., Stair, J. L., Schifano, F., & Di Chiara, G. (2016). Native CB1 receptor affinity, intrinsic activity and accumbens shell dopamine stimulant properties of third generation SPICE/K2 cannabinoids: BB-22, 5F-PB-22, 5F-AKB-48 and STS-135. *Neuropharmacology*, 105, 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.017>

Deadwyler SA, Heyser CJ, Hampson RE. Complete adaptation to the memory disruptive effects of D9-tetrahydrocannabinol following 35 days of exposure. *Neurosci Res Commun* 1995;17:9 – 18

Di Luca, N. M., Busardò, F. P., Pirani, F., & Vari, M. R. (2020). Evolution of Italian laws banning trafficking, use and abuse of psychotropic drugs. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 56(1), 76–89. https://doi.org/10.4415/ANN_20_01_12

Di Marzo V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(5), 438–455. <https://doi.org/10.1038/nrd2553>

Di Marzo, V., Berrendero, F., Bisogno, T., González, S., Cavaliere, P., Romero, J., Cebeira, M., Ramos, J. A., & Fernández-Ruiz, J. J. (2000). Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Journal of neurochemistry*, 74(4), 1627–1635. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741627.x>

Dickens, A. M., Borgan, F., Laurikainen, H., Lamichhane, S., Marques, T., Rönkkö, T., Veronese, M., Lindeman, T., Hyötyläinen, T., Howes, O., Hietala, J., & Orešič, M. (2020). Links between central CB1-receptor availability and peripheral endocannabinoids in patients with first episode psychosis. *NPJ schizophrenia*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.1038/s41537-020-00110-7>

Dickerson, B. C., Sperling, R. A., Hyman, B. T., Albert, M. S., & Blacker, D. (2007). Clinical prediction of Alzheimer disease dementia across the spectrum of mild cognitive

impairment. Archives of general psychiatry, 64(12), 1443–1450. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.12.1443>

Dickson, D. W., Fujishiro, H., DelleDonne, A., Menke, J., Ahmed, Z., Klos, K. J., Josephs, K. A., Frigerio, R., Burnett, M., Parisi, J. E., & Ahlskog, J. E. (2008). Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*, 115(4), 437–444. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0345-7>

Donahue, M.Z., National Geographic, 2019. Earliest Evidence for Cannabis Smoking. Discovered in Ancient Tombs. <https://www.nationalgeographic.com/culture/2019/06/earliest-evidence-cannabis-marijuana-smoking-china-tombs/#close>. (Last access: 03 May 2023)

Drews, E., Schneider, M., & Koch, M. (2005). Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 80(1), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.10.023>

D'Souza, D. C., Ranganathan, M., Braley, G., Gueorguieva, R., Zimolo, Z., Cooper, T., Perry, E., & Krystal, J. (2008). Blunted psychotomimetic and amnestic effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in frequent users of cannabis. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(10), 2505–2516. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301643>

Dutta, S., & Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life sciences*, 152, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>

Ebbert, J. O., Scharf, E. L., & Hurt, R. T. (2018). Medical Cannabis. *Mayo Clinic proceedings*, 93(12), 1842–1847. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.09.005>

Elder, G. J., Lazar, A. S., Alfonso-Miller, P., & Taylor, J. P. (2022). Sleep disturbances in Lewy body dementia: A systematic review. *International journal of geriatric psychiatry*, 37(10), 10.1002/gps.5814. <https://doi.org/10.1002/gps.5814>

Elmore, J. S., & Baumann, M. H. (2018). Repeated Exposure to the "Spice" Cannabinoid JWH-018 Induces Tolerance and Enhances Responsiveness to 5-HT_{1A} Receptor Stimulation in Male Rats. *Frontiers in psychiatry*, 9, 55. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00055>

Elsohly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life sciences*, 78(5), 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.011>

EMCDDA (2009) European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Understanding the 'Spice' Phenomenon, Publications Office of the European Union, Luxembourg (<https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/537/Spice-Thematic-paper-final-version.pdf>).

EMCDDA (2022) European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. European Drug Report 2022: Trends and Developments. Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2022.

EMCDDA. (2023) https://www.emcdda.europa.eu/news/2022/new-explorer-tool-offers-access-over-20-years-espad-data_en.

Ennaceur, A., Neave, N., & Aggleton, J. P. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Experimental brain research*, 113(3), 509–519. <https://doi.org/10.1007/pl00005603>

ESPAD The European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs. ESPAD report 2019. (<http://espad.org/espad-report-2019>).

European Medicine Agency Epidiolex. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/epidyolex>

Every-Palmer S. (2010). Warning: legal synthetic cannabinoid-receptor agonists such as JWH-018 may precipitate psychosis in vulnerable individuals. *Addiction (Abingdon, England)*, 105(10), 1859–1860. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03119.x>

Every-Palmer S. (2011). Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: an explorative study. *Drug and alcohol dependence*, 117(2-3), 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2011.01.012>

Fagundo, A. B., de la Torre, R., Jiménez-Murcia, S., Agüera, Z., Pastor, A., Casanueva, F. F., Granero, R., Baños, R., Botella, C., Del Pino-Gutierrez, A., Fernández-Real, J. M., Fernández-García, J. C., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Menchón, J. M., Moragrega, I., Rodríguez, R., Tárrega, S., Tinahones, F. J., & Fernández-Aranda, F. (2013). Modulation of the Endocannabinoids N-Arachidonylethanolamine (AEA) and 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) on Executive Functions in Humans. *PloS one*, 8(6), e66387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066387>

Fattore, L., & Fratta, W. (2011). Beyond THC: The New Generation of Cannabinoid Designer Drugs. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 60. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00060>

Feng, Z., Alqarni, M. H., Yang, P., Tong, Q., Chowdhury, A., Wang, L., & Xie, X. Q. (2014). Modeling, molecular dynamics simulation, and mutation validation for structure of cannabinoid receptor 2 based on known crystal structures of GPCRs. *Journal of chemical information and modeling*, 54(9), 2483–2499. <https://doi.org/10.1021/ci5002718>

Fitzpatrick, A.L., Kuller, L.H., Ives, D.G., Lopez, O.L., Jagust, W., Breitner, J.C.S., Jones, B., Lyketsos, C. and Dulberg, C. (2004), Incidence and Prevalence of Dementia in the Cardiovascular Health Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 52: 195-204. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2004.52058.x>

Funada, M., Takebayashi-Ohsawa, M., & Tomiyama, K. I. (2020). Synthetic cannabinoids enhanced ethanol-induced motor impairments through reduction of central glutamate neurotransmission. *Toxicology and applied pharmacology*, 408, 115283. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115283>

Gale, S. A., Acar, D., & Daffner, K. R. (2018). Dementia. *The American journal of medicine*, 131(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.01.022>

Ganguli, M., Fu, B., Snitz, B. E., Hughes, T. F., & Chang, C. C. (2013). Mild cognitive impairment: incidence and vascular risk factors in a population-based cohort. *Neurology*, 80(23), 2112–2120. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318295d776>

- Gaston, T. E., & Friedman, D. (2017). Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. *Epilepsy & behavior : E&B*, 70(Pt B), 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.016>
- Gerra G, Zaimovic A, Gerra ML, Ciccocioppo R, Cippitelli A, Serpelloni G, Somaini L. Pharmacology and toxicology of Cannabis derivatives and endocannabinoid agonists. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2010 Jan;5(1):46-52. doi: 10.2174/157488910789753521. PMID: 19832688.
- Gómez-Nieto, R., Horta-Júnior, J.deA., Castellano, O., Millian-Morell, L., Rubio, M. E., & López, D. E. (2014). Origin and function of short-latency inputs to the neural substrates underlying the acoustic startle reflex. *Frontiers in neuroscience*, 8, 216. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00216>
- Gonzalez R. Acute and non-acute effects of cannabis on brain functioning and neuropsychological performance. *Neuropsychol Rev*. 2007 Sep;17(3):347-61. doi: 10.1007/s11065-007-9036-8. PMID: 17680367.
- Gonzalez, R., Pacheco-Colón, I., Duperrouzel, J. C., & Hawes, S. W. (2017). Does Cannabis Use Cause Declines in Neuropsychological Functioning? A Review of Longitudinal Studies. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS*, 23(9-10), 893–902. <https://doi.org/10.1017/S1355617717000789>
- González, S., Cebeira, M., & Fernández-Ruiz, J. (2005). Cannabinoid tolerance and dependence: a review of studies in laboratory animals. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 81(2), 300–318. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.01.028>
- Gorno-Tempini, M. L., Hillis, A. E., Weintraub, S., Kertesz, A., Mendez, M., Cappa, S. F., Ogar, J. M., Rohrer, J. D., Black, S., Boeve, B. F., Manes, F., Dronkers, N. F., Vandenberghe, R., Rascovsky, K., Patterson, K., Miller, B. L., Knopman, D. S., Hodges, J. R., Mesulam, M. M., & Grossman, M. (2011). Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*, 76(11), 1006–1014. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821103e6>
- Gorzalka, B. B., Hill, M. N., & Hillard, C. J. (2008). Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 32(6), 1152–1160. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.004>
- Grimison, P., Mersiades, A., Kirby, A., Lintzeris, N., Morton, R., Haber, P., Olver, I., Walsh, A., McGregor, I., Cheung, Y., Tognela, A., Hahn, C., Briscoe, K., Aghmesheh, M., Fox, P., Abdi, E., Clarke, S., Della-Fiorentina, S., Shannon, J., Gedye, C., ... Stockler, M. (2020). Oral THC:CBD cannabis extract for refractory chemotherapy-induced nausea and vomiting: a randomised, placebo-controlled, phase II crossover trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 31(11), 1553–1560. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.020>
- Grøntvedt, G. R., Schröder, T. N., Sando, S. B., White, L., Bråthen, G., & Doeller, C. F. (2018). Alzheimer's disease. *Current biology: CB*, 28(11), R645–R649. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.080>

- Hachinski, V. C., Lassen, N. A., & Marshall, J. (1974). Multi-infarct dementia. A cause of mental deterioration in the elderly. *Lancet* (London, England), 2(7874), 207–210. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)91496-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)91496-2)
- Hainer, C., Mosienko, V., Koutsikou, S., Crook, J. J., Gloss, B., Kasparov, S., Lumb, B. M., & Alenina, N. (2015). Beyond Gene Inactivation: Evolution of Tools for Analysis of Serotonergic Circuitry. *ACS chemical neuroscience*, 6(7), 1116–1129. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.5b00045>
- Hale, M. W., Shekhar, A., & Lowry, C. A. (2012). Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cellular and molecular neurobiology*, 32(5), 695–708. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9827-1>
- Hall CB, Verghese J, Sliwinski M, Chen Z, Katz M, Derby C, Lipton RB. Dementia incidence may increase more slowly after age 90: results from the Bronx Aging Study. *Neurology*. 2005 Sep 27;65(6):882-6. doi: 10.1212/01.wnl.0000176053.98907.3f. PMID: 16186528.
- Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C., & Freund, T. F. (2002). The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *The European journal of neuroscience*, 16(7), 1395–1398. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02192.x>
- Halpert BP. Development of the term "senility" as a medical diagnosis. *Minn Med*. 1983 Jul;66(7):421-4. PMID: 6353191.
- Harkany, T., Hortobágyi, T., Sasvári, M., Kónya, C., Penke, B., Luiten, P. G., & Nyakas, C. (1999). Neuroprotective approaches in experimental models of beta-amyloid neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 23(6), 963–1008. [https://doi.org/10.1016/s0278-5846\(99\)00058-5](https://doi.org/10.1016/s0278-5846(99)00058-5)
- Hemelt, M. E., & Keller, A. (2008). Superior colliculus control of vibrissa movements. *Journal of neurophysiology*, 100(3), 1245–1254. <https://doi.org/10.1152/jn.90478.2008>
- Henderson C, Rehill A, Brooker D, Evans SC, Evans SB, Bray J, Saibene FL, Scorolli C, Szcześniak D, d'Arma A, Lion K, Atkinson T, Farina E, Rymaszewska J, Chattat R, Meiland F, Dröes RM, Knapp M. Costs and cost-effectiveness of the meeting centres support programme for people living with dementia and carers in Italy, Poland and the UK: The MEETINGDEM study. *Health Soc Care Community*. 2021 Nov;29(6):1756-1768. doi: 10.1111/hsc.13281. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33506538.
- Herman, T. S., Einhorn, L. H., Jones, S. E., Nagy, C., Chester, A. B., Dean, J. C., Furnas, B., Williams, S. D., Leigh, S. A., Dorr, R. T., & Moon, T. E. (1979). Superiority of nabilone over prochlorperazine as an antiemetic in patients receiving cancer chemotherapy. *The New England journal of medicine*, 300(23), 1295–1297. <https://doi.org/10.1056/NEJM197906073002302>
- Hermann, H., Marsicano, G., & Lutz, B. (2002). Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience*, 109(3), 451–460. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00509-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00509-7)

Herranz-Herrer, J., Gil-Benito, E., Ponte-López, T., Ortega-Gutiérrez, S., Macicior, J., Rosado-Garcia, S., Sánchez-López, A. J., & Blasco-Fontecilla, H. (2020). Serum endocannabinoid levels in suicide attempters: A pilot study. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 40, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.09.005>

Hill, M. N., Miller, G. E., Carrier, E. J., Gorzalka, B. B., & Hillard, C. J. (2009). Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1257–1262. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.03.013>

Hill, M. N., Miller, G. E., Ho, W. S., Gorzalka, B. B., & Hillard, C. J. (2008). Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry*, 41(2), 48–53. <https://doi.org/10.1055/s-2007-993211>

Hillard CJ. Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? *Neuropsychopharmacology*. 2018 Jan;43(1):155-172. doi: 10.1038/npp.2017.130. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28653665; PMCID: PMC5719092.

Hofman A, Rocca WA, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Cooper B, Copeland JR, Dartigues JF, da Silva Droux A, Hagnell O, et al. The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group. *Int J Epidemiol*. 1991 Sep;20(3):736-48. doi: 10.1093/ije/20.3.736. PMID: 1955260.

Holwerda TJ, Deeg DJ, Beekman AT, van Tilburg TG, Stek ML, Jonker C, Schoevers RA. Feelings of loneliness, but not social isolation, predict dementia onset: results from the Amsterdam Study of the Elderly (AMSTEL). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Feb;85(2):135-42. doi: 10.1136/jnnp-2012-302755. Epub 2012 Dec 10. PMID: 23232034.

Howlett A. C. (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68-69, 619–631. [https://doi.org/10.1016/s0090-6980\(02\)00060-6](https://doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00060-6)

Howlett A. C. (2005). Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of experimental pharmacology*, (168), 53–79. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_2

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, 54(2), 161–202. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>

Hrelia, P., Sita, G., Ziche, M., Ristori, E., Marino, A., Cordaro, M., Molteni, R., Spero, V., Malaguti, M., Morroni, F., & Hrelia, S. (2020). Common Protective Strategies in Neurodegenerative Disease: Focusing on Risk Factors to Target the Cellular Redox System. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 8363245. <https://doi.org/10.1155/2020/8363245>

http://dati.istat.it/Index.aspx?DataSetCode=DCIS_INDDEMOG1

https://cordis.europa.eu/project/id/MR4*0056

<https://www.epicentro.iss.it/ben/2005/febbraio/1>

<https://www.epicentro.iss.it/demenza/osservatorio-demenze-2015>

https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/E-7-2012-004842_IT.html

Huestegge, L., Radach, R., & Kunert, H. J. (2009). Long-term effects of cannabis on oculomotor function in humans. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 23(6), 714–722. <https://doi.org/10.1177/0269881108091601>

Hulette, C., Nochlin, D., McKeel, D., Morris, J. C., Mirra, S. S., Sumi, S. M., & Heyman, A. (1997). Clinical-neuropathologic findings in multi-infarct dementia: a report of six autopsied cases. *Neurology*, 48(3), 668–672. <https://doi.org/10.1212/wnl.48.3.668>

Hutcheon, A. W., Palmer, J. B., Soukop, M., Cunningham, D., McArdle, C., Welsh, J., Stuart, F., Sangster, G., Kaye, S., & Charlton, D. (1983). A randomised multicentre single blind comparison of a cannabinoid anti-emetic (levonantradol) with chlorpromazine in patients receiving their first cytotoxic chemotherapy. *European journal of cancer & clinical oncology*, 19(8), 1087–1090. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(83\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0277-5379(83)90032-9)

Iadecola C. (2010). The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta neuropathologica*, 120(3), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0718-6>

Iadecola C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*, 80(4), 844–866. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.008>

Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AV, Bazelot M, Dallas M, Whalley BJ. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*. 2015 Oct;12(4):699-730. doi: 10.1007/s13311-015-0377-3. PMID: 26264914; PMCID: PMC4604182.

Inouye SK, Studenski S, Tinetti ME, Kuchel GA. Geriatric syndromes: clinical, research, and policy implications of a core geriatric concept. *J Am Geriatr Soc*. 2007 May;55(5):780-91. doi: 10.1111/j.1532-5415.2007.01156.x. PMID: 17493201; PMCID: PMC2409147.

Ippoliti I, Ancidoni A, Da Cas R, Pierantozzi A, Vanacore N, Trotta F. Anti-dementia drugs: a descriptive study of the prescription pattern in Italy. *Neurol Sci*. 2023 May;44(5):1587-1595. doi: 10.1007/s10072-022-06586-8. Epub 2023 Jan 3. PMID: 36595207; PMCID: PMC9807981.

Isaev NK, Stelmashook EV, Genrikhs EE. Neurogenesis and brain aging. *Rev Neurosci*. 2019 Jul 26;30(6):573-580. doi: 10.1515/revneuro-2018-0084. PMID: 30763272.

Ishac, E. J., Jiang, L., Lake, K. D., Varga, K., Abood, M. E., & Kunos, G. (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *British journal of pharmacology*, 118(8), 2023–2028. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15639.x>

Jager, G., Block, R. I., Luijten, M., & Ramsey, N. F. (2010). Cannabis use and memory brain function in adolescent boys: a cross-sectional multicenter functional magnetic resonance imaging study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 49(6), 561–572.e5723. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2010.02.001>

Jatoi, A., Windschitl, H. E., Loprinzi, C. L., Sloan, J. A., Dakhil, S. R., Mailliard, J. A., Pundaleeka, S., Kardinal, C. G., Fitch, T. R., Krook, J. E., Novotny, P. J., & Christensen, B. (2002). Dronabinol versus megestrol acetate versus combination therapy for cancer-associated anorexia: a North Central Cancer Treatment Group study. *Journal of clinical*

oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 20(2), 567–573. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.2.567>

Jongsiriyanyong, S., & Limpawattana, P. (2018). Mild Cognitive Impairment in Clinical Practice: A Review Article. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, 33(8), 500–507. <https://doi.org/10.1177/1533317518791401>

Jung, K. M., Astarita, G., Yasar, S., Vasilevko, V., Cribbs, D. H., Head, E., Cotman, C. W., & Piomelli, D. (2012). An amyloid β 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 33(8), 1522–1532. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.012>

Justin, B. N., Turek, M., & Hakim, A. M. (2013). Heart disease as a risk factor for dementia. *Clinical epidemiology*, 5, 135–145. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S30621>

Kaasbøll C; Hagen R; Gråwe RW Population-based associations among cannabis use, anxiety, and depression in Norwegian adolescents. *J. Child Adolesc. Subst. Abuse*, 2018, 27(4), 238–243. 10.1080/1067828X.2018.1462281

Kaczocha, M., & Haj-Dahmane, S. (2022). Mechanisms of endocannabinoid transport in the brain. *British journal of pharmacology*, 179(17), 4300–4310. <https://doi.org/10.1111/bph.15469>

Kalant H. Adverse effects of cannabis on health: an update of the literature since 1996. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004 Aug;28(5):849-63. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.05.027. PMID: 15363608.

Kanayama, G., Rogowska, J., Pope, H. G., Gruber, S. A., & Yurgelun-Todd, D. A. (2004). Spatial working memory in heavy cannabis users: a functional magnetic resonance imaging study. *Psychopharmacology*, 176(3-4), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1885-8>

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological reviews*, 89(1), 309–380. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008>

Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological psychiatry*, 77(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.05.006>

Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual review of neuroscience*, 35, 529–558. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150420>

Keenan B, Jenkins C, Ginesi L. Preventing and diagnosing dementia. *Nurs Times*. 2016 Jun 29-Jul 5;112(26):22-5. PMID: 27544960.

Kim YE, Jung YS, Ock M, Yoon SJ. A Review of the Types and Characteristics of Healthy Life Expectancy and Methodological Issues. *J Prev Med Public Health*. 2022;55(1):1-9. doi:10.3961/jpmph.21.580

Kim, D. J., Schnakenberg Martin, A. M., Shin, Y. W., Jo, H. J., Cheng, H., Newman, S. D., Sporns, O., Hetrick, W. P., Calkins, E., & O'Donnell, B. F. (2019). Aberrant structural-

- functional coupling in adult cannabis users. *Human brain mapping*, 40(1), 252–261. <https://doi.org/10.1002/hbm.24369>
- Kirkwood, J. S., Broeckling, C. D., Donahue, S., & Prenni, J. E. (2016). A novel microflow LC-MS method for the quantitation of endocannabinoids in serum. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1033-1034, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.035>
- Koch M. (1999). The neurobiology of startle. *Progress in neurobiology*, 59(2), 107–128. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00098-7](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00098-7)
- Koppel J, Bradshaw H, Goldberg TE, Khalili H, Marambaud P, Walker MJ, Pazos M, Gordon ML, Christen E, Davies P. Endocannabinoids in Alzheimer's disease and their impact on normative cognitive performance: a case-control and cohort study. *Lipids Health Dis*. 2009 Jan 14;8:2. doi: 10.1186/1476-511X-8-2. PMID: 19144193; PMCID: PMC2631501.
- Kosel, F., Pelley, J. M. S., & Franklin, T. B. (2020). Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 112, 634–647. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.02.012>
- Kudriavtseva N. N. (1987). Razlichiiia v reaktivnosti mysheĭ dvukh genotipov na zoosotsial'nye signaly v teste "peregorodka" [Differences in the reactivity of 2 mouse genotypes to zoo-social signals in the partition test]. *Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I P Pavlova*, 37(5), 929–934.
- Kudryavtseva N. N. (2003). Use of the "partition" test in behavioral and pharmacological experiments. *Neuroscience and behavioral physiology*, 33(5), 461–471. <https://doi.org/10.1023/a:1023411217051>
- Kumari, V., & Sharma, T. (2002). Effects of typical and atypical antipsychotics on prepulse inhibition in schizophrenia: a critical evaluation of current evidence and directions for future research. *Psychopharmacology*, 162(2), 97–101. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1099-x>
- Lambert, F. M., Bras, H., Cardoit, L., Vinay, L., Coulon, P., & Glover, J. C. (2016). Early postnatal maturation in vestibulospinal pathways involved in neck and forelimb motor control. *Developmental neurobiology*, 76(10), 1061–1077. <https://doi.org/10.1002/dneu.22375>
- Langa, K. M., & Levine, D. A. (2014). The diagnosis and management of mild cognitive impairment: a clinical review. *JAMA*, 312(23), 2551–2561. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.13806>
- Lapoint, J., James, L. P., Moran, C. L., Nelson, L. S., Hoffman, R. S., & Moran, J. H. (2011). Severe toxicity following synthetic cannabinoid ingestion. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 49(8), 760–764. <https://doi.org/10.3109/15563650.2011.609822>
- Lara E, Caballero FF, Rico-Urbe LA, Olaya B, Haro JM, Ayuso-Mateos JL, Miret M. Are loneliness and social isolation associated with cognitive decline? *Int J Geriatr Psychiatry*. 2019 Nov;34(11):1613-1622. doi: 10.1002/gps.5174. Epub 2019 Jul 25. PMID: 31304639.

- Lavi, E., Rekhtman, D., Berkun, Y., & Wexler, I. (2016). Sudden onset unexplained encephalopathy in infants: think of cannabis intoxication. *European journal of pediatrics*, 175(3), 417–420. <https://doi.org/10.1007/s00431-015-2639-9>
- Le Boisselier R, Alexandre J, Lelong-Boulouard V, Debruyne D (2017) Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clin Pharmacol Ther* 101(2):220–229. <https://doi.org/10.1002/cpt.563>
- Lee, T. T., Hill, M. N., Hillard, C. J., & Gorzalka, B. B. (2013). Temporal changes in N-acylethanolamine content and metabolism throughout the peri-adolescent period. *Synapse (New York, N.Y.)*, 67(1), 4–10. <https://doi.org/10.1002/syn.21609>
- Lesch, K. P., & Waider, J. (2012). Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron*, 76(1), 175–191. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.013>
- Levin OS, Vasenina EE. Depressiia i kognitivnoe snizhenie u pozhilykh: prichiny i sledstviia [Depression and cognitive decline in elderly: causes and consequences]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2019;119(7):87-94. Russian. doi: 10.17116/jnevro201911907187. PMID: 31464295.
- Lichtman, A. H., Varvel, S. A., & Martin, B. R. (2002). Endocannabinoids in cognition and dependence. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 66(2-3), 269–285. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0351>
- Ljubenkov PA, Geschwind MD. Dementia. *Semin Neurol*. 2016 Aug;36(4):397-404. doi: 10.1055/s-0036-1585096. Epub 2016 Sep 19. PMID: 27643909.
- Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, 179(2), 312–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
- Long, J. Z., Li, W., Booker, L., Burston, J. J., Kinsey, S. G., Schlosburg, J. E., Pavón, F. J., Serrano, A. M., Selley, D. E., Parsons, L. H., Lichtman, A. H., & Cravatt, B. F. (2009). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nature chemical biology*, 5(1), 37–44. <https://doi.org/10.1038/nchembio.129>
- Long, L. E., Lind, J., Webster, M., & Weickert, C. S. (2012). Developmental trajectory of the endocannabinoid system in human dorsolateral prefrontal cortex. *BMC neuroscience*, 13, 87. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-87>
- Lopez OL, Kuller LH. Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias. *Handb Clin Neurol*. 2019;167:139-148. doi: 10.1016/B978-0-12-804766-8.00009-1. PMID: 31753130.
- Lorenzetti, V., Alonso-Lana, S., Youssef, G. J., Verdejo-Garcia, A., Suo, C., Cousijn, J., Takagi, M., Yücel, M., & Solowij, N. (2016). Adolescent Cannabis Use: What is the Evidence for Functional Brain Alteration?. *Current pharmaceutical design*, 22(42), 6353–6365. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160805155922>
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological psychiatry. Cognitive neuroscience and neuroimaging*, 6(6), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>

- Lu, Y., & Anderson, H. D. (2017). Cannabinoid signaling in health and disease. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 95(4), 311–327. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0346>
- Lubman, D. I., Cheetham, A., & Yücel, M. (2015). Cannabis and adolescent brain development. *Pharmacology & therapeutics*, 148, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.009>
- Luethi, D., & Liechti, M. E. (2020). Designer drugs: mechanism of action and adverse effects. *Archives of toxicology*, 94(4), 1085–1133. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02693-7>
- Luy M, Di Giulio P, Di Lego V, Lazarevič P, Sauerberg M. Life Expectancy: Frequently Used, but Hardly Understood. *Gerontology*. 2020;66(1):95-104. doi: 10.1159/000500955. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31390630; PMCID: PMC7026938.
- Lynch, M. E., & Campbell, F. (2011). Cannabinoids for treatment of chronic non-cancer pain; a systematic review of randomized trials. *British journal of clinical pharmacology*, 72(5), 735–744. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.03970.x>
- Maccarrone M. (2008). CB2 receptors in reproduction. *British journal of pharmacology*, 153(2), 189–198. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707444>
- Mackie, K., & Stella, N. (2006). Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *The AAPS journal*, 8(2), E298–E306. <https://doi.org/10.1007/BF02854900>
- Macri, S., Lanuzza, L., Merola, G., Ceci, C., Gentili, S., Valli, A., Macchia, T., & Laviola, G. (2013). Behavioral responses to acute and sub-chronic administration of the synthetic cannabinoid JWH-018 in adult mice prenatally exposed to corticosterone. *Neurotoxicity research*, 24(1), 15–28. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9371-2>
- Malaca, S., Tini, A., & Umani Ronchi, F. (2022). Fourth generation of synthetic cannabinoid receptor agonists: a summary on the latest insights. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*, 92(6), e2021546. <https://doi.org/10.23750/abm.v92i6.12696>
- Marcinkowska M, Śniecikowska J, Fajkis N, Paško P, Franczyk W, Kołaczkowski M. Management of Dementia-Related Psychosis, Agitation and Aggression: A Review of the Pharmacology and Clinical Effects of Potential Drug Candidates. *CNS Drugs*. 2020 Mar;34(3):243-268. doi: 10.1007/s40263-020-00707-7. PMID: 32052375; PMCID: PMC7048860.
- Marco, E. M., & Laviola, G. (2012). The endocannabinoid system in the regulation of emotions throughout lifespan: a discussion on therapeutic perspectives. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 26(1), 150–163. <https://doi.org/10.1177/0269881111408459>
- Maresz, K., Carrier, E. J., Ponomarev, E. D., Hillard, C. J., & Dittel, B. N. (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *Journal of neurochemistry*, 95(2), 437–445. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x>

Maroof N, Pardon MC, Kendall DA. Endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 2013 Dec;41(6):1583-7. doi: 10.1042/BST20130140. PMID: 24256258.

Maroof, N., Ravipati, S., Pardon, M. C., Barrett, D. A., & Kendall, D. A. (2014). Reductions in endocannabinoid levels and enhanced coupling of cannabinoid receptors in the striatum are accompanied by cognitive impairments in the A β PPswe/PS1 Δ E9 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 42(1), 227–245. <https://doi.org/10.3233/JAD-131961>

Marshall R. S. (2012). Effects of altered cerebral hemodynamics on cognitive function. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 32(3), 633–642. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120949>

Marsicano, G., & Lafenêtre, P. (2009). Roles of the endocannabinoid system in learning and memory. *Current topics in behavioral neurosciences*, 1, 201–230. https://doi.org/10.1007/978-3-540-88955-7_8

Martinez-Vargas M, Morales-Gomez J, Gonzalez-Rivera R, Hernandez-Enriquez C, Perez-Arredondo A, Estrada-Rojo F, Navarro L. Does the neuroprotective role of anandamide display diurnal variations? *Int J Mol Sci.* 2013 Nov 27;14(12):23341-55. doi: 10.3390/ijms141223341. PMID: 24287910; PMCID: PMC3876049.

Martínez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, González-Rivera R, Landa A, Méndez-Díaz M, Prospero-García O, Navarro L. Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience.* 2003;117(1):197-201. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00820-5. PMID: 12605905.

Mason, N. L., Theunissen, E. L., Hutten, N. R. P. W., Tse, D. H. Y., Toennes, S. W., Jansen, J. F. A., Stiers, P., & Ramaekers, J. G. (2021). Reduced responsiveness of the reward system is associated with tolerance to cannabis impairment in chronic users. *Addiction biology*, 26(1), e12870. <https://doi.org/10.1111/adb.12870>

Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561–564. <https://doi.org/10.1038/346561a0>

Mazdai, L., Fabbri, M., Tirri, M., Corli, G., Arfè, R., Marchetti, B., Bilel, S., Bergamin, E., Gaudio, R. M., Rubini, M., De-Giorgio, F., & Marti, M. (2022). Epigenetic Studies for Evaluation of NPS Toxicity: Focus on Synthetic Cannabinoids and Cathinones. *Biomedicines*, 10(6), 1398. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061398>

Mazzola, C., Micale, V., & Drago, F. (2003). Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *European journal of pharmacology*, 477(3), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.08.026>

Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annual review of psychology*, 64, 21–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143739>

Micale, V., & Drago, F. (2018). Endocannabinoid system, stress and HPA axis. *European journal of pharmacology*, 834, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.039>

- Mills, B., Yepes, A., & Nugent, K. (2015). Synthetic Cannabinoids. *The American journal of the medical sciences*, 350(1), 59–62. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000466>
- Monti, J. M., & Pandi-Perumal, S. R. (2022). Clinical Management of Sleep and Sleep Disorders With Cannabis and Cannabinoids: Implications to Practicing Psychiatrists. *Clinical neuropharmacology*, 45(2), 27–31. <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000494>
- Moore, C. F., & Weerts, E. M. (2022). Cannabinoid tetrad effects of oral Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) in male and female rats: sex, dose-effects and time course evaluations. *Psychopharmacology*, 239(5), 1397–1408. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05995-5>
- Mottarlini, F., Racagni, G., Brambilla, P., Fumagalli, F., & Caffino, L. (2020). Repeated cocaine exposure during adolescence impairs recognition memory in early adulthood: A role for BDNF signaling in the perirhinal cortex. *Developmental cognitive neuroscience*, 43, 100789. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2020.100789>
- Murataeva, N., Straiker, A., & Mackie, K. (2014). Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *British journal of pharmacology*, 171(6), 1379–1391. <https://doi.org/10.1111/bph.12411>
- Nascher, I. L. (1916). *Geriatrics: The diseases of old age and their treatment, including physiological old age, home and institutional care, and medico-legal relations*. Blakiston.
- Nealon CM, Henderson-Redmond AN, Hale DE, Morgan DJ (2019) Tolerance to WIN55,212–2 is delayed in desensitization-resistant S426A/S430A mice. *Neuropharmacology* 148:151–159. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2018.12.026>
- Nelson, A. P., & O'Connor, M. G. (2008). Mild cognitive impairment: a neuropsychological perspective. *CNS spectrums*, 13(1), 56–64. <https://doi.org/10.1017/s1092852900016163>
- Nicolussi, S., & Gertsch, J. (2015). Endocannabinoid transport revisited. *Vitamins and hormones*, 98, 441–485. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.12.011>
- Nidadavolu, P., Bilkei-Gorzo, A., Effah, F., Leidmaa, E., Schürmann, B., Berger, M., Bindila, L., Schmid, M., Lutz, B., Zimmer, A., & Bailey, A. (2022). Dynamic Changes in the Endocannabinoid System during the Aging Process: Focus on the Middle-Age Crisis. *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10254. <https://doi.org/10.3390/ijms231810254>
- Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine*, 19(12), 1584–1596. <https://doi.org/10.1038/nm.3407>
- Oboudiyat, C., Glazer, H., Seifan, A., Greer, C., & Isaacson, R. S. (2013). Alzheimer's disease. *Seminars in neurology*, 33(4), 313–329. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1359319>
- O'Brien, J. T., & Thomas, A. (2015). Vascular dementia. *Lancet (London, England)*, 386(10004), 1698–1706. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00463-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00463-8)

- OECD/European Union (2014), "Dementia prevalence", in Health at a Glance: Europe 2014, OECD Publishing, Paris. https://doi.org/10.1787/health_glance_eur-2014-18-en
- Olney, N. T., Spina, S., & Miller, B. L. (2017). Frontotemporal Dementia. *Neurologic clinics*, 35(2), 339–374. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.01.008>
- Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B. E., Liu, Q. R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasensfitz, L., & Uhl, G. R. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074, 514–536. <https://doi.org/10.1196/annals.1369.052>
- Onaivi, E.S., Sugiura, T., & Di Marzo, V. (Eds.). (2005). *Endocannabinoids: The Brain and Body's Marijuana and Beyond* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780367801038>
- Ortiz-Medina, M. B., Perea, M., Torales, J., Ventriglio, A., Vitrani, G., Aguilar, L., & Roncero, C. (2018). Cannabis consumption and psychosis or schizophrenia development. *The International journal of social psychiatry*, 64(7), 690–704. <https://doi.org/10.1177/0020764018801690>
- Ossato, A., Uccelli, L., Bilel, S., Canazza, I., Di Domenico, G., Pasquali, M., Pupillo, G., De Luca, M. A., Boschi, A., Vincenzi, F., Rimondo, C., Beggiano, S., Ferraro, L., Varani, K., Borea, P. A., Serpelloni, G., De-Giorgio, F., & Marti, M. (2017). Psychostimulant Effect of the Synthetic Cannabinoid JWH-018 and AKB48: Behavioral, Neurochemical, and Dopamine Transporter Scan Imaging Studies in Mice. *Frontiers in psychiatry*, 8, 130. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2017.00130>
- Ossato, A., Vigolo, A., Trapella, C., Seri, C., Rimondo, C., Serpelloni, G., & Marti, M. (2015). JWH-018 impairs sensorimotor functions in mice. *Neuroscience*, 300, 174–188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.021>
- Otten, R., & Engels, R. C. (2013). Testing bidirectional effects between cannabis use and depressive symptoms: moderation by the serotonin transporter gene. *Addiction biology*, 18(5), 826–835. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00380.x>
- Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 58(3), 389–462. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.2>
- Pan, J. X., Wang, Z. L., Li, N., Han, Z. L., Li, X. H., Tang, H. H., Wang, P., Zheng, T., Fang, Q., & Wang, R. (2014). Analgesic tolerance and cross-tolerance to the cannabinoid receptors ligands hemopressin, VD-hemopressin(α) and WIN55,212-2 at the supraspinal level in mice. *Neuroscience letters*, 578, 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.06.058>
- Pascual, A. C., Gaveglione, V. L., Giusto, N. M., & Pasquaré, S. J. (2013). Aging modifies the enzymatic activities involved in 2-arachidonoylglycerol metabolism. *BioFactors* (Oxford, England), 39(2), 209–220. <https://doi.org/10.1002/biof.1055>
- Patel, S., & Hillard, C. J. (2006). Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318(1), 304–311. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.101287>

- Pattnaik, F., Nanda, S., Mohanty, S., Dalai, A. K., Kumar, V., Ponnusamy, S. K., & Naik, S. (2022). Cannabis: Chemistry, extraction and therapeutic applications. *Chemosphere*, 289, 133012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133012>
- Paxinos, George. & Watson, Charles. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam. Elsevier
- Pertwee R. G. (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International journal of obesity* (2005), 30 Suppl 1, S13–S18. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803272>
- Pertwee, R. G. (Ed.) (2014). *Handbook of Cannabis*. (1 ed.) OXFORD UNIV PRESS. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199662685.001.0001>
- Petersen, R. C., Lopez, O., Armstrong, M. J., Getchius, T. S. D., Ganguli, M., Gloss, D., Gronseth, G. S., Marson, D., Pringsheim, T., Day, G. S., Sager, M., Stevens, J., & Rae-Grant, A. (2018). Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 90(3), 126–135. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004826>
- Petersen, R. C., Smith, G. E., Waring, S. C., Ivnik, R. J., Tangalos, E. G., & Kokmen, E. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of neurology*, 56(3), 303–308. <https://doi.org/10.1001/archneur.56.3.303>
- Petzke, F., Tölle, T., Fitzcharles, M. A., & Häuser, W. (2022). Cannabis-Based Medicines and Medical Cannabis for Chronic Neuropathic Pain. *CNS drugs*, 36(1), 31–44. <https://doi.org/10.1007/s40263-021-00879-w>
- Pfizer, T., Niederhoffer, N., & Szabo, B. (2004). Central effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on respiratory and cardiovascular regulation in anaesthetised rats. *British journal of pharmacology*, 142(6), 943–952. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705874>
- Pintori, N., Castelli, M. P., Miliano, C., Simola, N., Fadda, P., Fattore, L., Scherma, M., Ennas, M. G., Mostallino, R., Flore, G., De Felice, M., Sagheddu, C., Pistis, M., Di Chiara, G., & De Luca, M. A. (2021). Repeated exposure to JWH-018 induces adaptive changes in the mesolimbic and mesocortical dopaminergic pathways, glial cells alterations, and behavioural correlates. *British journal of pharmacology*, 178(17), 3476–3497. <https://doi.org/10.1111/bph.15494>
- Piyanova, A., Lomazzo, E., Bindila, L., Lerner, R., Albayram, O., Ruhl, T., Lutz, B., Zimmer, A., & Bilkei-Gorzo, A. (2015). Age-related changes in the endocannabinoid system in the mouse hippocampus. *Mechanisms of ageing and development*, 150, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.08.005>
- Polissidis, A., Galanopoulos, A., Naxakis, G., Papahatjis, D., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Antoniou, K. (2013). The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 16(2), 393–403. <https://doi.org/10.1017/S1461145712000156>

Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 229(2), 327–336.

Pouliou, N., Delis, F., Brakatselos, C., Polissidis, A., Koutmani, Y., Kokras, N., Dalla, C., Politis, P. K., & Antoniou, K. (2021). Detrimental effects of adolescent escalating low-dose Δ^9 -tetrahydrocannabinol leads to a specific bio-behavioural profile in adult male rats. *British journal of pharmacology*, 178(7), 1722–1736. <https://doi.org/10.1111/bph.15394>

Prestia, A., Caroli, A., van der Flier, W. M., Ossenkoppele, R., Van Berckel, B., Barkhof, F., Teunissen, C. E., Wall, A. E., Carter, S. F., Schöll, M., Choo, I. H., Nordberg, A., Scheltens, P., & Frisoni, G. B. (2013). Prediction of dementia in MCI patients based on core diagnostic markers for Alzheimer disease. *Neurology*, 80(11), 1048–1056. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182872830>

Preuss UW, Siafarikas N, Petrucci M, Wong WM. Depressive Störungen bei Demenzen und milder kognitiver Beeinträchtigung: Komorbidität, Ursache oder Risikofaktor? [Depressive disorders in dementia and mild cognitive impairments: is comorbidity a cause or a risk factor?]. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2009 Jul;77(7):399-406. German. doi: 10.1055/s-0028-1109454. Epub 2009 Jun 16. PMID: 19533574.

Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*. 2013 Jan;9(1):63-75.e2. doi: 10.1016/j.jalz.2012.11.007. PMID: 23305823.

Proietti Onori, M., Ceci, C., Laviola, G., & Macrì, S. (2014). A behavioural test battery to investigate tic-like symptoms, stereotypies, attentional capabilities, and spontaneous locomotion in different mouse strains. *Behavioural brain research*, 267, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.023>

Protti, M., Brighenti, V., Battaglia, M. R., Anceschi, L., Pellati, F., & Micolini, L. (2019). Cannabinoids from *Cannabis sativa* L.: A New Tool Based on HPLC-DAD-MS/MS for a Rational Use in Medicinal Chemistry. *ACS medicinal chemistry letters*, 10(4), 539–544. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00571>

Quaegebeur, A., Lange, C., & Carmeliet, P. (2011). The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron*, 71(3), 406–424. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.013>

Ramaekers, J. G., Theunissen, E. L., van Ruitenbeek, P., & Mason, N. L. (2022). Cannabis Use and Neuroadaptation: A Call for Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Challenge Studies. *Frontiers in psychiatry*, 13, 870750. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.870750>

Ramírez, B. G., Blázquez, C., Gómez del Pulgar, T., Guzmán, M., & de Ceballos, M. L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(8), 1904–1913. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4540-04.2005>

Ramirez-Bermudez J. (2012). Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept. *Archives of medical research*, 43(8), 595–599. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.11.008>

- Rana, T., Behl, T., Sehgal, A., Mehta, V., Singh, S., Kumar, R., & Bungau, S. (2021). Integrating Endocannabinoid Signalling In Depression. *Journal of molecular neuroscience* : MN, 71(10), 2022–2034. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01774-7>
- Rascovsky, K., Hodges, J. R., Knopman, D., Mendez, M. F., Kramer, J. H., Neuhaus, J., van Swieten, J. C., Seelaar, H., Dopper, E. G., Onyike, C. U., Hillis, A. E., Josephs, K. A., Boeve, B. F., Kertesz, A., Seeley, W. W., Rankin, K. P., Johnson, J. K., Gorno-Tempini, M. L., Rosen, H., Prioleau-Latham, C. E., ... Miller, B. L. (2011). Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology*, 134(Pt 9), 2456–2477. <https://doi.org/10.1093/brain/awr179>
- Rawls, S. M., Cabassa, J., Geller, E. B., & Adler, M. W. (2002). CB1 receptors in the preoptic anterior hypothalamus regulate WIN 55212-2 [(4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1ij]quinolin-6-one)-induced hypothermia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 301(3), 963–968. <https://doi.org/10.1124/jpet.301.3.963>
- Reith, W., & Mühl-Benninghaus, R. (2015). Differenzialdiagnose demenzieller Erkrankungen [Differential diagnostics of dementia type diseases]. *Der Radiologe*, 55(5), 378–385. <https://doi.org/10.1007/s00117-014-2799-z>
- Riedel, G., & Davies, S. N. (2005). Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handbook of experimental pharmacology*, (168), 445–477. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_15
- Rodvelt, K. R., Bumgarner, D. M., Putnam, W. C., & Miller, D. K. (2007). WIN-55,212-2 and SR-141716A alter nicotine-induced changes in locomotor activity, but do not alter nicotine-evoked [3H]dopamine release. *Life sciences*, 80(4), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.09.020>
- Rog, D. J., Nurmikko, T. J., Friede, T., & Young, C. A. (2005). Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology*, 65(6), 812–819. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000176753.45410.8b>
- Rohrer, J. D., & Warren, J. D. (2011). Phenotypic signatures of genetic frontotemporal dementia. *Current opinion in neurology*, 24(6), 542–549. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32834cd442>
- Romero, J., García, L., Cebeira, M., Zadrozny, D., Fernández-Ruiz, J. J., & Ramos, J. A. (1995). The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life sciences*, 56(23-24), 2033–2040. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00186-a](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00186-a)
- Roque-Bravo, R., Silva, R. S., Malheiro, R. F., Carmo, H., Carvalho, F., da Silva, D. D., & Silva, J. P. (2023). Synthetic Cannabinoids: A Pharmacological and Toxicological Overview. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 63, 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-031122-113758>
- Rostagno A. A. (2022). Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 107. <https://doi.org/10.3390/ijms24010107>

- Rubin R. Exploring the Relationship Between Depression and Dementia. *JAMA*. 2018 Sep 11;320(10):961-962. doi: 10.1001/jama.2018.11154. PMID: 30140930.
- Rubino, T., Viganò, D., Massi, P., & Parolaro, D. (2000). Changes in the cannabinoid receptor binding, G protein coupling, and cyclic AMP cascade in the CNS of rats tolerant to and dependent on the synthetic cannabinoid compound CP55,940. *Journal of neurochemistry*, 75(5), 2080–2086. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0752080.x>
- Rueda-Orozco PE, Soria-Gomez E, Montes-Rodriguez CJ, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospero-García O. A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Jul;198(4):565-76. doi: 10.1007/s00213-007-0911-z. Epub 2007 Sep 6. PMID: 17805517.
- Sachdev, P. S., Blacker, D., Blazer, D. G., Ganguli, M., Jeste, D. V., Paulsen, J. S., & Petersen, R. C. (2014). Classifying neurocognitive disorders: the DSM-5 approach. *Nature reviews. Neurology*, 10(11), 634–642. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.181>
- Sagar, K. A., & Gruber, S. A. (2019). Interactions between recreational cannabis use and cognitive function: lessons from functional magnetic resonance imaging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1451(1), 42–70. <https://doi.org/10.1111/nyas.13990>
- Sagredo, O., Ramos, J. A., Fernández-Ruiz, J., Rodríguez, M. L., & de Miguel, R. (2006). Chronic Delta9-tetrahydrocannabinol administration affects serotonin levels in the rat frontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 372(4), 313–317. <https://doi.org/10.1007/s00210-005-0026-1>
- Sanberg, P. R., Bunsey, M. D., Giordano, M., & Norman, A. B. (1988). The catalepsy test: its ups and downs. *Behavioral neuroscience*, 102(5), 748–759. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.102.5.748>
- Sanford A. M. (2018). Lewy Body Dementia. *Clinics in geriatric medicine*, 34(4), 603–615. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2018.06.007>
- Sawa, A., & Snyder, S. H. (2003). Schizophrenia: neural mechanisms for novel therapies. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 9(1-2), 3–9.
- Schindler RJ, Cucio CP. Late-life dementia. Review of the APA guidelines for patient management. *Geriatrics*. 2000 Oct;55(10):55-60; quiz 62. PMID: 11054951.
- Schliebs, R., & Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural brain research*, 221(2), 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>
- Schneider J. A. (2022). Neuropathology of Dementia Disorders. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 28(3), 834–851. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000001137>
- Schreiter Gasser, U., Rousson, V., Hentschel, F., Sattel, H., & Gasser, T. (2008). Alzheimer disease versus mixed dementias: an EEG perspective. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 119(10), 2255–2259. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2008.07.216>

Scotter EL, Abood ME, Glass M. The endocannabinoid system as a target for the treatment of neurodegenerative disease. *Br J Pharmacol*. 2010 Jun;160(3):480-98. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00735.x. PMID: 20590559; PMCID: PMC2931550.

Seelaar, H., Rohrer, J. D., Pijnenburg, Y. A., Fox, N. C., & van Swieten, J. C. (2011). Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 82(5), 476–486. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.212225>

Seeley W. W. (2017). Mapping Neurodegenerative Disease Onset and Progression. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(8), a023622. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023622>

Serý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L., & Janout, V. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia neuropathologica*, 51(1), 1–9. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.34190>

Shankar A, Hamer M, McMunn A, Steptoe A. Social isolation and loneliness: relationships with cognitive function during 4 years of follow-up in the English Longitudinal Study of Ageing. *Psychosom Med*. 2013 Feb;75(2):161-70. doi: 10.1097/PSY.0b013e31827f09cd. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23362501.

Sher L. (2019). Endogenous cannabinoids and suicide. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 53(3), 263–264. <https://doi.org/10.1177/0004867418817373>

Sipes, T.E., Geyer, M.A. (1997). DOI disrupts prepulse inhibition of startle in rats via 5-HT_{2A} receptors in the ventral pallidum. *Brain Res*. 761, 97–104, doi:10.1016/s0006-8993(97)00316-8

Stasiulewicz, A., Znajdek, K., Grudzień, M., Pawiński, T., & Sulkowska, A. J. I. (2020). A Guide to Targeting the Endocannabinoid System in Drug Design. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2778. <https://doi.org/10.3390/ijms21082778>

Stefansdottir, H., Arnar, D. O., Aspelund, T., Sigurdsson, S., Jonsdottir, M. K., Hjaltason, H., Launer, L. J., & Gudnason, V. (2013). Atrial fibrillation is associated with reduced brain volume and cognitive function independent of cerebral infarcts. *Stroke*, 44(4), 1020–1025. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.12.679381>

Steffens DC, Otey E, Alexopoulos GS, Butters MA, Cuthbert B, Ganguli M, Geda YE, Hendrie HC, Krishnan RR, Kumar A, Lopez OL, Lyketsos CG, Mast BT, Morris JC, Norton MC, Peavy GM, Petersen RC, Reynolds CF, Salloway S, Welsh-Bohmer KA, Yesavage J. Perspectives on depression, mild cognitive impairment, and cognitive decline. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Feb;63(2):130-8. doi: 10.1001/archpsyc.63.2.130. PMID: 16461855.

Steiner, M. A., & Wotjak, C. T. (2008). Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in brain research*, 170, 397–432. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00433-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00433-0)

Tai, S., Hyatt, W. S., Gu, C., Franks, L. N., Vasiljevik, T., Brents, L. K., Prather, P. L., & Fantegrossi, W. E. (2015). Repeated administration of phytocannabinoid $\Delta(9)$ -THC or synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 induces tolerance to hypothermia but not locomotor suppression in mice, and reduces CB1 receptor expression and function in a brain

region-specific manner. *Pharmacological research*, 102, 22–32.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.09.006>

Tai, S.; Fantegrossi, W.E. Pharmacological and Toxicological Effects of Synthetic Cannabinoids and Their Metabolites. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2017, 32, 249-262.
https://doi.org/10.1007/7854_2016_60

Talarico, G., Trebbastoni, A., Bruno, G., & de Lena, C. (2019). Modulation of the Cannabinoid System: A New Perspective for the Treatment of the Alzheimer's Disease. *Current neuropharmacology*, 17(2), 176–183.
<https://doi.org/10.2174/1570159X16666180702144644>

Taylor, J. P., McKeith, I. G., Burn, D. J., Boeve, B. F., Weintraub, D., Bamford, C., Allan, L. M., Thomas, A. J., & O'Brien, J. T. (2020). New evidence on the management of Lewy body dementia. *The Lancet. Neurology*, 19(2), 157–169. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30153-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30153-X)

Theunissen, E. L., Reckweg, J. T., Hutten, N. R. P. W., Kuypers, K. P. C., Toennes, S. W., Neukamm, M. A., Halter, S., & Ramaekers, J. G. (2021). Intoxication by a synthetic cannabinoid (JWH-018) causes cognitive and psychomotor impairment in recreational cannabis users. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 202, 173118.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173118>

Tinetti ME, Fried T. The end of the disease era. *Am J Med.* 2004 Feb 1;116(3):179-85. doi: 10.1016/j.amjmed.2003.09.031. PMID: 14749162.

Tirri, M., Arfè, R., Bilel, S., Corli, G., Marchetti, B., Fantinati, A., Vincenzi, F., De-Giorgio, F., Camuto, C., Mazzarino, M., Barbieri, M., Gaudio, R. M., Varani, K., Borea, P. A., Botrè, F., & Marti, M. (2022). In Vivo Bio-Activation of JWH-175 to JWH-018: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Studies in Mice. *International journal of molecular sciences*, 23(14), 8030. <https://doi.org/10.3390/ijms23148030>

Tisher A, Salardini A. A Comprehensive Update on Treatment of Dementia. *Semin Neurol.* 2019 Apr;39(2):167-178. doi: 10.1055/s-0039-1683408. Epub 2019 Mar 29. PMID: 30925610.

Tournebize, J., Gibaja, V., & Kahn, J. P. (2017). Acute effects of synthetic cannabinoids: Update 2015. *Substance abuse*, 38(3), 344–366.
<https://doi.org/10.1080/08897077.2016.1219438>

Trecki J, Gerona RR, Schwartz MD (2015) Synthetic cannabinoid-related illnesses and deaths. *N Engl J Med* 373(2):103–107. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1505328>

Trejo-Lopez, J. A., Yachnis, A. T., & Prokop, S. (2022). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 19(1), 173–185. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01146-y>

Tudorancea, I. M., Ciorpac, M., Stanciu, G. D., Carataşu, C., Săcărescu, A., Ignat, B., Burlui, A., Rezuş, E., Creangă, I., Alexa-Stratulat, T., Tudorancea, I., & Tamba, B. I. (2022). The Therapeutic Potential of the Endocannabinoid System in Age-Related Diseases. *Biomedicines*, 10(10), 2492. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102492>

Ulloa-Aguirre A. Preface. *Rev Invest Clin.* 2016 Mar-Apr;68(2):52. PMID: 27103039.

UN DESA, 2022. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division *World Population Prospects 2022: Summary of Results*. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.

Uttl, L., Szczurowska, E., Hájková, K., Horsley, R. R., Štefková, K., Hložek, T., Šíchová, K., Balíková, M., Kuchař, M., Micale, V., & Páleníček, T. (2018). Behavioral and Pharmacokinetic Profile of Indole-Derived Synthetic Cannabinoids JWH-073 and JWH-210 as Compared to the Phytocannabinoid Δ^9 -THC in Rats. *Frontiers in neuroscience*, 12, 703. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00703>

Valenti M, Viganò D, Casico MG, Rubino T, Steardo L, Parolaro D, Di Marzo V. Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Apr;61(7-8):945-50. doi: 10.1007/s00018-003-3453-5. PMID: 15095014.

Valeri, A., & Mazzon, E. (2021). Cannabinoids and Neurogenesis: The Promised Solution for Neurodegeneration?. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(20), 6313. <https://doi.org/10.3390/molecules26206313>

Valjent, E., Mitchell, J. M., Besson, M. J., Caboche, J., & Maldonado, R. (2002). Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. *British journal of pharmacology*, 135(2), 564–578. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704479>

Van der Stelt, M., Mazzola, C., Esposito, G., Matias, I., Petrosino, S., De Filippis, D., Micale, V., Steardo, L., Drago, F., Iuvone, T., & Di Marzo, V. (2006). Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(12), 1410–1424. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6037-3>

Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D., & Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5746), 329–332. <https://doi.org/10.1126/science.1115740>

Vandrey, R., Dunn, K. E., Fry, J. A., & Girling, E. R. (2012). A survey study to characterize use of Spice products (synthetic cannabinoids). *Drug and alcohol dependence*, 120(1-3), 238–241. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2011.07.011>

Vann Jones, S. A., & O'Brien, J. T. (2014). The prevalence and incidence of dementia with Lewy bodies: a systematic review of population and clinical studies. *Psychological medicine*, 44(4), 673–683. <https://doi.org/10.1017/S0033291713000494>

Vieira, R. T., Caixeta, L., Machado, S., Silva, A. C., Nardi, A. E., Arias-Carrión, O., & Carta, M. G. (2013). Epidemiology of early-onset dementia: a review of the literature. *Clinical practice and epidemiology in mental health : CP & EMH*, 9, 88–95. <https://doi.org/10.2174/1745017901309010088>

Vigolo, A., Ossato, A., Trapella, C., Vincenzi, F., Rimondo, C., Seri, C., Varani, K., Serpelloni, G., & Marti, M. (2015). Novel halogenated derivatives of JWH-018: Behavioral

and binding studies in mice. *Neuropharmacology*, 95, 68–82.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.02.008>

Wade, D. T., Makela, P., Robson, P., House, H., & Bateman, C. (2004). Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England), 10(4), 434–441.
<https://doi.org/10.1191/1352458504ms1082oa>

Wang, H., Dey, S. K., & Maccarrone, M. (2006). Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocrine reviews*, 27(5), 427–448.
<https://doi.org/10.1210/er.2006-0006>

Wang, L., Hong, P. J., May, C., Rehman, Y., Oparin, Y., Hong, C. J., Hong, B. Y., AminiLari, M., Gallo, L., Kaushal, A., Craigie, S., Couban, R. J., Kum, E., Shanthanna, H., Price, I., Upadhye, S., Ware, M. A., Campbell, F., Buchbinder, R., Agoritsas, T., ... Busse, J. W. (2021). Medical cannabis or cannabinoids for chronic non-cancer and cancer related pain: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ (Clinical research ed.)*, 374, n1034. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1034>

Wiley, J. L., Lefever, T. W., Marusich, J. A., Grabenauer, M., Moore, K. N., Huffman, J. W., & Thomas, B. F. (2016). Evaluation of first generation synthetic cannabinoids on binding at non-cannabinoid receptors and in a battery of in vivo assays in mice. *Neuropharmacology*, 110(Pt A), 143–153.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.016>

Wiley, J. L., Lefever, T. W., Marusich, J. A., Grabenauer, M., Moore, K. N., Huffman, J. W., & Thomas, B. F. (2016). Evaluation of first generation synthetic cannabinoids on binding at non-cannabinoid receptors and in a battery of in vivo assays in mice. *Neuropharmacology*, 110(Pt A), 143–153.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.016>

Wiley, J. L., Marusich, J. A., Lefever, T. W., Grabenauer, M., Moore, K. N., & Thomas, B. F. (2013). Cannabinoids in disguise: Δ^9 -tetrahydrocannabinol-like effects of tetramethylcyclopropyl ketone indoles. *Neuropharmacology*, 75, 145–154.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.022>

Wiley, J. L., Marusich, J. A., Martin, B. R., & Huffman, J. W. (2012). 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles and JWH-018 share in vivo cannabinoid profiles in mice. *Drug and alcohol dependence*, 123(1-3), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2011.11.001>

Williams, A. R., Santaella-Tenorio, J., Mauro, C. M., Levin, F. R., & Martins, S. S. (2017). Loose regulation of medical marijuana programs associated with higher rates of adult marijuana use but not cannabis use disorder. *Addiction* (Abingdon, England), 112(11), 1985–1991. <https://doi.org/10.1111/add.13904>

Williams, C. M., & Kirkham, T. C. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, 143(3), 315–317.
<https://doi.org/10.1007/s002130050953>

- Wilsey, B., Marcotte, T., Deutsch, R., Gouaux, B., Sakai, S., & Donaghe, H. (2013). Low-dose vaporized cannabis significantly improves neuropathic pain. *The journal of pain*, 14(2), 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.10.009>
- Wilsey, B., Marcotte, T., Tsodikov, A., Millman, J., Bentley, H., Gouaux, B., & Fishman, S. (2008). A randomized, placebo-controlled, crossover trial of cannabis cigarettes in neuropathic pain. *The journal of pain*, 9(6), 506–521. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.12.010>
- Wilson, C. D., Tai, S., Ewing, L., Crane, J., Lockhart, T., Fujiwara, R., Radomska-Pandya, A., & Fantegrossi, W. E. (2019). Convulsant Effects of Abused Synthetic Cannabinoids JWH-018 and 5F-AB-PINACA Are Mediated by Agonist Actions at CB1 Receptors in Mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 368(2), 146–156. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.251157>
- Winstock, A. R., & Barratt, M. J. (2013). Synthetic cannabis: a comparison of patterns of use and effect profile with natural cannabis in a large global sample. *Drug and alcohol dependence*, 131(1-2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.12.011>
- Witkin, J. M., Tzavara, E. T., Davis, R. J., Li, X., & Nomikos, G. G. (2005). A therapeutic role for cannabinoid CB1 receptor antagonists in major depressive disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 26(12), 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.10.006>
- Wolters, F. J., & Ikram, M. A. (2019). Epidemiology of Vascular Dementia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39(8), 1542–1549. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.311908>
- Woodhams, S. G., Chapman, V., Finn, D. P., Hohmann, A. G., & Neugebauer, V. (2017). The cannabinoid system and pain. *Neuropharmacology*, 124, 105–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.015>
- Wolf, C., Slavin, M. J., Draper, B., Thomassen, F., Kochan, N. A., Reppermund, S., Crawford, J. D., Trollor, J. N., Brodaty, H., & Sachdev, P. S. (2016). Can the Clinical Dementia Rating Scale Identify Mild Cognitive Impairment and Predict Cognitive and Functional Decline?. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 41(5-6), 292–302. <https://doi.org/10.1159/000447057>
- Yanes, J. A., Riedel, M. C., Ray, K. L., Kirkland, A. E., Bird, R. T., Boeving, E. R., Reid, M. A., Gonzalez, R., Robinson, J. L., Laird, A. R., & Sutherland, M. T. (2018). Neuroimaging meta-analysis of cannabis use studies reveals convergent functional alterations in brain regions supporting cognitive control and reward processing. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 32(3), 283–295. <https://doi.org/10.1177/0269881117744995>
- Ye, L., Cao, Z., Wang, W., & Zhou, N. (2019). New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Current molecular pharmacology*, 12(3), 239–248. <https://doi.org/10.2174/1874467212666190215112036>
- Younes, K., & Miller, B. L. (2020). Frontotemporal Dementia: Neuropathology, Genetics, Neuroimaging, and Treatments. *The Psychiatric clinics of North America*, 43(2), 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2020.02.006>

Zamberletti E, Prini P, Speziali S, Gabaglio M, Solinas M, Parolaro D, Rubino T. Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. *Neuroscience*. 2012 Mar 1;204:245-57. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.038>

Zinkevich, E.P., Vasilieva, V.S. (2001). Molecular Approaches in Chemical Communication of Mammals. In: Marchlewska-Koj, A., Lepri, J.J., Müller-Schwarze, D. (eds) *Chemical Signals in Vertebrates 9*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0671-3_7

Zlokovic B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(12), 723–738. <https://doi.org/10.1038/nrn3114>

Zombeck, J. A., Swearingen, S. P., & Rhodes, J. S. (2010). Acute locomotor responses to cocaine in adolescents vs. adults from four divergent inbred mouse strains. *Genes, brain, and behavior*, 9(8), 892–898. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00630.x>

Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>



Università
degli Studi
di Ferrara

Sezioni

Dottorati di ricerca

Il tuo indirizzo e-mail

trrmcl@unife.it

Oggetto:

"Dichiarazione di conformità della tesi di Dottorato"

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Tirri Micaela

Nato a:

Licata

Provincia:

Agrigento

Il giorno:

24/10/1989

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:

TERAPIE AVANZATE E FARMACOLOGIA SPERIMENTALE (D.M. 45/2013)

Ciclo di Dottorato

36

Titolo della tesi:

Variazioni delle risposte neuro-comportamentali e della trasmissione degli endocannabinoidi nei topi dopo la somministrazione ripetuta di JWH-018: sviluppo di un modello in vivo di demenza e correlazione cliniche.

Titolo della tesi (traduzione):

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)

Zuliani Giovanni

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)

BIO/14

Parole chiave della tesi (max 10):

Demenza senile; Sistema Endocannabinoide; NPS; THC; Cannabinoidi sintetici; safety pharmacology

Consapevole, dichiara

CONSAPEVOLE: (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 1 originale cartaceo e 1 in formato PDF/A caricata sulla procedura informatica Esse3 secondo le istruzioni pubblicate sul sito: <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce ESAME FINALE — disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università, sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso la pubblicazione ad accesso aperto nell'Archivio Istituzionale dei Prodotti della Ricerca IRIS-UNIFE (www.iris.unife.it) oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze; DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITÀ: (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo è del tutto identica a quella caricata in formato PDF/A sulla procedura informatica Esse3, a quelle

da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrò in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie; (3) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non compromette in alcun modo i diritti di terzi, ivi compresi quelli relativi alla sicurezza dei dati personali; che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà da me tenuta indenne da qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi; (4) che la tesi di **dottorato** non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata **prodotta** nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazioni di tipo brevettale o di tutela. PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Firma del dottorando

Ferrara, li 6/02/24 (data) Firma del Dottorando

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore

