



**Centro 3R**

Centro Interuniversitario per la Promozione dei Principi delle 3R nella Didattica e nella Ricerca



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL' EMILIA ROMAGNA**

"BRUNO UBERTINI"

## **PARERE TECNICO SCIENTIFICO PER VALUTAZIONE UTILIZZO METODI *HUMAN BASED* NEL CAMPO DELLE SOSTANZE D'ABUSO.**

### **1 Premessa**

Il presente documento nasce dalla collaborazione tra il Centro di Referenza Nazionale per i Metodi Alternativi, Benessere e Cura degli Animali da Laboratorio ed il Centro Interuniversitario per la Promozione dei Principi delle 3R nella Didattica e nella Ricerca (Centro 3R), come esigenza comune di fornire un documento con validità tecnico/scientifica alla Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari del Ministero della Salute. Il testo si riferisce, nello specifico, al D.Lgs 26/2014 art. 42. comma 2 e consegue alla valutazione e monitoraggio dei metodi alternativi all'utilizzo di animali per le disposizioni di cui all'art. 5 comma 2 e) - *Non possono essere autorizzate le procedure per le ricerche sulle sostanze d'abuso.*

Visto il riferimento nella legge 28 febbraio 2020, n. 8, art. 25 comma 2bis, dove viene menzionata una specifica richiesta relativa ai possibili metodi alternativi utilizzabili nell'ambito delle ricerche sulle sostanze d'abuso, il presente documento ha lo scopo di fornire un supporto allo sviluppo di metodi per poter proseguire le ricerche in questo ambito che non richiedono l'impiego di animali. Infatti, come delineato nella lettera dal Consiglio del Centro 3R inviato al DG e i Ministri il 24-02-2020, lo sviluppo di metodologie che non prevedono l'uso di animali potrebbe essere una grande opportunità per le scienze biomediche in questo Paese, ma la progressiva sostituzione della sperimentazione animale è possibile solo se pianificata con tempi adeguati e accompagnata da finanziamenti a sostegno di metodi alternativi.

Il documento si prefigge di fornire un passo costruttivo rispetto a quanto esposto con il parere dell'anno 2019 del Centro di Referenza, nel quale si era evidenziato maggiormente l'aspetto farmacologico legato all'utilizzo delle sostanze d'abuso.

Le sostanze d'abuso sono caratterizzate da una sindrome di dipendenza fisica legata all'uso/assunzione ripetuta di sostanze/farmaci, di cui il soggetto non può evitare l'impiego (desiderio incontrollato o applicazione terapeutica/farmacologica), nonostante gli effetti dannosi e gravi derivanti dalla sua assunzione siano noti. La sindrome si contraddistingue per una serie di alterazioni che riguardano aspetti comportamentali, cognitivi e fisiologici, che devono essere studiati al fine di valutare le sostanze da immettere sul mercato. Proprio questo punto, legato maggiormente alla sfera

emotiva e psicologica, a sua volta condizionata da aspetti sociali e familiari, rappresenta la questione maggiormente controversa e criticata da più parti, in quanto viene contestata l'opportunità di utilizzare gli animali allo scopo di valutare un comportamento umano. Dall'altra parte, la necessità di cercare interventi farmacologici per alleviare la dipendenza da sostanze d'abuso richiede l'utilizzo di modelli appropriati, per poterne valutare l'efficacia ed i potenziali effetti avversi.

Alla luce di quanto sopra esposto, la relazione fonda la propria struttura su studi scientifici, articoli in *peer-review* internazionali e prende in considerazione l'aspetto strettamente biomedico legato a ciò che significa ricerca e sperimentazione. Pertanto, l'intento degli autori non è quello di fornire una valutazione legata ad aspetti etico-morali, che sono, indubbiamente e fortemente, legati sia all'utilizzo degli animali nell'ambito della sperimentazione sia ad aspetti comportamentali condizionati dal contesto familiare e sociale.

Il documento si articola in modo da affrontare la tematica nelle sue varie sfaccettature scientifiche e tecniche:

- Definizioni;
- Stato dell'arte: metodiche animali impiegate per lo studio delle sostanze d'abuso, o potenziale di induzione di abuso;
- Descrizione dei metodi *human based* nel campo della ricerca/sviluppo delle sostanze d'abuso;
- Considerazioni finali con uno sguardo verso il futuro.

## 2 Definizioni

Le sostanze d'abuso sono definite dall'Agenzia Europea dei Medicinali, coinvolta nella valutazione dei medicinali– EMA- come **quelle sostanze in grado di indurre una sindrome da dipendenza le cui caratteristiche rientrano nella “*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*”, revisione 10 (ICD-10).**

La “*Food and Drug Administration – FDA*” fornisce la seguente definizione di sostanza d'abuso: **un'ampia gamma di prodotti/sostanze/farmaci che, in linea generale, agiscono sul Sistema Nervoso Centrale (SNC) risultano provviste di caratteristiche farmacologiche sovrapponibili a quelle possedute da altre sostanze note essere causa di potenziale dipendenza (*abuse potential*), e possono essere associate a vari effetti sulla psiche (sedazione, euforia, cambiamento dell'umore).**

Il sito del Ministero della Salute elenca le sostanze ad azione stupefacente o psicotropa poste sotto controllo internazionale e nazionale, classificandoli in quattro tabelle e una per i medicinali<sup>1</sup>.

Il presente documento considera tutte le sostanze che possono indurre una dipendenza, che a sua volta causa disturbi mentali e fisici, comprende quindi sia i principi attivi elencanti nella lista del Ministero della Salute sia sostanze come alcool, nicotina e le nuove sostanze psicoattive. Alcune principi attivi stupefacenti e psicotropi vengono anche impiegati come forme farmaceutiche per la terapia del dolore, come specificato nelle Tabelle Ministeriali. Visto l'impiego prettamente farmacologico di queste ultime, si ritiene che le ricerche sui medicinali per la terapia del dolore non rientrino nella definizione compresa nel D.Lgs 26/2014 art. art. 5 comma 2 e); come anche, gli accertamenti preclinici richiesti dalle autorità competenti ed inerenti i nuovi medicinali con potenziale di induzione di abuso e descritti nel paragrafo 3c.

Al contrario, sono comprese le procedure che necessitano l'uso di sostanze d'abuso per l'instaurazione di una condizione di dipendenza nell'ambito di ricerche traslazionali per il trattamento dei disturbi ad esso associati (paragrafo 3b).

### **3 Stato dell'arte: metodiche animali impiegate per lo studio delle sostanze d'abuso, o potenziale di induzione d'abuso**

Il ricorso alla sperimentazione animale utilizzando le sostanze d'abuso o comunque con potenziale di induzione d'abuso è perseguito per tre diversi ambiti operativi:

- a) ricerca di base: per lo studio della neurobiologia della dipendenza
- b) ricerca traslazionale: per il trattamento di disturbi da uso di sostanze legali e/o illecite
- c) adempimenti di tipo regolatorio: per l'accertamento preclinico del potenziale di induzione di abuso

#### *a) Ricerca di base*

Sebbene nessun modello animale rifletta appieno l'esperienza umana, gli esperimenti che utilizzano animali consentono ai ricercatori di studiare la dipendenza in condizioni altamente controllate, che potrebbero non essere possibili o etiche da replicare nell'uomo. Questi tipi di studi hanno contribuito notevolmente a rispondere alle domande su come determinati geni, processi di sviluppo e fattori ambientali, e fattori di stress, possano influenzare il comportamento dell'assunzione di sostanze <sup>2</sup>.

La maggior parte degli studi sperimentali su animali appartiene a questa categoria.

## b) *Ricerca traslazionale*

Il modello animale viene utilizzato per lo studio e lo sviluppo di nuovi farmaci e/o di nuovi interventi psico-comportamentali per pazienti sofferenti di un disturbo da uso di sostanze legali e/o illecite (alcol, tabacco, droghe). A tale proposito, è importante sottolineare che nonostante tali modelli abbiano contribuito allo sviluppo di terapie anti-dipendenza, le opzioni disponibili per trattare la stessa si siano dimostrate in molti casi inefficaci. Tali insuccessi sono dovuti alla scarsa comprensione e conoscenza dei meccanismi patologici indotti dai farmaci a carico dei circuiti cerebrali umani, cosa che rende difficile la razionale progettazione di terapie farmacologiche<sup>2</sup>. In ogni caso, è importante distinguere modelli predittivi (che precedono la ricerca clinica umana) da modelli postdittivi o retroattivi, in cui gli studi clinici sono tradotti in modelli animali. Gli esempi più notevoli di trattamenti di dipendenza sono stati studiati in modelli animali dopo osservazioni e adattamenti di alcuni trattamenti psicosociali già noti per altri disturbi psicologici<sup>4</sup>. Esistono comunque alcune terapie farmacologiche che derivano direttamente dalla traslazione di modelli sperimentali (vareniclina, acamprosato, naltrexone)<sup>5</sup>.

## c) *Adempimenti di tipo regolatorio*

Prima dell'approvazione e immissioni in commercio, i nuovi farmaci capaci di attraversare la barriera ematoencefalica e interagire con i recettori noti per essere coinvolti nelle dipendenze o comunque con effetti psicotropici, necessitano di una serie di accertamenti preclinici volti a valutare il potenziale di induzione di abuso. In questo contesto, le linee guida EMA<sup>6</sup> sull'accertamento preclinico di nuovi medicinali con potenziale di induzione di abuso indicano un approccio a più livelli, come di seguito descritto:

- Studi farmacologici: test *in vitro* e *in vivo* funzionali (interazione con recettori, espressione neurotrasmettitori, attività motoria).
- Studi comportamentali e di dipendenza approfonditi nel caso che gli studi farmacologici preliminari risultino positivi.

Alla luce di quanto esposto fino ad ora, nei paragrafi successivi si vuole delineare lo stato dell'arte dei modelli *human based* applicabili allo studio delle sostanze d'abuso. Secondo gli autori, questa potrebbe essere una valida opportunità per sostenere lo sviluppo di nuovi approcci legati alla ricerca e che, nel contempo, rientrino all'interno di quanto previsto dalla normativa vigente. Inoltre, un ulteriore aspetto da considerare, è legato alla definizione di sostanze d'abuso, in quanto deve essere chiaro che la ricerca inerente i principi attivi impiegati nella terapia del dolore cronico e delle cure palliative così come i test regolatori di nuovi medicinali con potenzialità di abuso, non possono essere preclusi o soggetti a limitazioni.

#### **4 Descrizione dei metodi non animali o *human based* nel campo della ricerca/sviluppo delle sostanze d'abuso**

Il campo della ricerca per i metodi non-animali o *human-based* nell'ambito delle sostanze d'abuso è ancora in fase di sviluppo; infatti, la legislazione vigente in ambito regolatorio, precede la tecnologia che sia in grado di garantire l'implementazione effettiva di metodi alternativi per lo studio a livello sistemico delle sostanze d'abuso e delle relative dipendenze.

Tuttavia, esistono delle eccezioni per le quali è consentito lo studio degli effetti potenzialmente avversi *in vitro*; uno di questi è la valutazione della nicotina sul tessuto polmonare, dove esistono vari sistemi anche commerciali per l'esposizione a nuvole di fumo in regimi controllati e di modelli (anche complessi e tridimensionali) dell'epitelio polmonare umano<sup>7</sup>. Detto questo, il divieto posto dal D.Lgs può essere visto come un'opportunità per la ricerca biomedica italiana se opportunamente supportata e valorizzata, come verrà meglio descritto in seguito.

Si possono individuare tre differenti approcci che non si basano sull'impiego di animali da laboratorio:

- Modelli *in vitro*;
- Metodi *in silico*;
- Modelli epidemiologici.

##### **Modelli *in vitro***

Negli ultimi 15 anni le tecnologie *in vitro* hanno subito dei miglioramenti significativi, rendendo i modelli sempre più complessi e quindi più vicini alla realtà fisiologica umana. Questi miglioramenti sono dovuti allo sviluppo di nuove biotecnologie, quali ad esempio:

- colture di cellule e tessuti in strutture tridimensionali
- possibilità di indurre caratteristiche staminali in cellule umane (le iPSC)
- sviluppo di metodi per realizzare organoidi di diversi tessuti partendo da cellule staminali e di tecnologie fluidiche per poter coltivare cellule in condizioni più fisiologiche
- nuove tecniche di analisi '*highthroughput*'. (es metodiche di screening e di imaging)

Recentemente, vi è stata una grande attenzione anche da parte dell'opinione pubblica rispetto alle potenzialità di questi metodi; infatti, nell'ambito tossicologico i modelli *in vitro* stanno gradualmente sostituendo i modelli animali anche a livello regolatorio.

Attualmente, esistono pochi studi *in vitro* sulle sostanze d'abuso, soprattutto se viene confrontato il numero di pubblicazioni su ricerche di base condotte mediante l'utilizzo di animali rispetto ad articoli

scientifici basati su colture cellulari. Più in particolare, nell'ambito delle sostanze d'abuso, i modelli *in vitro* ad oggi sviluppati riguardano lo studio e l'analisi dell'effetto delle sostanze su cellule e tessuti in coltura. Come sopra evidenziato, i modelli polmonari con esposizione a fumo e/o vapori sono molto sofisticati, e possono essere utilizzati per investigare gli effetti avversi (infiammazione, fibrosi, morte cellulare, ecc) di sostanze d'abuso inalate sui tessuti alveolari o bronchiali<sup>8,9</sup>.

Alcuni studi hanno mostrato la possibilità di classificare le sostanze d'abuso (anfetamine e alcune nuove sostanze psicoattive) a seconda dell'inibizione o meno dell'attività elettrofisiologica di neuroni (anche umani) in coltura. La stessa è stata misurata tramite matrici di microelettrodi ad alta densità<sup>10</sup>.

La tabella presentata come allegato, riporta altri metodi *in vitro* che riguardano lo studio di sostanze d'abuso, con possibili sviluppi e percorsi utili per migliorare le conoscenze relative a questi nuovi ambiti applicativi, che rappresentano la sfida dei prossimi anni. Da questi primi approcci, si evince che ulteriori sviluppi nel campo *in vitro* possono comprendere l'uso di organoidi cerebrali, cellule derivate da prelievi bioptici di persone affette da dipendenze<sup>11</sup>, uso di sistemi multi-organo<sup>12</sup> e impiego di modelli di zebrafish<sup>13,14</sup>.

Comunque, va sottolineato che i modelli *in vitro* attuali non sono utilizzabili per studi di comportamento o alterazioni della locomozione, per i quali sono al momento limitati quanto lo sono anche i modelli animali (impossibilità di replicare l'effetto società/ambiente). In ogni caso, questo aspetto non deve impedire l'opportunità di prevedere sviluppi in tale direzione; infatti, recentemente, una delle ricerche più all'avanguardia sugli organoidi cerebrali ha mostrato la loro capacità di generare attività elettrica spontanea in tratti assonali in grado di provocare la contrazione muscolare<sup>15</sup>.

I **modelli *in silico*** utilizzano metodi matematici, statistici e computazionali per simulare sistemi complessi biologici. Nell'ambito dei cosiddetti "metodi alternativi" sono spesso di supporto ai modelli *in vitro* sviluppati al computer. Ad esempio, nel caso dello studio dell'attività neuronale in presenza di anfetamine e altre droghe, i segnali elettrici acquisiti dai microelettrodi sono stati analizzati con metodi statistici per classificare le sostanze rispetto a controlli positivi e negativi. È importante citare i modelli molecolari, che sfruttano librerie di dati su strutture molecolari di droghe con attività nota per predire l'attività di nuove molecole<sup>16,17</sup>. Questi sistemi, noti come QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationships*), si basano su tecniche di intelligenza artificiale e possono essere utilizzati per lo *screening* di nuove sostanze illecite.

Data la complessità della patologia legata alla dipendenza, sono stati proposti approcci basati sulla biologia dei sistemi e modelli non lineari. Nello specifico, la biologia dei sistemi è un campo della biologia teorica che tenta di identificare schemi in insiemi di dati complessi; a differenza dei classici approcci riduzionisti delle scienze biomediche, la biologia dei sistemi consente l'integrazione delle

informazioni molecolari, fisiologiche e anche cliniche disponibili nel contesto di un quadro quantitativo, tipicamente utilizzato dalle scienze matematiche e dall'ingegneria. Per esempio, il metodo viene utilizzato al fine di ricostruire le reti cellulari come sistemi dinamici e quindi studiare l'inibizione e attivazione delle reti in presenza di nicotina, implementando regole, soglie e processi di apprendimento/ricompensa computazionale<sup>18</sup>. Si presta bene anche come supporto alle tecniche *in vitro* descritte sopra. Infine, i modelli non lineari associano l'ingresso di un sistema complesso con la sua uscita in modo da identificare le caratteristiche del sistema e, quindi, predire la sua risposta a diversi ingressi. Sono noti nell'ambito clinico, dove vengono utilizzati per regolare le quantità di farmaco, soprattutto ormoni, da somministrare ai pazienti. Nell'ambito delle sostanze d'abuso i modelli non lineari riescono a seguire le dinamiche del consumo di alcool e del complesso meccanismo legato al fenomeno del *relax* sostenute dall'abuso di sostanze psicoattive<sup>19</sup>.

I **modelli epidemiologici** sfruttano dati epidemiologici e clinici riferibili sia ai pazienti sia alla popolazione. Esistono numerosi studi prospettici eseguiti utilizzando campioni di giovani e giovani adulti che hanno evidenziato i fattori di rischio per il consumo di cannabis e la successiva progressione nell'utilizzo di droghe lecite e illecite. Si possono citare anche diversi studi longitudinali a breve termine che hanno fatto luce sui predittori di transizione di uso ed abuso di polisostanze<sup>20</sup>. Un esempio di questo tipo di studio è rappresentato dalla messa a punto dell'analisi di grandi dati (*big data*) basata sulla propensione da parte di utilizzatori di droghe a consultare determinati siti internet. La rielaborazione di tali dati ha permesso di correlare determinati processi cognitivo/comportamentali con la dipendenza nei confronti di alcool, nicotina e cannabinoidi<sup>21,22</sup>.

Ancora, altri studi si basano su approcci di intelligenza artificiale correlati alla raccolta di dati tramite questionari demografici/clinici per identificare soggetti con suscettibilità e tendenze di dipendenza verso diverse sostanze psicoattive (eroina, anfetamine)<sup>23,24</sup>. Data proprio la natura del problema, con fattori multipli che giocano un ruolo nella predisposizione alla dipendenza e la manifestazione di sintomi più o meno gravi, si ritiene che i modelli epidemiologici sull'uso e abuso di droghe, potenziate dall'intelligenza artificiale, possano giocare un ruolo fondamentale sia per le potenzialità scientifiche sia per l'impatto clinico e sociologico.

## 5 Considerazioni finali con uno sguardo verso il futuro

Come spesso viene citato in molti lavori scientifici, il fatto che l'utilizzo degli animali abbia consentito di raggiungere importanti e fondamentali svolte nell'ambito delle diverse branche di medicina, biologia e, più in generale, delle bioscienze, non deve essere utilizzato come scusante per non affrontare il tema legato alle possibili metodiche diverse dal modello animale.

In generale, a livello europeo, si sta sottolineando l'importanza di un approccio multidisciplinare, basato sull'integrazione di metodi *in vitro*, *in silico* ed analisi di biologia molecolare (proteomica, genomica, etc), in grado di analizzare e verificare gli effetti tossicologici sulla salute umana dei composti chimici, ivi comprese le sostanze d'abuso. Tale approccio consente, non solo una valutazione di tipo organica generale, ma anche una valutazione delle potenziali alterazioni metaboliche, genetiche e proteiche che queste sostanze potrebbero determinare a livello di organi e tessuti. Questo approccio multidisciplinare viene identificato con il termine IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*), che, quindi, considera metodi *human based* e nuove tecnologie di tipo computazionale e di *imaging*. L'insieme di questi sistemi rappresenta una nuova sfida per la ricerca applicata alle sostanze d'abuso, proprio per il fatto che la loro assunzione e le risposte che provocano sono legate a fattori complessi, sia patofisiologici che sociali e comportamentali. Proprio per questo, la possibilità di avere a disposizione un'importante quantità di dati bibliografici derivanti dalle numerose sperimentazioni effettuate sul modello animale, è un aspetto che non deve essere sottovalutato, ma, al contrario, deve rappresentare il nuovo punto d'inizio per uno studio diverso degli effetti delle sostanze d'abuso. L'opportunità di sviluppare innovativi modelli non animali, dovrebbe sfruttare i risultati già consolidati e sviluppare quei test che consentano di ottenere informazioni diverse (es. aspetti comportamentali legati a studi epidemiologici, effetti metabolici strettamente connessi al danno d'organo/tessuto e l'integrazione delle informazioni derivante da diversi tipi di studio e analisi) rispetto a quanto sviluppato fino ad oggi.

Ciò predetto, pensare di sostituire *in toto* il modello animale con quello non animale, perché il primo ha un limitato valore traslazionale, sarebbe non solo utopistico, ma, al momento, anche non scientificamente valido; infatti, è fondamentale ricordare che, come nei modelli *in vivo*, vi sono dei forti limiti applicativi legati anche all'approccio *human-based* che devono essere tenuti in considerazione. Vi sono dei ostacoli oggettivi che non possono essere ignorati e questi sono relativi agli effetti che le sostanze d'abuso presentano sul sistema nervoso centrale che, con le metodiche attualmente disponibili sia con o senza l'impiego di animali, non possono essere studiati in modo completo e corretto. Un esempio ne è la valutazione delle reazioni comportamentali determinate dall'assunzione di sostanze psicoattive a scopo terapeutico e non. In questo senso, l'unica alternativa,



come evidenziato nello studio di Soares et al<sup>27</sup>, è il ricorso a volontari umani, che, però, rappresenta un compromesso etico discutibile e non di facile attuazione. La stessa valutazione deve essere compiuta in merito alla terapia del dolore, legata a patologie gravemente invalidanti (pazienti oncologici, dolore cronico, etc), per il quale l'effetto terapeutico/farmacologico delle sostanze psicoattive può essere valutato solo nel modello animale, in quanto gli attuali sistemi neuronali *in vitro* non sono sufficientemente sviluppati e predittivi. Come riportato nel precedente paragrafo, i progressi compiuti in questo particolare ambito con i modelli neurologici, stanno fornendo i primi risultati interessanti, che, nel futuro, potranno essere d'aiuto anche per questo tipo di valutazioni.

In vista dell'applicazione prevista alle fine del 2020, è utile sottolineare come i metodi *human based* rappresentino una sfida scientifica del prossimo futuro; in particolare, riteniamo che gli argomenti con maggiori potenzialità e interesse siano:

- Sviluppo di modelli epidemiologici in grado di fornire dati predittivi sul rischio di predisposizione all'uso improprio di sostanze psicoattive. Questo aspetto, è quello maggiormente dibattuto, in quanto anche il modello animale risulta non totalmente aderente a ciò che può essere applicato all'uomo (stimoli socio/famigliari, etc). Per potenziare queste attività è necessario creare delle reti e infrastrutture di raccolta dati a livello Nazionale. Tale approccio deve essere accompagnato dalla collaborazione con informatici e gestori di grandi dati e dall'utilizzo di strumenti di intelligenza artificiale.
- Approccio multidisciplinare in grado di fornire modelli integrati che prendano in considerazione i differenti aspetti legati all'assunzione di sostanze d'abuso, basandosi sulla vasta bibliografia inerente i dati già ottenuti dal modello animale, che dovrebbero servire come base di partenza per affrontare un nuovo approccio di studio, che prenda in considerazione le metodiche *human based* al fine di compiere un passo in avanti nello studio delle sostanze d'abuso.
- Sviluppo di metodi *in vitro* complessi e multi-organo (ad esempio diversi organoidi in connessione in un sistema fluidico), utilizzando anche cellule provenienti da pazienti con patologia nota, capaci di studiare il potenziale danno specifico d'organo indotto dal principio attivo oggetto dello studio.

In conclusione, al fine di lavorare per ottenere risultati proficui e validi, nei confini della legislazione che verrà adottata a fine anno, è necessario puntare ad un piano mirato di fondi che premi l'approccio multidisciplinare per lo studio di metodi diversi da quello animale, in modo da ampliare le possibilità di ricerca e di studio legati all'utilizzo e dipendenza sulle sostanze d'abuso.

Per il Centro di Referenza Nazionale per i Metodi  
Alternativi, Benessere e Cura degli Animali da  
Laboratorio

Dr.ssa Silvia Dotti  
Dr. Riccardo Villa

Per il Centro Interuniversitario per la Promozione  
dei Principi delle 3R nella Didattica e nella  
Ricerca (Centro 3R)

Prof.ssa Arti Ahluwalia  
Prof.ssa Anna Maria Bassi

## Referenze bibliografiche

1. Ministero della Salute. Tabelle delle sostanze stupefacenti e psicotrope. Available at: [http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=3729&area=sostanzeStupefacenti&menu=vuoto](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3729&area=sostanzeStupefacenti&menu=vuoto). (Accessed: 28th May 2020)
2. Lynch, W. J., Nicholson, K. L., Dance, M. E., Morgan, R. W. & Foley, P. L. Animal models of substance abuse and addiction: Implications for science, animal welfare, and society. *Comparative Medicine* **60**, 177–188 (2010).
3. Kuhn, B. N., Kalivas, P. W. & Bobadilla, A. C. Understanding Addiction Using Animal Models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **13**, 262 (2019).
4. Field, M. & Kersbergen, I. Are animal models of addiction useful? *Addiction* **115**, 6–12 (2020).
5. Spanagel, R. Animal models of addiction. *Dialogues Clin. Neurosci.* **19**, 247–258 (2017).
6. EMA. Guideline on the non clinical investigation of the dependence potential of medicinal products EMEA/CHMP/SWP/94227/2004. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-investigation-dependence-potential-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-investigation-dependence-potential-medicinal-products_en.pdf). (Accessed: 28th May 2020)
7. Aghaloo, T., Kim, J. J., Gordon, T. & Behrsing, H. P. In Vitro Models, Standards, and Experimental Methods for Tobacco Products. *Advances in dental research* **30**, 16–21 (2019).
8. Cei, D. Development of a dynamic model of the alveolar interface for the study of aerosol deposition. (University of Pisa, 2015).
9. Benam, K. H. *et al.* Matched-Comparative Modeling of Normal and Diseased Human Airway Responses Using a Microengineered Breathing Lung Chip. *Cell Syst.* **3**, 456-466.e4 (2016).
10. Hondebrink, L. *et al.* Neurotoxicity screening of (illicit) drugs using novel methods for analysis of microelectrode array (MEA) recordings. *Neurotoxicology* **55**, 1–9 (2016).
11. Prytkova, I., Goate, A., Hart, R. P. & Slesinger, P. A. Genetics of Alcohol Use Disorder: A Role for Induced Pluripotent Stem Cells? *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **42**, 1572–1590 (2018).
12. Ahluwalia, A. *et al.* Systemic and vascular inflammation in an in-vitro model of central obesity. **13**,
13. Maximino, C. *et al.* Fingerprinting of Psychoactive Drugs in Zebrafish Anxiety-Like Behaviors. *PLoS One* **9**, e103943 (2014).
14. de Souza Anselmo, C. *et al.* Is zebrafish (Danio rerio) a tool for human-like metabolism study? *Drug Test. Anal.* **9**, 1685–1694 (2017).
15. Giandomenico, S. L. *et al.* Cerebral organoids at the air–liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat. Neurosci.* **22**, 669–679 (2019).
16. Negus, S. S. & Banks, M. L. Decoding the structure of abuse potential for new psychoactive substances: Structure-activity relationships for abuse-related effects of 4-substituted methcathinone analogs. in *Current Topics in Behavioral Neurosciences* **32**, 119–131 (Springer Verlag, 2017).
17. Todeschini, R. & Consonni, V. *Handbook of molecular descriptors*. WileyVCH, Weinheim. Wiley-VCH **11**, (Wiley, 2000).
18. Tretter, F., Gebicke-Haerter, P. J., Albus, M., an der Heiden, U. & Schwegler, H. Systems biology and addiction. *Pharmacopsychiatry* **42 Suppl 1**, S11–S31 (2009).
19. Warren, K., Hawkins, R. C. & Sprott, J. C. Substance abuse as a dynamical disease: Evidence and clinical implications of nonlinearity in a time series of daily alcohol consumption. *Addict. Behav.* **28**, 369–374 (2003).
20. Merikangas, K. R. & McClair, V. L. Epidemiology of substance use disorders. *Human Genetics* **131**, 779–789 (2012).
21. Whelan, R., Cao, Z., O’Halloran, L. & Pennie, B. Genetics, imaging, and cognition. in *Cognition and Addiction* 365–377 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/b978-0-12-815298-0.00027-7
22. Kim, S. J., Marsch, L. A., Hancock, J. T. & Das, A. K. Scaling Up Research on Drug Abuse and Addiction Through Social Media Big Data. *J. Med. Internet Res.* **19**, e353 (2017).
23. Shahriar, A., Faisal, F., Mahmud, S. U., Chakrabarti, A. & Rabiul Alam, M. G. A machine learning approach to predict vulnerability to drug addiction. in *2019 22nd International Conference on Computer and Information Technology, ICCIT 2019* (Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2019). doi:10.1109/ICCIT48885.2019.9038605
24. Ahn, W. Y. & Vassileva, J. Machine-learning identifies substance-specific behavioral markers for opiate and stimulant dependence. *Drug Alcohol Depend.* **161**, 247–257 (2016).
25. Pound, P., Ebrahim, S., Sandercock, P., Bracken, M. B. & Roberts, I. Where is the evidence that

- animal research benefits humans? *British Medical Journal* **328**, 514–517 (2004).
26. Robinson, N. B. *et al.* The current state of animal models in research: A review. *Int. J. Surg.* **72**, 9–13 (2019).
  27. P. Soares, V. & C. Campos, A. Evidences for the Anti-panic Actions of Cannabidiol. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 291–299 (2016).