

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE

Direttore: Ch.mo Prof. De Caro Raffaele

CLINICA PSICHIATRICA

Direttrice: Ch.ma Prof.ssa Favaro Angela

TESI DI LAUREA

**Connettività funzionale dinamica nei
consumatori di cannabis: uno studio di
risonanza magnetica funzionale a riposo**

Relatore: Prof. Sambataro Fabio

Correlatore: Dott. Olivo Daniele

Laureando: Fazio Giovanni

Matricola N. 1142477

Anno accademico 2021/2022

Indice

1	Sommario	1
2	Abstract	3
3	Introduzione	5
3.1	Panoramica sui disturbi psichiatrici correlati al consumo di cannabinoidi	5
3.1.1	Epidemiologia	6
3.1.2	Tossicocinetica	9
3.1.3	Quadri clinici correlati al consumo di cannabis	10
3.1.4	Neurobiologia: meccanismi cellulari e molecolari associati all'uso cronico di cannabis, alla tolleranza e alla dipendenza.	15
3.2	Studi di connettività funzionale in fMRI	23
3.2.1	Il sistema BOLD	24
3.2.2	Modelli di studio in fMRI	27
3.2.3	Componenti fondamentali delle analisi in fMRI	31
4	Scopo dello studio	41
5	Materiali e metodi	43
5.1	Popolazione	43
5.2	Acquisizione dei dati in risonanza magnetica	48
5.3	Analisi dei dati	48
5.3.1	Pre-processing dei dati	48
5.3.2	Decomposizione in functional network	50
5.3.3	MANCOVAN di sottrazione	52
5.3.4	Analisi di connettività dinamica	52
5.3.5	Analisi statistiche	55
6	Risultati	57
6.1	Analisi di connettività statica	57
6.2	Analisi di connettività dinamica	61

6.2.1	Analisi degli stati	61
6.2.2	Analisi dei meta-stati	66
7	Discussione	73
8	Conclusione	77
	Bibliografia	79
	Ringraziamenti	

1. Sommario

Presupposti dello studio: La cannabis è la terza sostanza controllata più utilizzata nel mondo. Sebbene sia consuetudine tra molti consumatori ritenere che essa esuli dai gravi pericoli associati al rischio di dipendenza e astinenza tipici di altre droghe d'abuso, vari sono i disturbi descritti nel DSM-5 determinati da un uso sregolato di tale stupefacente.

Tra questi, il disturbo da uso di cannabis assume notevole rilievo, in quanto raccoglie in sé tutte le manifestazioni cliniche relative ad un utilizzo cronico di cannabis.

Scopo: Numerosi sono gli studi di neurobiologia e di imaging svolti al fine di investigare i meccanismi d'azione tipici di questa sostanza, tuttavia, nessuno tra questi si è mai soffermato nell'indagare le alterazioni relative alla connettività dinamica cerebrale caratterizzanti i grandi utilizzatori di cannabinoidi.

Attraverso l'imaging a risonanza magnetica funzionale (fMRI), applicato in condizioni di riposo, si cercherà di individuare specifici pattern peculiari dei consumatori a rischio di dipendenza e di studiare in questi il comportamento della dinamica cerebrale nel suo complesso, così da introdurre nuove ipotesi riguardo la patogenesi del disturbo da uso di cannabis e identificare nuovi possibili target terapeutici.

Materiali e metodi: Questo studio si è svolto su una popolazione di 94 soggetti, ripartiti secondo il punteggio derivato dalla scala *CUDIT-R*, impiegata per valutare il rischio di sviluppare disturbo da uso di cannabis. Sono stati ottenuti, in tal maniera, due gruppi: quello dei controlli, costituito da 55 soggetti, e quello dei soggetti ad alto rischio d'abuso, composto da 39 soggetti.

Per ogni individuo sono state raccolte le scansioni strutturali e funzionali in risonanza magnetica e i relativi parametri demografici e clinici.

Dopo una prima fase di pre-processing dei dati, si è proceduto ad una di analisi spaziale di gruppo a componenti indipendenti (ICA) dei dati di fMRI, al fine di individuare i 53 componenti indipendenti associati a network funzionali. Sulle time-course ottenute è stata applicata, in primis, una *sliding window analysis*,

a cui è seguito un *K-means clustering*, svolto sulle matrici di correlazione ricavate, così da identificare gli *stati* di connettività. Successivamente, sono state implementate sulle time-course delle tecniche di riduzione volte ad individuare pattern di connettività indipendenti e costruire dei vettori di *meta-stato*. Le successive analisi statistiche sono state svolte per confrontare i due gruppi mediante le metriche d'interesse estratte per gli stati e i meta-stati.

Risultati: Le analisi statistiche hanno mostrato la presenza di una differenza significativa tra i due gruppi oggetto di studio relativamente al tempo di permanenza (*mean dwell time*) nello stato 4 e ai parametri dei meta-stati attinenti al *connectivity space* generato attraverso il K-means (*number of states, change between states, state span, total distance*).

Inoltre, risultati d'interesse sono stati ottenuti correlando detti valori con il *CUDIT-score*, con la *scala di valutazione dell'ansia di tratto (STAI-G X2)* e con alcuni dati riguardanti il consumo (*durata del consumo e uso corrente espresso in grammi/settimana*).

Conclusioni: Le analisi di connettività funzionale dinamica hanno permesso di definire come i soggetti a rischio di disturbo da uso di cannabis permangano più a lungo all'interno di uno stato con alte connessioni intra-network e come questo sembri correlare con la severità dell'abuso di THC.

Inoltre, nei soggetti a rischio si riscontra un maggior numero di meta-stati visitati durante la scansione e un maggior numero di transizioni da uno stato all'altro, da ciò ne consegue una maggiore lunghezza totale percorsa all'interno dello state-space.

Il numero di stati e la lunghezza totale sembrano correlare con il punteggio ottenuto alla scala STAI-G X2.

Parole chiave: cannabis, rs-fMRI, dynamic FNC, states, meta-states.

2. Abstract

Background: Cannabis is worldwide the third most commonly used controlled substance. Most consumers usually consider it a low-risk drug; namely, they believe it is not associated with addiction and risks of withdrawal which are typical of other drugs. Despite this, numerous are the psychiatric disorders described in DSM-5 related to unregulated use of this substance. Among them, the Cannabis Use Disorder is considered to be the most relevant, grouping all clinical manifestations caused by a chronic consumption.

Objective: Several neurobiology and imaging studies have been carried out to investigate cannabis' working mechanisms; nevertheless, none of these has explored changes in the dynamic cerebral connectivity of the patients.

Through functional magnetic resonance imaging (fMRI), applied in resting-state conditions, it was possible to find the specific patterns and to study the overall brain dynamics capable of describing these subjects' connectivity.

In doing so, we hope to introduce new pathogenetic hypothesis related to cannabis use disorder and, therefore, novel therapeutic targets of interest.

Methods: Ninety-four subjects participated in the study, and they have been grouped according to their *CUDIT-R* score. Said test was employed to evaluate how much a subject is at risk to develop Cannabis Use Disorder. Participants were thus split into two groups: the control group (N=55), and the high risk group (N=39). For each individual, structural and functional scans through MRI and their clinical and demographic data.

After a first pre-processing phase, we proceeded implementing a *spatial constrained ICA* within the group in order to find the 53 independent components defining the functional networks. On the obtained time-courses, some measurements were conducted: firstly, a *sliding window analysis*; and secondly, a *K-means clustering* on the detected correlation matrices, so as to identify the connectivity *states*.

Moreover, some reduction techniques were applied to the before mentioned time-courses, to obtain independent connectivity patterns and to build the *meta-state* vectors. Subsequent statistical analysis has been carried out comparing the two groups considering states and meta-states' metrics.

Results: The statistical comparisons have demonstrated a significant difference between the two groups, regarding the state 4 *mean dwell time* and K-means meta-states' parameters (*number of states, change between states, state span, total distance*). Furthermore, interesting results have been obtained correlating the previously mentioned values with the *CUDIT* score, with the *State-Trait Anxiety Inventory (STAI-G X2)* and with some overall consume datas (*duration use, current use g/week*).

Conclusions: Dynamic functional connectivity analysis allowed to demonstrate that high risk consumers dwell longer into a state with high within network connectivity and this correlates with the severity of the THC abuse. In addition, high risk subjects have an increased number of states that they transition in and out, an increased number of changes between states and the overall distance is greater. The number of states and the total distance correlate with STAI X2 scores.

Key words: cannabis, rs-fMRI, dynamic FNC, states, meta-states.

3. Introduzione

3.1 Panoramica sui disturbi psichiatrici correlati al consumo di cannabinoidi

La cannabis è una delle più antiche sostanze psicotrope conosciute dall'uomo e ne esistono evidenze riguardo all'impiego risalenti fino al 4000 a.C. [1].

Le principali preparazioni, utilizzate per il consumo a scopo ricreativo, si ottengono dalle infiorescenze femminili, le quali possono essere essiccate col fine di ottenere *marijuana*, o lavorate per ricavarne una resina viscosa definita *hashish* [2].

Tali sostanze espletano il loro ruolo psicoattivo attraverso 144 differenti cannabinoidi, il cui componente fondamentale risulta essere il Δ -9-tetraidrocannabinolo [3]. Questo produce i propri effetti agendo sul sistema degli endocannabinoidi, sistema che include i recettori CB1 e CB2, altri ligandi di detti recettori e gli enzimi coinvolti nella degradazione dei neurotrasmettitori stessi [4, 5].

L'effetto dell'interazione del THC col CB1 produce un'importante condizione di euforia (in inglese generalmente riferita come *high*) dalla quale deriva il desiderio di reiterare nel consumo della sostanza [6, 7]: in alcuni casi il quadro può sfociare in un vero e proprio disturbo psichiatrico, denominato nel DSM-5 come disturbo da uso di cannabis (CUD) [8], che si caratterizza per essere una condizione dettata dall'incapacità di desistere dal fare uso di cannabis, nonostante i danni di carattere fisico o psicologico provocati [9]. Tale situazione si presenta approssimativamente in 1 soggetto su 10 tra i consumatori regolari della pianta, e in circa 1 su 3 degli individui che ne fanno uso quotidiano, e si associa a un maggior rischio di sviluppare concomitanti disturbi psichiatrici, psicosi e altre patologie di carattere internistico [10, 11].

3.1.1 Epidemiologia

Cenni di epidemiologia generale

La cannabis è la terza sostanza controllata più utilizzata al mondo, dopo alcol e tabacco. Stime delle Nazioni Unite, risalenti al 2018, indicano che 192 milioni di persone, ovvero il 3.9% della popolazione globale di età adulta, hanno fatto almeno una volta uso di cannabis nell'anno precedente [10]. La prevalenza di tali dati diverge notevolmente in base allo stato e alla regione considerata, con il Nord America che assume il primo posto come paese consumatore (12.4%), seguito da Africa Centrale e Occidentale (12.4%), Oceania (10.3%), Nord Africa (4.3%), Europa Meridionale e Orientale (2.4%) e Asia (1.8%) [12].

L'esordio del consumo spesso occorre in tarda adolescenza e nella prima età adulta, con una mediana comune tra Europa, Asia, Nuova Zelanda, Medio Oriente e Africa che si posiziona tra i 18-19 anni e una media che si localizza sui 15-16 anni [13, 14]: ogni giorno circa 6.600 individui provano la cannabis per la prima volta e il 58.3% dei nuovi utilizzatori di marijuana ha un'età inferiore ai 18 anni [2].

Studi sui gemelli hanno osservato come un esordio precoce nell'utilizzo della sostanza sia influenzato sia da fattori genetici, sia dai fattori ambientali condivisi, sia dalla vulnerabilità sociale e dallo sviluppo del soggetto. Questo concetto assume fondamentale importanza se si considera che l'introduzione dell'uso di cannabis prima dei 16 anni correla con un maggior rischio di sviluppare dipendenza, disturbi d'ansia, depressione, disturbi della condotta e altri disturbi da uso di sostanze [13, 15, 16].

Il disturbo da uso di cannabis in epidemiologia

I soggetti che fanno uso di cannabis spesso tendono a presumere che tale sostanza non conduca ad alcuna forma di dipendenza, nonostante ciò, gli effetti avversi riconducibili ad un regolare consumo sono stati documentati da diversi studi di carattere clinico e comportamentale.

I dati globali riguardanti il CUD risultano ancora incompleti, ma i più recenti (2016) stimano che in circa 22.1 milioni di soggetti sia possibile rilevare una positività per i criteri diagnostici definenti uno stato di dipendenza (289.7 casi su 100.000 soggetti) [17].

Il rischio di sviluppo di CUD aumenta conseguentemente all'aumentare della frequenza del consumo: a sostegno di ciò, studi svolti negli USA hanno rilevato come individui adulti affetti da CUD consumino cannabis in media 6.2 giorni

su 10 durante l'anno [18]. Approssimativamente il 17.0% dei soggetti che consumano cannabis settimanalmente e il 19.0% di quelli che consumano cannabis quotidianamente presenta positività ai criteri diagnostici per CUD [19].

Comorbidità con altri disturbi psichiatrici

Un campionamento australiano, svoltosi sul territorio nazionale su soggetti dai 18 anni in su, ha rilevato come:

- 7 persone su 10 affette da CUD presentino un concomitante disturbo psichiatrico;
- 4 persone su 10 facenti uso di cannabis, ma non affette da CUD, presentino un concomitante disturbo psichiatrico;
- 1.5 persone su 10 non facenti uso di cannabis presentino un disturbo psichiatrico [20].

I medesimi studi hanno definito che:

- Tra soggetti caratterizzati da diagnosi di CUD nei 12 mesi passati, il 40.5% presenti positività ai criteri di diagnosi per disturbi d'ansia;
- Tra soggetti facenti uso di cannabis, ma non affette da CUD, il 20.8% presenti concomitanti disturbi d'ansia;
- Tra soggetti non facenti uso di cannabis, l'11.2% presenti concomitanti disturbi d'ansia [21].

Similmente, altre indagini nazionali svoltesi negli Stati Uniti hanno descritto come la presenza di CUD si associ in maniera significativa ad un alto rischio di essere affetti da disturbi dell'umore (OR 3.8), disturbi d'ansia (OR 2.8), disturbo da stress post-traumatico (OR 4.3) e disturbi di personalità (OR 4.8). Più dettagliatamente, le stesse indagini hanno individuato in soggetti affetti da CUD una prevalenza dell'8.9% di disturbo d'ansia generalizzata, 8.4% di disturbo d'ansia sociale, 7.7% di disturbo di panico e 16.4% di fobie specifiche [18, 22].

Un'altra metanalisi svoltasi su studi clinici ed epidemiologici statunitensi ed europei ha riferito che il 12% di individui diagnosticati o trattati per disturbo depressivo maggiore sia affetto da CUD [23] e che, tra persone affette da disturbo bipolare, il 24% faccia uso di cannabis e il 20% sia affetto da CUD [24].

Studi di popolazione svolti su soggetti affetti da schizofrenia hanno rilevato come 1 su 4 tra questi presenti CUD concomitante o l'abbia presentato durante la vita [25]. In ogni caso, la prevalenza varia sostanzialmente di regione in regione, con valori più alti di comorbidità tra CUD e schizofrenia individuabili nel Regno Unito (36.7%), seguito dall'Australia (35.2%), Europa (27.8%), Nord America (23.5%) e dalle altre regioni (4.5%).

Per quanto riguarda gli altri disturbi psichiatrici, i dati attinenti a una concomitante diagnosi di CUD sono meno consistenti: prendendo come esempio il disturbo post-traumatico da stress, un'indagine svolta negli Stati Uniti ha rilevato una prevalenza di comorbidità del 9.4% nei soggetti con CUD presente da almeno 12 mesi e una prevalenza di comorbidità del 17.6% in soggetti con CUD persistente per tutta la vita. Studi danesi basati sui registri psichiatrici ne hanno, però, rilevato una minore prevalenza (3%) [26].

Comorbidità con l'uso di altre sostanze

Campioni svolti sul territorio nazionale negli Stati Uniti hanno individuato come le persone con diagnosi di CUD siano più propense a sviluppare un disturbo da uso di alcol (OR 6.0) e di altre droghe (OR 9.0) [18].

Tra le persone affette da CUD, l'83.51% degli uomini e l'82.9% delle donne presenta un'altra forma di dipendenza e il 59.4% degli uomini e il 59.5% delle donne soddisfa i criteri per un disturbo da uso di alcol [27].

Tra le condizioni che influenzano maggiormente il concomitante uso di droghe, si rilevano: la capacità di reperirne, le pratiche culturali, la politica adottata riguardo le droghe stesse a livello nazionale, il costo, la purezza, la salute mentale del soggetto e il profilo di rischio associato [28].

La ragione di questo elevato rapporto di comorbidità tra l'uso di cannabis e di altre droghe è ancora dibattuta: è infatti ancora poco chiaro se il consumo di cannabis si associ in maniera causa-effetto all'utilizzo di altre droghe o se l'associazione si fonda sulla possibilità di accesso ad altre sostanze illecite attraverso il mercato o attraverso altri consumatori [29,30].

3.1.2 Tossicocinetica

La particolare composizione che caratterizza la cannabis ne implica una maggiore complessità di studio rispetto ad altre sostanze d'abuso. Il consumo o l'inalazione della pianta, infatti, espone il consumatore a centinaia di componenti, tra cui cannabinoidi e non cannabinoidi, dei quali molti risultano essere bioattivi [31]. Questo presupposto è necessario se si considera che ciò che si conosce riguardo la farmacocinetica relativa deriva da studi che si focalizzano sull'analisi del singolo THC.

È chiaro, dunque, come questi non siano in grado di catturare la totale complessità della reazione risultante dal consumo della pianta.

Assorbimento, Distribuzione e Metabolismo del THC

Il THC, principale agente psicoattivo, viene solitamente introdotto mediante il fumo. Viene rapidamente assorbito a livello polmonare e distribuito a livello sistemico via perfusione, a cui segue un rapido meccanismo di primo passaggio a livello epatico [32]. L'ingestione orale segue un decorso più graduale e ritarda il picco di concentrazione plasmatica.

A livello del compartimento ematico, la molecola risulta per lo più legata a lipoproteine e solo il 3% si presenta libero [33,34].

Grazie alle sue proprietà lipofile, il THC penetra facilmente a livello di tutti gli organi; di seguito, esso manifesta una cinetica particolarmente lenta nei compartimenti lipidici (tra cui l'encefalo), permettendone un accumulo e un lento rilascio dal tessuto adiposo, seguito da un ulteriore processamento a livello della circolazione entero-epatica, da cui derivano i prodotti attivi.

Per tale ragione, il rilascio dal tessuto adiposo viene descritto come il *rate-limiting step* nella farmacocinetica del THC [35].

Il metabolismo a livello epatico può produrre oltre 80 metaboliti del Δ -9-tetraidrocannabinolo: la reazione fondamentale si esprime nell'idrossilazione del gruppo allilico in posizione 11, a cui segue l'ossidazione che produce un derivato carbossilico. Avviene, poi, la coniugazione con alcuni metaboliti: è possibile, infatti, che i prodotti lipofili formino dei coniugati, permettendone maggiore stabilità e prolungandone, così, l'emivita [36].

3.1.3 Quadri clinici correlati al consumo di cannabis

Il DSM-5 classifica i quadri derivanti dal consumo di cannabis in base alla durata del consumo, quindi rispettivamente in acuti e cronici.

I disturbi che rientrano in fase acuta includono:

- L'intossicazione da cannabis;
- L'astinenza da cannabis;
- Un insieme di condizioni secondarie quali: delirium, psicosi, ansia e insonnia.

Nella fase cronica vengono raggruppati tutti quei disordini di carattere comportamentale che derivano da un prolungato consumo di cannabis e vengono raccolti sotto il disturbo da uso di cannabis.

L'intossicazione da cannabis si presenta con una varietà di effetti di carattere comportamentale e non che possono includere: uno stato di euforia, di ansia, risata incontrollabile, aumento dell'appetito, inattività, smemoratezza, irrequietezza, disturbi del sonno, tachicardia, iniezione congiuntivale e bocca secca. Sintomi meno comuni constano in delirio, allucinazioni e derealizzazione [37]. Non è ancora completamente chiaro perché alcuni individui sperimentino effetti psicologici positivi mentre altri soggetti sviluppino sintomi negativi, in ogni caso, il setting, le aspettative ed eventuali disordini psichiatrici concomitanti sembrano influenzare l'esperienza derivante dal primo consumo [38].

L'uso prolungato e la conseguente astinenza si associano, invece, a una condizione depressiva caratterizzata da apatia, perdita di motivazione, irritabilità, perdita di interesse per quelle che sono le attività quotidiane tipiche, difficoltà di concentrazione e isolamento. A ciò, si possono associare condizioni di dipendenza da altre sostanze e disturbi d'ansia. Nei casi più estremi, tali disordini di carattere affettivo possono addirittura sfociare in tentativi di suicidio o in episodi di violenza e tentati omicidi [37].

È interessante notare che uno studio a doppio cieco condotto da D'Souza e collaboratori, ha comparato gli effetti di varie dosi di THC somministrate rispettivamente a utilizzatori frequenti di cannabis e a non consumatori: è stato riscontrato come, mentre gli effetti psicologici, cognitivi e ansiogeni siano ridotti nei consumatori cronici, gli effetti d'euforia rimangano inalterati. Lo stesso studio ha rilevato come anche il livello di cortisolo risulterebbe più basso negli utilizzatori cronici. Queste scoperte tenderebbero, dunque, ad indicare una variabilità nello sviluppo della tolleranza ai diversi effetti del THC [39].

La diagnosi differenziale è rivolta verso il disturbo depressivo persistente e il disturbo depressivo maggiore e richiede la comprensione dell'intensità e della durata dei sintomi associati: la persistenza dei sintomi in un periodo di sobrietà, infatti, può indicare la presenza in comorbidità di un altro disturbo psichiatrico primario.

Al fine di trattare nella maniera più esaustiva possibile le condizioni cliniche fino ad ora analizzate, si riportano di seguito i criteri diagnostici come indicati nel DSM-5.

Intossicazione da cannabis: criteri diagnostici del DSM-5

- A Recente uso di cannabis.

- B Comportamento problematico clinicamente significativo o cambiamenti psicologici (per es., coordinazione motoria compromessa, euforia, ansia, sensazione di rallentamento del tempo, capacità critica compromessa, isolamento sociale) che si sviluppano durante, o subito dopo, l'uso della cannabis.

- C Due (o più) dei seguenti segni o sintomi, che si sviluppano entro due ore dall'uso della cannabis:
 - 1. Iperemia congiuntivale.
 - 2. Aumento dell'appetito.
 - 3. Secchezza delle fauci.
 - 4. Tachicardia.

- D I segni o sintomi non sono attribuibili a un'altra condizione medica e non sono meglio spiegati da un altro disturbo mentale.

- E Specificare se sono presenti i seguenti disturbi di carattere percettivo:
 - 1. Allucinazioni con esame della realtà intatto.
 - 2. Illusioni di carattere uditivo, visivo e tattile in assenza di delirium.

Astinenza da cannabis: criteri diagnostici del DSM-5

- A Cessazione dell'uso di cannabis che è stato pesante e prolungato (cioè abituale uso quotidiano o quasi, almeno per un periodo di alcuni mesi).
- B Tre (o più) dei seguenti segni e sintomi, che si sviluppano approssimativamente entro 1 settimana dopo il Criterio A:
1. Irritabilità, rabbia, aggressività.
 2. Nervosismo, ansia.
 3. Difficoltà del sonno (per es., insonnia, sogni inquietanti).
 4. Diminuzione dell'appetito o perdita di peso.
 5. Irrequietezza.
 6. Umore depresso.
 7. Almeno uno dei seguenti sintomi fisici causa malessere significativo: dolori addominali, instabilità/tremori, sudorazione, febbre, brividi, cefalea.
- C I segni o sintomi causano disagio clinicamente significativo o compromissione del funzionamento in ambito sociale, lavorativo o in altre aree importanti.
- D I segni o sintomi non sono attribuibili ad un'altra condizione medica e non sono meglio spiegati da un altro disturbo mentale compresa l'intossicazione o l'astinenza da un'altra sostanza.

Si noti come tali sintomi seguano un tipico pattern di presentazione temporale: i disturbi del sonno, i sintomi somatici e la diminuzione dell'appetito si presentano principalmente nei giorni iniziali di astinenza, seguiti da irritabilità, irrequietezza e ansia. L'aggressività e la rabbia sono prominenti, invece, dopo la prima settimana [40–42]. Altri sintomi rilevati includono sogni vividi e incubi, sensazione di incapacità nel raggiungere i propri scopi nella vita, cambiamenti della libido, noia e craving. Aumenti di appetito e di peso sono stati individuati nelle fasi più tardive [43, 44].

È necessario, infine, riportare come l'evidenza suggerisca che l'astinenza si presenti solo in un sottoinsieme di individui. I sintomi solitamente appaiono dopo le prime 24 ore, raggiungono il picco dopo 3 giorni e possono durare fino a 2 settimane [45].

Disturbo da Uso di Cannabis: criteri diagnostici del DSM-5

L'abuso di cannabis e la dipendenza da cannabis sono stati unificati nel DSM-5 in una singola patologia psichiatrica necessaria per descrivere i disordini del comportamento derivanti da un uso cronico di cannabis.

Tale viene denominato come disturbo da uso di cannabis (CUD) ed è definito da:

A Un pattern problematico di uso di cannabis che porta a disagio o compromissione clinicamente significativi, come manifestato da almeno due delle seguenti condizioni, che si verificano entro un periodo di 12 mesi:

1. La cannabis è spesso assunta in quantitativi maggiori o per un periodo più lungo di quanto fosse nelle intenzioni.
2. Desiderio persistente o sforzi infruttuosi di ridurre o controllare l'uso di cannabis.
3. Una gran parte del tempo è impiegata in attività necessarie a procurarsi la cannabis, usare la cannabis o recuperare dai suoi effetti.
4. Craving, o forte desiderio o spinta all'uso di cannabis.
5. Uso corrente di cannabis, che causa un fallimento nell'adempimento dei principali obblighi di ruolo sul lavoro, a scuola, a casa.
6. Uso continuato di cannabis nonostante la presenza di persistenti o ricorrenti problemi sociali o interpersonali causati o esacerbati dagli effetti della cannabis.
7. Importanti attività sociali, lavorative o ricreative vengono abbandonate o ridotte a causa dell'uso di cannabis.
8. Uso ricorrente di cannabis in situazioni nelle quali è fisicamente pericoloso.
9. Uso continuato di cannabis nonostante la consapevolezza di un problema persistente o ricorrente, fisico o psicologico, che è stato probabilmente causato o esacerbato dalla cannabis.
10. Tolleranza, come definita da ciascuno dei seguenti fattori:
 - a) Un bisogno di quantità marcatamente aumentate di cannabis per ottenere intossicazione o l'effetto desiderato.
 - b) Una marcata diminuzione dell'effetto con l'uso continuato della stessa quantità di cannabis.

11. Astinenza, manifestata da ciascuno dei seguenti fattori:
 - a) La caratteristica sindrome da astinenza di cannabis.
 - b) La cannabis viene assunta per attenuare o evitare sintomi di astinenza.

12. Gli specificatori adottati sono dati da:
 - a) In una condizione di remissione precoce: dopo aver soddisfatto pienamente i criteri diagnostici del disturbo da uso di cannabis, nessuno dei criteri deve essere più identificato per un tempo maggiore ai 3 mesi, ma minore ai 12 mesi (con l'eccezione del craving).
 - b) In una condizione di remissione protratta: dopo aver soddisfatto pienamente i criteri diagnostici del disturbo da uso di cannabis, nessuno dei criteri deve essere più identificato per un tempo maggiore o uguale ai 12 mesi (con l'eccezione del craving).

3.1.4 Neurobiologia: meccanismi cellulari e molecolari associati all'uso cronico di cannabis, alla tolleranza e alla dipendenza.

Il sistema degli endocannabinoidi

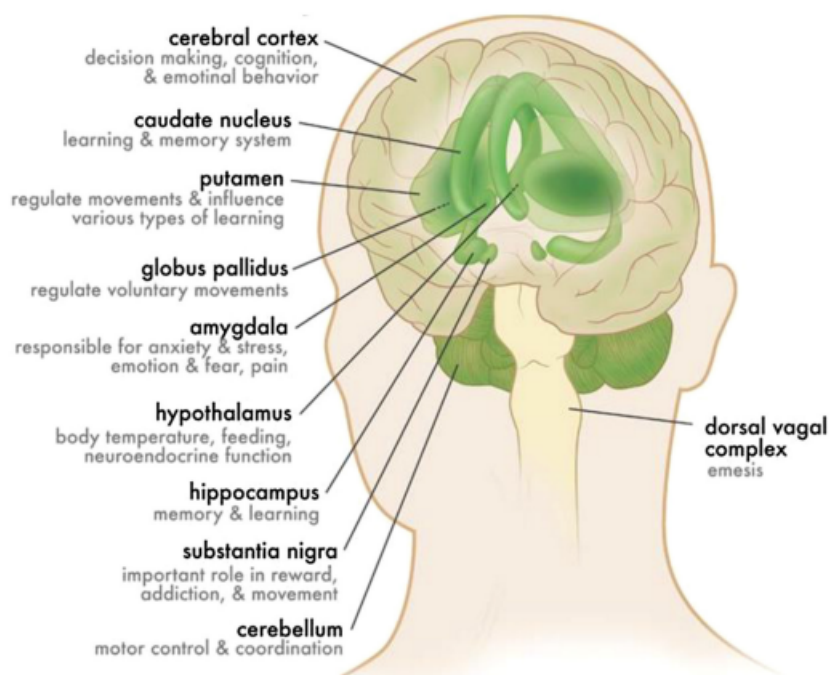


Figura 3.1: La distribuzione dei recettori CB1 a livello cerebrale [46].

Tutti gli effetti riguardanti l'utilizzo di cannabis si fondano sull'azione mediata dal THC a livello cellulare e molecolare. Il bersaglio primario di tale molecola è rappresentato da CB1, recettore accoppiato ad una proteina G; sebbene, infatti, l'azione si espleti anche a livello del recettore CB2, va considerato come questo sia di gran lunga meno espresso a livello del SNC e si riscontri principalmente a livello delle cellule del sistema immunitario (Figura 3.1) [47].

La complessità farmacologica di tale sistema, però, suggerisce che altri recettori GPCR abbiano un ruolo fisiologico rivelante. Negli ultimi anni, il GPR18 e il GPR55 sono emersi come potenziali membri mancanti della famiglia dei recettori cannabinoidi, anche se la loro espressione a livello dell'SNC è ancora non del tutto chiara. Anche la classe A dei recettori orfani GPCR, il GPR3, il GPR6 e il GPR12 sono stati associati con l'attività fisiologica mediata dai cannabinoidi [48]. A livello del CB1 e del CB2, il THC agisce come agonista parziale [49], tuttavia, esistono anche dei neurotrasmettitori endogeni che si legano a livello del CB1 stesso e che su tale recettore fondano la loro azione di

modulazione cerebrale, si tratta per l'appunto degli endocannabinoidi.

Gli endocannabinoidi più rappresentati e con effetto più prominente sul SNC sono l'anandamide [50] e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) [51] che vengono sintetizzati rispettivamente dall'*N*-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasi D e dalla diacilglicerolo lipasi [52] a partire dalla degradazione di lipidi contenenti acido arachidonico (Figura 3.2).

Tali neurotrasmettitori vengono poi degradati rispettivamente dalla amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH) [53] e dalla monoacilglicerol lipasi (MGL) [54].

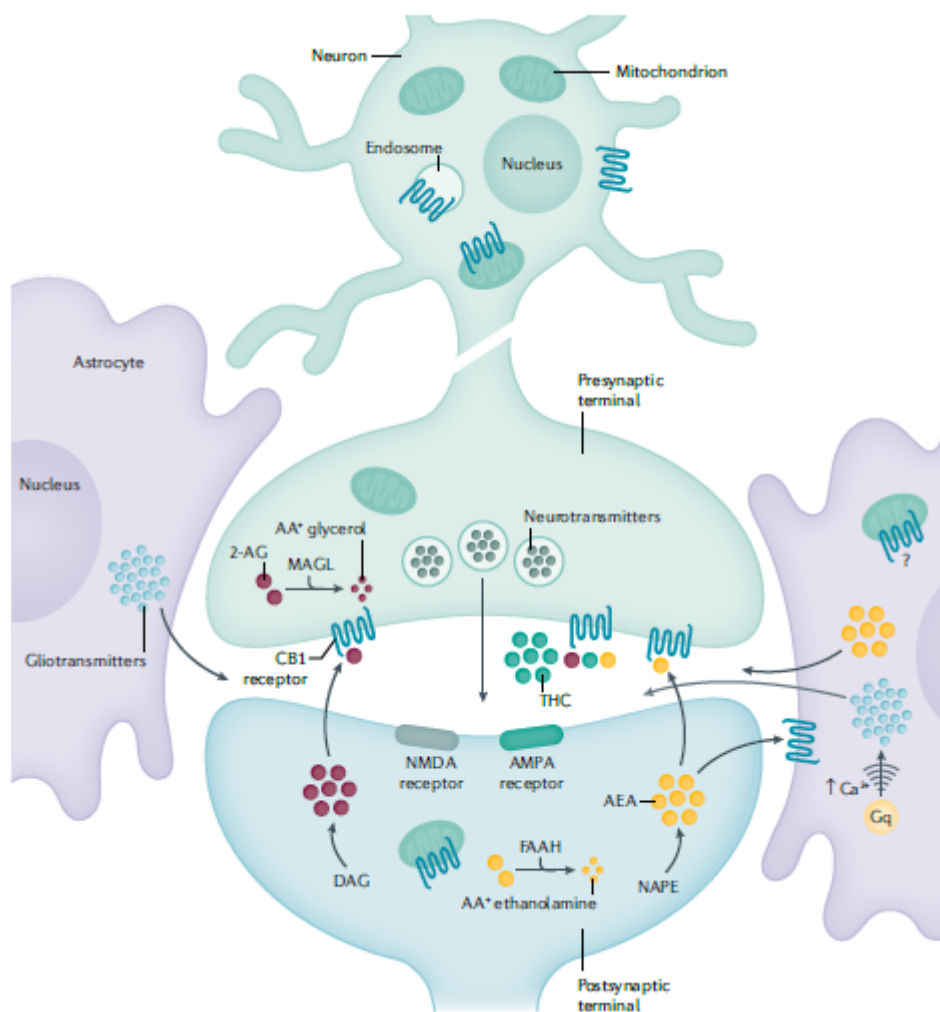


Figura 3.2: *Signaling del recettore CB1 mediato dagli endocannabinoidi [55].*

Questi due endocannabinoidi possono essere prodotti a livello di diverse tipologie di cellule nervose, ma anche a livello del resto dell'organismo; il rilascio sembra poi avvenire mediante secrezioni juxtacrine sulle cellule circostanti [56]. Si tratta, inoltre, di molecole implicate nell'attivazione della via della

ciclossigenasi-2 che, attraverso un processo di ossidazione, porta alla produzione di prostaglandine, con conseguente attivazione della cascata della mitogen-activated protein kinase (MAPK) e dell'inositolo 1,4,5-trifosfato [57].

Le vie di trasduzione del segnale del THC

Concentrandosi ora sui meccanismi cellulari propri del processo d'interazione del THC e degli endocannabinoidi con CB1, che si tradurrà, infine, in una modulazione della funzione cerebrale, ci si accorge come questo vada a determinare l'attivazione di numerose vie di trasduzione del segnale.

Il primo processo intracellulare consta nell'attivazione della pathway attraverso la proteina G recettoriale, costituita dalle subunità α o α_0 e dal complesso β/γ .

In seguito, le subunità α svolgono un'azione inibitrice a livello dell'adenilato ciclasi, comportando la diminuzione dei livelli di cAMP intracellulare, a cui consegue un decremento dell'attivazione degli enzimi a valle come le proteinchinasi cAMP-dipendenti (PKA) e fattori di scambio attivati direttamente da cAMP (EPAC) [58].

La liberazione del complesso delle subunità β/γ porta invece al legame di questo con diversi canali ionici, a cui consegue l'inibizione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti e l'attivazione dei canali del potassio [59, 60].

Tale complesso può, per di più, andare ad attivare alcune isoforme della fosfolipasi C [61].

Altri target inclusi nella cascata d'attivazione del CB1 sono la β -arrestina [62], la precedente menzionata MAPK, vari canali ionici e altre chinasi implicate nella regolazione extracellulare.

La risposta generatasi può influenzare una moltitudine di processi cellulari, sia di tipo neurofisiologico, sia di scambio proteico che di espressione genica [63]. Sembra, inoltre, che il tipo di reazione ottenuta sia dipendente dalle tipologie di neurone interessato.

A livello cerebrale, la maggior parte delle funzioni mediate dai recettori CB1 sono da imputarsi ai recettori collocati a livello delle terminazioni presinaptiche e il funzionamento di questi si basa su un meccanismo retrogrado di trasmissione del segnale. A seguito dell'attivazione del neurone post-sinaptico, avviene il rilascio di cannabinoidi endogeni a livello dello spazio intersinaptico che vanno ad interagire col neurone presinaptico. Qui, l'attivazione dei CB1 determina la riduzione del rilascio neurotrasmettitoriale attraverso l'effetto inibitorio espletato sui canali del calcio voltaggio-dipendenti e sul meccanismo di

rilascio vescicolare.

Altre localizzazioni tipiche, a livello cerebrale, sono state identificate a livello astrocitario, mitocondriale e nei compartimenti somatodendritici dei neuroni. Il principale locus di espressione dei CB1 è situato a livello delle sinapsi GABAergiche e glutammatergiche [54]. In questi circuiti complessi, i cannabinoidi agiscono modulando lo stato eccitatorio neuronale attraverso la regolazione del rilascio di glutammato (determinante un effetto eccitatorio) e GABA (determinante un effetto inibitorio); la risultante finale dipenderà, dunque, da molteplici fattori, includenti: il numero di recettori collocati rispettivamente su entrambe le tipologie di neuroni, l'anatomia del circuito locale e l'efficacia del signaling a livello di ciascun neurone, la quale potrà variare in base all'area cerebrale interessata.

Inoltre, altri neurotrasmettitori e modulatori vengono regolati dal recettore CB1, come ad esempio la noradrenalina e l'acetilcolina, ma anche la serotonina [64].

Attraverso questo meccanismo, i recettori CB1, attivati dal THC, gestiscono gli input e gli output dei circuiti cerebrali menzionati, comportando così profondi effetti a livello del comportamento, del dolore, dell'appetito, ma anche a livello motorio, della memoria, del sonno e dei meccanismi di risposta allo stress [38].

Il THC e il circuito della ricompensa

Esposizioni acute alla cannabis possono risultare in un'attivazione del circuito di ricompensa che richiama il pattern tipico delle droghe d'abuso.

Il componente che più si contraddistingue in tal senso è dato dalle proiezioni dopaminergiche che dall'area tegmentale ventrale (VTA) vanno al nucleus accumbens (NAc), le quali sono cruciali per il meccanismo di riconoscimento della ricompensa e per l'avviamento del soggetto al pattern di consumo. In aggiunta, alcuni neuroni dalla VTA si portano all'ippocampo (HIPP) e alla corteccia prefrontale (PFC) e partecipano in questo modo alla regolazione delle altre regioni del circuito stesso.

Oltre alle proiezioni di carattere dopaminergico sopra menzionate, il nucleus accumbens riceve un insieme di innervazioni di tipo glutammatergico dalla corteccia prefrontale, dall'amigdala basolaterale (BLA), dall'ippocampo e dal nucleo del letto della stria terminalis (BNST).

Esiste, quindi, una ricca interconnessione glutammatergica tra queste aree che consente l'esecuzione di complesse funzioni di carattere affettivo e cognitivo,

come la formazione e il recupero di memorie di paura e ricompensa contestuali ad una certa esperienza.

Altri neuroni GABAergici sono stati identificati all'interno della VTA stessa ed altri proiettano dal nucleo accumbens alla VTA attraverso una pathway diretta e una indiretta passante attraverso il pallido ventrale (VP). Questi neuroni agiscono come potenti regolatori dell'attività dopaminergica della VTA e in tal modo regolano i comportamenti associati alla ricompensa e alla repulsione (Figura 3.3) [55].

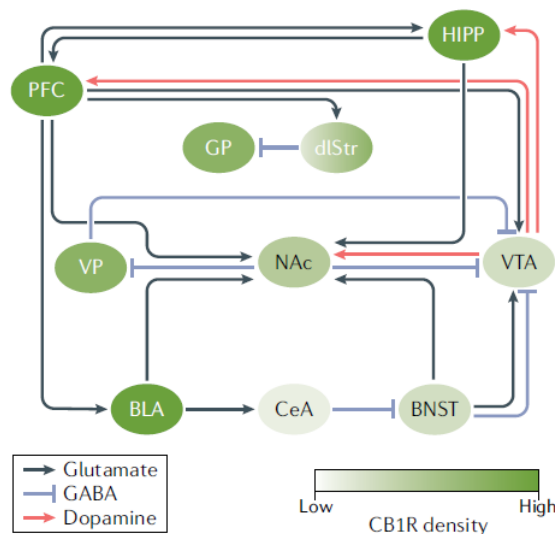


Figura 3.3: Il circuito della ricompensa: oltre ai componenti già indicati nel testo, in immagine si possono individuare le proiezioni GABAergiche che dipartono dal nucleo centrale dell'amigdala (CeA) e quelle che dallo striato dorsolaterale (dlStr) proiettano al globo pallido (GP) [65].

La stimolazione dei recettori CB1 comporta l'attivazione del sistema dopaminergico, il quale è implicato nella genesi del senso di ricompensa riguardante molte droghe. Nonostante i recettori CB1 siano ampiamente espressi a livello cerebrale, questi non si collocano a livello dei neuroni dopaminergici mesencefalici [64]. Si pensa, dunque, che il THC influenzi la scarica di tali neuroni mediante un meccanismo indiretto che si conclude con un incremento dell'attività dopaminergica.

Come precedentemente riportato, nell'area ventrale tegmentale, i recettori CB1 si collocano per lo più a livello dei neuroni GABAergici. Le più moderne teorie sostengono che l'azione mediata dal THC a livello presinaptico, sui neuroni GABAergici della VTA, inibisca il rilascio di GABA, permettendo ai neuroni dopaminergici della VTA di scaricare [66]. Alcuni studi di imaging, inoltre, svolti mediante PET sugli esseri umani, mostrano come il THC incrementi

significativamente il rilascio di dopamina nello striato limbico [67], anche se questo risulta essere molto inferiore rispetto a quello scatenato da altre droghe psicotrope, simulando invece quello prodotto dall'alcol [68].

I meccanismi di astinenza nel consumo di cannabis

Partendo dal presupposto che l'esposizione del CB1 al THC porti ad un decremento dell'attività sinaptica, una riduzione dell'espressione del recettore sulla superficie cellulare delle terminazioni presinaptiche potrebbe essere considerato come meccanismo alla base della tolleranza.

A supporto di ciò, alcuni studi, svoltisi attraverso misurazioni con radioligandi, indicherebbero una downregolazione recettoriale in diverse aree cerebrali, tra le quali il cervelletto, il globo pallido e lo striato [69].

Altri studi svolti su esseri umani, mediante l'utilizzo di PET, indicano un decremento della disponibilità recettoriale nei consumatori regolari di cannabis, sebbene i livelli del recettore sembrino ritornare al valore di controllo dopo una prolungata astinenza in tutte le regioni cerebrali esaminate eccetto che nell'ippocampo [4, 5]. Inoltre, utilizzando neuroni ippocampali in colture primarie, Coutts e collaboratori hanno dimostrato come l'esposizione cronica all'agonista CB1 comporti un decremento dell'espressione recettoriale sulla superficie cellulare all'immunoistochimica [70].

Nuove tecniche di imaging ad ultra-risoluzione sono state impiegate in tali analisi: servendosi della microscopia a ricostruzione ottica stocastica (STORM), Katona e collaboratori hanno misurato il quantitativo recettoriale localizzato sulla superficie terminale assonale e all'interno delle sinapsi GABAergiche dell'ippocampo. Per di più, in tal modo si è dimostrato come ripetute esposizioni al THC riducano l'esposizione del CB1 sulla superficie cellulare in maniera dose-dipendente, e come il recupero richieda diverse settimane dopo la cessazione dell'esposizione al THC [71].

Variazioni del quantitativo circolante di mRNA, codificante per CB1, sono meno consistenti [72], forse ad indicare che la downregolazione recettoriale non includa modifiche a livello trascrizionale o relative alla stabilità del mRNA stesso. In ogni caso, decrementi dell'espressione dell'mRNA sono stati osservati nello striato durante e dopo un'esposizione cronica al THC [73].

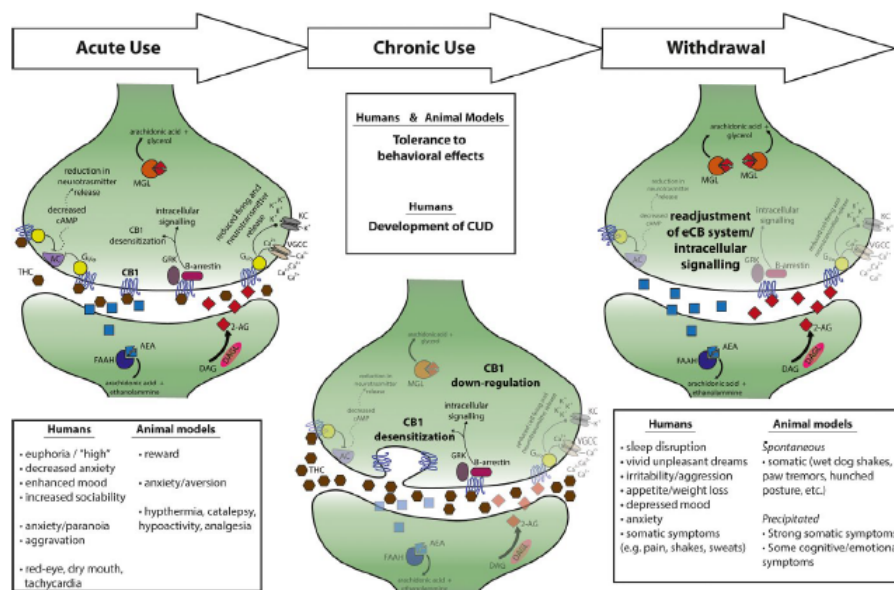


Figura 3.4: Alterazioni cellulari associate all'astinenza: si noti come l'utilizzo cronico comporti una desensibilizzazione e una down-regolazione del CB1, a cui segue, all'instaurarsi della dipendenza, una modifica del signaling intracellulare e dell'espressione degli endocannabinoidi.

Vengono, inoltre, riportati i sintomi tipici relativi ad ogni fase del consumo [74].

Si prendano ora in considerazione altri meccanismi esaminati che coinvolgono alterazioni a livello del signaling intracellulare.

Alcuni studi svolti su ratti, esprimenti una mutazione del recettore CB1 implicata in un meccanismo di resistenza all'attività di fosforilazione recettoriale delle GRK [75], mostrano un ritardo nello sviluppo della tolleranza ad alcuni effetti del THC ed effetti simili sono stati osservati in topi knockout per la β -arrestina [76]. Queste scoperte indicherebbero che la funzione GRK arrestina-associata potrebbe essere coinvolta nel trafficking/inattivazione recettoriale associato all'instaurarsi della tolleranza.

Anche l'attivazione delle GTP γ recettore-dipendente diminuisce a seguito dell'esposizione cronica al THC: questo supporta l'idea che anche il primo step della pathway intracellulare CB1-stimolata, coinvolgente la dissoluzione delle proteine G, sia influenzato da un meccanismo di tolleranza che segue a una duratura attivazione recettoriale [77].

Sempre secondo studi inerenti al signaling, l'aumentata funzione di isoforme dell'adenilato ciclasi, inibite fisiologicamente, potrebbe contribuire all'instaurarsi della tolleranza [78], così come la fosforilazione di CB1 mediata dalla c-Jun chinasi terminale [79].

Pochi studi al giorno d'oggi sono andati ad analizzare l'effetto del consumo cronico del THC sugli endocannabinoidi e un loro possibile ruolo nell'insorgere della tolleranza. Questi sembrano aver individuato che esposizioni croniche al THC, a dosaggi che conducono a tolleranza nel ratto, risultino in un decremento dei livelli tissutali di AEA e 2-AG nello striato, misurate attraverso cromatografia liquida ad alta prestazione-spettrometria di massa. In contrasto, i livelli di AEA risultano incrementati nel limbico frontale [80].

Un aumento dell'espressione degli mRNA della monoacilglicerolo lipasi è stato osservato nell'ipotalamo a seguito dell'esposizione cronica al THC mentre per il FAAH non sono state individuate alterazioni significative rispetto ai controlli (Figura 3.4) [81, 82].

Anche per gli oppioidi endogeni sembra esserci un'abbondante evidenza riguardo un loro ruolo nella genesi della dipendenza da cannabinoidi. Studi condotti su topi geneticamente modificati, al fine di sopprimere la sintesi del precursore oppioide proencefalina, dimostrano come la crisi d'astinenza suscitata dall'antagonista cannabinoide sia di entità minore rispetto ai controlli [83]. Risultati simili sono stati ottenuti in topi deficitari per il recettore μ degli oppioidi [84]. Ulteriori analisi identificano un meccanismo di cross-tolerance bidirezionale tra la morfina e il THC in modelli murini [85, 86]: l'esposizione cronica al THC, ad un quantitativo determinante tolleranza (misurata come un diminuito effetto analgesico), sembra essere in grado di prevenire la soppressione dell'espressione recettoriale quando somministrato congiuntamente a un trattamento cronico con morfina [86, 87]. In ultima, alcuni studi sembrano aver identificato un'alterata espressione dei livelli e della funzione dei recettori μ nelle regioni cerebrali connesse al fenomeno di ricompensa in ratti trattati con THC o agonista [88, 89].

Anche il fattore di rilascio della corticotropina (CRF) sembra essere influenzato da numerose droghe d'abuso. Questo subisce un incremento a livello dell'amigdala centrale durante la crisi d'astinenza mediata dall'antagonista, a seguito di una esposizione cronica a cannabinoidi sintetici [90]. Incrementi di mRNA codificanti per CRF sono stati, inoltre, individuati a livello dell'ipotalamo a seguito di un'esposizione cronica a THC o ad agonista. Tale neuropeptide, coinvolto nelle reazioni stress-related, potrebbe contribuire, quindi, alla genesi dei sintomi dell'astinenza [91, 92].

3.2 Studi di connettività funzionale in fMRI

La necessità di identificare una corrispondenza anatomo-funzionale tra le lesioni cerebrali implicate nella genesi delle patologie neuropsichiatriche e i quadri clinici rilevati è stata per molto tempo base di ricerca di numerosi studi e ha portato ad importanti progressi nel campo delle tecniche di imaging adoperate. La risonanza magnetica funzionale, in tal senso, ricopre un ruolo centrale: grazie all'introduzione di questa tecnica diagnostica, infatti, e di altre quali PET e SPECT, è stato possibile, per la prima volta, mappare aree cerebrali in modo non invasivo [93].

Dalla sua introduzione nel 1990, la risonanza magnetica funzionale è stata utilizzata in un quantitativo eccezionale di studi, sia nell'ambito delle scienze cognitive, sia in ambito psichiatrico, ma anche nell'impiego clinico come metodo di pianificazione preoperatorio.

La popolarità della fMRI deriva certamente dalla sua diffusa versatilità, dato che può essere svolta anche su uno scanner da 1.5 T, ma soprattutto dal fatto che risulta essere una tecnica non invasiva e che non richiede l'iniezione di radioisotopi e di altri agenti farmacologici, garantendo, inoltre, una migliore risoluzione temporale e spaziale rispetto ad altre tecniche di imaging, come le precedenti citate SPECT e PET [94].

Per l'appunto, mentre queste ultime utilizzano traccianti come marker diretti dell'attività neuronale, la fMRI visualizza il cambiamento di stato dell'emoglobina conseguente al metabolismo cerebrale: è, quindi, una tecnica indiretta che sfrutta il cosiddetto *accoppiamento neuro-vascolare*, dal quale nasce il contrasto di immagine di tipo *blood oxygenation level dependent (BOLD)*, descritto per la prima volta da Ogawa e collaboratori nel 1990 [95].

3.2.1 Il sistema BOLD

La fMRI rientra tra quelle che sono le tecniche di acquisizione dell'immagine basate sull'uso dell'imaging a risonanza magnetica (MRI) e, come tale, fonda il suo funzionamento sulle metodiche d'acquisizione di tale categoria. Quando esposti ad un campo magnetico statico di elevata intensità, i protoni emettono un segnale che può venire a sua volta modulato dalla somministrazione di una sequenza di impulsi a radiofrequenza: utilizzando gradienti diversi è, così, possibile elaborare diverse immagini incorporanti differenti tipologie di contrasto [96,97].

Come precedentemente accennato, la fMRI si serve in modo preponderante di un particolare contrasto, ovvero il sistema BOLD. Al fine di comprenderne il funzionamento, però, è necessario prima aprire una parentesi riguardo il metabolismo cerebrale, il quale si basa fondamentalmente sulla glicolisi aerobia: i neuroni, infatti, usano glucosio e ossigeno per produrre l'adenosina trifosfato (ATP) e svolgere le loro funzioni cellulari primarie [93]. La produzione di tale nucleotide esita, inoltre, nella produzione di diossido di carbonio come effetto secondario.

Si consideri ora un soggetto intento a completare un determinato compito: lo svolgimento di tale attività richiede l'attivazione simultanea di diversi neuroni in una particolare area cerebrale e, dunque, un aumento dell'attività metabolica, del fabbisogno energetico e del rateo metabolico cerebrale di O_2 ($CMRO_2$) [98]. La produzione di CO_2 e di altri prodotti secondari, come ossido nitrico e ioni idrogeno, conduce, poi, ad un rilassamento della muscolatura liscia del letto capillare con conseguente vasodilatazione e aumento del flusso di sangue ossigenato alle aree cerebrali: in questo modo si colma il gap energetico precedentemente generatosi. Importante è, però, considerare che, per ragioni ancora non del tutto comprese, il quantitativo di ossigeno fornito in questo punto del processo risulta essere maggiore rispetto a quanto richiesto per compensare la lacuna metabolica.

Ricapitolando, dunque, l'attivazione neurale risulta inizialmente in un aumento della deossiemoglobina (Hb) e nella diminuzione dell'emoglobina ossigenata (HbO_2) negli spazi intra ed extravascolari, seguito dopo pochi secondi da una risposta vasodilatatoria che permette un'inversione di tale situazione. [99,100].

Comprese tali nozioni, è possibile delineare quelle che sono le due conseguenze primariamente derivate dall'attività neurale, ossia:

- L'incremento del flusso sanguigno cerebrale locale (CBF).
- Le variazioni della concentrazione di ossigeno a livello locale (BOLD).

Entrambe possono essere rilevate dall'MRI.

L'incremento del CBF si osserva attraverso l'iniezione di un agente di contrasto con la *perfusion-weighted imaging (PWI)* [101] o con l'*arterial spin labeling (ASL)* [102], ma soffre di ridotta sensibilità, aumento dei tempi d'acquisizione e una maggiore sensibilità al movimento se comparato al contrasto BOLD.

Quest'ultimo si ottiene, invece, dalle variazioni del campo magnetico che circonda gli eritrociti e che dipende dallo stato d'ossigenazione dell'emoglobina. Quando completamente ossigenata, l'emoglobina si comporta, infatti, in maniera diamagnetica ed è magneticamente indistinguibile dal resto del tessuto cerebrale, presentando così momento magnetico nullo e non in grado di interferire col campo magnetico statico B_0 . Se invece l'emoglobina si trova in uno stato di totale disossidazione, si presenta con quattro elettroni spaiati, risultando altamente paramagnetica e con momento diverso da zero, rendendola, così, capace di interferire col campo magnetico statico B_0 (Figura 3.5) [103].

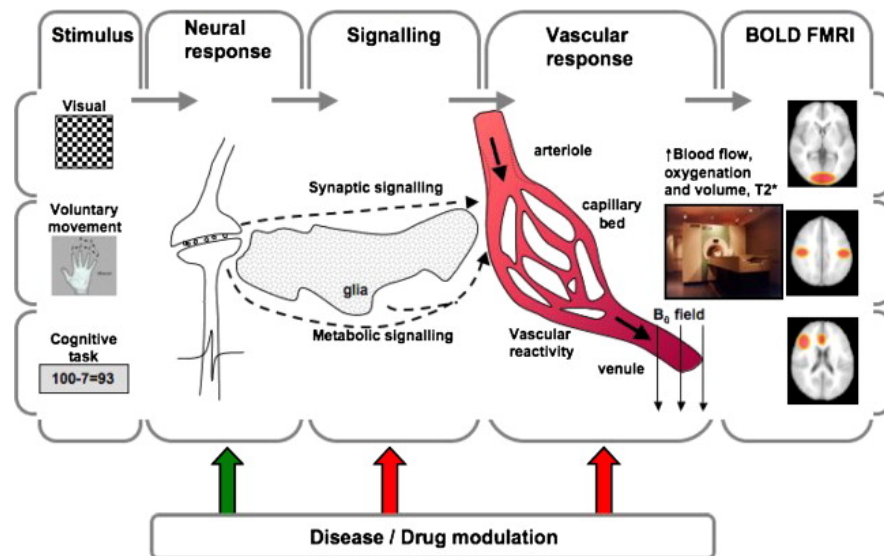


Figura 3.5: Illustrazione schematica del funzionamento del contrasto BOLD: in figura si identificano anche le fasi del meccanismo in cui possono interferire potenziali condizioni patologiche o farmaci/droghe [104].

Le proprietà paramagnetiche della deossiemoglobina possono fungere, perciò, come gradiente, la cui intensità dipenderà dalla concentrazione di emoglobina presente nell'area considerata. Tale gradiente andrà a modulare le sequenze $T2^*$, particolarmente sensibili al paramagnetismo, provocandone una caduta di segnale.

Con la conseguente vasodilatazione locale e diluizione della deossiemoglobina, si ottiene, poi, un aumento relativo della ossiemoglobina, di conseguenza, una minor distorsione del campo magnetico statico, una minor velocità di decadimento della magnetizzazione trasversale e un incremento del segnale $T2^*$. Se lo stimolo è breve, il segnale torna ai valori basali dopo un breve periodo di *undershoot*; al contrario, se lo stimolo è prolungato, il segnale BOLD raggiunge una fase di stazionarietà fino al termine dello stimolo stesso, quindi, esso torna ai livelli di base (Figura 3.6) [93].

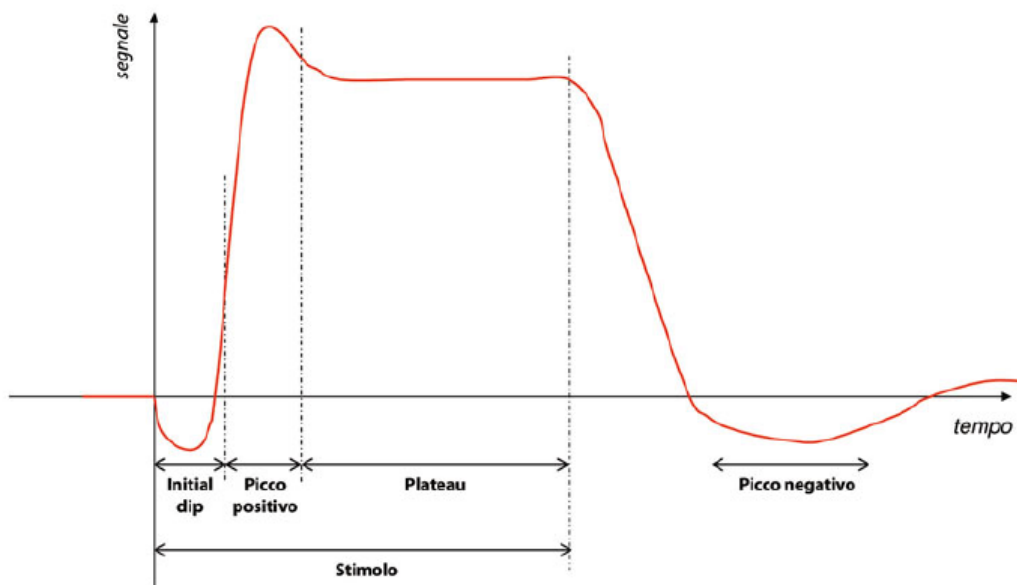


Figura 3.6: La curva del sistema BOLD [93]

Per quanto concerne l'acquisizione del segnale, con campi magnetici di 1.5 T e 3 T, vengono utilizzate solitamente *sequenze rapide echo-planari $T2^*$ -pesate (GE-EPI)*, caratterizzate da una bassa risoluzione spaziale, ma da elevata velocità di acquisizione [105]. Un'acquisizione standard con un campo magnetico di 3 T può arrivare ad una risoluzione temporale di 2-3 s e una risoluzione spaziale di 3-5 mm.

Con campi magnetici di intensità maggiore, invece, studi hanno iniziato a preferire il *contrasto pesato in diffusione* sul tempo di rilassamento $T2$, rispetto al BOLD, il quale permette una migliore discriminazione spaziale,

soprattutto se accostato all'utilizzo delle più moderne sequenze *spin-echo* (*SE-EPI*) [106, 107]. In questo modo, infatti, si sfrutta la capacità delle SE-EPI di conferire alle immagini con contrasto legato al rilassamento trasversale un reale contrasto T2-dipendente, eliminando i contributi che determinano un rilassamento trasversale T2* [93].

Altre innovazioni tecnologiche più recenti constano nell'utilizzo delle *sequenze multiband accelerated EPI* che permettono l'acquisizione di diverse sezioni simultaneamente. Questi approcci permettono un miglioramento ulteriore della risoluzione spaziale che raggiunge, così, limiti di 2mm, e della risoluzione temporale che raggiunge, in tal maniera, valori limite di acquisizione di 1 sezione ogni mezzo secondo [108, 109]: una migliore risoluzione temporale è, infatti, necessaria per migliorare la sensibilità statistica e aumentare il quantitativo di informazioni estrapolabile dai dati riguardanti la dinamica neurale.

Nonostante ciò, l'insita latenza della risposta emodinamica all'attivazione cerebrale porrà sempre un limite all'utilità dell'introduzione di ulteriori progressi tecnologici [110, 111].

3.2.2 Modelli di studio in fMRI

Nella precedente sessione si è andati ad analizzare i metodi d'acquisizione dell'immagine in fMRI, tuttavia una domanda sorge ora spontanea: attraverso quali metodologie è possibile sfruttare a pieno il potenziale del sistema BOLD, al fine di ottenere risultati solidi e riproducibili?

Con tali premesse è necessario ora andare ad affrontare il macroargomento dei disegni sperimentali in fMRI, concentrandosi in particolar modo sui modelli di studio in resting-state, la cui trattazione si rivelerà fondamentale per comprendere a pieno il lavoro svolto in questa tesi.

In generale, in fMRI si può procedere attraverso due tipologie di disegni di studio: i task-based e i resting-state.

Studi in resting-state design

Una tipologia di modello di studio in fMRI consiste nell'applicazione delle tecniche di MRI a riposo: si tratta appunto di quelle che vengono definite come *analisi di resting-state fMRI* o *di connettività funzionale*.

La rs-fMRI si occupa di identificare le attivazioni sincrone tra regioni distinte, senza stimolare il soggetto attraverso una task cognitiva, andando così a mappare i *resting-state network (RSN)* [112].

Al fine di comprendere il funzionamento di tali tecniche, bisogna considerare che le immagini in fMRI, ottenute utilizzando il contrasto BOLD, mostrano fluttuazioni del segnale anche in condizioni di riposo. Queste fluttuazioni a basse frequenze (0.01-0.05 Hz) sono dovute ad una attività basale neurale spontanea, fondamentale per il mantenimento dell'organizzazione e per lo sviluppo delle reti neurali [113], che si dimostra essere coerente tra regioni cerebrali strutturalmente distinte, ma con funzionalità correlata [114–116].

Regioni che mostrano fluttuazioni coerenti possono, così, essere raggruppate all'interno dello stesso RSN, ognuno contraddistinto da un segnale con diverso andamento temporale [117].

Gli RSN persistono anche durante il sonno profondo [118] e accomunano soggetti [119] e, in alcuni casi, anche specie diverse [120].

Si prosegue, ora, elencando i principali RSN conosciuti e i loro corrispettivi componenti anatomici (Figura 3.7):

- Il primo RSN ad essere stato riconosciuto risulta nel *default mode network (DMN)*, individuato per la prima volta da Raichle e collaboratori attraverso uno studio in PET [121] e in seguito confermato da Greicius e collaboratori con studi in fMRI [117].

Si tratta di un insieme di regioni cerebrali più attive a riposo che durante la performance di compiti cognitivi. Studi hanno ipotizzato l'esistenza di due grandi sistemi cerebrali in opposizione tra loro, uno dato dal DMN e l'altro composto da RSN attivi durante l'esecuzione di compiti di tipo cognitivo, somatosensoriale, visivo o che richiedano un ruolo dell'attenzione [122].

- Il *somatomotor network* include tutte le aree motorie e sensoriali primarie e secondarie [114].
- Il *visual network* si estende nella maggior parte della corteccia occipitale [119].
- L'*auditory network* è costituito dal giro di Heschl, dal giro temporale superiore dall'insula posteriore [123].
- Il *language network* interessa le aree di Broca e di Wernicke, ma si estende anche alle regioni prefrontali, temporali, parietali e subcorticali [124].

- Il *dorsal attention network*, formato dal solco intraparietale e dal campo oculare frontale, si occupa del controllo esecutivo [125].
- Il *ventral attention network* racchiude la giunzione temporo-parietale e la corteccia frontale ventrale e si attiva quando uno stimolo si presenta inaspettatamente (ad esempio quando questo appare al di fuori del focus dell'attenzione spaziale) [125].
- Il *frontoparietal control network* è dato dalla corteccia prefrontale laterale e dal lobo parietale inferiore. È coinvolto nei processi di decision-making [126].
- Il *cingulo-opercular network*, composto dalla corteccia frontale superiore mediale, dall'insula anteriore e dalla corteccia prefrontale anteriore, gioca un ruolo fondamentale nell'esecuzione di compiti diretti ad uno scopo [127].

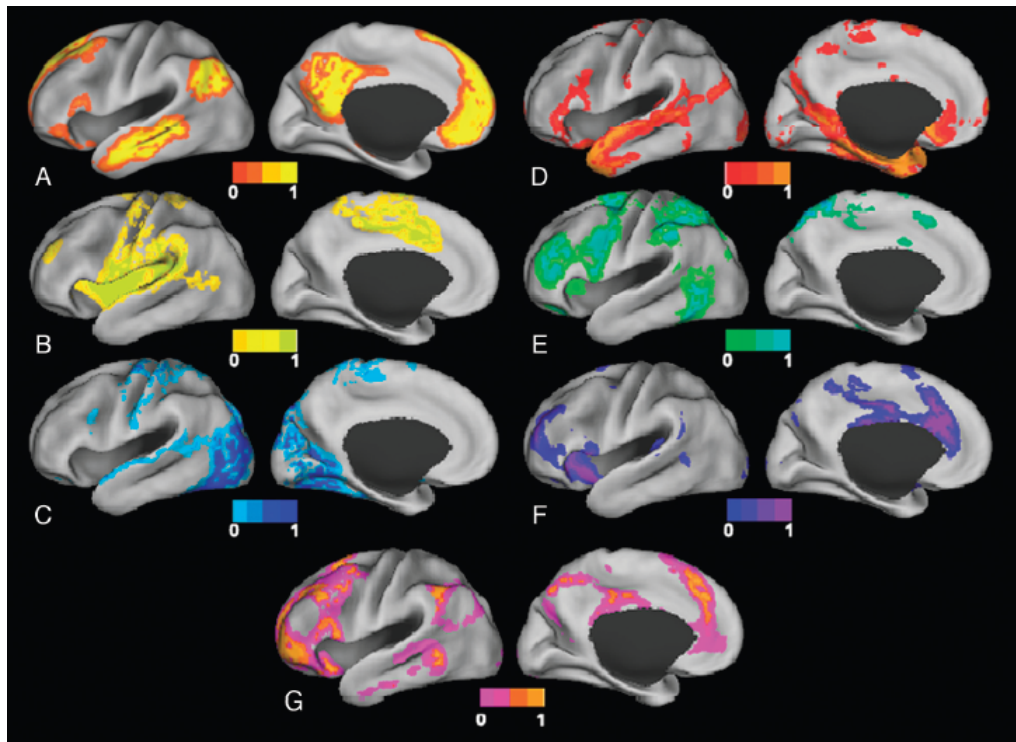


Figura 3.7: Mappatura dei principali RSN: A) *Default mode network*. B) *Somatomotor network*. C) *Visual network*. D) *Language network*. E) *Dorsal attention network*. F) *Ventral attention network*. G) *Frontoparietal control network*. [112].

Oltre a fornire nuove informazioni riguardo la struttura e la funzione del cervello sano, gli studi rs-fMRI hanno dimostrato di avere un potenziale valore clinico, fornendo possibili marcatori di malattia [128].

Un lavoro recente ha dimostrato la capacità di questi di riflettere il livello di compromissione dello stato di coscienza in soggetti con danno cerebrale, rilevando una correlazione negativa tra la connettività del DMN e il livello di coscienza [129].

In altri casi, gli studi rs-fMRI sono stati sfruttati per studiare pazienti con malattie psichiatriche, come il disturbo depressivo maggiore [130] e la schizofrenia [131]. Simile utilizzo se ne è fatto al fine di studiare pazienti con autismo [132] e deficit di attenzione [133].

La principale critica volta a questo modello riguarda la possibilità che le fluttuazioni a basse frequenze individuate non siano diretta conseguenza dell'attività neurale, ma riflettano, invece, movimenti fisiologici dovuti all'atto respiratorio, al battito cardiaco o ancora alla modulazione del tono vasale [134, 135]. Studi sono stati svolti al fine di portare chiarezza in merito, aumentando la frequenza di campionamento dell'immagine e aggirando in tal modo il problema dell'aliasing dovuto al basso sampling rate della fMRI. Si è così definito come, sebbene alcune fluttuazioni siano chiaramente dovute al rumore di fondo dei cicli cardio-respiratori, eliminando tali distorsioni dal segnale fMRI, sia possibile identificare, comunque, l'esistenza di una coerenza nei pattern di scarica caratterizzanti le regioni costituenti lo stesso RSN. Ciò starebbe ad indicare che il rumore di fondo prodotto dai processi fisiologici menzionati sia un processo fenomenologicamente distinto rispetto al segnale prodotto dall'attivazione neurale [114, 134].

Altri importanti quesiti da considerare riguardano la riproducibilità e la variabilità intersoggettiva. Studi suggeriscono come gli RSN possano essere individuati in modo affidabile tra diverse sessioni di imaging e tra diversi soggetti [136, 137]. A tal fine, Chou e collaboratori sono andati ad esaminare la riproducibilità degli studi rs-fMRI lungo un anno, rilevando una correlazione intra-classe maggiore di 0.60 per il 70% dei networks esaminati [138].

La maggior parte degli esperimenti in resting-state necessita che i partecipanti rimangano all'interno dello scanner per un periodo di diversi minuti, a riposo e senza specifici stimoli esterni. Sebbene l'impostazione di questa tipologia di esperimenti possa sembrare semplice, è necessario che il ricercatore fornisca delle istruzioni chiare al soggetto esaminato. L'individuo viene, così, istruito a tenere gli occhi chiusi o aperti fissando un punto o una croce di fissazione, cer-

cando per quanto possibile di non pensare a niente e di non addormentarsi. Le istruzioni appaiono, perciò, molto semplici e non particolarmente impegnative, facilitando in questo modo la comparazione tra soggetti di gruppi differenti (controlli e pazienti) e rendendo l'esperimento più facilmente standardizzabile. Tale modello appare, quindi, particolarmente vantaggioso in quegli studi di popolazione che vanno a indagare gruppi particolarmente differenti per capacità cognitive e comportamentali, in quanto la semplicità del compito stesso lo rende agevolmente realizzabile anche per soggetti con particolari disfunzioni cognitive (si pensi ad esempio ad un paziente affetto da schizofrenia) [139].

3.2.3 Componenti fondamentali delle analisi in fMRI

Pre-processing dei dati in fMRI

Il pre-processing consiste in una serie di passaggi che devono essere applicati ai dati al fine di renderli adatti alle successive analisi.

Con l'eccezione della correzione del movimento, tutti gli step che compongono tale fase si possono considerare opzionali e la loro introduzione all'interno dello studio dipende solo dalle necessità del ricercatore e dalla tipologia dei dati disponibili.

Un'altra fase anticipa, però, il pre-processing: lo scarto delle immagini acquisite nella prima decina di secondi della sessione. Tale accorgimento è dovuto al fatto che la macchina necessita di detto tempo per raggiungere un equilibrio nella magnetizzazione e stabilizzare così i gradienti. Le prime immagini saranno, perciò, soggette ad importanti alterazioni del segnale e, quindi, all'introduzione di maggiori distorsioni.

Si procede, di seguito, con l'elenco dei principali componenti:

- Il *quality control* consiste nel primo componente fondamentale del pre-processing e dovrebbe essere svolto in ogni fase per permettere l'individuazione e la rimozione di potenziali artefatti. Questo può essere elaborato manualmente o attraverso l'utilizzo di appositi pacchetti di analisi.

All'interno della stessa sessione di acquisizione dei dati grezzi, infatti, si possono introdurre diverse tipologie di artefatti, dovute a difetti intrinseci allo scanner stesso. Esempi sono dati dalle *spikes*, causate da brevi cambiamenti nella luminosità dati dall'instabilità dello scanner, o ancora dal *ghosting*, derivato da un lieve sfasamento tra le diverse linee del k-spazio nel momento dell'acquisizione echo-planar, causato da moti periodici, quali il battito cardiaco o l'atto respiratorio.

- La *distortion correction* interessa principalmente quegli artefatti introdotti a causa di una debolezza intrinseca delle sequenze GE-EPI: nelle regioni dove l'aria e i tessuti si incontrano, come nei seni paranasali o nei condotti uditivi, il campo magnetico statico soffre di mancanza di omogeneità e ciò può risultare nell'inserimento di due tipologie di distorsioni: il dropout e la distorsione geometrica.

Il *dropout* risulta in una riduzione del segnale nelle regioni cerebrali adiacenti alle interfacce aero-tissutali, come la corteccia orbito-frontale e il lobo temporale laterale.

Le *distorsioni geometriche* sono dovute ad errori nella localizzazione delle strutture nell'immagine risultante e si presentano quando i gradienti vengono applicati per codificare l'informazione spaziale. Sono date anch'esse dalla disomogeneità nel campo magnetico e si riscontrano soprattutto nella corteccia prefrontale anteriore e nella orbito-frontale.

- Si consideri ora che tutti i dati fMRI sono raccolti utilizzando un'acquisizione in 2D, nella quale le sezioni vengono ottenute una alla volta. Queste possono essere rilevate in ordine cranio-caudale o nella maniera contraria o, in altri casi ancora, si utilizza un metodo denominato *interleaved acquisition*, nel quale l'ordine di ottenimento delle sezioni procede rilevando prima le dispari e poi le pari o viceversa per evitare l'eccitazione residua di due fette vicine.

L'uso dell'acquisizione 2D implica che i dati nelle diverse sezioni dell'immagine siano raccolti con tempi differenti, anche se all'interno di un range di pochi secondi. Queste differenze nel tempo di acquisizione dei vari voxel risultano, però, problematiche nella fase di analisi dei dati, dato che essa si fonda sull'assunzione a priori che tutti i dati componenti l'immagine siano stati rilevati nello stesso identico istante.

Ne risulta, così, la necessità di colmare il mismatch tra il modello ideale e il dato grezzo ed è in questo processo che risulta utile l'applicazione della *slice timing correction*: l'approccio più comune consta nello scegliere una sezione di riferimento e poi interpolare il dato in tutte le altre, così da fare corrispondere a tutte lo stesso tempo di riferimento.

- Il componente di maggiore importanza del pre-processing è la *spatial transformation* che, a sua volta, si articola su quattro funzioni principali:

1. *Realignment function*: Lo scopo della funzione di riallineamento, o di correzione del movimento, è quello di andare a ridurre il disalli-

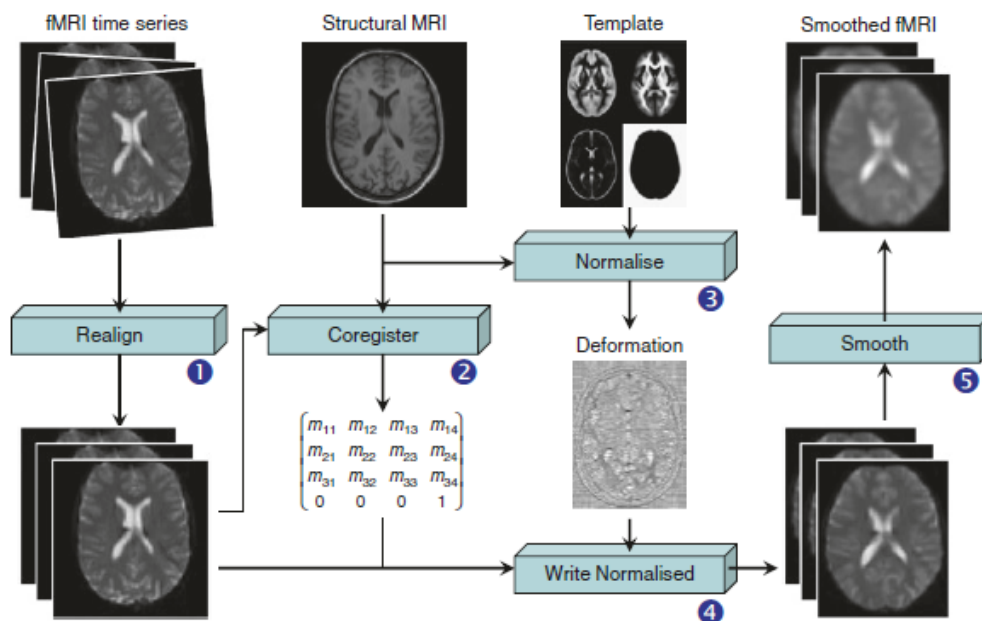


Figura 3.8: Flowchart standard di un pre-processing in fMRI [140].

neamento che si instaura tra le immagini di una time-series a causa del movimento del capo.

In breve, ogni immagine nella time-series viene riallineata su un riferimento comune utilizzando un metodo basato sulla registrazione dell'immagine; le immagini vengono, poi, ricomputate al fine di creare la versione riallineata del dato originale.

Gli strumenti utilizzati a questo scopo si basano sulla considerazione che il movimento della testa può essere descritto utilizzando una *rigid body transformation*, ciò sta a significare che la posizione del capo può variare sui tre assi dello spazio, sia in traslazione che in rotazione, senza variare, però, nella forma. Per quanto riguarda il riferimento della correzione, questo può essere scelto specificatamente tra le singole immagini o risultare nella media della time-series.

2. *Normalise function*: consta nel ricondurre le immagini ottenute da un numero di individui ad un unico spazio standard.

A tal fine, possono essere utilizzati diversi sistemi di coordinate: il modello più impiegato risulta in quello descritto da Talairach e Tournoux nel 1988, anche se, lo sfruttamento di nuovi atlanti sta prendendo sempre più piede all'interno della brain imaging comunità: tra questi risulta il *Montreal Neurological Institute (MNI) space*. Il processo di trasformazione si fonda su funzioni più complesse ri-

spetto a quelle analizzate nei processi precedenti e permettono, infatti, maggiori gradi di libertà, garantendo così sia trasformazioni di carattere lineare che non lineare. A tal scopo, ci si serve di un modello bayesiano, il quale permette di introdurre informazioni a priori e di aggiungere limiti all'entità della deformazione per ridurre il cospicuo numero di parametri necessario per eseguire le trasformazioni non lineari.

3. *Coregister function*: consiste nell'acquisizione di immagini di natura funzionale e di natura strutturale dallo stesso soggetto.

Sono diversi i vantaggi che derivano dall'applicazione di tale processo: in primis, infatti, le immagini in funzionale possono essere, così, sovrapposte ad uno scan anatomico, migliorando in tal maniera la visualizzazione dell'immagine; inoltre, la normalizzazione gode di maggiore precisione quando le trasformazioni vengono stimate su un'immagine anatomica dettagliata, piuttosto che sulla funzionale. Al fine di misurare la similarità tra le due acquisizioni, ci si serve del concetto di *mutual information*: si tratta di una misurazione delle informazioni condivise tra i data set, basata sulla distribuzione congiunta di probabilità delle intensità delle immagini.

Sulle immagini coregistrate si esegue, in seguito, la *segmentazione*, la quale garantisce un miglior allineamento delle immagini isolando e facendo corrispondere le porzioni rappresentanti la sostanza grigia e le porzioni di sostanza bianca. La segmentazione si serve di un modello generativo che include un mix di gaussiane per modellare la distribuzione delle intensità e di un componente dedito alla correzione dei bias per conformare le variazioni di uniformità dello spazio; segue, infine, la registrazione sulle mappe di probabilità.

4. *Smooth function*: consiste nell'applicazione di un *filtro passa basso* ai dati. Tipicamente, ci si serve di una convoluzione in un *3D gaussian kernel*, parametrizzato sul modello *piena larghezza a metà altezza (FWHM)* nelle tre direzioni. Quindi, l'intensità di ogni voxel è rimpiazzata dalla media pesata di sé stesso e dei voxel vicini, dove il ponderare segue una forma gaussiana centrata sul voxel considerato.

Di primo impatto, potrebbe sembrare controintuitivo ridurre la risoluzione delle acquisizioni, tuttavia, questa funzione si applica per diverse ragioni: in primis, in tal maniera si incrementa il rappor-

to segnale-rumore, riducendo l'errore; in secondo luogo, grazie al teorema del limite centrale, lo smoothing permette una maggiore distribuzione dell'errore e rende valido così l'uso della statistica inferenziale; in ultima, si incrementa il grado di sovrapposizione anatomico-funzionale tra soggetti, riducendo gli errori nella registrazione e garantendo una maggiore significatività nelle successive analisi statistiche [140,141].

Analisi dei dati in fMRI

Tutti gli obiettivi che l'analisi dei dati in fMRI si pone sono caratterizzati da una natura intrinseca di carattere statistico, tuttavia, l'approccio utilizzato per raggiungere lo scopo designato cambia radicalmente in base alle premesse che il ricercatore pone riguardo l'uso del sistema BOLD.

Negli esperimenti in cui il disegno di studio si addice ad un maggior controllo da parte del ricercatore, è possibile assumere che la funzione alla base dello stimolo sia nota e equivalente al paradigma sperimentale scelto. Se si presuppone, quindi, che la funzione della risposta emodinamica sia definita a priori, è possibile operare nel modello una regressione multipla in cui si considerano come variabili note i componenti del segnale e come variabili non note le ampiezze. Su questi presupposti si fonda l'approccio *general linear mode (GLM)*, modello d'analisi particolarmente utilizzato negli studi task-based.

Altre metodologie vengono, invece, impiegate per l'implementazione dell'analisi negli studi in resting-state, nei quali non esiste uno stimolo su cui costruire una potenziale funzione [142]. Per andare a valutare la connettività funzionale, infatti, ci si serve di due principali approcci: la *seed-ROI-based correlation* e la *independent component analysis (ICA)*.

La *region of interest (ROI) seed based analysis* consiste nello scegliere una o più regioni di interesse e indagare le connessioni funzionali esistenti tra queste e le altre aree cerebrali mediante un modello basato su funzioni di regressione e correlazione.

Diversamente, la *independent component analysis (ICA)* è un approccio model-free, dove i dati in 4D vengono scomposti in un insieme di time-series indipendenti associate a delle mappe spaziali in 3D, descrivendo, così, le caratteristiche spaziali e temporali del componente e del segnale sottostante [140].

Come sarà successivamente delineato nel dettaglio, nello svolgere le analisi di connettività statica e dinamica in questo studio, si è proceduto attraverso l'implementazione di numerose ICA, perciò, si ritiene necessario approfondire in

tale sezione questa metodologia d'approccio.

Lo sviluppo dell'ICA trova la sua genesi nella necessità di risolvere il *blind source separation problem*, ovvero, il problema che si pone riguardo la rilevazione di segnali d'origine sconosciuta all'interno di un set di dati. Si consideri che il modello ICA può essere descritto in matematica attraverso la funzione:

$$x = As$$

dove x indica il segnale che si sta tentando di scomporre, s rappresenta il set di componenti sconosciuti e A risulta come la matrice ignota che combina i diversi componenti per ottenere il segnale osservato. Sia A che s sono, dunque, sconosciute, perciò, si dovrà procedere elaborando una serie di assunzioni riguardo le relazioni esistenti tra i diversi componenti di s .

Se si assume che la tipologia dei dati rispetti una struttura ortogonale e gaussiana, si può risolvere il quesito a monte applicando una *principal components analysis (PCA)*. La PCA, infatti, permette di riesprimere il set di dati come gruppo di componenti non correlati tra loro e, quindi, ortogonali. Si procede attraverso questa logica: il primo componente principale è equivalente alla direzione attraverso cui il dato stabilisce il maggiore ammontare di varianza, il secondo è la seconda direzione per ammontare di varianza che non sia correlata col primo componente etc. Ciò impone, però, che se i dati non risultano ortogonali e gaussiani, la PCA non sarà in grado di individuarne la fonte.

La ICA si fonda sul concetto che i componenti di s siano statisticamente indipendenti tra loro, quindi, si può assumere che la probabilità congiunta sia uguale al prodotto delle loro probabilità individuali:

$$P(A, B) = P(A)P(B)$$

Nei casi in cui i componenti del segnale sono generati da processi indipendenti, come nei processi neurali indagati in fMRI, la ICA sarà più performante nell'identificare la fonte del segnale perché, probabilmente, questa non seguirà una distribuzione gaussiana [141]. È possibile, infatti, che due variabili siano statisticamente dipendenti anche se ortogonali: questo accade, appunto, quando i dati non si conformano a detta distribuzione.

Al fine di applicare la ICA ai dati, questi devono essere prima riarrangiati in una matrice bidimensionale; si sceglie, successivamente, se l'algoritmo debba ricercare i componenti massimamente indipendenti nella dimensione spaziale (sICA) o temporale (tICA). La scelta, se procedere attraverso una tICA o

una sICA, è stata da sempre motivo di dibattito: in generale è raccomandato esplorare tutto lo spettro ed effettuarle entrambe [143].

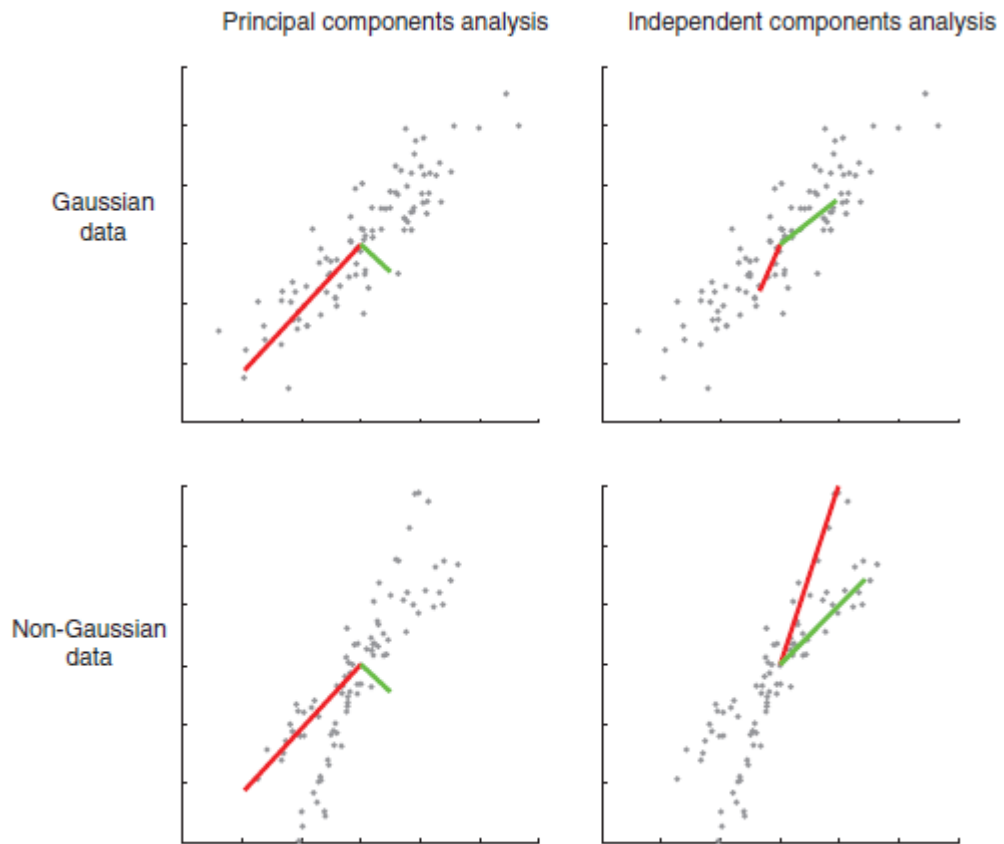


Figura 3.9: Si noti come, nei grafici in cui i dati si distribuiscono in maniera non gaussiana, la PCA non sia in grado di individuare le fonti della varianza, dato che queste non risultano ortogonali, mentre la ICA risulti capace di dectare i due segnali [141].

Analisi di connettività funzionale dinamica tra network

Fino a tempi recenti, la maggior parte degli studi svolti in resting-state si è fondata sulla supposizione che la connettività tra network fosse un attributo statico del cervello a riposo, almeno nel lasso di tempo in cui viene svolta la scansione in fMRI. Questa semplificazione risulta certamente utile per facilitare lo svolgimento delle analisi, tuttavia, va ad oscurare l'impatto che i diversi processi neurali, quali i pensieri, gli stati di coscienza, le memorie e l'esperire di stati emotivi, determinano sulla connettività funzionale nel tempo.

Vari approcci sono stati, perciò, sviluppati col fine di studiare gli effetti determinati dalle variazioni temporali nella struttura spazio-temporale del segnale BOLD, tra queste, alcune sono state disegnate per identificare coppie di variazioni nella sincronia inter-regionale (*sliding window analysis* e *time-frequency coherence analysis*), altre si focalizzano sull'identificazione di cambiamenti nei pattern di sincronia attraverso analisi multivariate (*single-volume co-activation patterns*, *repeating sequences of BOLD activity* e *independent component analysis*).

Poiché la *sliding windowed analysis* tutt'oggi risulta essere il modello più utilizzato, sfruttato, inoltre, nelle analisi impiegate in questo studio, si ritiene opportuno un approfondimento di tale metodologia nelle pagine seguenti.

In questo approccio, si usufruisce di una finestra temporale di dimensioni definite a priori che viene fatta scorrere sulle time-course dei soggetti in analisi, con lo scopo calcolare le stabilite metriche d'interesse. Tale finestra viene, così, fatta scivolare nel tempo su uno stabilito numero di data point (che vanno dal singolo valore alla totale lunghezza della finestra), definendo l'ammontare di sovrapposizione che si ottiene tra una finestra e la successiva.

Diverse metriche possono essere calcolate in questa maniera: quella di maggiore interesse risulta essere il *coefficiente di correlazione*, dal quale si ricavano le matrici di correlazione, denominate *windowed functional network connectivity matrices (wFNC)*, consistenti in una serie di istantanee rappresentanti l'evoluzione della connettività cross-network lungo la time-course [144].

I primi studi svolti in tali termini sono stati sviluppati da Allen e collaboratori, i quali si sono serviti di un *K-means clustering*, implementato sulle matrici ottenute, per ricavare dei prototipi delle dynamic functional connectivity (dFNC) individuali, denominati come *stati* [145]. Si tenga presente che ogni matrice è definita dal valore $N(N-1)/2$, dove N rappresenta il numero di componenti di interesse: il K-means clustering consiste in uno strumento di riduzione dimensionale che permette di far "collassare" uno spazio di con-

nettività di $N(N-1)/2 > 1000$ dimensioni in una sola, ricavando in tal modo il pattern di connettività più ricorrente: un soggetto si ritroverà, perciò, in un determinato singolo stato in ogni momento considerato. Si può facilmente immaginare come una riduzione di tale entità porti inevitabilmente ad oscurare e a distorcere importanti caratteristiche relative al comportamento del network-coupling.

Col fine di ovviare a tale problematica, Miller e collaboratori hanno introdotto un nuovo approccio, basato sull'applicazione di una ICA alle matrici di correlazione, con lo scopo di ottenere pattern di connettività massivamente indipendenti. Ogni wFNC viene, perciò, rimaneggiata in un vettore discretizzato in quartili, i cui valori corrispondono al contributo dei singoli pattern considerati nel tempo: si parla in questo caso di *meta-stati* (Figura 3.10).

Il peso di ogni pattern può assumere, così, valore positivo o negativo, definendo se il contributo additivo è dato dal *pro-stato*, ovvero dallo stesso pattern di connettività, o in caso di segno negativo, dalla forma *anti-stato*. In questo modo, un soggetto si ritroverà, con grado diverso, in ogni stato in qualsiasi momento considerato perché si andranno a ottenere pattern completamente indipendenti l'uno dall'altro nella dimensione temporale [146].

Per raggiungere tale scopo ci si serve di una *group temporal independent component analysis (tICA)*, applicata alle wFNC una volta concatenate, col fine di scomporre la dimensione temporale dei soggetti in studio in time-course indipendenti, ognuna con un associato pattern di connettività condiviso tra i vari soggetti. Le time-course subiscono una trasformazione nel corrispondente quartile discretizzato, da cui si ricava un vettore tempo-indicizzato di 5 dimensioni, rappresentante i 5 punti temporali in cui la time-course varia da un livello ad un altro. Il vettore viene ulteriormente discretizzato in quartili, ottenendo, così, il meta-stato.

Si può, inoltre, procedere con l'implementazione di altri metodi di analisi, svolgendo, così, una *spatial independent component analysis (sICA)*, una *principal component analysis (PCA)* e un *K-means clustering* con lo stesso fine.

Dalle traiettorie percorse all'interno del connectivity space generato dai meta-stati ottenuti è possibile, successivamente, calcolare diverse metriche d'interesse che saranno approfondite nelle sezioni successive.

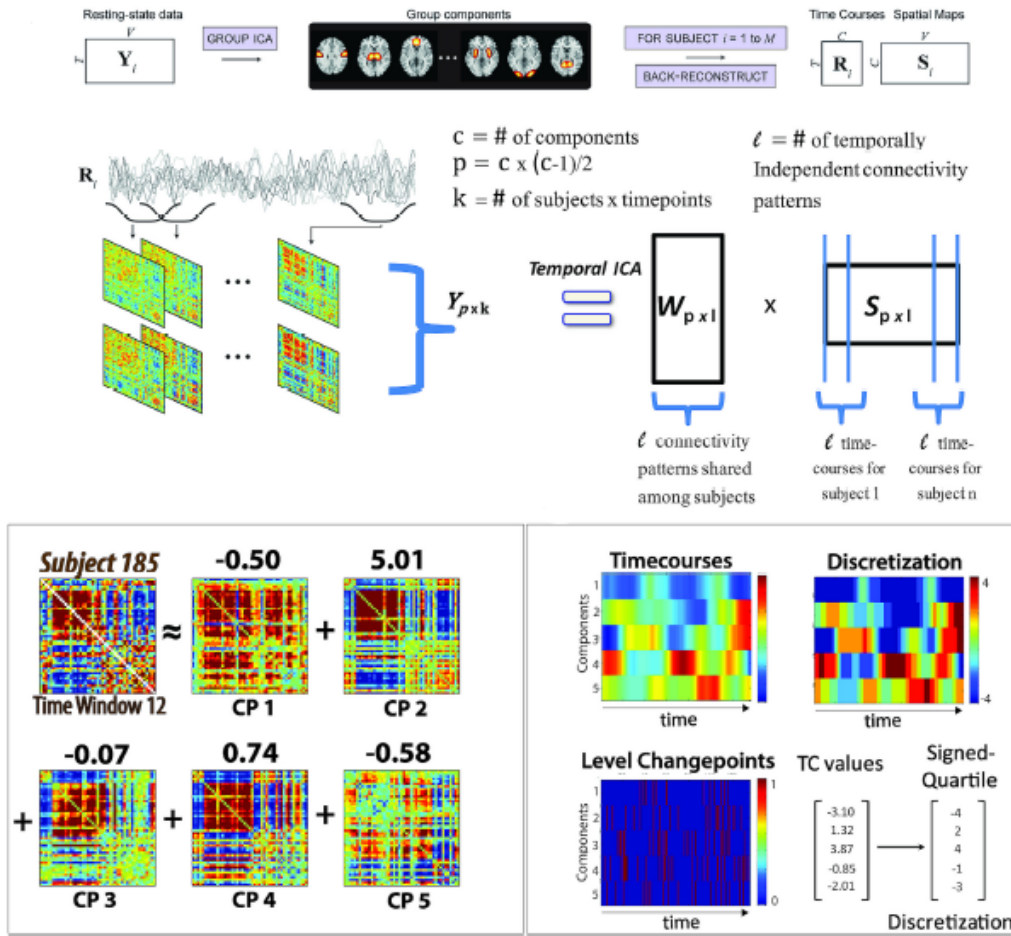


Figura 3.10: Flowchart dell'analisi di connettività dinamica basata sui meta-stati: sulla time-course, ottenuta mediante la fase di analisi di connettività statica (group ICA), viene applicato l'approccio sliding window, così da ottenere un numero di finestre pari a $[N \times (N-1)/2] \times n^\circ$ di soggetti $\times n^\circ$ di time-point. Su queste, una volta concatenate, si procede mediante l'implementazione della temporal ICA, così da ottenere i pattern di correlazione massivamente indipendenti con la relativa time-course. Da quest'ultime, una volta discretizzate, si ricavano i punti di variazione tra i vari livelli di connettività nel tempo, i quali, una volta inseriti su un vettore, subiranno un processo di discretizzazione in quartili, così da ottenere i meta-stati [146].

4. Scopo dello studio

La costante diffusione di miglioramenti tecnologici nel campo dell'imaging e il raffinarsi delle tecniche d'analisi risultano di estrema utilità in ambito psichiatrico perché permettono di elaborare dei modelli biologici in grado di porre maggiore luce riguardo le cause alla base della sofferenza mentale.

Gli studi di connettività funzionale dinamica acquistano, in tal senso, un ruolo preponderante nell'ambito dell'imaging a risonanza magnetica funzionale, presentandosi come una metodologia estremamente raffinata e moderna, impiegabile con il fine di identificare pattern di connettività contraddistinti e riconducibili a quelle che sono le patologie psichiatriche di maggior interesse.

Il presente studio ha come intento il servirsi di questo potente approccio per indagare l'esistenza di potenziali alterazioni nell'assetto funzionale cerebrale dei soggetti facenti uso reiterato di cannabis a scopo ricreativo, sia attraverso la ricerca di pattern di connettività specifici (*stati*), sia mediante la valutazione della dinamica cerebrale nella sua complessività (*meta-stati*).

Si mira, dunque, a individuare delle caratteristiche specifiche della connettività funzionale in tali pazienti, in modo da introdurre nuove ipotesi riguardo la patogenesi della dipendenza da cannabis ed identificare, così, nuovi biomarcatori da impiegare per lo sviluppo di nuovi farmaci atti a trattare le tossicodipendenze.

5. Materiali e metodi

Questo studio è stato condotto in cooperazione con il laboratorio del Prof. Robert Christian Wolf, del dipartimento di psichiatria generale dell'ospedale universitario di Heidelberg, il cui staff ha provveduto alla composizione del database analizzato. Le analisi sono state svolte con la collaborazione del Dott. Daniele Olivo, sotto il coordinamento e la supervisione del Prof. Fabio Sambataro.

5.1 Popolazione

Ai fini di questo studio, sono stati selezionati 98 soggetti iniziali, di cui 3 sono stati successivamente scartati per l'incompletezza delle scansioni e 1 per mancanza dei dati demografici e clinici necessari.

I criteri d'inclusione hanno richiesto l'integrazione solo di consumatori di cannabis e nicotina, escludendo, così, tutti coloro che praticassero un uso corrente o passato di altre sostanze illecite. La concordanza con tale criterio si è andata a verificare mediante uno screening di carattere qualitativo, consistente nell'analisi delle urine, così da escludere un potenziale uso di altre sostanze illecite nel momento dell'acquisizione dati.

Altri criteri d'esclusione hanno previsto la mancata presa parte allo studio di tutti i soggetti con un presente o passato disturbo mentale, verificato mediante questionario SCID del DSM-IV-TR, o con storie di patologie di carattere neurologico, di traumi cerebrali o di altri trattamenti farmacologici, indagati mediante un'anamnesi ben strutturata. Inoltre, sono stati esclusi tutti i soggetti con un corrente o un passato disturbo da uso di alcol, come stabilito secondo i criteri del DSM-IV-TR, e gli individui con una diagnosi di sindrome psicotica attenuata, come definita dalle appendici del DSM-5.

I 94 individui restanti, di età compresa tra i 18 e i 30 anni, sono risultati suddivisibili in 66 persone di sesso maschile e 28 di sesso femminile.

Questi sono stati ripartiti in due gruppi servendosi del punteggio ottenuto al *cannabis use disorder identification test (CUDIT-R)*, uno strumento di screening costituito da 8 voci che va a indagare il rischio per il paziente di sviluppare il disturbo da uso di cannabis (CUD). Ad ogni voce può essere assegnato un valore che va da 0 a 4 in base alla frequenza e alla gravità del fattore indagato.

Il punteggio massimo raggiungibile risulterebbe, così, di 32 punti, tuttavia, la scala pone come riferimento il punteggio di 8 o più per identificare individui a rischio, e di 12 o più per definire soggetti con possibile disturbo da uso di cannabis. Nelle pagine seguenti, si riporta per completezza la scala rivisitata da Adamson e collaboratori (Figura 5.1).

Il cut-off del nostro studio è stato posto, perciò, al valore di 8: in caso di risultato maggiore o uguale, il paziente è stato integrato nel gruppo dei soggetti ad alto rischio di abuso, in caso contrario, nel gruppo dei controlli. Il primo gruppo è risultato, così, costituito da 39 soggetti mentre il secondo da 55.

Per ogni individuo sono stati raccolti i rispettivi dati demografici, quali:

- Età;
- Sesso;
- Manualità.
- Istruzione;

Sono stati, inoltre, rilevati i relativi dati clinici, quali:

- Le scale di valutazione della depressione (*BDI*, *HAMD*).
- Le scale per la valutazione dell'ansia di stato e di tratto (*STAI-G X1*, *STAI-G X2*).
- Le scale di valutazione dei deficit di attenzione/iperattività (*ADHD SB*, *ADHS inactivity*, *ADHS hyperactivity*, *ADHS impulsivity*).
- Il *CUDIT* e i parametri relativi al consumo (*uso totale THC*, *età inizio consumo*, *durata del consumo*, *consumo corrente (giorno/settimana)*, *consumo corrente (grammi/settimana)*) (Tabelle 5.1 e 5.2).

Descriptives		CUDIT_group	Age	Sex	R/L	Edu (ys)	BDI	HAMD	STAI-G X1	STAI-G X2	ADHD-SB tot	ADHS inatt
N	0	55	55	55	55	54	55	55	55	55	55	55
	1	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39
Missing	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0	23.3	1.45	1.09	14.9	2.74	0.364	31.0	31.5	6.11	2.98	
	1	23.2	1.08	1.03	13.7	6.69	1.38	36.3	35.6	13.1	5.82	
Median	0	23	1	1	15.0	2.00	0	31	31	4	2	
	1	22	1	1	13.0	4	0	36	34	11	5	
Standard deviation	0	3.00	0.503	0.290	2.68	3.69	0.729	7.47	7.74	5.99	2.55	
	1	3.31	0.270	0.160	2.57	7.05	2.22	8.03	8.75	6.94	3.10	
Minimum	0	18	1	1	10.0	0	0	20	20	0	0	
	1	18	1	1	9.00	0	0	24	20	3	1	
Maximum	0	30	2	2	20.0	21	2	54	52	26	9	
	1	30	2	2	19.5	28	10	70	58	35	12	

Tabella 5.1: Analisi descrittive applicate ai parametri demografici e clinici raccolti. Vengono evidenziati i dati che presentano una differenza statisticamente significativa alle analisi di varianza (ANOVA) eseguite comparando i due gruppi.

Descriptives

	CUDIT_group	ADHS hyperact	ADHS impulsivity	Tabak (pack years)	THC use LT (joints)	CUDIT	Onset use (age)	Duration use	Current use (day/week)	Current use (g/week)
N	0 1	55 39	55 39	55 39	55 39	55 39	55 39	55 39	55 39	55 39
Missing	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Mean	0 1	1.62 3.03	0.836 2.18	0.942 2.50	200 3258	1.04 16.9	4.67 17.7	0.373 3.41	0.473 4.95	0.212 5.01
Median	0 1	1 3	1 1	0.00 0.750	1 1500	0 15	0.00 17.0	0.00 3.00	0.00 5.00	0.00 3.50
Standard deviation	0 1	2.21 2.28	1.13 2.14	3.09 4.65	843 3949	2.04 7.64	8.17 2.89	1.57 3.39	1.41 2.32	0.779 5.53
Minimum	0 1	0 0	0 0	0.00 0.00	0 70	0 8	0.00 11.0	0.00 0.00	0.00 0.500	0.00 0.0140
Maximum	0 1	9 10	5 7	20.0 25.5	6000 18000	7 36	24.0 25.0	10.0 14.5	7.00 7.00	5.25 28.0

Tabella 5.2: *Analisi descrittive applicate ai parametri demografici e clinici raccolti. Vengono evidenziati i dati che presentano una differenza statisticamente significativa alle analisi di varianza (ANOVA) eseguite comparando i due gruppi.*

The Cannabis Use Disorder Identification Test - Revised (CUDIT-R)

Have you used any cannabis over the past six months? Yes _____ No _____

If you answered "Yes" to the previous question, please answer the following questions about your cannabis use. Circle the response that is most correct for you in relation to your cannabis use over the *past six months*.

1. How often do you use cannabis?

Never	Monthly or less	2-4 times a month	2-3 times a week	4+ times a week
0	1	2	3	4

2. How many hours were you "stoned" on a typical day when you had been using cannabis?

Less than 1	1 or 2	3 or 4	5 or 6	7 or more
0	1	2	3	4

3. How often during the past 6 months did you find that you were not able to stop using cannabis once you had started?

Never	Less than monthly	Monthly	Weekly	Daily/almost daily
0	1	2	3	4

4. How often during the past 6 months did you fail to do what was normally expected from you because of using cannabis?

Never	Less than monthly	Monthly	Weekly	Daily or almost daily
0	1	2	3	4

5. How often in the past 6 months have you devoted a great deal of your time to getting, using, or recovering from cannabis?

Never	Less than monthly	Monthly	Weekly	Daily/almost daily
0	1	2	3	4

6. How often in the past 6 months have you had a problem with your memory or concentration after using cannabis?

Never	Less than monthly	Monthly	Weekly	Daily or almost daily
0	1	2	3	4

7. How often do you use cannabis in situations that could be physically hazardous, such as driving, operating machinery, or caring for children?

Never	Less than monthly	Monthly	Weekly	Daily/almost daily
0	1	2	3	4

8. Have you ever thought about cutting down, or stopping, your use of cannabis?

Never	Yes, but not in the past 6 months	Yes, during the past 6 months
0	2	4

This questionnaire was designed for self-administration and is scored by adding each of the 8 items:

Question 1-7 are scored on a 0-4 scale

Question 8 is scored 0, 2, or 4

Score: _____

Scores of 8 or more indicate hazardous cannabis use, while scores of 12 or more indicate a possible cannabis use disorder for which further intervention may be required.

Adamson SJ, Kay-Lambkin FJ, Baker AL, Lewin TJ, Thornton L, Kelly BJ, and Sellman JD. (2010). An Improved Brief Measure of Cannabis Misuse: The Cannabis Use Disorders Identification Test - Revised (CUDIT-R). *Drug and Alcohol Dependence* 110:137-143.

Figura 5.1: *In immagine la scala CUDIT-R come concepita da Adamson e collaboratori.*

5.2 Acquisizione dei dati in risonanza magnetica

Le scansioni sono state ottenute mediante un sistema MRI di tipo Magnetom Skyra (Siemens, Erlangen, Germania) a 3 T.

Le immagini in strutturale sono state acquisite attraverso delle sequenze rapide preparate a magnetizzazione di tipo *gradient-echo (3D-MPRAGE)* impostate con i seguenti parametri: TE=3.29 ms, TR=1900 ms, TI=110 ms, flip angle=9°, FOV=240 mm, slice plane=axial, voxel size=0.5×0.5×0.9 mm³, distance factor=50%, number of slices=192.

In seguito, le immagini in rs-fMRI sono state ricavate mediante una *sequenza BOLD echo-planare (EPI)* impostata con i seguenti parametri: TE=30 ms, TR=1800 ms, flip angle=90°, FOV=192 mm, slice plane=transversal, voxel size=3×3×3 mm³, distance factor=25%, number of slices=32, PAT factor=2, number of measurements=230.

Le prime 8 scansioni, acquisite per permettere al segnale di raggiungere lo steady-state, sono state scartate successivamente, risultando, perciò, in un numero totale pari a 222.

5.3 Analisi dei dati

L'intera analisi dei dati è stata portata a termine mediante *MATLAB*, attraverso l'impiego di appositi pacchetti d'analisi (*GIFT*, *SPM12*, *DPABI*, *XJVIEW*, *REST*).

5.3.1 Pre-processing dei dati

Al fine di eseguire il pre-processing dei dati, ci si è serviti del *data processing assistant for rs-fMRI (DPABI/DPARSF 5.2)*, un toolbox sviluppato da Yan Chao-Gan e collaboratori, operante come estensione di *SPM12*.

Si è proceduto, inizialmente, attraverso una *slice-timing correction*, così da correggere il mismatch temporale tra le varie sezioni. Successivamente, si è utilizzata la *realignment function* per compiere la *rigid body transformation* e correggere i movimenti del capo dei soggetti scansionati.

Le immagini sono state, poi, sottoposte al processo di *coregistrazione* tra dati funzionali e strutturali, a cui è seguita la *segmentazione* e la *normalizzazione* mediante *DARTEL* su un *template MNI* di voxel size 3x3x3 mm³.

Infine, per lo *smoothing* si è impiegato un *3D gaussian kernel* con *FWHM* impostato a 6mm (Figura 5.2).

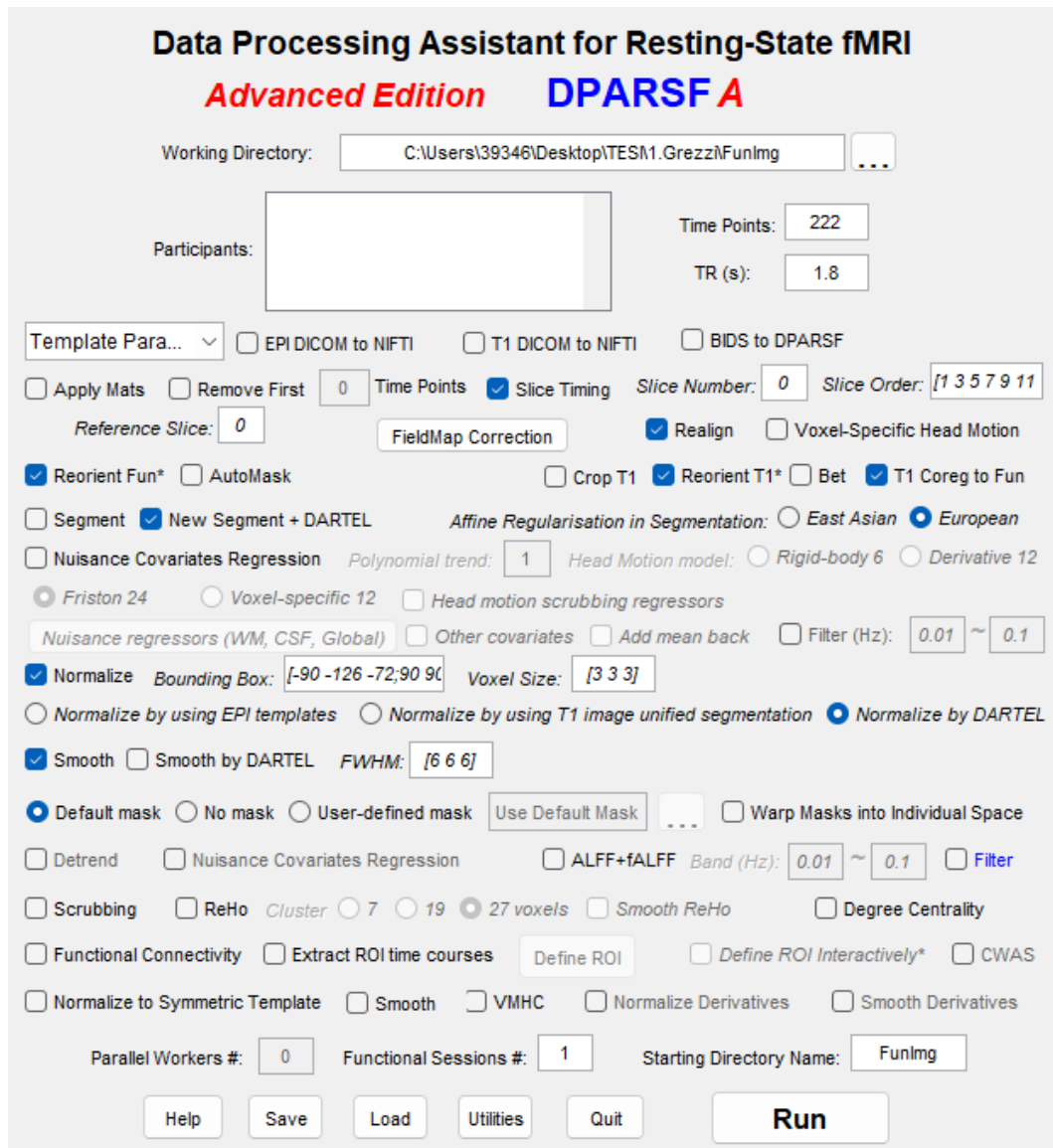


Figura 5.2: In immagine la graphic user interface (GUI) di DPARSF come impostata per l'esecuzione del pre-processing.

5.3.2 Decomposizione in functional network

Per la decomposizione dei dati in network ci si è serviti di una *group independent component analysis (GICA)*, implementata attraverso *GIFT* con un apposito batch script.

Il file batch è stato impostato come segue:

- Sono stati introdotti i dati con il relativo prefisso *rest* e il tempo di ripetizione (TR) di 1.8 s;
- Il numero di componenti indipendenti (IC) è stato fissato a 53, basandosi sul template di *NeuroMark* costruito su uno studio che ha cercato di individuare ICN altamente riproducibili e confrontabili tra diversi data set [147] (Figura 5.3);
- L'algoritmo scelto per l'esecuzione della constrained ICA è risultato nel *MOO-ICAR* (rinominato come *GIG-ICA (group information guided ICA)* nelle ultime versioni di *GIFT*): il rilevamento dei componenti si è basato, perciò, su modelli ICA precedentemente definiti, con lo scopo di stimare le fonti d'interesse per ogni soggetto;
- Come tipologia d'analisi ci si è serviti di *ICASSO*, il cui toolbox è stato adoperato per definire l'attendibilità e la stabilità dell'algoritmo ICA: questo è stato impostato in modalità *randinit*, in modo tale da garantire che l'algoritmo fosse settato su valori iniziali differenti. *ICASSO* ha svolto, così, la sua funzione ripetendo l'algoritmo ICA un numero stabilito di volte: in questo caso 50.

Relativamente all'ICA:

- Nel pre-processing si è optato per la rimozione della *mean per time-point*;
- La maschera è stata calcolata attraverso le opzioni di default;
- Per quanto concerne la tipologia di group ICA, in questa fase si è proceduto attraverso una *spatial ICA*;
- Si è deciso di eseguire una concomitante *subject specific group PCA*, in modo tale da effettuare una PCA su ogni data set prima dell'implementazione della group PCA;
- In seguito, è stata svolta una *back reconstruction* con algoritmo GIG-ICA;
- Infine, i risultati sono stati scalati sugli *z-score*.

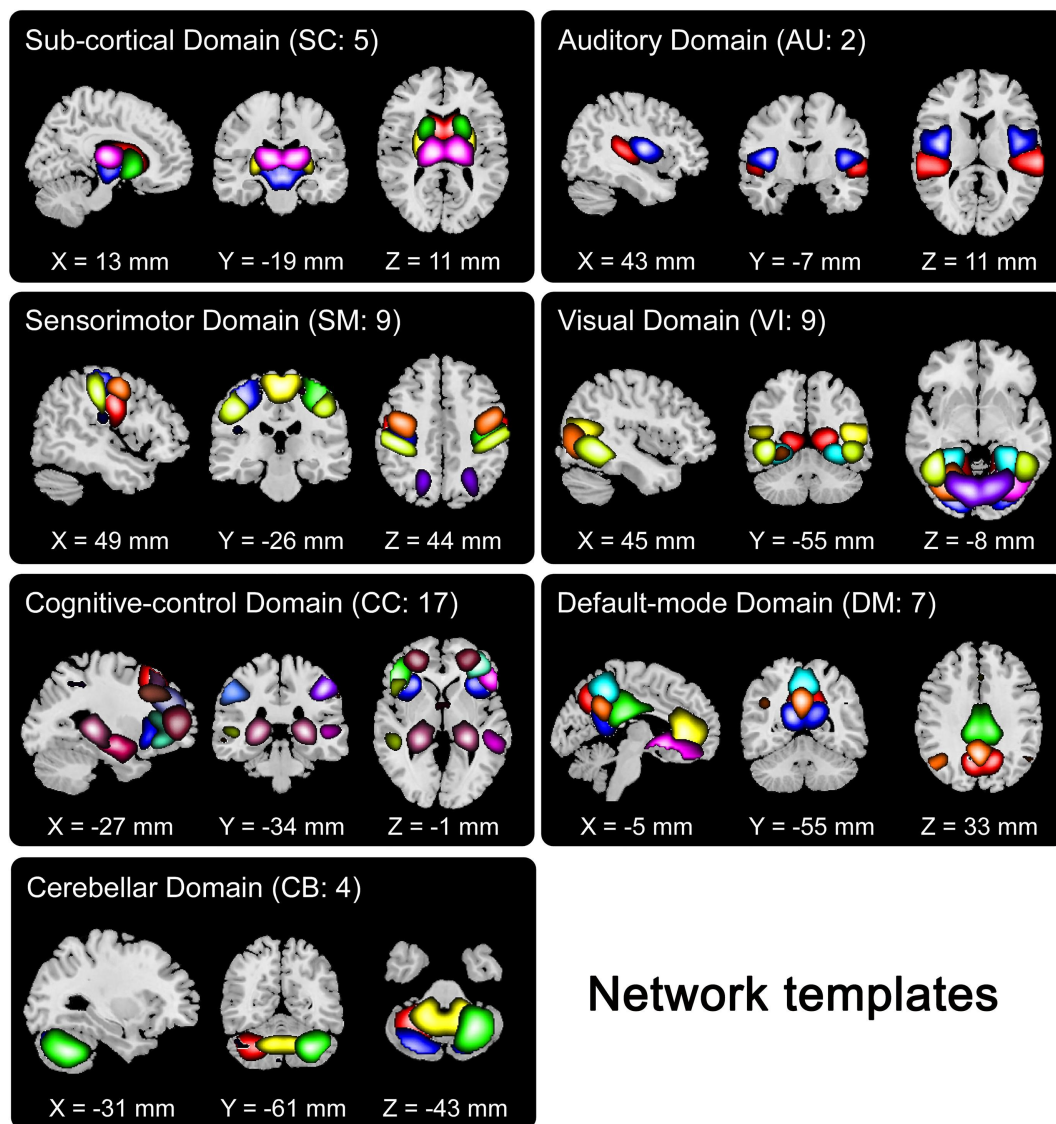


Figura 5.3: Il template prevede l'individuazione di 7 domini, composti da 53 componenti, suddivisi in tal modo: Sub-cortical domain (1:5); Auditory domain (6:7); Sensorimotor domain (8:16); Visual domain (17:25); Cognitive-control domain (26:42); Default-mode domain (43:49); Cerebellar domain (50:53) [147].

5.3.3 MANCOVAN di sottrazione

Ci si è serviti di una MANCOVAN per operare un'analisi multivariata, così da individuare la varianza attribuibile al gruppo oggetto di studio (variabile indipendente), valutandola in base al peso assegnabile alle determinate covariate scelte (variabili dipendenti). Si è scelto, così, per la composizione di un batch script, impostato per ricevere in input le mappe spaziali, le time-course e le correlazioni FNC di tutti i 53 componenti e ricavare da questi la varianza riconducibile a:

- Età;
- Sesso;
- Educazione;
- *Mean framewise displacement (FD) di Power*: una misura utilizzata per definire le variazioni del movimento della testa da un volume al successivo.

5.3.4 Analisi di connettività dinamica

A questo punto, si è proceduto esplorando la *temporal dynamic functional network connectivity* mediante l'apposito toolbox di *GIFT*.

Il *temporal dynamic FNC toolbox (dFNC)* viene utilizzato per studiare la connettività funzionale dinamica dei network mediante le time-course dei vari componenti, determinando da queste le varie matrici di correlazione e stimando, così, gli stati di connettività.

Il toolbox lavora sull'output della group ICA precedentemente eseguita e si articola in due fasi: una fase di setup e una di post-processing.

Fase di setup

Attraverso la *sliding window analysis*, svolta sulle time-course ottenute durante la fase di decomposizione dei network, sono state calcolate le matrici di correlazione tra i vari componenti.

Si è proceduto, inizialmente, con il setting del pre-processing: le time-course di ogni soggetto hanno subito, così, un processo di detrending e despiking utilizzando *3dDespike*, e, successivamente, sono state filtrate utilizzando un *filtro passa-basso Butterworth* di quinto ordine con un cut-off di 0.15 Hz.

Si è proseguito, successivamente, con la rimozione della varianza associata ai parametri di riallineamento, ottenuti nella fase iniziale di pre-processing, dalle time-course.

Nel pre-processing, si è definita la metodologia con cui stimare le correlazioni: si è scelto di settare il metodo sull'alternativa *L1*, in questo modo è stata calcolata la matrice sparsa di covarianza inversa attraverso una regressione *Lasso* (*least absolute shrinkage and selection operator*), impiegando una penalità *L1* e migliorando la stima sulle time-course più brevi.

Per quanto concerne i parametri relativi alla sliding window, si è scelto di impostare le dimensioni della finestra a 30 TR con una gaussiana di 3 TR.

Fase di post-processing

Prima di procedere con la fase di post-processing vera e propria, si è eseguita la regressione della varianza, individuata per le variabili della precedente *MANCOVAN*, dalle finestre di correlazione ottenute.

Successivamente, sono state approfondite le analisi seguenti:

Primariamente, si è implementata la *state-based dFNC analysis*: si è svolto un *K-means clustering* sulle matrici di correlazione ottenute, il quale ha permesso di individuare 4 pattern di connettività più ricorrenti, minimizzando la varianza totale all'interno delle matrici più simili e ottenendo, così, gli *stati*.

Le opzioni della GUI hanno garantito di: modificare il numero di *K-means* da eseguire, impostare il metodo di calcolo della distanza (in questo caso si è selezionato come modello il *square Euclidean*), introdurre il massimo numero di interazioni e il numero di data set di riferimento per la *gap analysis*.

In un secondo tempo, si è implementata la *meta-state dFNC analysis*: attraverso diverse metodiche (*tICA*, *sICA*, *PCA*), sono stati individuati 6 pattern di connettività massimamente indipendenti nelle dimensioni spaziali e temporali. Come algoritmo *ICA* si è scelto di utilizzare *Infomax* e di ripetere queste per 10 volte ciascuna col fine di ottenere un risultato solido e attendibile.

In aggiunta, sulle *wFNC* è stato eseguito un ulteriore *K-means clustering*: in questo caso anche i 6 cluster ottenuti hanno subito lo stesso processamento dei pattern di connettività.

Si è, così, proceduto attraverso la discretizzazione in quartili delle time-course individuate, calcolando, in tal maniera, i *meta-stati*.

Trattandosi di 6 pattern di connettività/cluster, ogni meta-stato è risultato in un vettore composto da 6 valori: per ogni pattern/cluster, infatti, si è andato a calcolare il contributo apportato da questo all'interno della somma pesata.

Si è potuto, così, definire il vettore ottenuto come:

$$w^k(t) = (w_1^k(t), w_2^k(t), w_3^k(t), w_4^k(t), w_5^k(t), w_6^k(t))$$

Questo è stato, successivamente, convertito, sostituendo i valori reali del peso di ogni pattern/cluster con un valore pari a $\pm(1,2,3,4)$, in base al segno e al quartile di appartenenza di ogni contributo. Il vettore ottenuto è risultato matematicamente così definito:

$$\lambda^k(t) = (\lambda_1^k(t), \lambda_2^k(t), \lambda_3^k(t), \lambda_4^k(t), \lambda_5^k(t), \lambda_6^k(t))$$

Dove:

$$\lambda_i^k(t) = \pm(1, 2, 3, 4)$$

Da questa caratterizzazione della connettività in 6 dimensioni discretizzate si è potuto ricavare lo *state-space* X (Figura 5.4), il quale è risultato composto di un reticolo costituito da un set di 6 co-dimensioni mutualmente ortogonali, da cui viene sottratto per ognuna un iperpiano, corrispondente al set 0 di una delle dimensioni.

Lo *state-space* X è risultato, perciò, formato da $C = 8^6 = 262.144$ punti differenti, indicativi del numero di meta-stati possibili realizzabili. Sulla base di ciò, sono state ricavate 4 metriche d'interesse su cui si sono focalizzate le successive analisi statistiche:

- *Number of states*: il numero dei diversi meta-stati che ogni soggetto occupa durante la propria scansione (parametro n);
- *Change between states*: il numero di volte che ogni soggetto passa da un meta-stato a un altro (parametro s);
- *State span*: la massima distanza L1 (distanza nella geometria del taxi) tra meta-stati per ogni soggetto (parametro r);
- *Total distance*: somma delle distanze L1 tra meta-stati successivi per ogni soggetto, ovvero la distanza totale percorsa da ogni soggetto lungo lo *state-space*. L'ultima misura risulta logicamente determinata dalle 3 precedenti. É massimizzata quando un soggetto oscilla frequentemente tra due meta-stati in punti distanti dello *state-space* (parametro d).

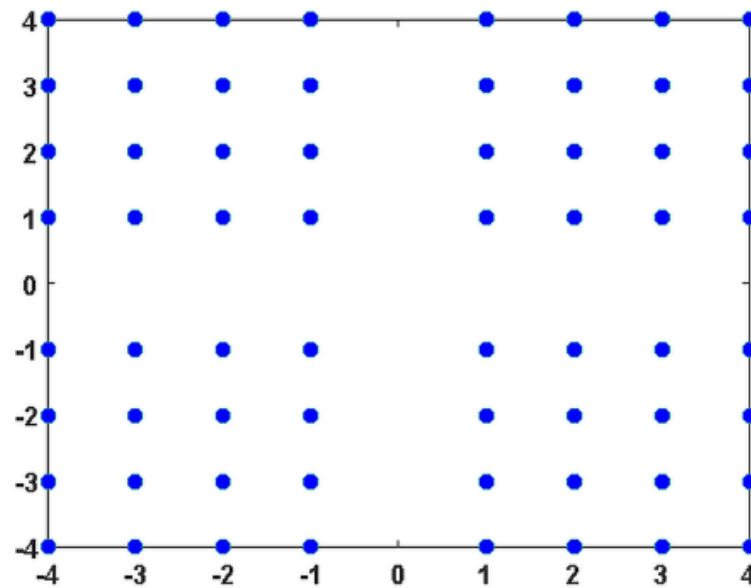


Figura 5.4: *Rappresentazione dello state-space X individuato ponendo sui due assi gli 8 valori assegnabili al peso di ogni pattern/cluster nel vettore meta-stato (L'iperpiano 0 viene rimosso perché non rientra tra i quartili assegnabili). Tale rappresentazione risulta nella semplificazione di un modello costruito, in realtà, su un numero di dimensioni pari al numero di pattern/cluster ottenuti (6 nel nostro caso) [146].*

5.3.5 Analisi statistiche

Per questa fase dello studio ci si è serviti inizialmente della funzione $dFNC$ *stats* di *GIFT*, in questo modo si è andati ad operare un *two sample t-test*, svolto comparando i controlli con i soggetti ad alto rischio di abuso.

Per ogni gruppo sono stati ricalcolati i cluster centroid relativi, indicando, inoltre, il numero di soggetti in cui ogni *stato* è occorso con un numero finito di correlazioni.

Sono state ottenute così:

- Le *cluster mean correlation* attinenti ai due gruppi inizialmente selezionati e i risultati del relativo two sample t-test;
- Le *mean dwell time*, ovvero il tempo medio che i soggetti dei rispettivi due gruppi trascorrono nello stesso stato, e i risultati del relativo two sample t-test;
- I risultati del two sample t-test inerenti ai meta-stati.

Per svolgere le analisi restanti, ci si è serviti del programma *JAMOVI*, ovvero un'interfaccia grafica di *R* che garantisce la possibilità di accedere in maniera intuitiva alle più moderne novità nell'ambito della metodologia statistica.

Il database è stato, dunque, rielaborato come file *JAMOVI* e ampliato con i parametri relativi agli stati (*mean dwell time*) e ai meta-stati (*number of states, change between states, state span, total distance*).

Su questi dati sono state ricavate rispettivamente:

- Le analisi di statistica descrittiva;
- Le analisi della varianza (*ANOVA*), con relativo post hoc test, e di covarianza (*ANCOVA*), utilizzando come covariate i dati clinici relativi a *HAMD, STAI-G X1, STAI-G X2 e ADHD totale* valutati singolarmente;
- Le correlazioni con i parametri clinici e di consumo;
- Le analisi di mediazione tra i risultati significativi.

6. Risultati

6.1 Analisi di connettività statica

Attraverso l'applicazione della *constrained group ICA* sono stati individuati 53 componenti, ascrivibili a 7 domini di connettività.

Di seguito vengono riportati i componenti medi rilevati tra i 94 soggetti, raggruppati in base al dominio d'appartenenza.

Ognuno di essi viene rappresentato con:

- La propria *spatial map* (z-score), raffigurante le sezioni assiali, coronali e sagittali più significative e i picchi di attivazione (Figura 6.1);
- La *power spectra*, il cui andamento permette di determinare l'effettiva provenienza cerebrale del segnale (Figura 6.2).

Per ogni soggetto sono state ottenute, inoltre, le *time-course* di ogni componente, fondamentali per il completamento delle successive analisi.

Sempre in questa fase è stato possibile ricavare una mappa delle correlazioni medie tra i diversi componenti in condizioni di connettività statica, raffigurata di seguito mediante un apposito *grafico a matrice* (Figura 6.3) e il *connettogramma* (Figura 6.4).

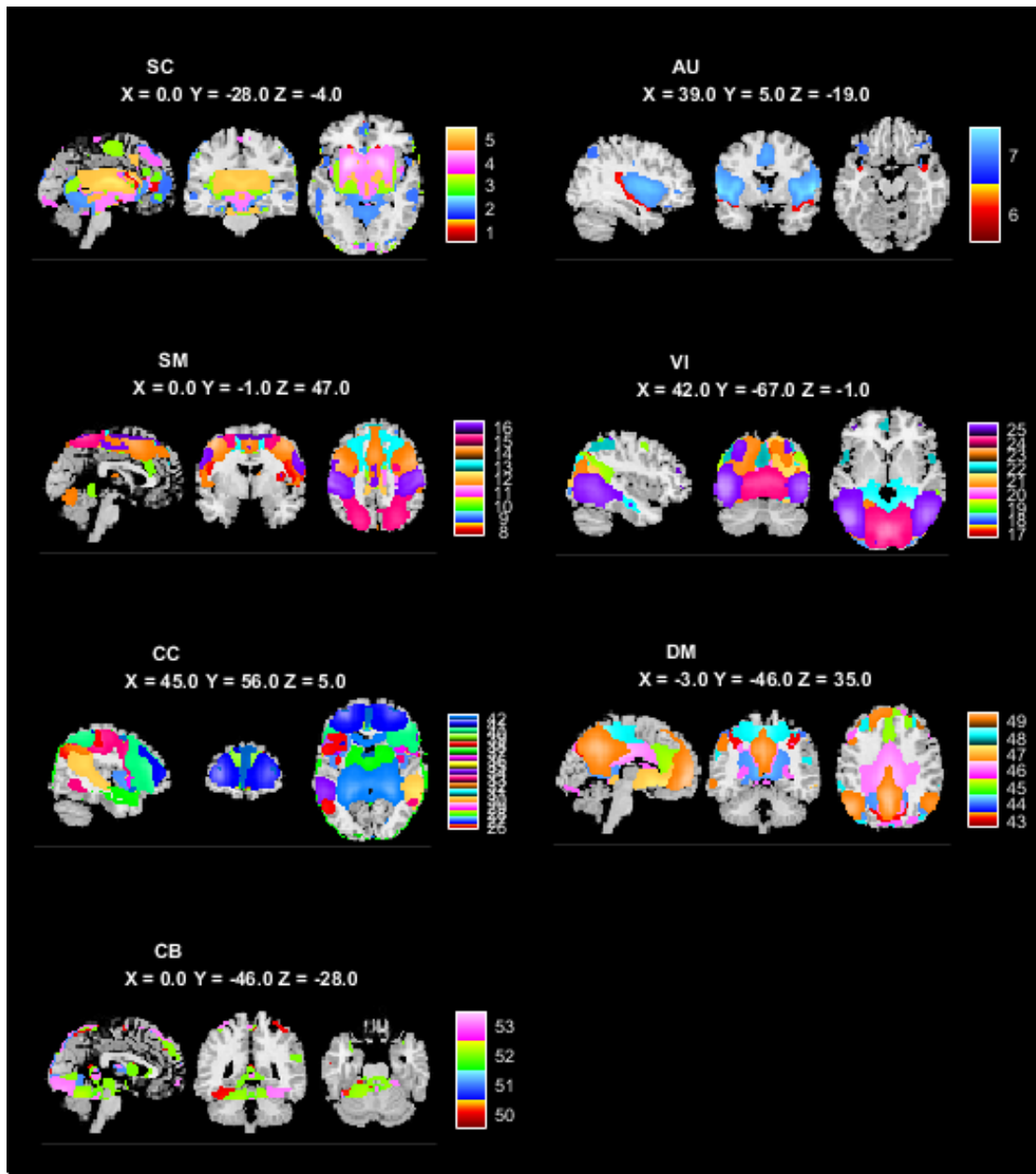


Figura 6.1: *Spatial map dei componenti raggruppati in base al dominio di riferimento, come definito dal template di NeuroMark53.*

Da sinistra a destra procedendo verso il basso:

Sub-cortical domain (1:5); Auditory domain (6:7);

Sensorimotor domain (8:16); Visual domain (17:25);

Cognitive-control domain (26:42); Default-mode domain (43:49);

Cerebellar domain (50:53).

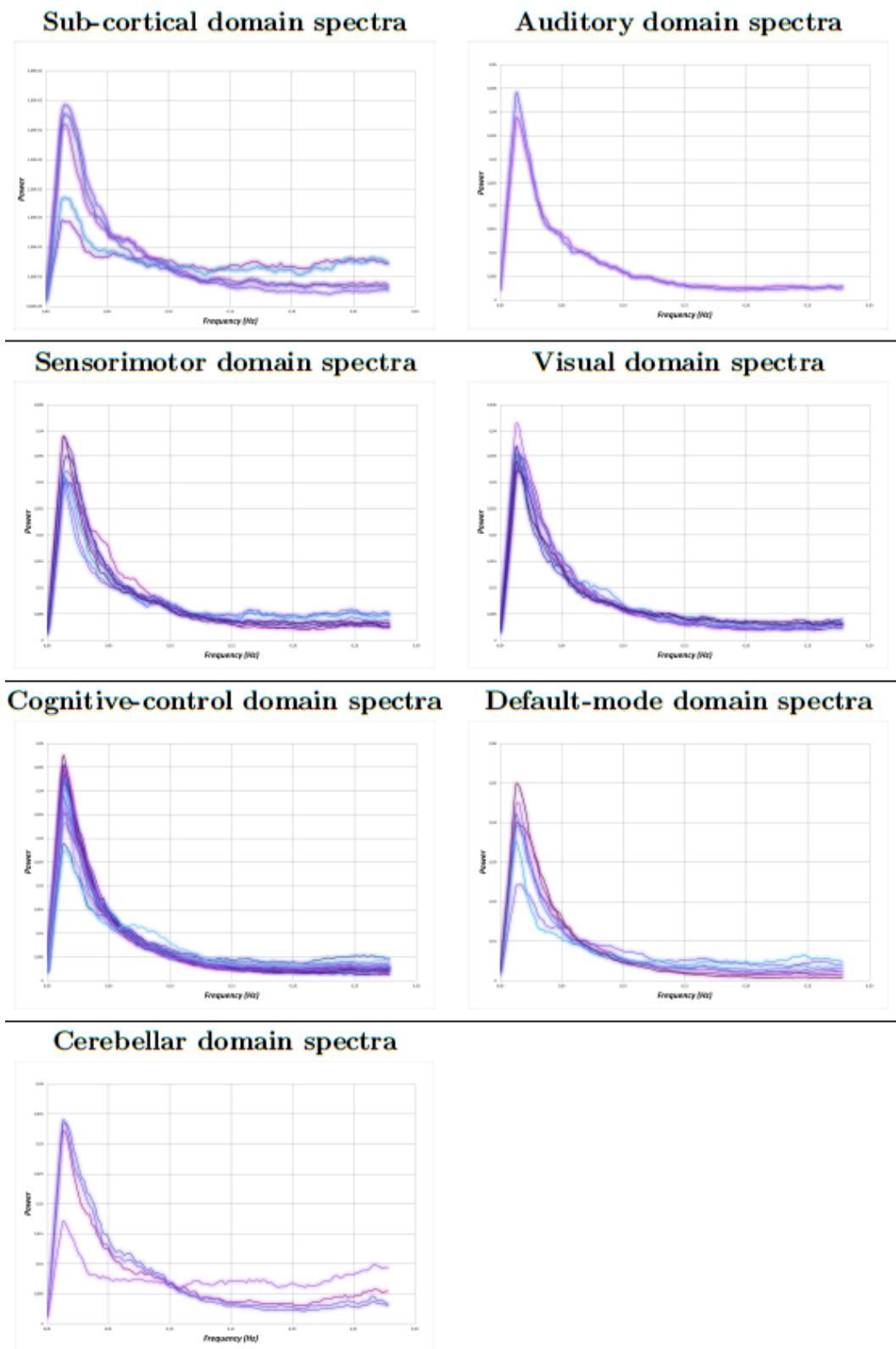


Figura 6.2: *Power spectra dei componenti raggruppati in base al dominio di riferimento, come definito dal template di Neuromark53.*

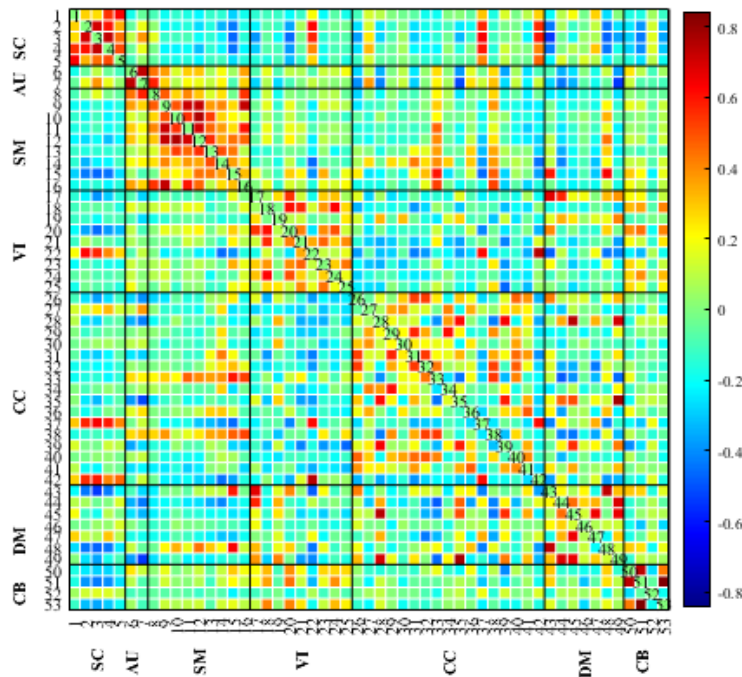


Figura 6.3: Matrix plot raffigurante le correlazioni medie tra componenti in static FNC. Le correlazioni positive vengono rappresentate in rosso, in blu le negative.

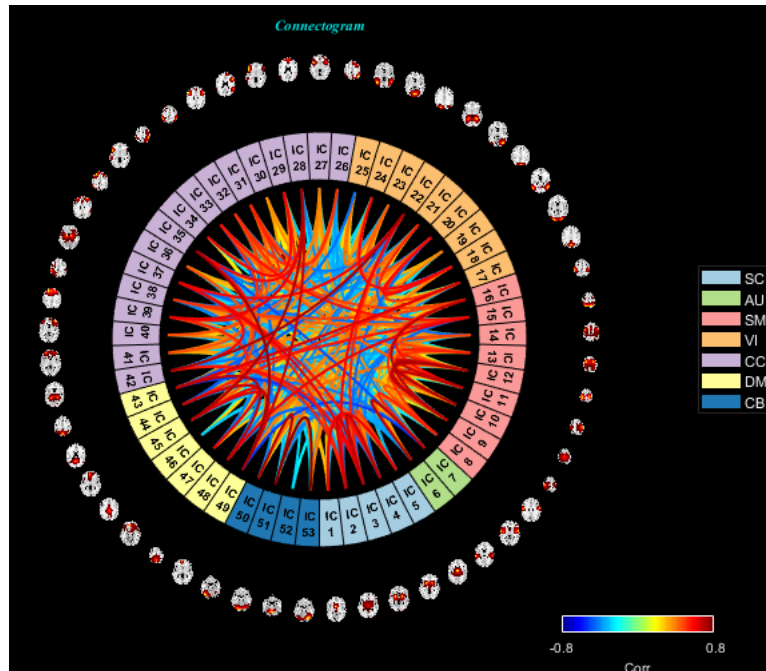


Figura 6.4: Connettogramma raffigurante le correlazioni medie tra componenti in static FNC. Le correlazioni positive vengono rappresentate in rosso, in blu le negative.

6.2 Analisi di connettività dinamica

6.2.1 Analisi degli stati

A seguire i 4 stati ottenuti dalle *state-based dFNC analysis* con il corrispondente cluster centroid e la frequenza, espressa in percentuale, con cui questo si è ripresentato lungo la time-course (Figura 6.5): l'adeguamento lineare sembrerebbe indicare una prominente prevalenza di ricorrenza dello stato 4 rispetto agli altri.

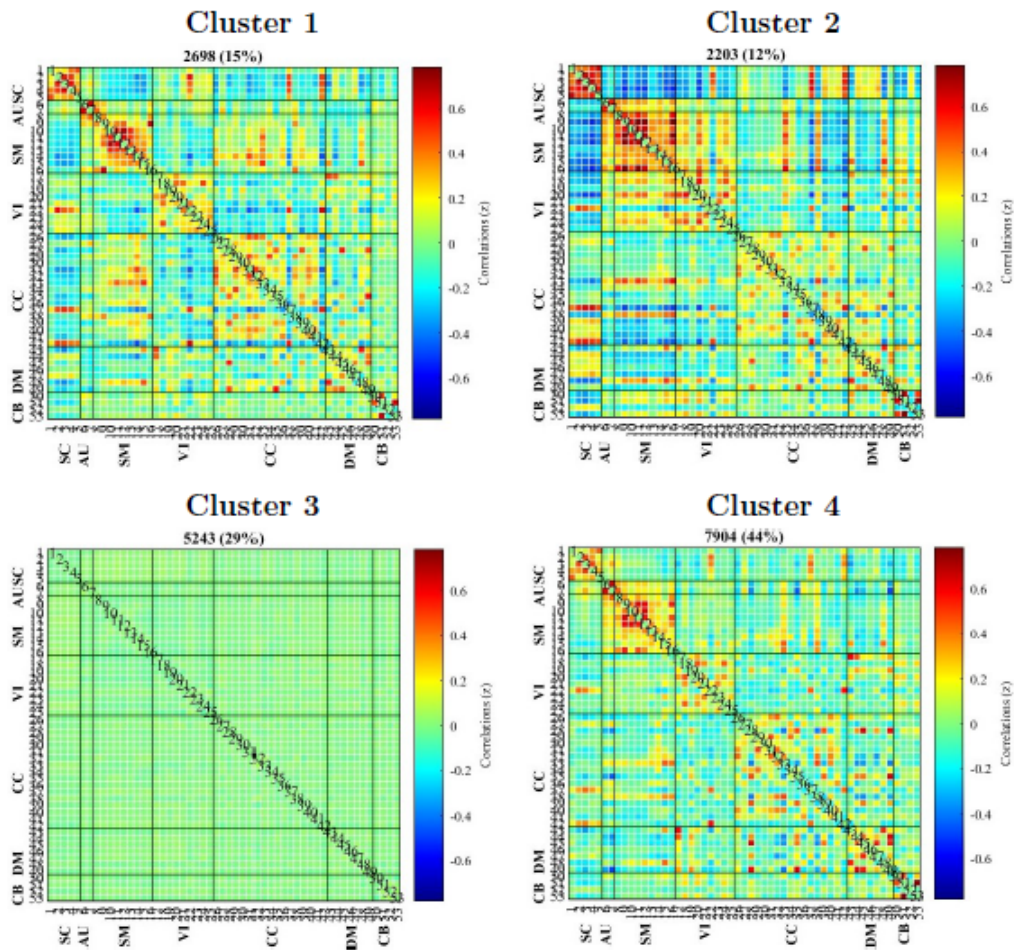


Figura 6.5: Cluster centroid dei 4 stati individuati mediante il K-means clustering:

Lo stato 1 si è presentato con una frequenza pari al 15%;
Lo stato 2 si è presentato con una frequenza pari al 12%;
Lo stato 3 si è presentato con una frequenza pari al 29%;
Lo stato 4 si è presentato con una frequenza pari al 44%.

Proseguendo attraverso un confronto della *mean dwell time* tra i due gruppi (Figura 6.6), ovvero del tempo medio di permanenza in ogni stato, si è identificata come statisticamente significativa la differenza dei due tempi nello stato 3 e 4. Si è optato, tuttavia, per non considerare lo stato 3 nelle successive analisi, in quanto il gruppo di soggetti a rischio in cui questo è occorso è stato ritenuto poco rappresentativo, risultando composto di soli 7 soggetti.

Indagando ulteriormente lo stato 4 attraverso analisi di statistica descrittiva (Tabella 6.1 e 6.2) e analisi di varianza (Tabella 6.3), si è riscontrata una maggiore propensione dei pazienti ad oscillare all'interno dello stato 4 rispetto ai controlli.

Le analisi di covarianza, inoltre, hanno permesso di dimostrare come le differenze individuate tra controlli e pazienti non dipendano dalle variabili psicopatologiche relative a depressione (*HAMD*), ansia (*STAI-G X1*, *STAI-G X2*) e disturbo da deficit di attenzione e iperattività (*ADHD totale*) (Tabella 6.4).

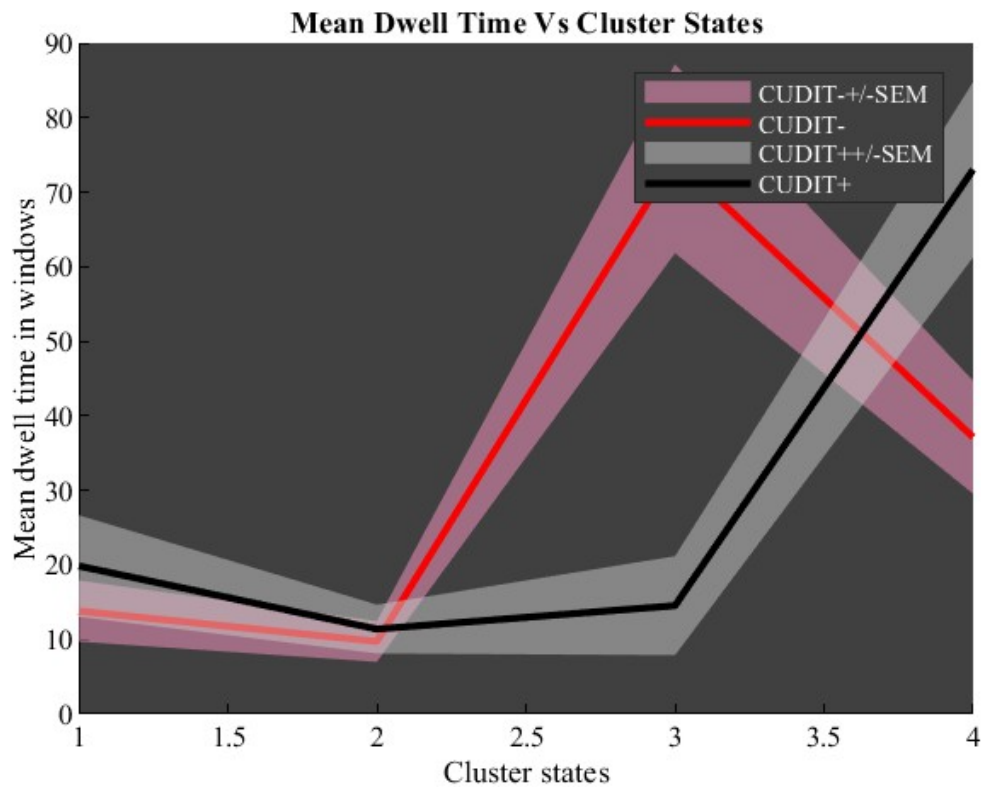


Figura 6.6: *Mean dwell time dei 4 stati individuata all'interno dei due gruppi d'indagine (CUDIT+ = Gruppo soggetti ad alto rischio di abuso, CUDIT- = Gruppo controlli). Tra i due gruppi non sembra esserci una differenza significativa confrontando il tempo di permanenza nei primi due stati, si è proceduto, perciò, soffermandosi solo sugli stati 3 e 4.*

Tabella 6.1: *Analisi di statistica descrittiva applicata alle mean dwell time dei 4 stati individuati.*

Descriptives					
	CUDIT group	Mean dwell time C1	Mean dwell time C2	Mean dwell time C3	Mean dwell time C4
N	0	55	55	55	55
	1	39	39	39	39
Missing	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
Mean	0	13.5	12.1	74.8	35.7
	1	19.9	11.4	14.5	73.0
Median	0	0.00	0.00	0.00	13.0
	1	6.00	0.00	0.00	49.0
Standard deviation	0	28.9	27.7	90.9	53.6
	1	42.6	20.4	41.5	73.4
Minimum	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	0.00	0.00	0.00
Maximum	0	192	157	192	192
	1	192	77.0	192	192

Tabella 6.2: *Box plot rappresentativo della mean dwell time dello stato 4, come distribuita tra i due gruppi di indagine, mettendone in risalto la mediana. I soggetti del gruppo 1 (soggetti a rischio) presentano una distribuzione media in valori più alti rispetto al gruppo 0 (controlli).*

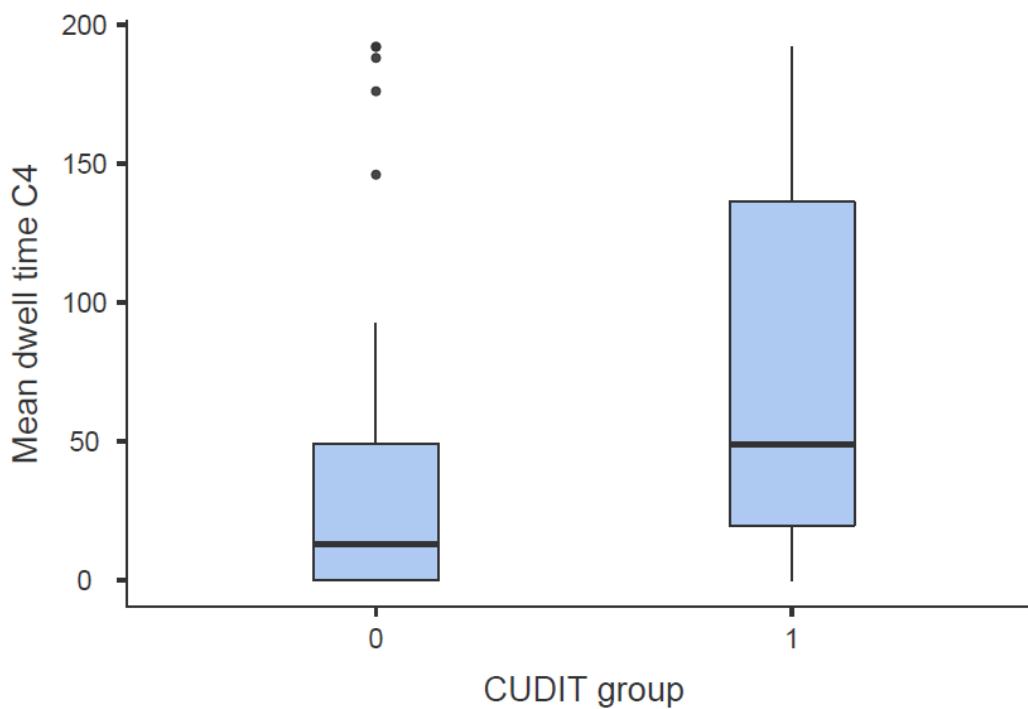


Tabella 6.3: L'analisi di varianza (ANOVA) svolta sulla mean dwell time dello stato 4 dimostra una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ($p\text{-value}<0.05$). Il post hoc conferma la distribuzione in valori più elevati della mean dwell time per i pazienti.

ANOVA - Mean dwell time C4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
CUDIT group	31723	1	31723	8.11	0.005
Residuals	359816	92	3911		

Post Hoc Comparisons - CUDIT group

Comparison		Mean Difference	SE	df	t	Ptukey
CUDIT group	CUDIT group					
0	- 1	-37.3	13.1	92.0	-2.85	0.005

Tabella 6.4: Le analisi di covarianza (ANCOVA) svolte sulla mean dwell time dello stato 4 dimostrano una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ($p<0.05$) anche per i confronti operati considerando come covariate i dati psicopatologici relativi a depressione (HAMD), ansia (STAI-G X1, STAI-G X2) e disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD totale) in maniera indipendente.

In questo modo si è andati a determinare con certezza come la differenza non dipenda da queste variabili psicopatologiche.

	HAM-D	STAI-G X1	STAI-G X2	ADHD-SB tot
CLUSTER 4	0.013	0.013	0.006	0.023

A questo punto si è proceduto andando a correlare il tempo di permanenza con i dati clinici precedentemente raccolti.

Una correlazione statisticamente significativa è stata individuata con il punteggio *CUDIT-R* dei vari soggetti. Andando a ricercare la correlazione tra i due gruppi indipendentemente, si è riscontrato come solo nel gruppo dei pazienti i parametri siano correlabili in maniera significativa (Tabella 6.5).

Le analisi di correlazione parziale, inoltre, hanno permesso di dimostrare come la significatività individuata non sia dipendente dalle variabili psicopatologiche relative a depressione (HAMD), ansia (STAI-G X1, STAI-G X2) e disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD totale) (Tabella 6.6).

Tabella 6.5: *Analisi di correlazione tra la mean dwell time dello stato 4 e il punteggio CUDIT svolte indipendentemente sui due gruppi (a sinistra i controlli, a destra i pazienti) in seguito all'applicazione di un filtro: si noti come la presenza di significatività si identifica solo all'interno del gruppo dei pazienti ($p\text{-value}=0.018<0.05$).*

Correlation			Correlation		
Mean dwell time C4			Mean dwell time C4		
Mean dwell time C4	Pearson's r	—	Mean dwell time C4	Pearson's r	—
	p-value	—		p-value	—
CUDIT	Pearson's r	-0.020	CUDIT	Pearson's r	0.377*
	p-value	0.883		p-value	0.018

Tabella 6.6: *Analisi di correlazione parziale tra la mean dwell time dello stato 4 e il punteggio CUDIT svolte per il gruppo dei soggetti a rischio, assumendo come covariate i dati psicopatologici relativi a depressione (HAMD), ansia (STAI-G X1, STAI-G X2) e disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD totale) indipendentemente. La presenza di significatività per ognuna delle analisi svolte ($p<0.05$) dimostra come la correlazione ottenuta non dipenda da detti parametri clinici.*

	HAM-D	STAI-G X1	STAI-G X2	ADHD-SB tot
CLUSTER 4 with CUDIT	0.016	0.011	0.016	0.014

6.2.2 Analisi dei meta-stati

Risultati di interesse sono stati ricavati dalle analisi relative al *K-means clustering*, si è deciso, perciò, di approfondire nelle pagine a seguire i prodotti tratti dalle statistiche svolte su questo algoritmo.

Di seguito si riportano i pattern/cluster (Figura 6.7) e i dati ricavati dalle analisi descrittive (Tabella 6.7): dai box plot (Tabella 6.8) e dalle analisi di varianza, si è potuto definire come i soggetti a rischio di abuso di cannabis tendano ad avere valori più elevati sia per quanto riguarda il numero di meta-stati occupati (Tabella 6.9), sia per il numero di cambi di meta-stato (Tabella 6.10), sia per la distanza totale percorsa nello state-space (Tabella 6.11).

Non sono stati ottenuti risultati significativi dalle analisi applicate sull'intervallo tra meta-stati (*state span*).

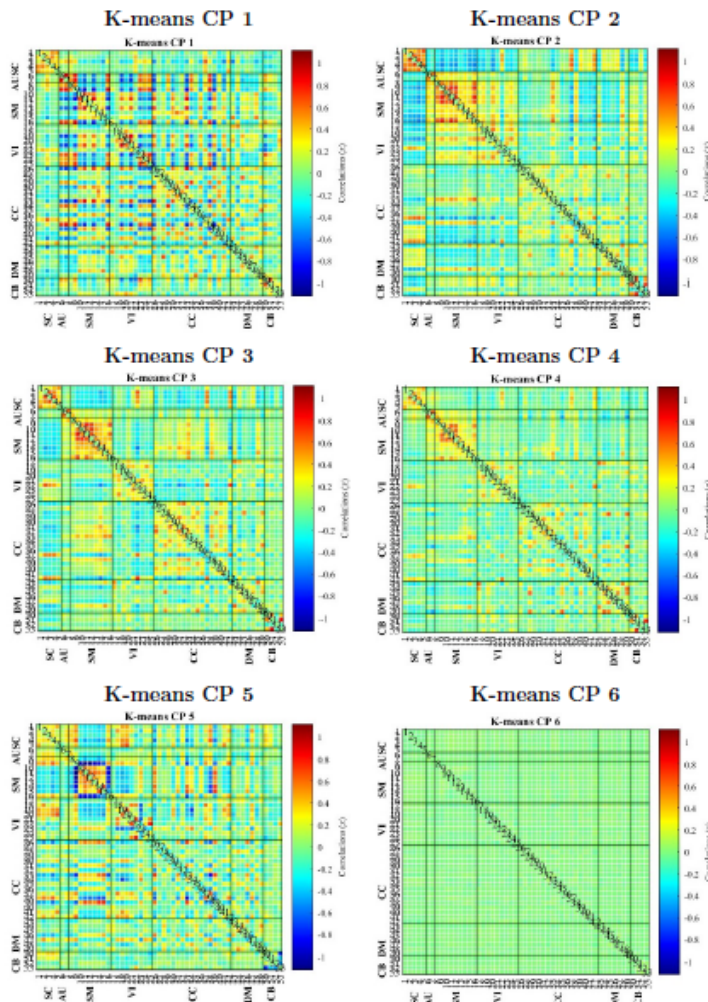


Figura 6.7: Pattern di connettività rappresentativi delle 6 matrici più ricorrenti all'interno delle time-course.

Tabella 6.7: *Analisi di statistica descrittiva applicate alle metriche del K-means, ripartendo i dati in base al gruppo di appartenenza.*

Descriptives						
	CUDIT group	K-means (N° states)	K-means (Change states)	K-means (State span)	K-means (Total distance)	
N	0	55	55	55	55	
	1	39	39	39	39	
Missing	0	0	0	0	0	
	1	0	0	0	0	
Mean	0	8.95	17.3	4.36	18.3	
	1	11.0	21.3	4.67	22.4	
Median	0	9	18	5	19	
	1	10	20	5	21	
Standard deviation	0	3.62	6.66	1.38	7.08	
	1	4.08	6.83	1.13	7.51	
Minimum	0	2	2	1	2	
	1	3	7	2	7	
Maximum	0	16	31	7	33	
	1	24	35	8	38	

Tabella 6.8: *Box plot rappresentativi della distribuzione dei valori di ogni metrica del K-means per i due gruppi. Escludendo lo state span, si riscontra per le altre metriche una distribuzione in valori medi più elevati per i pazienti rispetto ai controlli.*

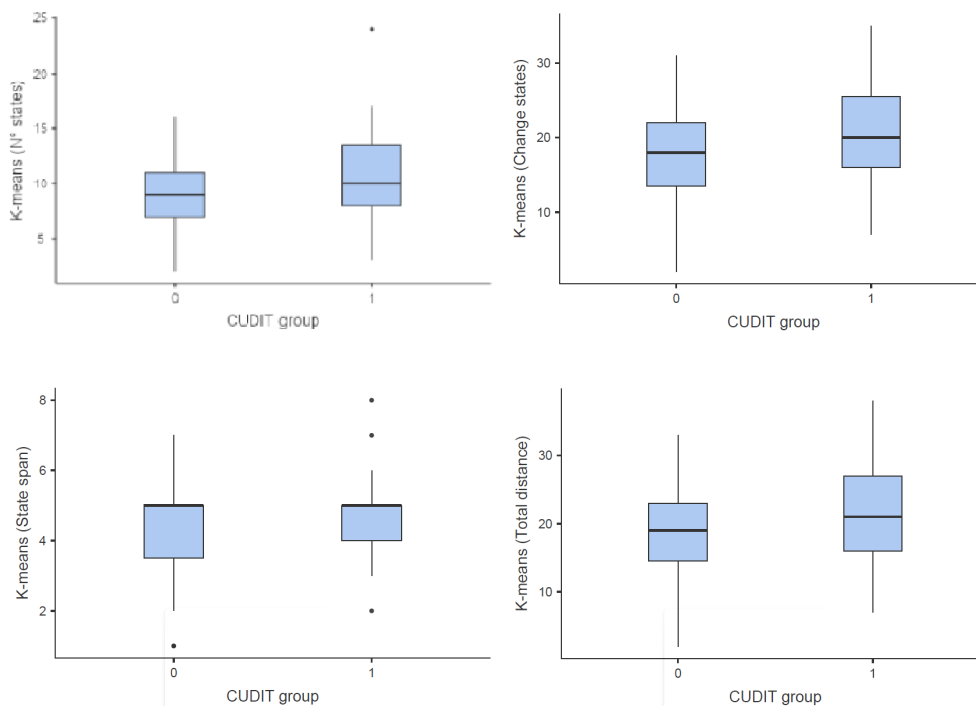


Tabella 6.9: *Analisi di varianza (ANOVA) applicata per confrontare il numero di meta-stati visitati per i due gruppi di studio. Si noti come il valore della $p\text{-value}=0.013 < 0.05$ sia indicativo di una differenza statisticamente significativa. Il post hoc test svolto successivamente ha confermato una distribuzione in valori più alti per la metrica di riferimento per il gruppo dei pazienti.*

ANOVA - K-means (N° states)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
CUDIT group	93.9	1	93.9	6.45	0.013
Residuals	1339.8	92	14.6		

Post Hoc Comparisons - CUDIT group

Comparison		Mean Difference	SE	df	t	Ptukey
CUDIT group	CUDIT group					
0	- 1	-2.03	0.799	92.0	-2.54	0.013

Tabella 6.10: *Analisi di varianza (ANOVA) applicata per confrontare il numero di cambi di meta-stato tra i due gruppi di studio. Si noti come il valore della $p\text{-value}=0.005 < 0.05$ sia indicativo di una differenza statisticamente significativa. Il post hoc test svolto successivamente ha confermato una distribuzione in valori più alti per la metrica di riferimento per il gruppo dei pazienti.*

ANOVA - K-means (Change states)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
CUDIT group	370	1	369.5	8.15	0.005
Residuals	4170	92	45.3		

Post Hoc Comparisons - CUDIT group

Comparison		Mean Difference	SE	df	t	Ptukey
CUDIT group	CUDIT group					
0	- 1	-4.02	1.41	92.0	-2.86	0.005

Tabella 6.11: *Analisi di varianza (ANOVA) applicata per confrontare la distanza totale percorsa nello state-space tra i due gruppi di studio. Si noti come il valore della p -value=0.008<0.05 sia indicativo di una differenza statisticamente significativa. Il post hoc test svolto successivamente ha confermato una distribuzione in valori più alti per la metrica di riferimento per il gruppo dei pazienti.*

ANOVA - K-means (Total distance)						
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	
CUDIT group	384	1	384.4	7.29	0.008	
Residuals	4849	92	52.7			

Post Hoc Comparisons - CUDIT group							
Comparison							
CUDIT group	CUDIT group	Mean Difference	SE	df	t	Ptukey	
0	- 1	-4.10	1.52	92.0	-2.70	0.008	

Le analisi di covarianza hanno permesso di dimostrare come le differenze individuate non dipendano dalle variabili psicopatologiche relative a depressione (*HAMD*) e ansia (*STAI-G X1*, *STAI-G X2*) (Tabella 6.12).

Tabella 6.12: *Le analisi di covarianza (ANCOVA) svolte sulle metriche del K-means mostrano una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ($p<0.05$) anche per i confronti operati considerando in maniera indipendente i dati psicopatologici relativi a depressione (*HAMD*) e ansia (*STAI-G X1*, *STAI-G X2*) come covariate. Risultati in tendenza sono stati ottenuti anche per le analisi svolte considerando come covariata l'ADHD totale, sebbene risultino non significativi.*

	HAM-D	STAI-G X1	STAI-G X2	ADHD-SB tot
<i>K-means</i>				
N. states	0.012	0.025	0.038	0.165
Change states	0.004	0.013	0.017	0.075
Total distance	0.006	0.018	0.024	0.087

Andando a valutare le correlazioni con i dati clinici, si sono riscontrati dei risultati significativi nel confronto stabilito con la *scala di valutazione dell'ansia di tratto (STAI-G X2)*.

Correlando gli stessi parametri indipendentemente nei due gruppi, si è confermata la presenza di una significatività solo all'interno del gruppo dei consumatori.

Risultati analoghi non sono stati ottenuti indagando la correlazione con la *scala di valutazione dell'ansia di stato (STAI-G X1)* (Tabella 6.13).

Tabella 6.13: *Correlazioni ottenute confrontando le metriche del K-means con le scale di valutazione dell'ansia. Si conferma una correlazione significativa per la scala dell'ansia di tratto (STAI-G X2), la quale è stata successivamente indagata indipendentemente nei due gruppi tramite l'applicazione di un filtro. Si riportano nelle ultime due righe i risultati ottenuti per il gruppo dei controlli ($p\text{-value} > 0.05$) e, in ultima, i risultati ottenuti per il gruppo dei soggetti a rischio ($p\text{-value} < 0.05$).*

		K-means (N° states)	K-means (Change states)	K-means (State span)	K-means (Total distance)
K-means (N° states)	Pearson's r	—			
	p-value	—			
K-means (Change states)	Pearson's r	0.860 ***	—		
	p-value	< .001	—		
K-means (State span)	Pearson's r	0.886 ***	0.761 ***	—	
	p-value	< .001	< .001	—	
K-means (Total distance)	Pearson's r	0.867 ***	0.994 ***	0.774 ***	—
	p-value	< .001	< .001	< .001	—
STAI-G X1	Pearson's r	0.115	0.135	0.084	0.127
	p-value	0.269	0.194	0.419	0.224
STAI-G X2	Pearson's r	0.212 *	0.205 *	0.210 *	0.197
	p-value	0.040	0.047	0.042	0.057
STAI-G X2	Pearson's r	0.037	-0.070	0.079	-0.072
	p-value	0.786	0.612	0.567	0.599
STAI-G X2	Pearson's r	0.297	0.411 **	0.362 *	0.393 *
	p-value	0.067	0.009	0.023	0.013

Le successive analisi di correlazione parziale, svolte per il gruppo dei pazienti, mostrano come i parametri clinici non influenzino l'esito delle correlazioni precedentemente esaminate (Tabella 6.14).

Tabella 6.14: *Analisi di correlazione parziale tra le metriche del K-means e la scala STAI-G X2, svolte per il gruppo dei soggetti a rischio, assumendo come covariate indipendenti i dati psicopatologici relativi a depressione (HAMD), ansia (STAI-G X1) e disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD totale). La presenza di significatività per quasi la totalità delle analisi svolte (la p-value dell'analisi di correlazione tra numero di stati e STAI-G X2 si rivela non significativa se si considera come covariata l'ADHD totale, tuttavia il risultato rimane in tendenza con le altre analisi operate) dimostra come le correlazioni ottenute non dipendano da detti parametri clinici.*

	HAM-D	STAI-G X1	STAI-G X2	ADHD-SB tot
N. states	0.043	0.035		0.072
Change states	0.003	0.006		0.025
State span	0.032	0.018		0.029
Total distance	0.005	0.008		0.031

Altri risultati di minor interesse clinico sono stati ottenuti correlando le metriche del K-means con alcuni parametri di consumo (*duration use, current use g/week*) (Tabella 6.15).

Tabella 6.15: *Correlazioni ottenute confrontando le metriche del K-means con i parametri di consumo all'interno del solo gruppo dei soggetti a rischio. Tali analisi rilevano una significatività se operate sulla durata del consumo e sull'uso corrente valutato in grammi a settimana.*

		K-means (N° states)	K-means (Change states)	K-means (State span)	K-means (Total distance)
Duration use	Pearson's r	-0.359 *	-0.339 *	-0.351 *	-0.340 *
	p-value	0.025	0.035	0.029	0.034
Current use (g/week)	Pearson's r	-0.329 *	-0.424 **	-0.277	-0.417 **
	p-value	0.041	0.007	0.088	0.008

Alla luce dei risultati precedentemente trattati, si è deciso di meglio indagare la relazione vigente tra la diagnosi di rischio di abuso e le alterazioni rilevate. Si è stabilito, così, di svolgere delle analisi di mediazione, con lo scopo di definire se il rapporto di dipendenza tra le due variabili fosse diretto o se, invece, fosse mediato dalla maggiore propensione dei pazienti a sviluppare ansia di tratto. Tali funzioni hanno mostrato come non esista alcuna significatività in grado di spiegare un possibile effetto mediatore del punteggio STAI-G X2 (Tabelle 6.16, 6.17, 6.18).

Tabella 6.16: *Analisi di mediazione tra la diagnosi rischio di di abuso e il numero di stati visitati, assumendo come mediatore la scala STAI-G X2. L'effetto indiretto assume valore non significativo ($p\text{-value}=0.187>0.05$), ne consegue la mancata esistenza di un rapporto di mediazione.*

Mediation Estimates					
Effect	Estimate	SE	Z	p	% Mediation
Indirect	0.307	0.233	1.32	0.187	15.2
Direct	1.721	0.804	2.14	0.032	84.8
Total	2.029	0.790	2.57	0.010	100.0

Tabella 6.17: *Analisi di mediazione tra la diagnosi di rischio di abuso e il numero di cambi di stato, assumendo come mediatore la scala STAI-G X2. L'effetto indiretto assume valore non significativo ($p\text{-value}=0.218>0.05$), ne consegue la mancata esistenza di un rapporto di mediazione.*

Mediation Estimates					
Effect	Estimate	SE	Z	p	% Mediation
Indirect	0.495	0.401	1.23	0.218	12.3
Direct	3.530	1.422	2.48	0.013	87.7
Total	4.024	1.394	2.89	0.004	100.0

Tabella 6.18: *Analisi di mediazione tra la diagnosi di rischio di abuso e la distanza totale percorsa, assumendo come mediatore la scala STAI-G X2. L'effetto indiretto assume valore non significativo ($p\text{-value}=0.231>0.05$), ne consegue la mancata esistenza di un rapporto di mediazione.*

Mediation Estimates					
Effect	Estimate	SE	Z	p	% Mediation
Indirect	0.513	0.429	1.20	0.231	12.5
Direct	3.591	1.535	2.34	0.019	87.5
Total	4.104	1.504	2.73	0.006	100.0

7. Discussione

La risonanza magnetica funzionale occupa un ruolo ormai centrale se riferito al moderno campo di ricerca delle neuroscienze, in particolar modo se si considerano i numerosi studi portati negli ultimi anni imputabili alla connettività funzionale e alle alterazioni che la caratterizzano in alcune condizioni patologiche.

Questi ultimi, infatti, rappresentano ormai un tema d'indagine particolarmente attivo che acquista una peculiare importanza in quei contesti di ricerca, come in psichiatria, dove risulta complesso ricondurre una distinta condizione neurobiologica ad una varietà di sintomi cognitivi e comportamentali.

Le analisi di connettività funzionale si assumono, così, l'onere di porre maggior luce tra ciò che esiste tra il micro e il macro, comportandosi come anello di congiunzione tra i presupposti eziopatogenici elaborati e la realtà clinica.

Per molto tempo si è discusso riguardo gli effetti determinati dalla cannabis sulla salute mentale dei soggetti consumatori e oramai è innegabile riconoscere in tale sostanza la causa di numerosi disturbi psichiatrici: tra questi, il più compromettente risulta essere certamente il disturbo da uso di cannabis. Di fatto, anche per questo disturbo psichiatrico è stato possibile definire un'ampia varietà di sintomi ad esso associabili, senza, però, essere in grado di determinarne la causa biologica sottostante.

Numerosi sono gli studi, in realtà, soffermatasi sull'indagare i meccanismi molecolari e recettoriali alla base della dipendenza e dell'astinenza indotta dalla cannabis, tuttavia, scarseggiano in letteratura pubblicazioni riferibili alle alterazioni attribuibili alla connettività funzionale di detti soggetti, questo studio, infatti, si presenta come l'unico che si è occupato di indagare il ruolo della connettività dinamica nel rischio di sviluppo del disturbo da uso di sostanze. Pertanto, si è deciso di procedere in questo lavoro, attraverso una metodologia solida e innovativa, con lo scopo di esplorare un argomento di indagine non ancora affrontato e dare una risposta ai quesiti ivi riportati.

Le analisi svolte ci hanno permesso di definire specifici pattern di connettività individuabili solo per i soggetti a rischio d'abuso, inoltre, ci è stato così possibile stabilire le diverse modalità, sia nella dimensione spaziale che temporale, con cui i due gruppi tendono a muoversi all'interno dello state-space disegnato attraverso i meta-stati.

In tal modo, si è determinato come, in primo luogo, i soggetti a rischio permangono per maggior tempo all'interno di uno stato caratterizzato da una notevole connettività intra-network, ma da una ridotta interazione tra network diversi. Secondariamente, si è ricavato come non solo i pazienti sembrano muoversi occupando più meta-stati diversi se confrontati con i controlli, ma siano anche caratterizzati da un maggior numero di passaggi tra un meta-stato e il successivo, ne consegue logicamente anche un aumento della distanza totale percorsa all'interno del connectivity space, la quale risulta anch'essa significativamente maggiore rispetto ai controlli. Non si sono identificate differenze significative, invece, confrontando lo *state span*, metrica indicativa del maggiore intervallo percorso tra un meta-stato e un altro: sembra, dunque, che entrambi i gruppi si muovano all'interno di un ipercubo della stessa grandezza radiale.

Alla luce di tali risultati, è possibile attribuire ai soggetti a rischio d'abuso una maggiore instabilità nella sfera della *fluidità dinamica* mentre non si possono trarre conclusioni analoghe se considerato il *range dinamico* occupato.

A questo punto appare doverosa una specificazione dato che, ad una prima lettura, la maggiore predisposizione dei soggetti a rischio d'abuso a stanziare all'interno dello stato 4 potrebbe essere interpretata come il seguito di una dinamica cerebrale più stabile, in contraddizione con ciò che è stato precedentemente affermato. È necessario considerare, però, che il modello degli stati di Allen si collochi ad un livello più macroscopico rispetto a quello elaborato da Miller, ed è, perciò, verosimile affermare che, sebbene i pazienti permangono per più tempo all'interno dello stato 4, sia plausibile che all'interno di quest'ultimo, su una scala temporale ad alta risoluzione, si possa riscontrare un maggiore disequilibrio.

Soffermandosi ora sulle correlazioni individuate con i parametri clinici, possiamo desumere, basandosi sulle analisi svolte con il punteggio *CUDIT-R*, come le caratteristiche peculiari del connettoma dello stato 4 siano indicative della severità dell'abuso di THC e che stanziandosi, dunque, per più tempo all'interno di uno stato con alta attività intra-network e basse interazioni tra network, i soggetti a rischio tendano ad essere caratterizzati da una maggiore probabilità di sviluppare disturbo da uso di cannabis.

Valutando, poi, le performance di connettività dinamica, precedentemente descritte per il gruppo dei pazienti, si nota come queste correlino con valori più elevati del punteggio *STAI-G X2*. Considerata la maggiore tendenza dei consumatori a rischio d'abuso ad essere affetti da ansia di tratto (affermazione basata sulle analisi di varianza svolte su ogni parametro clinico), ci si è po-

sti come quesito la possibilità che fosse quest'ultima condizione a causare la maggiore disconnessione dinamica rilevata, piuttosto che la diagnosi di abuso stessa. Con tali premesse, si è deciso di svolgere dei test di mediazione per indagare il rapporto vigente tra i tre dati considerati e definire se l'ansia di tratto potesse svolgere un ruolo mediatore, tuttavia, dette analisi non hanno prodotto alcun risultato significativo. In questa maniera è stato possibile definire come la correlazione individuata sia dovuta ad un effetto diretto che la dipendenza da cannabis pone sulla dinamica cerebrale.

Considerando la maggiore severità dei sintomi psichiatrici relativi ad ansia e depressione nei consumatori a rischio d'abuso, si è scelto di ripetere le analisi valutando se le differenze rilevate tra la connettività dinamica di controlli e pazienti dipendessero dai punteggi *HAMD*, *STAI-G X1*, *STAI-G X2* e *ADHD totale*. Si è deciso di riformulare le analisi di varianza e le correlazioni semplici in analisi di covarianza e correlazioni parziali, andando, così, a studiare i dati clinici come covariate una ad una. Il fatto che tutte le analisi operate covariando i punteggi delle scale di valutazione della depressione e le scale dell'ansia siano risultate significative mostra come queste variabili non concorrono in modo limitato a causare l'instabilità individuata. Per quanto riguarda l'*ADHD*, i risultati si sono rivelati più incostanti, ad ogni modo, anche i valori non significativi tendono a rimanere nel trend delle altre analisi effettuate.

Stabilito, quindi, come lo sconvolgimento funzionale correli con una maggiore propensione all'ansia di tratto, sarebbe stato auspicabile valutare la presenza di significatività per una correlazione con il punteggio ricavato dalla *global assessment of functioning (GAF)*, ovvero una scala utilizzata per valutare soggettivamente il funzionamento sociale, occupazionale e psicologico di un individuo, in risposta ai vari problemi nella vita. Si sarebbe, così, definito come lo squilibrio dinamico sia in grado di influenzare tutto lo spettro del funzionamento dei soggetti in esame. Un limite fondamentale di questo studio consta, però, proprio nella assenza, tra i dati clinici raccolti nella fase di costruzione del database, di un parametro in grado di definire il funzionamento globale di questi individui.

Oltre alle valutazioni finora esposte a riguardo della patogenesi del disturbo da uso di cannabis, altri sono i campi di interesse in cui l'applicazione delle indagini di connettività funzionale potrebbe garantire risvolti di estremo vantaggio: gli esempi principali sono dati dalla ricerca clinica e dal monitoraggio degli effetti farmacologici dei soggetti in trattamento. In tale contesto, infatti, i pattern di connettività patologici rilevati potrebbero fungere da biomarcatori,

stabilendo, così, l'efficacia di un ipotizzabile farmaco basandosi sulla normalizzazione di questi, confrontandoli prima e dopo il trattamento. Sarebbe in questo modo possibile selezionare dei farmaci di dimostrata efficacia in sede pre-clinica, da testare, in seguito, attraverso trial clinici su larga scala.

In aggiunta, un altro utilizzo terapeutico che si potrebbe trarre da tale campo d'indagine consta nella individuazione di potenziali regioni cerebrali selezionate su cui procedere attraverso la *stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS)*, al fine di incrementare l'attività funzionale dedicata al controllo cognitivo e decrementare l'impulso automatico al consumo di sostanze che vige alla base del comportamento d'abuso.

Con tali premesse, la nostra ricerca potrebbe risultare in un nuovo punto di partenza per il trattamento della dipendenza da sostanze d'abuso: lo sviluppo di studi pre-clinici basati su farmaci in grado di stabilizzare la dinamica cerebrale di detti soggetti potrebbe, infatti, risultare in un primo obiettivo su cui costruire trial clinici in grado di testare l'efficacia di terapie per trattare le tossicodipendenze.

8. Conclusione

Per concludere, con questo studio abbiamo stabilito, attraverso una metodica di indagine innovativa e robusta, capace di ricavare in maniera ottimale i molteplici dettagli che le moderne tecniche di imaging a risonanza magnetica funzionale possono fornirci, come i consumatori a rischio di sviluppo di disturbo da uso di cannabis siano caratterizzati da pattern di connettività specifici e da una compromissione della connettività funzionale dinamica, essendo essi caratterizzati da un maggior numero di meta-stati differenti, una maggior predisposizione ad oscillare tra un meta-stato e il successivo e, di conseguenza, da una maggiore lunghezza totale percorsa all'interno state-space.

Ne consegue un quadro su cui è possibile costruire delle potenziali ipotesi di eziopatogenesi, stabilendo come queste alterazioni, attribuibili al consumo di cannabis, siano, probabilmente, sinonimo di vulnerabilità per lo sviluppo di disturbi psichiatrici, quali principalmente: dipendenza dall'uso di cannabis e disturbi d'ansia.

Su queste considerazioni, lavori futuri potrebbero trarre le necessarie premesse con lo scopo di stabilire un modello biologico in grado porre certezza alle nostre supposizioni; inoltre, ricerche in campo farmacologico potrebbero trarne dei biomarcatori utili su cui sviluppare studi pre-clinici per il trattamento delle tossicodipendenze.

Bibliografia

- [1] Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & biodiversity*. 2007;4(8):1614-48.
- [2] Kranzler HR, Ciraulo DA, Zindel LR. *Psicofarmacologia delle dipendenze*. Manuale clinico. 2nd ed. Edra; 2014.
- [3] Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Tagliabatella-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural product reports*. 2016;33(12):1357-92.
- [4] D'Souza DC, Cortes-Briones JA, Ranganathan M, Thurnauer H, Creatura G, Surti T, et al. Rapid changes in cannabinoid 1 receptor availability in cannabis-dependent male subjects after abstinence from cannabis. *Biological psychiatry: cognitive neuroscience and neuroimaging*. 2016;1(1):60-7.
- [5] Hirvonen J, Goodwin R, Li CT, Terry G, Zoghbi S, Morse C, et al. Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Molecular psychiatry*. 2012;17(6):642-9.
- [6] Bloomfield MA, Ashok AH, Volkow ND, Howes OD. The effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the dopamine system. *Nature*. 2016;539(7629):369-77.
- [7] Zehra A, Burns J, Liu CK, Manza P, Wiers CE, Volkow ND, et al. Cannabis addiction and the brain: a review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2018;13(4):438-52.
- [8] Vandrey R, Haney M. Pharmacotherapy for cannabis dependence. *CNS drugs*. 2009;23(7):543-53.
- [9] Guha M. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. Reference Reviews*. 2014.
- [10] Hallam C, Bewley-Taylor DR. *Mapping the world drug problem: Science and politics in the United Nations drug control system*. 2010.
- [11] Hall W. *Health and Social Effects of Nonmedical Cannabis Use (The)*. World Health Organization; 2016.
- [12] Peacock A, Leung J, Larney S, Colledge S, Hickman M, Rehm J, et al. Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. *Addiction*. 2018;113(10):1905-26.

- [13] Kelly AB, Weier M, Hall WD. The age of onset of substance use disorders. In: Age of onset of mental disorders. Springer; 2019. p. 149-67.
- [14] Degenhardt L, Chiu WT, Sampson N, Kessler RC, Anthony JC, Angermeyer M, et al. Toward a global view of alcohol, tobacco, cannabis, and cocaine use: findings from the WHO World Mental Health Surveys. *PLoS medicine*. 2008;5(7):e141.
- [15] Agrawal A, Lynskey MT. Cannabis controversies: how genetics can inform the study of comorbidity. *Addiction*. 2014;109(3):360-70.
- [16] Verweij KJ, Zietsch BP, Lynskey MT, Medland SE, Neale MC, Martin NG, et al. Genetic and environmental influences on cannabis use initiation and problematic use: a meta-analysis of twin studies. *Addiction*. 2010;105(3):417-30.
- [17] Degenhardt L, Charlson F, Ferrari A, Santomauro D, Erskine H, Mantilla-Herrera A, et al. The global burden of disease attributable to alcohol and drug use in 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Psychiatry*. 2018;5(12):987-1012.
- [18] Hasin DS, Kerridge BT, Saha TD, Huang B, Pickering R, Smith SM, et al. Prevalence and correlates of DSM-5 cannabis use disorder, 2012-2013: findings from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions–III. *American Journal of Psychiatry*. 2016;173(6):588-99.
- [19] Cogle JR, Hakes JK, Macatee RJ, Zvolensky MJ, Chavarria J. Probability and correlates of dependence among regular users of alcohol, nicotine, cannabis, and cocaine: concurrent and prospective analyses of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *The Journal of clinical psychiatry*. 2016;77(4):15653.
- [20] Teesson M, Hall W, Lynskey M, Degenhardt L. Alcohol-and drug-use disorders in Australia: Implications of the National Survey of Mental Health and Wellbeing. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 2000;34(2):206-13.
- [21] Teesson M, Slade T, Swift W, Mills K, Memedovic S, Mewton L, et al. Prevalence, correlates and comorbidity of DSM-IV cannabis use and cannabis use disorders in Australia. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 2012;46(12):1182-92.
- [22] Feingold D, Weiser M, Rehm J, Lev-Ran S. The association between cannabis use and anxiety disorders: results from a population-based representative sample. *European Neuropsychopharmacology*. 2016;26(3):493-505.

- [23] Hunt GE, Malhi GS, Lai HMX, Cleary M. Prevalence of comorbid substance use in major depressive disorder in community and clinical settings, 1990–2019: Systematic review and meta-analysis. *Journal of affective disorders*. 2020;266:288-304.
- [24] Pinto JV, Medeiros LS, da Rosa GS, de Oliveira CES, de Souza Crippa JA, Passos IC, et al. The prevalence and clinical correlates of cannabis use and cannabis use disorder among patients with bipolar disorder: A systematic review with meta-analysis and meta-regression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2019;101:78-84.
- [25] Hunt GE, Large MM, Cleary M, Lai HMX, Saunders JB. Prevalence of comorbid substance use in schizophrenia spectrum disorders in community and clinical settings, 1990–2017: Systematic review and meta-analysis. *Drug and alcohol dependence*. 2018;191:234-58.
- [26] Toftdahl NG, Nordentoft M, Hjorthøj C. Prevalence of substance use disorders in psychiatric patients: a nationwide Danish population-based study. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology*. 2016;51(1):129-40.
- [27] Kerridge BT, Pickering R, Chou P, Saha TD, Hasin DS. DSM-5 cannabis use disorder in the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions-III: Gender-specific profiles. *Addictive Behaviors*. 2018;76:52-60.
- [28] Connor JP, Feeney GF, Kelly AB, Saunders JB. Polysubstance use. *The SAGE handbook of drug and alcohol studies 2nd ed California*: Sage Publications. 2016:283-305.
- [29] Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ. Cannabis use and other illicit drug use: testing the cannabis gateway hypothesis. *Addiction*. 2006;101(4):556-69.
- [30] Hall WD, Lynskey M. Is cannabis a gateway drug? Testing hypotheses about the relationship between cannabis use and the use of other illicit drugs. *Drug and alcohol review*. 2005;24(1):39-48.
- [31] Papaseit E, Pérez-Mañá C, Pérez-Acevedo AP, Hladun O, Torres-Moreno MC, Muga R, et al. Cannabinoids: from pot to lab. *International journal of medical sciences*. 2018;15(12):1286.
- [32] Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *Journal of analytical Toxicology*. 1992;16(5):276-82.
- [33] Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister L, Gillespie H. Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1980;28(3):409-16.

- [34] Kelly P, Jones RT. Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users. *Journal of analytical toxicology*. 1992;16(4):228-35.
- [35] Johansson EK, Hollister LE, Halldin MM. Urinary elimination half-life of delta-1-tetrahydrocannabinol-7-oic acid in heavy marijuana users after smoking. *NIDA Research Monograph*. 1989;95:457-8.
- [36] Dinis-Oliveira RJ. Metabolomics of Δ 9-tetrahydrocannabinol: implications in toxicity. *Drug metabolism reviews*. 2016;48(1):80-7.
- [37] Marwaha JPR. *Cannabis Use Disorder*. 1st ed. StatPearls Publishing; 2022.
- [38] Cooper ZD, Williams AR. Cannabis and cannabinoid intoxication and toxicity. In: *Cannabis use disorders*. Springer; 2019. p. 103-11.
- [39] D'souza DC, Ranganathan M, Braley G, Gueorguieva R, Zimolo Z, Cooper T, et al. Blunted psychotomimetic and amnestic effects of Δ -9-tetrahydrocannabinol in frequent users of cannabis. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(10):2505-16.
- [40] Allsop DJ, Norberg MM, Copeland J, Fu S, Budney AJ. The Cannabis Withdrawal Scale development: patterns and predictors of cannabis withdrawal and distress. *Drug and alcohol dependence*. 2011;119(1-2):123-9.
- [41] Budney AJ, Moore BA, Vandrey RG, Hughes JR. The time course and significance of cannabis withdrawal. *Journal of abnormal psychology*. 2003;112(3):393.
- [42] Hesse M, Thylstrup B. Time-course of the DSM-5 cannabis withdrawal symptoms in poly-substance abusers. *BMC psychiatry*. 2013;13(1):1-11.
- [43] Bahji A, Stephenson C, Tyo R, Hawken ER, Seitz DP. Prevalence of cannabis withdrawal symptoms among people with regular or dependent use of cannabinoids: a systematic review and meta-analysis. *JAMA network open*. 2020;3(4):e202370-0.
- [44] Copersino ML, Boyd SJ, Tashkin DP, Huestis MA, Heishman SJ, Dermand JC, et al. Cannabis withdrawal among non-treatment-seeking adult cannabis users. *The American Journal on Addictions*. 2006;15(1):8-14.
- [45] Bonnet U, Preuss UW. The cannabis withdrawal syndrome: current insights. *Substance abuse and rehabilitation*. 2017;8:9.
- [46] Weiss SR, Howlett KD, Baler RD. Building smart cannabis policy from the science up. *International Journal of Drug Policy*. 2017;42:39-49.

- [47] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
- [48] Morales P, Reggio PH. An update on non-CB1, non-CB2 cannabinoid related G-protein-coupled receptors. *Cannabis and cannabinoid research*. 2017;2(1):265-73.
- [49] Pertwee R. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *British journal of pharmacology*. 2008;153(2):199-215.
- [50] Devane WA, Hanuš L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9.
- [51] Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology*. 1995;50(1):83-90.
- [52] Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *The Journal of cell biology*. 2003;163(3):463-8.
- [53] Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996;384(6604):83-7.
- [54] Dinh T, Carpenter D, Leslie F, Freund T, Katona I, Sensi S, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the national Academy of sciences*. 2002;99(16):10819-24.
- [55] Connor JP, Stjepanović D, Le Foll B, Hoch E, Budney AJ, Hall WD. Cannabis use and cannabis use disorder. *Nature Reviews Disease Primers*. 2021;7(1):1-24.
- [56] Lovinger DM. Endocannabinoid liberation from neurons in transsynaptic signaling. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2007;33(1):87-93.
- [57] Yang H, Chen C. Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(14):1443-51.
- [58] Howlett A, Johnson MR, Melvin L, Milne G. Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Molecular pharmacology*. 1988;33(3):297-302.
- [59] Betke KM, Wells CA, Hamm HE. GPCR mediated regulation of synaptic transmission. *Progress in neurobiology*. 2012;96(3):304-21.

- [60] Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein β γ subunits. *Nature*. 1996;380(6571):255-8.
- [61] Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P. Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β 2 by G protein $\beta\gamma$ -subunits. *Nature*. 1992;360(6405):684-6.
- [62] Breivogel CS, Puri V, Lambert JM, Hill DK, Huffman JW, Razdan RK. The influence of beta-arrestin2 on cannabinoid CB1 receptor coupling to G-proteins and subcellular localization and relative levels of beta-arrestin1 and 2 in mouse brain. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2013;33(6):367-79.
- [63] Sim-Selley LJ, Martin BR. Effect of Chronic Administration of R-(+)-[2, 3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl) methyl] pyrrolo [1, 2, 3-de]-1, 4-benzoxazinyl)-(1-naphthalenyl) methanone Mesylate (WIN55, 212-2) or Δ 9-Tetrahydrocannabinol on Cannabinoid Receptor Adaptation in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002;303(1):36-44.
- [64] Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*. 1991;11(2):563-83.
- [65] Curran HV, Freeman TP, Mokrysz C, Lewis DA, Morgan CJ, Parsons LH. Keep off the grass? Cannabis, cognition and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*. 2016;17(5):293-306.
- [66] Lupica CR, Riegel AC. Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology*. 2005;48(8):1105-16.
- [67] Bossong MG, Mehta MA, van Berckel BN, Howes OD, Kahn RS, Stokes PR. Further human evidence for striatal dopamine release induced by administration of Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC): selectivity to limbic striatum. *Psychopharmacology*. 2015;232(15):2723-9.
- [68] Dierckx RA, Otte A, De Vries EF, Van Waarde A, Den Boer JA. PET and SPECT in Psychiatry. Springer; 2014.
- [69] Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Vogt LJ, Sim-Selley LJ. Chronic Δ 9-Tetrahydrocannabinol Treatment Produces a Time-Dependent Loss of Cannabinoid Receptors and Cannabinoid Receptor-Activated G Proteins in Rat Brain. *Journal of neurochemistry*. 1999;73(6):2447-59.
- [70] Coutts AA, Anavi-Goffer S, Ross RA, MacEwan DJ, Mackie K, Pertwee RG, et al. Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*. 2001;21(7):2425-33.

- [71] Dudok B, Barna L, Ledri M, Szabó SI, Szabadits E, Pintér B, et al. Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nature neuroscience*. 2015;18(1):75-86.
- [72] Sim-Selley LJ. Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Critical ReviewsTM in Neurobiology*. 2003;15(2).
- [73] Zhuang Sy, Kittler J, Grigorenko EV, Kirby MT, Sim LJ, Hampson RE, et al. Effects of long-term exposure to Δ 9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Molecular Brain Research*. 1998;62(2):141-9.
- [74] Kesner AJ, Lovinger DM. Cannabis use, abuse, and withdrawal: Cannabinergic mechanisms, clinical, and preclinical findings. *Journal of neurochemistry*. 2021;157(5):1674-96.
- [75] Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Celver JP, Koovor A, et al. Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(10):3773-80.
- [76] Morgan DJ, Davis BJ, Kearn CS, Marcus D, Cook AJ, Wager-Miller J, et al. Mutation of putative GRK phosphorylation sites in the cannabinoid receptor 1 (CB1R) confers resistance to cannabinoid tolerance and hypersensitivity to cannabinoids in mice. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(15):5152-63.
- [77] Oviedo A, Glowa J, Herkenham M. Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain research*. 1993;616(1-2):293-302.
- [78] Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *Journal of neurochemistry*. 1998;71(4):1525-34.
- [79] Henderson-Redmond AN, Nealon CM, Davis BJ, Yuill MB, Sepulveda DE, Blanton HL, et al. c-Jun N terminal kinase signaling pathways mediate cannabinoid tolerance in an agonist-specific manner. *Neuropharmacology*. 2020;164:107847.
- [80] Di Marzo V, Berrendero F, Bisogno T, Gonzalez S, Cavaliere P, Romero J, et al. Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of Δ 9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Journal of neurochemistry*. 2000;74(4):1627-35.
- [81] DeVuono MV, Hrelja KM, Sabaziotis L, Rajna A, Rock EM, Limebeer CL, et al. Conditioned gaping produced by high dose Δ 9-tetrahydrocannabinol: Dysregulation of the hypothalamic endocannabinoid system. *Neuropharmacology*. 2018;141:272-82.

- [82] Dowie M, Howard M, Nicholson L, Faull R, Hannan A, Glass M. Behavioural and molecular consequences of chronic cannabinoid treatment in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience*. 2010;170(1):324-36.
- [83] Lichtman A, Sheikh S, Loh H, Martin B. Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in Δ 9-tetrahydrocannabinol and morphine-dependent mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;298(3):1007-14.
- [84] Valverde O, Maldonado R, Valjent E, Zimmer AM, Zimmer A. Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(24):9284-9.
- [85] Robledo P, Berrendero F, Ozaita A, Maldonado R. Advances in the field of cannabinoid-opioid cross-talk. *Addiction Biology*. 2008;13(2):213-24.
- [86] Thorat SN, Bhargava HN. Evidence for a bidirectional cross-tolerance between morphine and Δ 9-tetrahydrocannabinol in mice. *European journal of pharmacology*. 1994;260(1):5-13.
- [87] Cichewicz DL, Haller VL, Welch SP. Changes in opioid and cannabinoid receptor protein following short-term combination treatment with Δ 9-tetrahydrocannabinol and morphine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;297(1):121-7.
- [88] Ellgren M, Spano SM, Hurd YL. Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(3):607-15.
- [89] Fattore L, Viganò D, Fadda P, Rubino T, Fratta W, Parolaro D. Bidirectional regulation of mu-opioid and CB1-cannabinoid receptor in rats self-administering heroin or WIN 55,212-2. *European Journal of Neuroscience*. 2007;25(7):2191-200.
- [90] Rodriguez de Fonseca F, Carrera MRA, Navarro M, Koob GF, Weiss F. Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science*. 1997;276(5321):2050-4.
- [91] Corchero J, Fuentes J, Manzanares J. Chronic treatment with CP-55,940 regulates corticotropin releasing factor and proopiomelanocortin gene expression in the hypothalamus and pituitary gland of the rat. *Life sciences*. 1999;64(11):905-11.
- [92] Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA. Repeated administration of Δ 9-tetrahydrocannabinol produces a differential time related responsiveness on proenkephalin, proopiomelanocortin and corticotropin releasing factor gene expression in the hypothalamus and pituitary gland of the rat. *Neuropharmacology*. 1999;38(3):433-9.

- [93] Coriasco M, Rampado O, Bradac GB. Elementi di risonanza magnetica: Dal protone alle sequenze per le principali applicazioni diagnostiche. Springer Science & Business Media; 2014.
- [94] Glover GH. Overview of functional magnetic resonance imaging. *Neurosurgery Clinics*. 2011;22(2):133-9.
- [95] Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(24):9868-72.
- [96] Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *nature*. 1973;242(5394):190-1.
- [97] Bernstein MA, King KF, Zhou XJ. Handbook of MRI pulse sequences. Elsevier; 2004.
- [98] Buxton RB, Frank LR. A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation. *Journal of cerebral blood flow & metabolism*. 1997;17(1):64-72.
- [99] Buxton RB, Wong EC, Frank LR. Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model. *Magnetic resonance in medicine*. 1998;39(6):855-64.
- [100] Davis TL, Kwong KK, Weisskoff RM, Rosen BR. Calibrated functional MRI: mapping the dynamics of oxidative metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(4):1834-9.
- [101] Belliveau J, Kennedy D, McKinstry R, Buchbinder B, Weisskoff R, Cohen M, et al. Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. *Science*. 1991;254(5032):716-9.
- [102] Detre JA, Leigh JS, Williams DS, Koretsky AP. Perfusion imaging. *Magnetic resonance in medicine*. 1992;23(1):37-45.
- [103] Thulborn KR, Waterton JC, Matthews PM, Radda GK. Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1982;714(2):265-70.
- [104] Iannetti G, Wise RG. BOLD functional MRI in disease and pharmacological studies: room for improvement? *Magnetic resonance imaging*. 2007;25(6):978-88.
- [105] Weisskoff R, Zuo CS, Boxerman JL, Rosen BR. Microscopic susceptibility variation and transverse relaxation: theory and experiment. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1994;31(6):601-10.

- [106] Shmuel A, Yacoub E, Chaimow D, Logothetis NK, Ugurbil K. Spatio-temporal point-spread function of fMRI signal in human gray matter at 7 Tesla. *Neuroimage*. 2007;35(2):539-52.
- [107] Yacoub E, Van De Moortele PF, Shmuel A, Ugurbil K. Signal and noise characteristics of Hahn SE and GE BOLD fMRI at 7 T in humans. *Neuroimage*. 2005;24(3):738-50.
- [108] Moeller S, Yacoub E, Olman CA, Auerbach E, Strupp J, Harel N, et al. Multiband multislice GE-EPI at 7 tesla, with 16-fold acceleration using partial parallel imaging with application to high spatial and temporal whole-brain fMRI. *Magnetic resonance in medicine*. 2010;63(5):1144-53.
- [109] Setsompop K, Gagoski BA, Polimeni JR, Witzel T, Wedeen VJ, Wald LL. Blipped-controlled aliasing in parallel imaging for simultaneous multislice echo planar imaging with reduced g-factor penalty. *Magnetic resonance in medicine*. 2012;67(5):1210-24.
- [110] Feinberg DA, Moeller S, Smith SM, Auerbach E, Ramanna S, Glasser MF, et al. Multiplexed echo planar imaging for sub-second whole brain FMRI and fast diffusion imaging. *PloS one*. 2010;5(12):e15710.
- [111] Smith SM, Miller KL, Moeller S, Xu J, Auerbach EJ, Woolrich MW, et al. Temporally-independent functional modes of spontaneous brain activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(8):3131-6.
- [112] Lee MH, Smyser CD, Shimony JS. Resting-state fMRI: a review of methods and clinical applications. *American Journal of neuroradiology*. 2013;34(10):1866-72.
- [113] Fox MD, Greicius M. Clinical applications of resting state functional connectivity. *Frontiers in systems neuroscience*. 2010:19.
- [114] Biswal B, Zerrin Yetkin F, Haughton VM, Hyde JS. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magnetic resonance in medicine*. 1995;34(4):537-41.
- [115] Shulman GL, Corbetta M, Buckner RL, Fiez JA, Miezin FM, Raichle ME, et al. Common blood flow changes across visual tasks: I. Increases in subcortical structures and cerebellum but not in nonvisual cortex. *Journal of cognitive neuroscience*. 1997;9(5):624-47.
- [116] Gusnard DA, Raichle ME. Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain. *Nature reviews neuroscience*. 2001;2(10):685-94.
- [117] Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V. Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(1):253-8.

- [118] Picchioni D, Duyn JH, Horovitz SG. Sleep and the functional connectome. *Neuroimage*. 2013;80:387-96.
- [119] Yeo BT, Krienen FM, Sepulcre J, Sabuncu MR, Lashkari D, Hollinshead M, et al. The organization of the human cerebral cortex estimated by intrinsic functional connectivity. *Journal of neurophysiology*. 2011.
- [120] Li L, Hu X, Preuss TM, Glasser MF, Damen FW, Qiu Y, et al. Mapping putative hubs in human, chimpanzee and rhesus macaque connectomes via diffusion tractography. *Neuroimage*. 2013;80:462-74.
- [121] Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, Powers WJ, Gusnard DA, Shulman GL. A default mode of brain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(2):676-82.
- [122] Power JD, Cohen AL, Nelson SM, Wig GS, Barnes KA, Church JA, et al. Functional network organization of the human brain. *Neuron*. 2011;72(4):665-78.
- [123] Smith SM, Fox PT, Miller KL, Glahn DC, Fox PM, Mackay CE, et al. Correspondence of the brain's functional architecture during activation and rest. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2009;106(31):13040-5.
- [124] Tomasi D, Volkow ND. Resting functional connectivity of language networks: characterization and reproducibility. *Molecular psychiatry*. 2012;17(8):841-54.
- [125] Fox MD, Corbetta M, Snyder AZ, Vincent JL, Raichle ME. Spontaneous neuronal activity distinguishes human dorsal and ventral attention systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(26):10046-51.
- [126] Vincent JL, Kahn I, Snyder AZ, Raichle ME, Buckner RL. Evidence for a frontoparietal control system revealed by intrinsic functional connectivity. *Journal of neurophysiology*. 2008;100(6):3328-42.
- [127] Dosenbach NU, Visscher KM, Palmer ED, Miezin FM, Wenger KK, Kang HC, et al. A core system for the implementation of task sets. *Neuron*. 2006;50(5):799-812.
- [128] Castellanos FX, Di Martino A, Craddock RC, Mehta AD, Milham MP. Clinical applications of the functional connectome. *Neuroimage*. 2013;80:527-40.
- [129] Vanhaudenhuyse A, Noirhomme Q, Tshibanda LJF, Bruno MA, Bove-roux P, Schnakers C, et al. Default network connectivity reflects the level of consciousness in non-communicative brain-damaged patients. *Brain*. 2010;133(1):161-71.

- [130] Sambataro F, Visintin E, Doerig N, Brakowski J, Holtforth MG, Seifritz E, et al. Altered dynamics of brain connectivity in major depressive disorder at-rest and during task performance. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2017;259:1-9.
- [131] Sambataro F, Blasi G, Fazio L, Caforio G, Taurisano P, Romano R, et al. Treatment with olanzapine is associated with modulation of the default mode network in patients with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(4):904-12.
- [132] Anderson JS, Nielsen JA, Froehlich AL, DuBray MB, Druzgal TJ, Carriello AN, et al. Functional connectivity magnetic resonance imaging classification of autism. *Brain*. 2011;134(12):3742-54.
- [133] Zhu CZ, Zang YF, Cao QJ, Yan CG, He Y, Jiang TZ, et al. Fisher discriminative analysis of resting-state brain function for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuroimage*. 2008;40(1):110-20.
- [134] Lowe M, Mock B, Sorenson J. Functional connectivity in single and multislice echoplanar imaging using resting-state fluctuations. *Neuroimage*. 1998;7(2):119-32.
- [135] Xiong J, Parsons LM, Gao JH, Fox PT. Interregional connectivity to primary motor cortex revealed using MRI resting state images. *Human brain mapping*. 1999;8(2-3):151-6.
- [136] Biswal BB, Mennes M, Zuo XN, Gohel S, Kelly C, Smith SM, et al. Toward discovery science of human brain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(10):4734-9.
- [137] Shehzad Z, Kelly AC, Reiss PT, Gee DG, Gotimer K, Uddin LQ, et al. The resting brain: unconstrained yet reliable. *Cerebral cortex*. 2009;19(10):2209-29.
- [138] Chou Yh, Panych LP, Dickey CC, Petrella JR, Chen NK. Investigation of long-term reproducibility of intrinsic connectivity network mapping: a resting-state fMRI study. *American Journal of Neuroradiology*. 2012;33(5):833-8.
- [139] Duncan NW, Northoff G. Overview of potential procedural and participant-related confounds for neuroimaging of the resting state. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2013;38(2):84-96.
- [140] Ulmer S, Jansen O. *fMRI*. Springer; 2010.
- [141] Poldrack RA, Mumford JA, Nichols TE. *Handbook of functional MRI data analysis*. Cambridge University Press; 2011.
- [142] Lindquist MA. The statistical analysis of fMRI data. *Statistical science*. 2008;23(4):439-64.

- [143] Calhoun VD, Adali T, Hansen LK, Larsen J, Pekar JJ. ICA of functional MRI data: an overview. In: in Proceedings of the International Workshop on Independent Component Analysis and Blind Signal Separation. Citeseer; 2003. .
- [144] Hutchison RM, Womelsdorf T, Allen EA, Bandettini PA, Calhoun VD, Corbetta M, et al. Dynamic functional connectivity: promise, issues, and interpretations. *Neuroimage*. 2013;80:360-78.
- [145] Allen EA, Damaraju E, Plis SM, Erhardt EB, Eichele T, Calhoun VD. Tracking whole-brain connectivity dynamics in the resting state. *Cerebral cortex*. 2014;24(3):663-76.
- [146] Miller RL, Yaesoubi M, Turner JA, Mathalon D, Preda A, Pearlson G, et al. Higher dimensional meta-state analysis reveals reduced resting fMRI connectivity dynamism in schizophrenia patients. *PloS one*. 2016;11(3):e0149849.
- [147] Du Y, Fu Z, Sui J, Gao S, Xing Y, Lin D, et al. NeuroMark: An automated and adaptive ICA based pipeline to identify reproducible fMRI markers of brain disorders. *NeuroImage: Clinical*. 2020;28:102375.

Ringraziamenti

Giunti al termine di questo lungo e difficile percorso, sorgerà a tutti spontaneo il confrontarsi con gli innumerevoli quesiti e considerazioni mossi in noi dai dubbi e dalle speranze nutrite verso il futuro, tuttavia, mentre scrivo queste pagine, non posso fare a meno di immergermi in un insieme di vicoli, in quel grande dedalo che è la memoria, per riesumare dei ricordi in grado di dare un significato a questi sei anni e comprendere veramente cosa abbia implicato per me questo cammino.

Così, non posso che ripensare al notevole numero di anime con cui mi sono trovato ad avere a che fare e che, in qualche dolce serata di compagnia, è riuscito ad imprimere in me degli apprezzatissimi spunti di riflessione sui quali ancor oggi ragiono e mi domando. Sì, perché è probabilmente grazie ad essi che ho maturato quella che è la più grande lezione che considero appresa in questo periodo, ovvero, la capacità di guardare con fino occhio critico a sé stessi e a ciò che ci circonda, maturando, così, la possibilità di conoscere una nuova bellezza insita nel mondo e nelle sue infinite imperfezioni.

Moltissimi sono coloro che meriterebbero una menzione in tal senso, eppure, sfortunatamente, queste pagine mi concedono di aprire il cuore, con un po' di imbarazzo e di impaccio, come ben saprà chi ha avuto modo di conoscermi, a ben poche persone, selezionando quelle che più direttamente hanno contribuito a plasmarmi in ciò che oggi sono.

La mia riconoscenza va, primariamente, alla mia famiglia per avermi supportato con ogni mezzo in questo percorso, radicando in me la passione per la conoscenza necessaria affinché riuscissi a muovermi successivamente da solo nel vasto mondo della cultura.

A Maddalena va la mia gratitudine per avermi aiutato ad aprire gli occhi e a vedere le cose con una nuova sensibilità, introducendomi ad una sfera di lettura della realtà di cui prima ignoravo l'esistenza e che solo la sua gentilezza è stata in grado di insegnarmi.

A Leonardo dedico questo omaggio, per avermi dimostrato la generosità e la bontà che solo un vero amico sa dare, comportandosi sempre con me come solo un fratello potrebbe.

Ringrazio, dunque, tutti i miei ex coinquilini di via Scrovegni 2A, specialmente Filippo, Giovanni, Francesco, Marco, Raffaele, Francesca M., Sabrina B., Lin-

da, Anna G. e Francesca Z. (sì, eravamo in tanti in effetti), con cui ho avuto modo di condividere delle esperienze al limite del surreale e che porterò per sempre nei miei ricordi.

Desidero, poi, esprimere riconoscenza verso la mia compagnia di Thiene, in particolar modo a Giulia F., Federico D.M., Claudio, Bernardo, Giulia M., Nicola D.M, Michele, Maria Chiara e Valentina per la grande capacità di accogliermi sempre come se mai me ne fossi andato e per rammentarmi, ogni volta, quanto sia bello tornare a casa.

Un enorme ringraziamento è necessario anche per i miei compagni di studio: Sabrina M., Federico F., Outman, Sakin, Elia, Giacomo, Giorgio, Alessia, Elena, Luca, Marco, Pietro, Mattia, Chiara, Giorgia, Claudia, Manuela e Anna M., i quali hanno saputo insegnarmi come affrontare al meglio i severi impegni imposti dall'università, addolcendo con la loro presenza e con la loro leggerezza anche i momenti più critici.

Infine, ci tengo a rivolgere un ultimo pensiero a tutte quelle figure professionali, accademiche e non, che mi hanno sostenuto, incoraggiandomi nello sviluppo di questa importante passione per il campo della psichiatria e, in generale, delle neuroscienze.

Ringrazio, dunque, il Dott. G. Pigato, la Dott.ssa F. Gentili, il Dott. D. Gargano, gli specializzandi di psichiatria, in particolare il Dott. L. Zappari e il Dott. A. Brancaleoni e il Dott. D. Gammicchia, i quali hanno saputo accogliermi con estrema cordialità e disponibilità in reparto, avviandomi verso quello che spero un giorno diventi il mio settore lavorativo.

Ringrazio, inoltre, Prof. A. Vallesi per avermi accolto nel suo laboratorio e il Dott. A. Visalli per tutti gli insegnamenti forniti e per la pazienza dimostrata, regalandomi, così, l'opportunità di dedicarmi ad un nuovo lavoro di ricerca sperimentale.

A tutti voi dedico questa tesi di laurea, con l'auspicio che un giorno essa possa fungere d'aiuto per chi soffre dei mali subdoli della mente.