



Università degli Studi di Cagliari

Dipartimento di Scienze Biomediche

Corso di Laurea in Chimica e Tecnologie Farmaceutiche

**RISPOSTE DELLA TRASMISSIONE DOPAMINERGICA
MESOLIMBICA DURANTE L' AUTO-SOMMINISTRAZIONE DI
ETANOLO E SACCAROSIO NEL RATTO.**

Relatore:
Dott.ssa Valentina Bassareo

Tesi di Laurea di:
Maria Laura Dessì

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

INDICE

Introduzione	pag. 5
§ La gratificazione naturale e il comportamento motivato	5
§ Il sistema dopaminergico	14
§ L'etanolo:	23
- generalità	23
- metabolismo	25
- meccanismo d'azione	29
- tossicità	33
- intossicazione acuta e cronica	35
- dipendenza e abuso	36
- meccanismi di rinforzo dell'etanolo	38
- approccio terapeutico dell'alcolismo	40
Scopo della ricerca	42
Materiali e metodi	43
§ Animali	43
§ La microdialisi cerebrale	45
§ Preparazione delle sonde da microdialisi	47
§ Sessione chirurgica	49
§ Self-administration	53
-sostanze utilizzate	53
-protocollo di auto-somministrazione	53
-esperimento di microdialisi e self administration	56
§ Analisi HPLC del dializzato	58
§ Istologia	60
§ Analisi statistica	63
Risultati	64
Discussione	74
Bibliografia	78

RINGRAZIAMENTI

Ai miei genitori, ai turni di mamma e al doppio lavoro di papà; grazie per avermi fatto arrivare a quasi una settimana dal giorno che avete aspettato tanto, forse quasi più di me. Spero possiate essere sempre orgogliosi di me come in quel giorno.

Ai miei fratelli, Daniele ed Enrico, per aver dovuto sopportare i miei malumori da pre-esame (e non solo quelli).

A Elli, per essere una sorella.

A tutta la mia grande famiglia, tanto grande da non poter essere citata per intero, ai miei nonni e agli zii; a zia Luciana per tutto ciò che fa, e a nonna Caterina che solo per poco tempo non potrà esserci.

A Gino e Ugo per essere parte della famiglia anche loro.

A questi ringraziamenti, scritti con le lacrime agli occhi, la notte prima della consegna, con la fretta che mi farà sicuramente dimenticare qualcuno, e per cui mi scuso già da ora.

Alle mie più care amiche Michela, Maria Dolores, Daniela, Alice, Ilenia e Claudia, per tutte le volte che ho dovuto dirvi no perchè dovevo studiare; per quello che rappresentate, al di là delle distanze chilometriche e non, che sembrano separarci ma che in fondo ci uniscono ancora di più.

Alla Professoressa Valentina Bassareo, per avermi fatto dare uno “sguardo” nel mondo della ricerca, per avermi permesso di svolgere il mio anno di tesi nel suo laboratorio del dipartimento di Scienze Biomediche e per la sensibilità con la quale si rapporta ai suoi studenti; alla Dottoressa Flavia Cucca per la pazienza e l'aiuto prezioso che mi ha riservato.

A me stessa.

A nonno Giso, perchè ho sempre saputo che avrei voluto dedicare a lui la mia tesi; per essere stato, nel bene e nel male, importante, come un padre.

A Nonno Giso

INTRODUZIONE

La gratificazione naturale e il comportamento motivato

Il sistema della gratificazione consente di provare un insieme di sensazioni fisiche ed emotive che a livello della coscienza vengono riconosciute come piacere. Il piacere, inteso come l'insieme delle sensazioni che conseguono all'appagamento dei bisogni, è stato ed è tuttora un elemento indispensabile che ha permesso l'evoluzione degli animali e dell'uomo. Tutti gli esseri viventi, nel corso della loro vita, perseguono due obiettivi essenziali: la propria sopravvivenza e la conservazione della specie. La possibilità di raggiungere queste due finalità si basa sull'appagamento di alcuni istinti come la fame, la sete, il sesso, la cura della prole, ed è garantito dall'esistenza del meccanismo cerebrale della gratificazione. Il piacere dunque rappresenta un aspetto centrale del comportamento motivato di organismi altamente evoluti come i mammiferi.

Le aree cerebrali dalla cui attività conseguono le proprietà motivazionali del piacere sono topograficamente vicine a quelle da cui dipendono i comportamenti primordiali legati alla sopravvivenza del singolo e della specie (comportamento alimentare, sessuale, predatorio, materno, ecc.) che sono localizzate nella parte più mediale e ventrale dell'encefalo. Possiamo affermare che tale localizzazione ventro-mediale delle aree che mediano le proprietà motivazionali del piacere è conferma della loro origine precoce nel corso dell'evoluzione. Tali aree vengono considerate tradizionalmente parte del **sistema limbico**, considerato il più importante tra i circuiti di gratificazione cerebrale. Classicamente si considera che questo sistema sia costituito dalle seguenti strutture: *Cortex* prefrontale, Ippocampo, Ipotalamo, Talamo. Al suo interno si trovano alcuni nuclei fondamentali

come l'abenua, l'amigdala, e i nuclei dorsale (i gangli della base) e ventrale (*nucleo accumbens*, suddiviso nelle due sottoporzioni *shell* e *core*) dello striato.

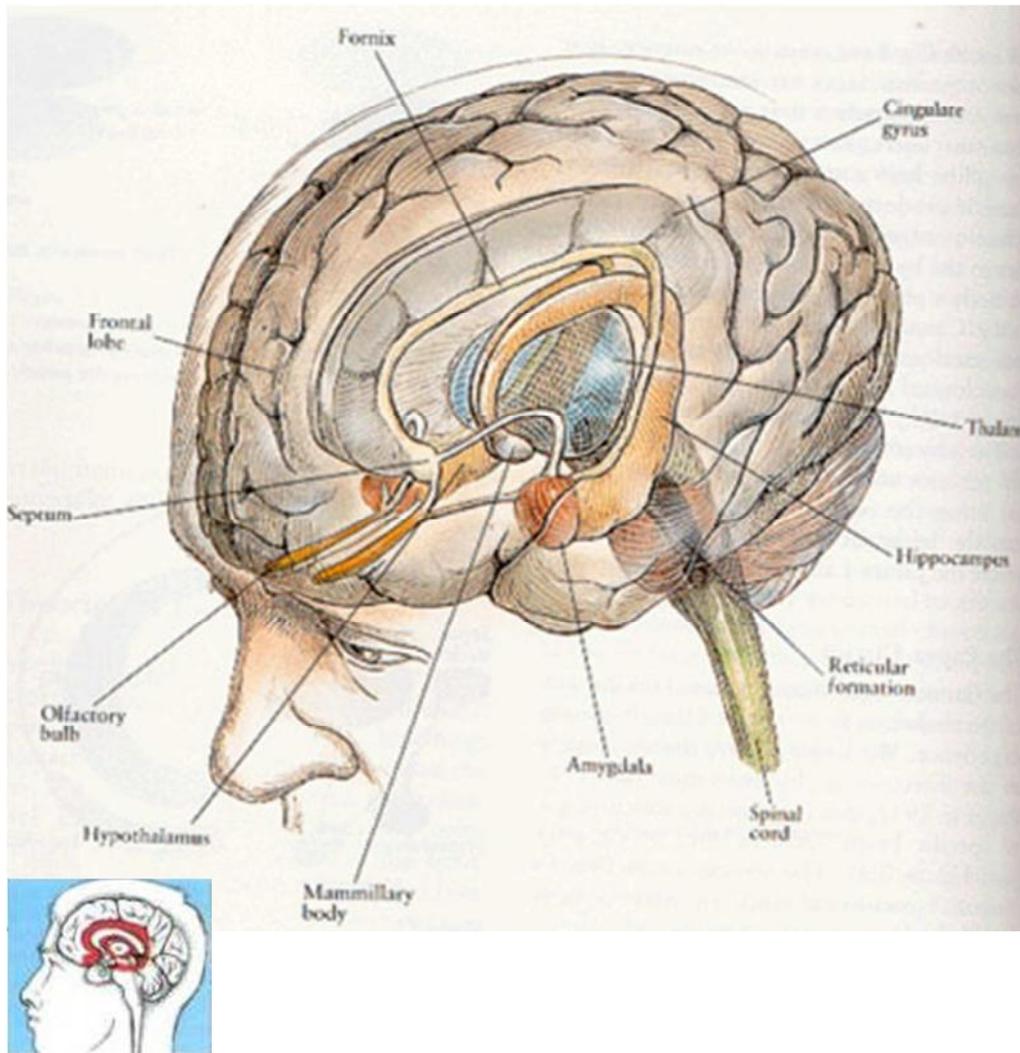


Figura 1: sistema limbico

I centri cerebrali che controllano i meccanismi della gratificazione vennero identificati nel 1954 da James Olds e Peter Milner (*Olds e Milner, 1954*) che osservarono come l'autostimolazione elettrica, tramite comportamento volontario e operante sulle aree cerebrali del sistema limbico, potesse dar luogo a un forte stimolo gratificante.

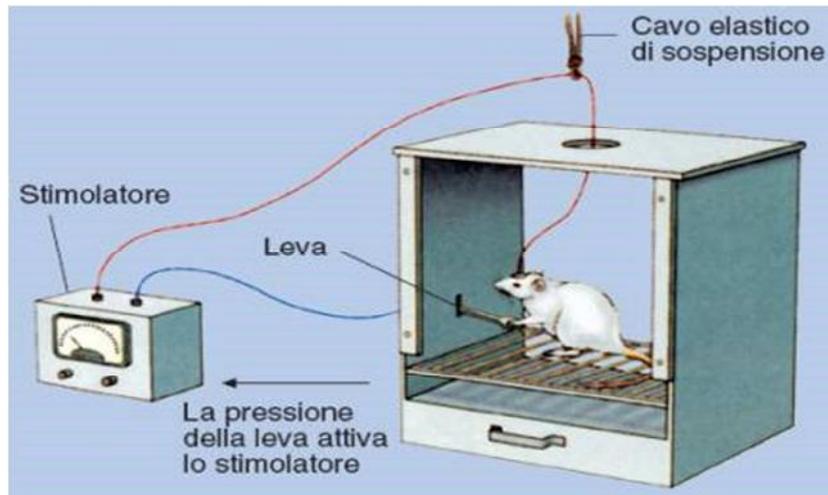


Figura 2: un ratto nell'atto di premere una leva per ottenere una stimolazione cerebrale di ricompensa

Le aree tradizionalmente considerate parte del sistema limbico sono state successivamente riclassificate e raggruppate da *Heimer* e il suo gruppo (1991) a costituire la cosiddetta “*amigdala estesa*”.

In particolare i sistemi implicati nella gratificazione sono il sistema dopaminergico mesolimbico, che sembrerebbe controllare la spinta motivazionale verso la ricerca dello stimolo gratificante; il sistema oppioide, che medierebbe i processi di gratificazione conseguenti al consumo della sostanza; il sistema glutammatergico, che modula il rilascio della dopamina in alcune aree cerebrali e il sistema gabaergico, che inibisce il rilascio di dopamina (DA) a livello del SNC. È chiaro dunque come il circuito della gratificazione sia estremamente complesso e si integri con varie regioni cerebrali, che abbiamo detto essere necessarie per

caratterizzare emotivamente le esperienze e per dirigere la risposta dell'individuo verso attività piacevoli come cibo, sesso ed interazioni sociali.

Gli stimoli naturali indispensabili alla sopravvivenza possiedono una valenza motivazionale positiva poiché determinano effetti piacevoli e sono quindi considerati stimoli appetitivi; possiedono la proprietà intrinseca di determinare un *rinforzo positivo*, dove per rinforzo si intende l'insieme di condizioni sostenute da uno stimolo e capaci di determinare una risposta che favorisce (o evita) la presentazione dello stimolo stesso. Al contrario stimoli percepiti come dannosi, spiacevoli o dolorosi, possiedono una valenza motivazionale negativa e vengono considerati come avversivi. Ne consegue che il comportamento sarà indirizzato alla ricerca e all'avvicinamento agli stimoli piacevoli, poiché gratificanti, inducendo nel soggetto il cosiddetto comportamento motivato. Tale proprietà si può definire come l'atteggiamento per cui l'individuo focalizza le sue azioni verso l'ambiente in relazione alle proprie necessità o desideri; si realizza così una ricerca continua di nuovi contatti con lo stimolo, per poter nuovamente usufruire dei suoi effetti gratificanti, che producono in chi li ricerca, sensazioni di euforia ed appagamento. Viceversa, nel caso di stimoli spiacevoli o dolorosi, il comportamento sarà finalizzato alla loro attenuazione o estinzione.

Possiamo identificare nel comportamento motivato 3 fasi principali:

- fase incentiva (o appetitiva) in cui l'individuo, attratto dallo stimolo, lo raggiunge.
- fase consumatoria in cui l'individuo è in contatto con lo stimolo e quindi lo consuma.
- Fase post-consumatoria in cui al consumo seguono sensazioni di soddisfazione e appagamento.

Durante la fase appetitiva l'individuo assume comportamenti generici di ricerca e approccio a stimoli diversi indipendenti dalla loro natura specifica; durante la fase consumatoria, il comportamento assume rigidi schemi legati alla natura dello stimolo. Infine, durante la fase post-consumatoria si raggiunge la sazietà e l'appagamento (*Konorski, 1967; Woodworth, 1981*).

Le prime due fasi sono definite *ergotropiche* e sono caratterizzate da uno stato d'allerta e di aumento dell'attività motoria, con attivazione del sistema simpatico e del catabolismo. I farmaci d'abuso psicostimolanti sono in grado di mimare proprio queste due fasi. Al contrario, durante la fase post-consumatoria, detta anche *trofotropica*, si manifesta attivazione del parasimpatico, rilascio di insulina, anabolismo e sedazione, cui può seguire un sonno ristoratore.

Il comportamento motivato viene mantenuto dagli stimoli gratificanti naturali attraverso due proprietà principali definite incentive e funzionali. Le prime sono essenziali per stimolare il comportamento indirizzato alla ricerca verso lo stimolo; le proprietà funzionali invece sono importanti per la loro efficacia in termini fisiologici e biologici.

L'associazione di stimoli neutri allo stimolo primario gratificante avviene attraverso due modalità principali: l'apprendimento pavloviano e il condizionamento operante.

- **Condizionamento pavloviano**

L'apprendimento associativo, sulla base della teoria dell' *incentive learning*, avviene in seguito a condizionamento classico o pavloviano, dal nome del suo scopritore Ivan Pavlov. Pavlov dimostrò che se stimoli neutri, come il suono del campanello (stimolo condizionato), precedono regolarmente la presentazione di cibo (stimolo non condizionato), diventano predittivi del suo arrivo; in questo modo il campanello diventa un segnale del cibo che porta l'animale a salivare. Il comportamento dell'animale diventa così una “risposta condizionata” al suono del campanello. Se al suono del campanello non segue più la presentazione del cibo, allora l'animale smette di rispondere e si parla di “estinzione” della risposta. L'associazione dei 2 stimoli, fa sì che lo stimolo condizionato funga da segnale anticipatorio per lo stimolo non condizionato. Il grado di condizionamento raggiungibile dipende da quanto lo stimolo non condizionato è nuovo e inaspettato, e dal fatto che non sia avvenuta una precedente associazione con lo stimolo condizionato. Nel momento in cui lo stimolo non condizionato diventerà prevedibile, il grado di apprendimento sarà nullo.

- **Condizionamento operante**

Nel condizionamento operante l'animale impara ad attuare un determinato comportamento al fine di ricevere una ricompensa. Nei protocolli di auto-somministrazione il ratto impara velocemente a compiere un lavoro per auto-somministrarsi lo stimolo gratificante.

Maggiore è il rinforzo maggiore è la velocità di apprendimento da parte del

soggetto; l'efficacia del rinforzo dipende anche dal tempo nel quale viene somministrato (se è immediato avrà quindi più valore mentre un ritardo nella somministrazione può inficiare il processo).

Relativamente ai nostri esperimenti, il condizionamento operante degli animali, si realizza durante le settimane di training, mediante l'utilizzo delle gabbie per l'auto-somministrazione, e ha lo scopo di insegnare all'animale uno specifico comportamento per ottenere una ricompensa (la soluzione di etanolo o saccarosio). Il nostro protocollo di auto-somministrazione prevede che gli animali imparino ad associare degli stimoli neutri, come il suono o la luce del nose-poke, al lavoro che devono compiere per ottenere la ricompensa. In questo modo, al termine del training, l'animale avrà acquisito un comportamento operante (consistente nell'inserimento del muso all'interno del nose-poke "attivo") col fine di auto-somministrarsi la soluzione di etanolo o saccarosio.

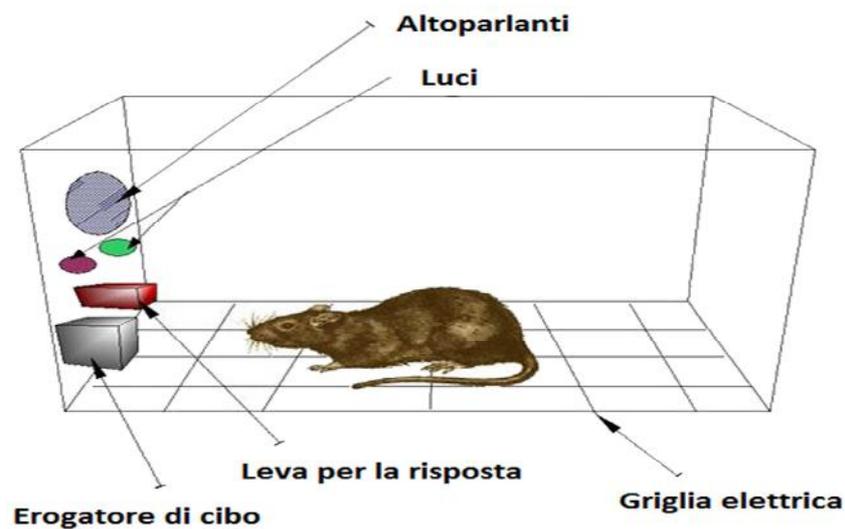


Figura 3: rappresentazione del condizionamento operante

Sebbene ogni fase del comportamento motivato sia piacevole, in realtà la natura del piacere è diversa; durante la fase appetitiva il piacere induce una condizione di eccitazione ed euforia che sta alla base del meccanismo di rinforzo che porta il soggetto a ricercare nuovamente l'oggetto del suo desiderio. Questo tipo di piacere conduce a una condizione di edonia, definita “*state hedonia*” (stato di edonia), che va intesa come uno stato affettivo o emotivo che fa parte dell'eccitazione comportamentale (*incentive arousal*) tipica della fase appetitiva (Di Chiara, 2005).

L'attivazione del sistema DAergico mesolimbico è responsabile di molte delle proprietà degli aspetti incentivi degli stimoli naturali, aumenta l'attenzione e favorisce il comportamento motorio mirato (orientamento).

Come gli stimoli gratificanti naturali, anche le sostanze d'abuso, indipendentemente dal loro meccanismo d'azione, possiedono spiccate proprietà gratificanti e sono in grado di stimolare il sistema DAergico mesolimbico. Contrariamente agli stimoli naturali, i farmaci d'abuso inducono dipendenza determinando un'alterazione dei meccanismi cerebrali che controllano il sistema della gratificazione e degli stati motivazionali dell'individuo. La tossicodipendenza si configura quindi come un disturbo della motivazione e della scelta, in cui ogni comportamento è indirizzato in maniera compulsiva verso l'assunzione e la ricerca della droga, che diventa essa stessa la motivazione che guida il comportamento.

Le sostanze d'abuso producendo un senso di appagamento, rappresentano così stimoli dotati di valenza positiva (rinforzo positivo); questo negli animali da esperimento si manifesta come un aumento della probabilità di compiere comportamenti che hanno come scopo la somministrazione della sostanza. Le sostanze d'abuso, in virtù della loro capacità di attivare il sistema DAergico mesolimbico, sono in grado di condizionare il

comportamento motivato e di facilitare i processi dell'apprendimento. In questo senso le sostanze d'abuso possono essere intese come surrogati degli stimoli gratificanti naturali. Tale fenomeno è stato messo in evidenza da studi condotti con la tecnica della microdialisi cerebrale (*Di Chiara, 1995*).

Il sistema dopaminergico

Nel SNC la Dopamina (DA), o 3,4-diidrossifenilettilamina, svolge un ruolo importante in una serie di funzioni tra cui l'attenzione, il controllo dell'attività motoria, la sfera cognitiva, le risposte allo stress, l'affettività. Oggetto del nostro studio è stato il ruolo della DA nei meccanismi di ricompensa e rinforzo che stanno alla base dell'instaurarsi dei fenomeni di dipendenza dall'etanolo.

La DA è una catecolamina (CA) endogena, ovvero una molecola costituita da un nucleo catecolico (un anello benzenico con 2 gruppi ossidrilici in posizione 3 e 4) al quale è legato un gruppo etilamminico. Oltre la DA, le catecolamine endogene comprendono la noradrenalina (NA) e l'adrenalina (A).

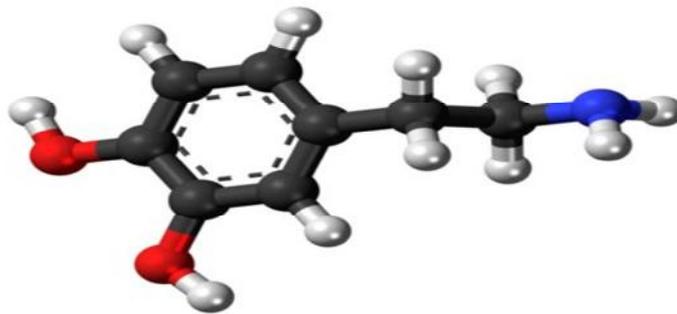


Figura 4: molecola della Dopamina e rappresentazione in 3D

Le CA vengono sintetizzate a partire da 2 amminoacidi essenziali: fenilalanina e tirosina, provenienti dalle proteine assunte con la dieta. Di norma l'assunzione di tirosina con l'alimentazione è sufficiente per la sintesi delle CA, tuttavia vi è la possibilità di convertire la fenilalanina in tirosina ad opera dell'enzima fenilalanina idrossilasi. La tirosina è trasportata all'interno del neurone catecolaminergico tramite uno specifico trasportatore dove l'enzima tirosina idrossilasi catalizza l'idrossilazione in

posizione 3 dell'anello fenolico della tirosina con formazione di diidrossifenilalanina (DOPA): questa reazione rappresenta la tappa limitante della biosintesi delle CA sotto controllo dell'attività del neurone. La DOPA non si accumula nei nervi catecolaminergici poiché si forma lentamente e viene rapidamente convertita in DA (e CO₂) tramite una DOPA-decarbossilasi aspecifica (detta anche decarbossilasi degli aminoacidi aromatici). La DA appena formata viene trasportata all'interno della vescicola sinaptica grazie a specifici trasportatori vescicolari per le monoamine.

All'interno delle vescicole dei neuroni adrenergici e noradrenergici e nelle cellule cromaffini del surrene è localizzata la dopamina beta-idrossilasi che converte la DA in NA. La NA, per subire la N-metilazione a dare l'A, deve ritornare nel citoplasma perché è nella frazione solubile che si trova l'ultimo enzima della catena, la feniletanolamina N-metiltransferasi, la cui principale localizzazione è nella midollare del surrene.

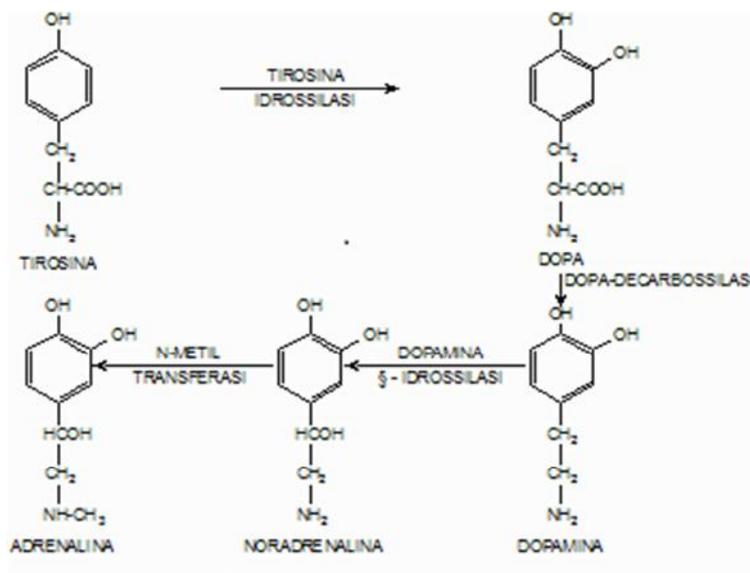


Figura 5: biosintesi delle catecolamine

La maggior parte della DA presente nelle terminazioni nervose viene internalizzata nelle vescicole sinaptiche mentre solo una piccola quota è libera nel citoplasma. L'accumulo all'interno delle vescicole sinaptiche avviene grazie a una proteina che funge da trasportatore attivo. La DA viene liberata nello spazio sinaptico in seguito a esocitosi delle vescicole sinaptiche in risposta a un potenziale d'azione presinaptico. La DA liberata svolge le sue azioni per interazione con specifici recettori metabotropi, accoppiati a proteine G e costituiti da una singola catena polipeptidica con struttura ad alfa elica che attraversa 7 volte la membrana plasmatica. La classificazione attualmente accettata prevede la distinzione dei recettori DAergici in 2 famiglie: “D1-like” e “D2-like receptors”, sulla base delle proprietà strutturali e farmacologiche. Ai recettori “D1-like” appartengono i recettori D1 e D5, mentre ai “D2-like” appartengono i recettori D2, D3 e D4. I recettori D1 e D5 sono di tipo stimolatorio essendo accoppiati a una proteina G stimolatoria la quale attiva l'adenilato ciclasi che porta alla formazione di cAMP e aumento dell'attività della fosfolipasi C. Mentre riguardo i “D2-like”, i recettori D2 inibiscono la formazione di cAMP per associazione a proteine G inibitorie con conseguente aumento delle correnti di potassio e inibizione di quelle al calcio.

Ognuno dei 5 recettori DAergici ha una distribuzione anatomica distinta. I recettori D1 e D2 sono abbondantemente espressi nello striato, i recettori D4 e D5 sono in gran parte al di fuori dello striato, mentre l'espressione del recettore D3 è bassa nel caudato e nel putamen e più abbondante nel nucleo accumbens e nel tubercolo olfattorio. Inoltre alcuni studi hanno evidenziato che i D1 sono distribuiti prevalentemente a livello postsinaptico e solo in alcune aree hanno localizzazione presinaptica. I D2 invece sono massimamente presinaptici, comportandosi così da *autorecettori* a carattere inibitorio verso la liberazione della DA stessa. Il ruolo fisiologico degli

autorecettori sembra essere quello di impedire un'eccessiva attività del neurone DAergico. Dunque quando la DA viene liberata in eccesso, interagisce essa stessa con gli autorecettori, inibendo così sintesi e liberazione del neurotrasmettitore, e conseguentemente l'attività elettrica del neurone DAergico.

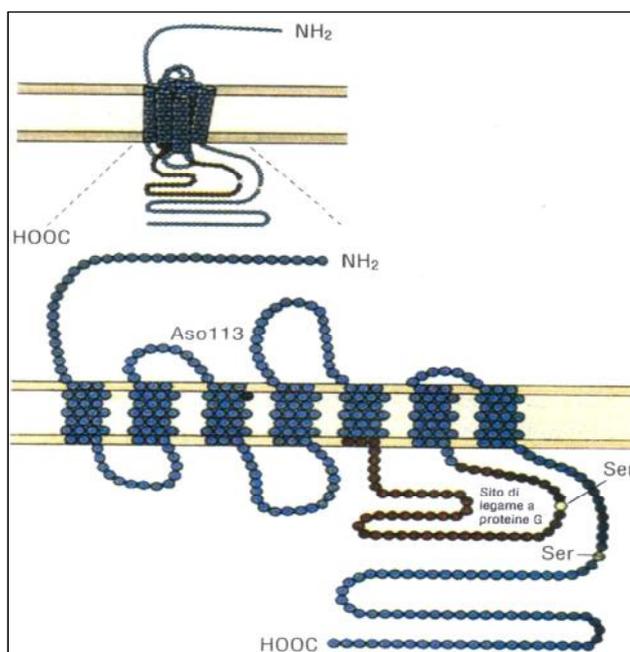


Figura 6: recettore dopaminergico a 7 domini transmembrana accoppiato a proteina G

Lo spegnimento del segnale DAergico prevede due meccanismi principali: ricaptazione e catabolismo. La ricaptazione avviene attraverso un trasportatore di membrana ad alta affinità per la DA (*DAT, dopamine transporter*) e successiva internalizzazione nelle vescicole.

Il catabolismo della DA prevede due principali vie di degradazione: una deaminazione ossidativa operata dalle monoamino ossidasi (MAO) e una ometilazione ad opera delle catecol-o-metil transferasi (COMT). La DA viene deaminata dalla MAO e diventa 3,4-diidrossi-fenil-acetaldeide (DHPA), poi trasformata ad opera di un'aldeide deidrogenasi in acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC). Successivamente viene trasformata in acido

omovanillico (HVA) al di fuori del neurone mediante una doppia conversione enzimatica tramite la COMT prima e la MAO poi. In alternativa la DA viene metilata in posizione 3 dell'anello benzenico dalla COMT e trasformata in 3-metossitiramina (3MT). Questa viene poi deaminata dalla MAO e forma la 3-metossi-4-idrossi-fenilacetaldeide (3MHPA) la quale viene trasformata dall'aldeide deidrogenasi in HVA. Nell' uomo l'HVA è il prodotto primario del metabolismo della DA (*Cooper e coll., 1996*).

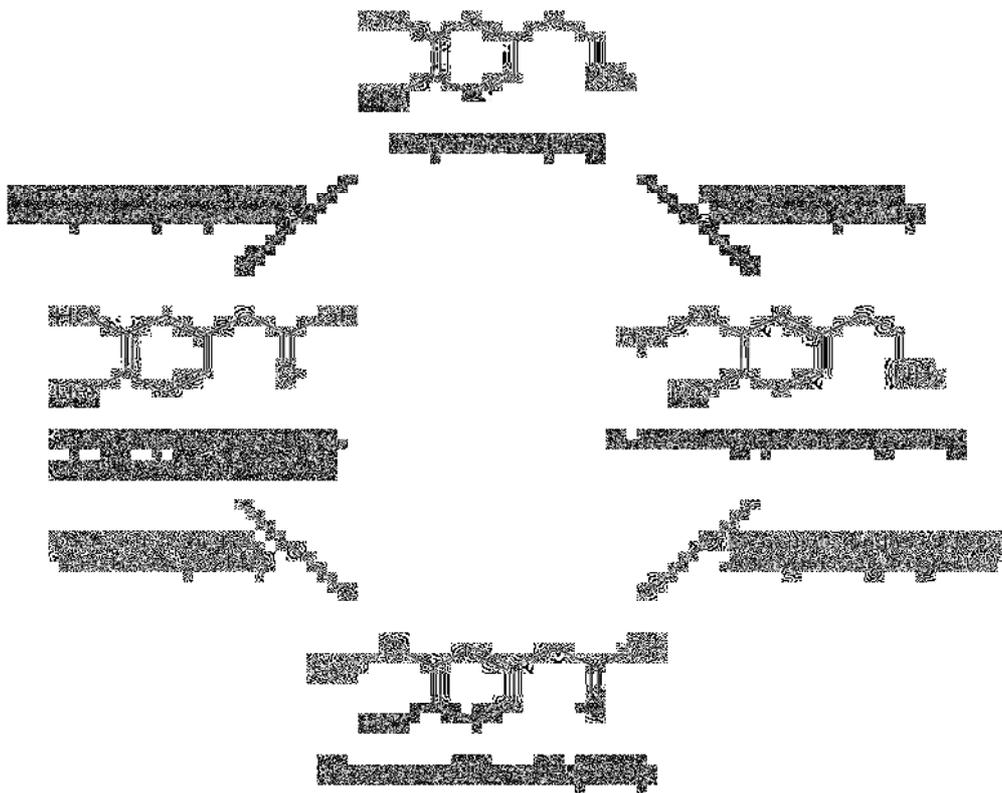


Figura 7: biotrasformazione della Dopamina

I sistemi DAergici nel SNC sono rappresentati da:

- sistema nigrostriatale
- sistema mesolimbico
- sistema mesocorticale
- sistema tuberoinfundibolare

I neuroni del sistema nigrostriatale hanno sede nella pars compacta della substantia nigra del mesencefalo e proiettano le loro terminazioni nel corpo striato (caudato e putamen). Tali neuroni fanno parte del sistema extrapiramidale e svolgono un ruolo preminente nella regolazione del tono muscolare e della coordinazione motoria. La degenerazione di questi neuroni è responsabile dell'insorgenza del morbo di Parkinson e induce sintomi motori quali tremore a riposo, acinesia e rigidità.

I neuroni del sistema mesolimbico sono localizzati per la gran parte nell'area ventrale tegmentale (VTA) del mesencefalo e in misura minore nella parte mediale della substantia nigra. Le loro fibre innervano il nucleo accumbens, il tubercolo olfattorio e il nucleo interstiziale della stria terminalis. Questo sistema, oltre a partecipare al controllo motorio, fa parte del sistema limbico e svolge un ruolo di rilievo nelle funzioni emotive e nel comportamento motivazionale; avviene infatti a questo livello l'integrazione tra emozioni e comportamento, tramite le motivazioni che portano un individuo ad assumere un comportamento, definito appunto comportamento motivato. Di norma se lo stimolo è gratificante l'individuo agisce col fine di prolungarlo, viceversa se è avversivo sarà portato ad allontanarlo.

Il sistema mesocorticale, come quello mesolimbico, origina nella VTA del mesencefalo e in piccola parte nella substantia nigra. I neuroni di questo sistema proiettano le loro fibre nervose al setto, soprattutto nel nucleo

laterale, all'amigdala, all'ippocampo, e alla corteccia prefrontale; quest'ultima è coinvolta in una serie di funzioni psichiche superiori come l'attenzione, la motivazione, la pianificazione, l'organizzazione temporale del comportamento e la socializzazione.

Infine, i piccoli neuroni del sistema tuberoinfundibolare originano nel nucleo arcuato dell'ipotalamo e arrivano all'eminenza mediana, dove liberano DA direttamente nei vasi del sistema portale ipofisario. La DA raggiunge così i recettori presenti nelle cellule mammotrope ipofisarie inibendo la secrezione di prolattina.

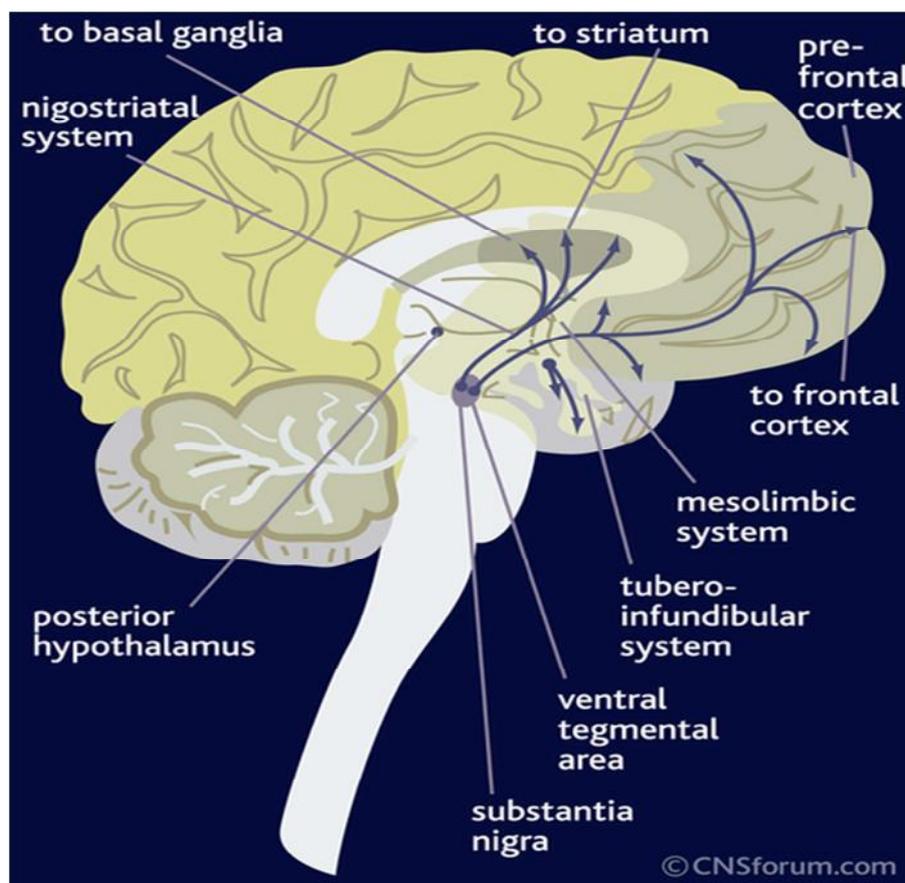


Figura 8: vie DAergiche

La trasmissione DAergica mesolimbica, con particolare riferimento al NAc, ricopre un ruolo cruciale nella mediazione degli effetti di rinforzo positivo (gratificazione) sia relativamente agli stimoli naturali, sia a molti farmaci d'abuso ed è implicata inoltre negli aspetti motivazionali della sospensione dovuti ad assunzione in cronico, quindi nel rinforzo negativo.

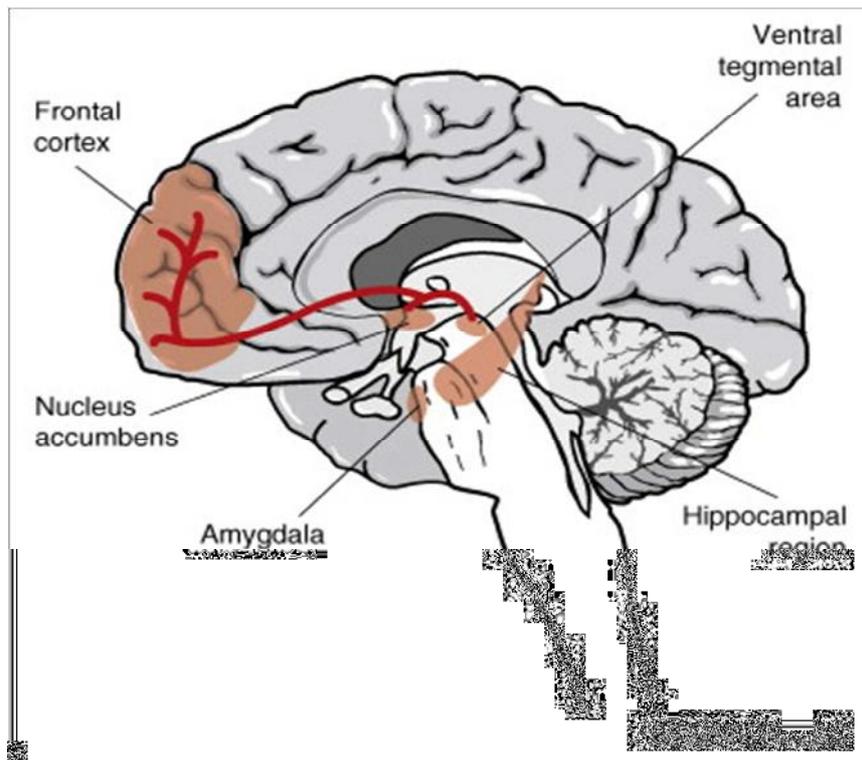


Figura 9: circuito della gratificazione

L'ipotesi della DA come “**molecola del piacere**” prende corpo alla fine degli anni '70 con Roy Wise che formulò la teoria DAergica dell'anedonia (“*anhedonia hypothesis*”, Wise 1978, 1982) secondo cui alla base dell'incapacità di provare piacere si collocava un qualche deficit funzionale a carico della via mesolimbica della DA.

Il NAc riveste un ruolo fondamentale nel meccanismo della dipendenza ed è parte integrante dei circuiti delle aree limbiche ed extra-piramidali; appartiene allo striato ventrale e riceve le informazioni limbiche che

vengono elaborate e convertite in attività motivate, grazie alle connessioni con il sistema extrapiramidale motorio.

Funzionalmente e anatomicamente può essere suddiviso in due porzioni identificate come *shell* e *core*. La *shell* occupa una posizione ventromediale e può essere considerata una struttura a carattere limbico, poiché fa parte di un complesso sistema nucleare, chiamato *amigdala estesa*, che si è conservato nell'evoluzione delle specie. In particolare la *shell* sarebbe l'area direttamente coinvolta nei meccanismi di gratificazione naturale e di quelli indotti artificialmente mediante somministrazione di sostanze d'abuso (*Di Chiara e Imperato, 1988; Carboni e coll., 1989; Pontieri e coll., 1996; Tanda e coll., 1997; Bassareo e Di Chiara, 1997*). Il *core* rappresenta la porzione dorso-laterale ed è considerato la continuazione del caudato dorsale con funzioni motorie extrapiramidali (con un ruolo nell'iniziazione del movimento); sarebbe coinvolto nell'espressione motoria dei comportamenti motivati e negli aspetti direzionali e strumentali della motivazione. (*Di Chiara e coll., 1999*).

L'ETANOLO

Generalità

L'etanolo (o alcol etilico) è una molecola organica costituita da un singolo gruppo idrossilico (OH) e da una corta catena alifatica di due atomi di carbonio; la compresenza di una componente idrofila (il gruppo ossidrilico) e di una lipofila (la catena etilica) rende la molecola dell'etanolo un anfotero, proprietà importante per la sua attività biologica.

È una molecola ad elevato contenuto energetico (7Kcal/g), valore intermedio tra quello dei glucidi e dei lipidi, ma a differenza di questi ultimi non viene accumulato bensì viene eliminato attraverso le urine e l'aria espirata o metabolizzato.

Viene definito “*pseudo-alimento dotato di effetti psicotropi*”. In realtà, pur apportando molte calorie, appare evidente come l'etanolo non possa essere considerato un nutriente essenziale a causa dei suoi effetti nocivi sull'organismo.

È chiaro che il consumo delle bevande alcoliche non debba essere demonizzato in toto; è risaputo che il vino rosso, assunto nelle giuste quantità, riduce ad esempio il rischio di insorgenza delle malattie cardiovascolari migliorando il metabolismo del colesterolo; sebbene non esistano prove scientificamente sicure ha un effetto benefico sulla digestione mentre è certo il suo ruolo vasodilatatore e antiossidante. Non meno importante è come il vino rappresenti anche arte, cultura, convivialità e aggregazione; grazie ai suoi tipici effetti disinibenti il suo uso è sempre stato associato a eventi importanti o momenti della routine quotidiana, coinvolgendo oltre che l'ambiente sociale anche la sfera religiosa, in cui l'alcol ha sempre assunto molti significati simbolici. È

chiaro però che il suo beneficio è tale purchè assunto solo in piccole quantità; al momento si ritiene accettabile una quantità giornaliera di alcol pari a 35-40 gr per l'uomo e 23-28 gr per la donna, corrispondenti, rispettivamente, a 3 bicchieri e a 2 bicchieri di vino rosso; quantità maggiori sono potenzialmente in grado di causare gravi danni, in particolare a carico del fegato e del SNC.

L'etanolo rappresenta il principio attivo di abuso più diffuso nel mondo, anche in relazione al fatto che è una droga giuridicamente legale, facilmente reperibile e a basso costo, responsabile di una serie di complicanze di natura sia acuta che cronica molto gravi, oltre che in termini di salute dell'individuo, anche in termini sociali.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) classifica l'alcol fra le droghe e considera l'abuso da etanolo una piaga mondiale, ed è per questo che negli ultimi anni ha investito numerose risorse nella risoluzione dei problemi correlati all'abuso di alcol.

Secondo l'OMS in Europa si ha il più elevato consumo alcolico al mondo. Il consumo per abitante è il doppio rispetto alla media mondiale. L'alcol è il terzo fattore di rischio per i decessi e per le invalidità in Europa, e il principale fattore di rischio per la salute dei giovani.

Metabolismo

L'etanolo viene assorbito dal cavo orale, dallo stomaco e dall'intestino tenue per diffusione semplice, per cui la velocità di assorbimento è proporzionale alla quantità ingerita. Il picco alcolemico si raggiunge entro i 30-45 minuti a digiuno e dopo 60-90 minuti se l'assunzione avviene in concomitanza all'ingestione di alimenti. Il livello di alcolemia, una volta terminata l'assunzione, comincia a ridursi attraverso i processi di escrezione polmonare e urinaria ma soprattutto mediante metabolizzazione che avviene, per il 90% della dose assorbita, nel fegato ed in misura minore nella mucosa gastrica, nei polmoni e nei reni.

Numerosi fattori possono influenzare l'assorbimento di etanolo; di norma l'assorbimento a livello duodenale è più rapido che nello stomaco e il tempo di svuotamento gastrico è una variabile fondamentale poiché minore è il tempo di svuotamento più rapido è l'assorbimento. La presenza di cibo nello stomaco comporta un rallentamento del tempo di svuotamento gastrico e quindi conseguente rallentamento dell'assorbimento. Anche la velocità con cui avviene l'ingestione è importante: un'ingestione a piccoli sorsi induce un assorbimento più lento se rapportato all'ingestione della stessa dose in un unico sorso. Tutti quei fattori che determinano alterazioni della motilità gastrica (fumo, farmaci o droghe, esercizio fisico, variazioni dell'equilibrio ormonale, temperatura esterna) sono in grado di modificare l'assorbimento.

Raggiunto l'equilibrio di distribuzione, la concentrazione di alcol risulta proporzionale al contenuto di acqua del tessuto; ciò porta ad avere concentrazioni maggiori nel sangue, nel liquor e nell'urina e conseguentemente minori nel tessuto adiposo e scheletrico.

In seguito all'ingestione, l'alcol giunge nello stomaco dove in parte comincia la sua biotrasformazione ad opera dell'enzima *alcol deidrogenasi*

(ADH) gastrica, simile a quella epatica. L' ADH gastrica rappresenta una prima barriera all'assorbimento dell'etanolo poiché ne riduce la quantità che giunge nel circolo sistemico, rivestendo così un ruolo significativo come fattore limitante la biodisponibilità (first-pass o eliminazione di primo passaggio). Altra caratteristica dell'ADH gastrica è che la sua attività diminuisce durante il digiuno, ragion per cui l'alcol mostra un effetto maggiore se assunto a stomaco vuoto.

Negli alcolisti cronici l'azione dell' ADH gastrica è meno efficiente e ciò potrebbe spiegare la maggiore sensibilità all'alcol.

La quantità di alcol assorbita giunge al fegato, dove è possibile la metabolizzazione da parte di tre sistemi enzimatici differenti.

Il più importante coinvolge due deidrogenasi:

1. *alcol deidrogenasi* (ADH)
2. *aldeide deidrogenasi* (ALDH)

L' ADH è l'enzima più importante nel metabolismo dell'etanolo; contiene zinco ed è localizzato nel citosol di diversi tessuti, in particolare a livello epatico, e in misura minore nel rene, nel polmone e, come già detto, nella mucosa gastrica.

La prima reazione, catalizzata dall' ADH, converte l'etanolo in acetaldeide determinando liberazione di ioni idrogeno e conversione di nicotinamide adenin dinucleotide (NAD⁺) a NADH.

La seconda reazione, catalizzata dall' ALDH, converte l'acetaldeide in acetato sempre con liberazione di ioni idrogeno, utilizzando il NAD⁺ come cofattore. La reazione complessiva è la seguente:

dalla *catalasi*, espressa in particolare a livello del SNC, dove catalizza la reazione tra etanolo e acqua ossigenata a dare acetaldeide. La scarsa importanza della catalasi nel catabolismo dell'etanolo è da attribuire al fatto che la produzione di acqua ossigenata nel fegato è insignificante.

La capacità di metabolizzazione epatica dipende dalle condizioni del fegato stesso. Fattori come il sesso, l'età, la presenza di altre patologie o l'abuso di farmaci psicotropi possono far variare la funzionalità di tali processi metabolici.

Meccanismo d'azione

Dal punto di vista farmacologico, l'etanolo è una sostanza psicoattiva, per cui non è considerato come farmaco; è un depressore del SNC, che a dosi crescenti induce sedazione e al termine ipnosi. L'attività farmacologica è sempre di tipo inibitorio, anche se a basse concentrazioni prevalgono gli effetti ansiolitico e disinibente; all'aumentare della dose insorgono gli effetti sedativo-ipnotico e anticonvulsivante.

Studi recenti dimostrano che l'etanolo, in seguito all'interazione con specifici recettori di membrana, potenzia l'attività inibitoria e diminuisce quella eccitatoria nel SNC. Infatti una delle azioni neurofarmacologiche principali dell'etanolo è la sua interazione con il sistema *GABAergico* in termini di attivazione e la sua azione inibitoria sui recettori per l'*N*-metil-D-aspartato (*NMDA*) del glutammato, il principale amminoacido eccitatorio del SNC; ciò spiega perché l'alcol agisca come depressore del SNC. Tale depressione assume, sia in termini comportamentali che clinici, un andamento bifasico caratterizzato da un'azione disinibitoria (ovvero di depressione delle inibizioni) a basse dosi, e da una depressione del SNC in toto a dosi elevate.

Per quanto riguarda l'azione a carico dei recettori glutammatergici, l'etanolo a basse concentrazioni agisce sui recettori *NMDA* con affinità elevata, inibendo il flusso ionico passante attraverso questi recettori (*Grant e coll.* 1995); mentre è scarsamente significativa l'affinità dell'etanolo verso i recettori *AMPA* e i recettori *Kainato*. Il meccanismo d'azione prevede il legame dell'etanolo ad una tasca idrofobica presente nel terzo dominio transmembrana della subunità *NR1* bloccando l'attività del recettore a cui consegue la riduzione del tono glutammatergico. In realtà l'azione dell'etanolo non si limita a questo poiché, con l'esposizione prolungata, si manifestano una serie di fenomeni adattativi a livello recettoriale che

tendono a ridurre la sensibilità del recettore NMDA all'azione dell'etanolo. Un primo meccanismo di adattamento è rappresentato dall' *up-regulation*; un secondo meccanismo riguarda cambiamenti nello stato di fosforilazione del recettore per cui l'esposizione cronica all'etanolo indurrebbe un aumento della fosforilazione, con conseguente riduzione della sensibilità del recettore NMDA nei confronti dell'etanolo.

Altro target d'azione dell'etanolo è rappresentato dal recettore GABA_A cui va a legarsi l'etanolo facilitando il flusso di ioni cloro all'interno del neurone, con conseguente azione di iperpolarizzazione della membrana e di riduzione dell'eccitabilità neuronale; in questo senso l'etanolo possiede un profilo farmacologico in parte sovrapponibile a quello delle benzodiazepine e dei barbiturici, anch'essi, come l'etanolo, deprimenti non selettivi del SNC. Gli effetti dell'etanolo inoltre sono potenziati dagli agonisti GABAergici come il muscimolo, mentre sono ridotti dagli antagonisti come la bicucullina. Negli animali trattati cronicamente con etanolo si osservano cambiamenti nei livelli delle subunità dei recettori GABA_A. I livelli di GABA_A risultano ridotti nel plasma e nell'encefalo in alcolisti che si sono detossificati di recente (*Behar, 1999*). Alcuni studi hanno evidenziato che l'antagonista benzodiazepinico flumazenil, potrebbe ridurre nell'uomo l'intossicazione da etanolo, a dosi più alte di quelle richieste per antagonizzare gli effetti delle benzodiazepine (*Lheureux, 1991*) ma col vantaggio di non produrre sintomi di astinenza in pazienti dipendenti (*Potokar e coll., 1997*).

Altra azione dell'etanolo riguarda il potenziamento della trasmissione serotoninergica, con particolare specificità nei confronti del recettore 5-HT₃ che spiega la nausea che si manifesta successivamente all'assunzione di elevate quantità di etanolo, poiché tali recettori si trovano nell'area CTZ (Chemoreceptor Trigger Zone) implicata nell' emesi.

È stato proposto un meccanismo d'azione dell'etanolo che comporta l'inibizione del trasporto di adenosina (*Diamond e coll.*, 1991): si verifica un aumento delle concentrazioni extracellulari di adenosina che, per interazione con recettori di membrana accoppiati a proteine G, contribuisce alla depressione neuronale indotta dall'etanolo e agli effetti di regolazione cellulare seguenti all'esposizione cronica di etanolo.

Indirettamente l'alcol induce liberazione di oppioidi endogeni e attivazione dei recettori oppioidi che, unitamente agli effetti sulla dopamina, spiegano gli effetti gratificanti dell'alcol. Aumentati livelli di beta-endorfine ed encefaline sono infatti stati osservati durante l'assunzione acuta (*Gianoulakis e coll.*, 1996; *Herz*, 1997). Gli antagonisti degli oppioidi riducono la capacità gratificante e gli effetti dell'etanolo, a riprova del coinvolgimento degli oppioidi endogeni nell'euforia e nel comportamento indotti dall'alcol (*Herz*, 1997).

È chiaro come le monoamine cerebrali (noradrenalina, dopamina e serotonina) siano coinvolte tutte nell'azione farmacologica dell'alcol (*Nutt*, 1999).

In particolare la somministrazione di etanolo determina un incremento della trasmissione dopaminergica nel nucleo accumbens (*Imperato e Di Chiara*, 1986) e in modo preferenziale nella shell del nucleo accumbens (*Bassareo e coll.*, 2003).

Appare sempre più chiaro come anche l'acetaldeide giochi un ruolo importante nelle proprietà gratificanti dell'etanolo (*Aragon e coll.*, 1986; *Smith e coll.*, 1997; *Eriksson*, 2001). Studi comportamentali hanno dimostrato che l'acetaldeide, somministrata per infusione intracerebroventricolare in ratti Sprague-Dawley (*Smith e coll.*, 1984), oppure per via intraperitoneale in ratti Wistar (*Quetermont e De Witte*, 2001), è in grado di indurre *place preference* condizionata; inoltre produce

stimolazione dei neuroni DAergici del sistema mesolimbico (*Quatermont e coll., 2005; Melis e coll., 2007; Diana e coll., 2008; Enrico e coll., 2009*).

Come già detto, l'alcol ha un effetto bifasico: a basse dosi mostra risposte euforizzanti, attivanti ed energizzanti dovute appunto al coinvolgimento del sistema monoaminergico. Infatti, l'intossicazione acuta di etanolo è stata associata con un incremento dell'attività adrenergica nel cervello (*Littleton, 1978; Tabakoff e Hoffman, 1980*). Inoltre dopo l'assunzione acuta di etanolo è stato dimostrato un incremento significativo nella secrezione di catecolamine. Successivamente invece si manifesta una fase ansiolitica, sedativa e di inibizione attribuibile all'azione inibitoria sui recettori degli amminoacidi eccitatori (NMDA) e a un incremento dell'azione GABAergica (*Kostowski e Bienkowski, 1999*).

Oltre all'effetto ansiolitico, l'etanolo a basse dosi induce un innalzamento della soglia del dolore e del freddo, la depressione dei riflessi nocicettivi e la riduzione nella coordinazione dei movimenti.

Tossicità

La tossicità diretta o indiretta dell'etanolo e dell'acetaldeide non risparmia nessun organo, in particolare il fegato che, essendo la sede principale del metabolismo, rappresenta l'organo più frequentemente colpito dagli effetti tossici dell'etanolo. Eventi come lo squilibrio del potenziale redox, la liberazione di radicali ossidanti e di addotti dell'acetaldeide e le reazioni immunitarie modificano il metabolismo lipidico e glucidico stimolando la fibrogenesi. La carenza di vitamine del gruppo B dovuta al malassorbimento intestinale, la formazione di aldeidi biogene e un alterato metabolismo mitocondriale favoriscono patologie degenerative o demielinizzanti a carico del sistema nervoso centrale e periferico. La tossicità cardiovascolare invece è condizionata dall'iperattività adrenergica, dagli squilibri elettrolitici e dall'alterazione degli enzimi mitocondriali. L'etanolo inoltre è potenzialmente in grado di interferire sui processi immunitari, di riparazione del DNA e sul sistema microsomiale epatico promuovendo la carcinogenesi.

La citotossicità acuta a carico di organi e tessuti è in parte dovuta alla tossicità diretta dell'etanolo e dell'acetaldeide sul SNC e sul fegato che si manifesta a seguito dell'assunzione di dosi elevate di alcol, mentre nell'alcolismo cronico con compromissione delle capacità dell'ALDH e dei sistemi detossificanti anche a dosi più basse. Nella tossicità cronica intervengono invece modificazioni dell'ambiente biochimico e metabolico a carico di vari organi sensibili. L'assunzione cronica di etanolo determina, come già spiegato, una modificazione dell'espressione dei recettori a livello del SNC tra cui una up regulation dei recettori NMDA con conseguente neurotossicità del glutammato dovuta a iperstimolazione recettoriale con accumulo di calcio intraneuronale in corrispondenza delle crisi d'astinenza. Alla tossicità da etanolo contribuisce anche il suo principale metabolita,

l'acetaldeide. Tale prodotto è altamente reattivo e forma addotti con diverse proteine tra cui quelle mitocondriali, microsomiali e con le lipoproteine. A livello mitocondriale diminuisce l'attività della citocromo ossidasi e degli enzimi del ciclo di Krebs, con disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e aumento della glicolisi anaerobia. Inoltre l'acetaldeide si lega ai neurotrasmettitori formando addotti a carattere neurotossico verso i sistemi monoaminergici.

Relativamente al fegato, le patologie principali riguardano steatosi, epatite alcolica acuta e cronica, cirrosi ed epatocarcinoma, con ripercussioni anche sistemiche come le dislipidemie.

Intossicazione acuta e cronica

Gli effetti indotti dall'assunzione di alcol dipendono in larga misura dalla quantità di alcol assunta. I sintomi dell'intossicazione acuta comprendono: instabilità emozionale, diminuzione delle inibizioni, discorsi incoerenti, diminuzione della memoria e della capacità di comprensione, diminuzione delle risposte sensorie e aumento dei tempi di reazione, deambulazione incerta, stato confusionale, stati emozionali esasperati (paura, irascibilità, aggressività). Con l'aumentare delle dosi compare sedazione profonda e all'ultimo stadio coma, perlopiù per depressione respiratoria. Di norma l'intossicazione acuta da alcol raramente è associata al coma (a patto che l'alcol non venga assunto con altri deprimenti del SNC come barbiturici e benzodiazepine) e non è richiesta terapia, bensì è sufficiente attendere che l'etanolo ingerito venga metabolizzato.

Per l'intossicazione cronica si rimanda al paragrafo seguente.

Dipendenza e abuso

L'abuso di alcol può condurre all'instaurarsi dei fenomeni di *tolleranza* e *dipendenza*. L'alcolista si adatta all'etanolo sviluppando tolleranza agli effetti dell'intossicazione. Alcuni bevitori possono apparire sobri a concentrazioni ematiche etanoliche di 89-108 mmol/l.

Il Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM IV, 1994) distingue tra abuso di alcol (o uso prolungato) e dipendenza da alcol (addiction o alcolismo); si parla di dipendenza da alcol quando si manifestano i segni classici della farmacodipendenza, in particolare lo sviluppo di tolleranza associata o meno a reazioni da astinenza clinicamente evidenti.

Con il termine di *tolleranza farmacologica* (o farmacoabitudine) si definisce il fenomeno caratterizzato dalla necessità di aumentare la dose di un farmaco per mantenere costante l'intensità dell'azione da esso prodotta. L'azione farmacologica si riduce progressivamente a causa dell'acquisizione di una maggiore capacità di tolleranza dell'organismo.

La tolleranza farmacologica si considera *semplice* quando alla sospensione del farmaco non seguono disturbi né si accende il desiderio di consumo. Diversamente, quando la brusca sospensione del farmaco porta alla sindrome d'astinenza e alla ricerca spasmodica della sostanza con conseguenti disturbi psichici e somatici più o meno gravi, allora si parla di *tolleranza tossicomaniaca*. Un'ulteriore caratteristica dell'abitudine tossicomaniaca è il desiderio incoercibile della sostanza oggetto d'abuso, un bisogno incontrollabile di bere (*craving*). Per *craving* si intende *una particolare appetizione patologica, un desiderio intenso, una brama* verso la sostanza, che si manifesta nel desiderio spasmodico di assumerla e, nel caso in cui questo non sia possibile, nella comparsa dei sintomi tipici quali

ansia, irritabilità, depressione, insonnia e nei caratteristici comportamenti di ricerca, che possono spingere l'individuo a superare ogni limite di ordine etico e morale per la ricerca della sostanza d'abuso.

Diverse tecniche sperimentali permettono di predire la capacità di una sostanza di dare *addiction*; per la gran parte queste tecniche si basano sull'auto-somministrazione del farmaco in animali da esperimento. La sospensione del farmaco agli animali resi dipendenti permette di comprendere la natura della sindrome d'astinenza.

La *dipendenza fisica* è una condizione che si sviluppa in conseguenza dell'adattamento prodotto da un riequilibrio di meccanismi omeostatici in risposta all'uso ripetuto di un farmaco e in cui l'assunzione del farmaco stesso diventa indispensabile per lo svolgimento delle normali funzioni tissutali. Un soggetto in stato di dipendenza fisica manifesta tremori, alterazioni percettive, convulsioni e *delirium tremens*. I tremori sono il primo e più comune sintomo che inizia dopo 6-8 ore dall'ultima assunzione e sono più intensi a 24-36 ore. Ai tremori può accompagnarsi sudorazione, tachicardia, ipertensione. Possono comparire insonnia, sintomi gastrointestinali (nausea, vomito, diarrea), alterate percezioni visive, uditive e tattili. L'intensità dei sintomi è modesta nelle fasi precoci e si risolve nelle 24-48 ore dalla sospensione, normalmente senza necessità di intervento terapeutico.

Il *Delirium Tremens* è l'evento più temibile, con il 5-15% di mortalità dovuta a squilibri idroelettrolitici, cardiovascolari o neurofisiologici. Può insorgere dopo 4-10 giorni e, oltre ai sintomi già riportati, è caratterizzato da stato confusionale, agitazione, allucinazioni, tremori scuotenti e possibili complicanze per convulsioni, rabdomiolisi, aritmie, ipertermia e collasso cardiocircolatorio.

Meccanismi di rinforzo dell'etanolo

Nell'alcolismo, inteso come urgenza all'assunzione compulsiva ed eccessiva di alcol, risulta cruciale il *concetto di rinforzo*. Si definisce rinforzo un evento che aumenta la probabilità di una risposta (*Johanson, 1992*); è certo che alcune delle azioni farmacologiche esercitate dall'alcol rappresentino stimoli di rinforzo, sia positivo che negativo (*Allgaier C. 1992*). Il soggetto alcolista associa l'assunzione di etanolo a un piacere, a un evento positivo (esempio il miglioramento del tono dell'umore) cosa che aumenta la possibilità che questo venga ulteriormente ricercato e consumato. Paradossalmente anche i rinforzi negativi possono portare un individuo ad assumere ulteriori quantità, ad esempio quando l'alcol è assunto al fine di scongiurare una crisi d'astinenza o quando lo scopo è placare uno stato d'ansia o depressione. Le proprietà di rinforzo positive e/o negative sono alla base della reiterazione nella ricerca dell'alcol e delle recidive, anche dopo lunghi periodi di astensione (relapse).

Al contempo può avvenire che stimoli o eventi di per sé neutrali possano acquisire proprietà di rinforzo, quando vengano ripetutamente associati con gli effetti di rinforzo dell'alcol, determinando il rinforzo secondario (*Babbini e Gaiardi 1992*).

Sebbene il fenomeno della dipendenza coinvolga pressochè tutti i neurotrasmettitori la dopamina è il principale neurotrasmettitore che media le azioni di rinforzo positivo.

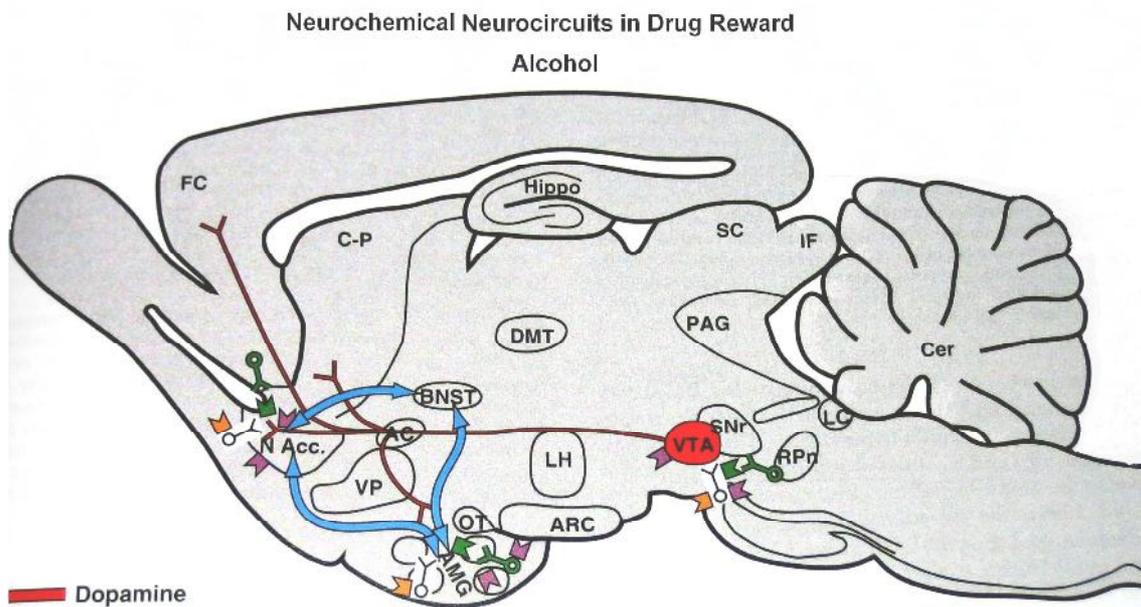


Figura 11: circuiti neuronali coinvolti nei meccanismi di rinforzo dell'etanolo.

Approccio terapeutico dell'alcolismo

Il trattamento dell'alcoldipendenza si basa principalmente sulla terapia di supporto psicologico e sociale, ma talvolta risulta indispensabile associare ad essa una terapia di tipo farmacologico, finalizzata ad ottenere la piena riabilitazione del soggetto e la prevenzione delle ricadute.

I principali farmaci ad azione anticraving attualmente utilizzati nella terapia dell'alcoldipendenza, in particolare nella prevenzione della ricaduta, comprendono:

Disulfiram: in alcune nazioni il nome commerciale è *Antabuse* o *Antabus*. Agisce bloccando l'ossidazione dell'alcol allo stadio di acetaldeide durante il suo metabolismo, in seguito ad inibizione irreversibile dell'enzima *aldeide deidrogenasi* che converte l'acetaldeide ad acetato. L'accumulo di acetaldeide che ne consegue risulta tossico per l'organismo e provoca una serie di sintomi spiacevoli. Infatti in presenza del farmaco, l'assunzione di alcol, anche in piccole quantità, provoca sensazioni di calore intenso al volto, al collo, al tronco con conseguente rush cutaneo di colore violaceo, cefalea pulsante, sudorazione, nausea, vomito, dispnea, confusione, ipotensione e vertigini. L'obiettivo del trattamento con *disulfiram* è quello di creare un'avversione verso l'alcol, per cui il paziente, associando lo stato di malessere conseguente l'assunzione di alcol, dovrebbe essere dissuaso dal continuare ad assumere alcolici.

Naltrexone: è un antagonista dei recettori degli oppioidi che si è dimostrato utile nel ridurre il craving e la frequenza di assunzione di alcol. Il presupposto neurofarmacologico dell'efficacia degli antagonisti degli oppioidi nella terapia dell'alcolismo è che le endorfine, in quanto oppioidi endogeni, contribuiscano agli effetti di rinforzo positivo dell'alcol, interagendo con il sistema dopaminergico mesolimbico.

Acamprosato: è un derivato sintetico di un aminoacido

(omotaurinato) strutturalmente simile al GABA, il cui effetto anti-craving sembrerebbe dovuto alla modulazione della trasmissione GABAergica e glutammatergica; in particolare il meccanismo d'azione sembra legato alla riduzione dell'eccitabilità neuronale dovuta all'azione del farmaco sui canali al calcio.

Sale sodico dell'acido 4-idrossibutirrico (GHB): il meccanismo d'azione del GHB è ancora poco conosciuto. Tale sostanza agirebbe sui recettori GABA (in particolare GABA-B) e su recettori specifici per il GHB, inducendo un incremento della concentrazione cerebrale di DA e di serotonina, ma sarebbero coinvolti anche altri neurotrasmettitori. Il GHB determina una riduzione del craving da alcol, in quanto ne riproduce gli effetti gratificanti diminuendo così anche la frequenza degli episodi di ricaduta. Durante il periodo di trattamento è possibile l'insorgenza di craving per il farmaco e conseguente abuso del farmaco stesso.

Farmaci ad azione sul sistema dopaminergico (tiapride, amilsupride e flupentixolo), e serotoninergico (buspirone, fluoxetina, nefazodone, ritanserina e ondansetron) sono stati e sono attualmente oggetto di studi clinici.

SCOPO DELLA RICERCA

Secondo la teoria dell'*incentive learning* l'apprendimento associativo nel tossicodipendente risulta essere potenziato, probabilmente in seguito ad una stimolazione abnorme della trasmissione DAergica a livello della shell del NAc. In seguito a questo apprendimento patologico gli stimoli condizionati che fanno da corollario all'uso del farmaco d'abuso assumono un'importanza esasperata per l'individuo e da essi dipende il mantenimento dell'assunzione continua del farmaco e, quindi, la tossicodipendenza.

Lo scopo del nostro studio è quello di studiare la risposta della trasmissione DAergica nella shell e nel core del NAc durante la auto-somministrazione di etanolo e di saccarosio, come sostanza di controllo, e nella risposta agli stimoli condizionati alla loro assunzione.

Verrà adoperata come via di somministrazione quella normalmente utilizzata dall'uomo per la assunzione delle bevande alcoliche: la via orale.

Durante il nostro studio verrà effettuato il monitoraggio dei valori del neurotrasmettitore DA durante le varie fasi della auto-somministrazione di etanolo e di saccarosio mediante la tecnica della microdialisi cerebrale (durante la auto-somministrazione, durante la presentazione dei singoli stimoli condizionati e durante la somministrazione passiva dell'etanolo).

Ciò ci consentirà di chiarire il ruolo giocato dalla DA nelle due diverse porzioni del NAc in risposta alla auto-somministrazione di stimoli gratificanti naturali come il saccarosio e di farmaci d'abuso come l'alcool.

MATERIALI E METODI

Animali



Figura 12: Ratto maschio specie Norvegicus, ceppo Sprague-Dawley.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando ratti maschi della specie Norvegicus, varietà Albinus e del ceppo Sprague-Dawley, del peso medio di 300 grammi.

Va sottolineato che tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le linee guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio, secondo quanto approvato dalla Society for Neuroscienze nel gennaio 1995 e secondo le direttive sancite nel 1992 dalla Comunità Economica Europea (86/609; D.L.: 27.01.1992, N° 116).

I ratti sono stati stabulati in gruppi di otto, in gabbie di plexiglas, per almeno una settimana prima dell'inizio delle pratiche sperimentali, nutriti con cibo standard e acqua ad libitum. L'illuminazione è stata regolata, automaticamente e artificialmente, in cicli luce/buio di 12 ore ognuno (luce dalle 8:00 AM alle 8:00 PM). La temperatura (23°C) e l'umidità (60%) sono state mantenute costanti.

Successivamente alla sessione chirurgica i ratti sono stati stabulati

singolarmente, nelle stesse condizioni ambientali sopra riportate, in gabbie di dimensioni 45x20x24 cm.

Gli animali alloggeranno nelle stesse gabbie sia per il periodo della convalescenza sia del training di self administration.

La microdialisi cerebrale

La microdialisi cerebrale è una tecnica di importanza cruciale nel campo delle neuroscienze per il campionamento in vivo dei diversi neurotrasmettitori presenti in ambiente extracellulare.

La tecnica permette di studiare le variazioni di neurotrasmettitore per esempio dopo somministrazione sistemica di un farmaco oppure di somministrare un farmaco direttamente nell'area di interesse, verificandone gli effetti locali. Inoltre, poiché la tecnica si realizza generalmente sull'animale sveglio e libero di muoversi (freely moving), permette di analizzare le variazioni comportamentali dell'animale conseguenti la somministrazione.

Oltre che nelle neuroscienze, la microdialisi trova applicazione clinica in diabetologia, in terapia intensiva, in cardiocirurgia, neurochirurgia e chirurgia ricostruttiva.

La microdialisi si realizza previo inserimento nel parenchima cerebrale dell'animale da esperimento di specifiche fibre da dialisi (probes), nelle aree cerebrali di interesse. Ciò consente a molecole sufficientemente piccole, come la DA nel nostro caso, e di dimensioni compatibili con la porosità della membrana da dialisi, di diffondere sotto la spinta del gradiente di concentrazione dal liquido extracellulare cerebrale al Ringer ovvero la soluzione fisiologica di perfusione che è spinta attraverso il probe per mezzo di una pompa a un flusso costante di 1,0 $\mu\text{l}/\text{min}$. Avviene quindi il recupero del liquido, detto dializzato, il quale viene

immediatamente sottoposto alle analisi per la rivelazione quali-quantitativa dei composti di interesse tramite HPLC. Uno dei vantaggi di questa tecnica è che fornisce campioni “puliti” che possono essere direttamente analizzati senza bisogno di una purificazione preventiva.

Durante la procedura della microdialisi, due variabili rivestono particolare importanza: composizione ionica e velocità di flusso del Ringer di perfusione. Partendo dal presupposto per cui è estremamente difficile ricostruire fedelmente la complessa composizione del liquido extracellulare cerebrale per via dei continui cambiamenti cui va incontro, si sono messi in atto numerosi tentativi col fine di ottenere soluzioni di Ringer a composizione il più possibile simile a quella dei fluidi extracellulari. La gran parte degli studi di dialisi su monoamine utilizzano una soluzione di Ringer molto semplice contenente solamente Sodio, Potassio, Calcio e Cloro, ioni essenziali per il release dei neurotrasmettitori. Nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato soluzioni di Ringer con la seguente concentrazione: NaCl 147 mM, CaCl₂ 2,2 mM, KCl 4mM.

Per quanto riguarda la seconda variabile, ovvero la velocità di flusso, questo è un parametro importante sia perchè bisogna dare tempo al Ringer perfuso di equilibrarsi con il fluido extracellulare, sia perchè va considerato che la sonda da dialisi asporta dal tessuto encefalico sostanze come nutrienti e glucosio; ne consegue che velocità di perfusione troppo elevate potrebbero danneggiare e impoverire eccessivamente il tessuto.

Preparazione delle sonde da microdialisi

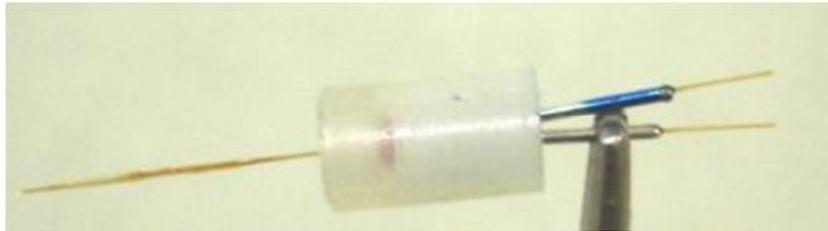


Figura 13: Rappresentazione di una fibra da dialisi

L'allestimento delle sonde da microdialisi segue il metodo descritto da *Di Chiara e coll.* (1993) poi modificato da *Tanda e coll.* (1996); tale procedura prevede di utilizzare una fibra sottile da dialisi costituita da un copolimero acrilico di sodio-meta-allil-solfonato (AN 69 HOSPAL, diametro esterno 310 μm e diametro interno 220 μm). Internamente alla fibra da dialisi viene inserito un mandrino di tungsteno (Clark Instruments UK, diametro 200 μm) che ha funzione temporanea di sostegno. L'estremità libera della fibra viene chiusa con una goccia di colla epossidica che per capillarità penetra nella fibra per circa 1 mm. Dopo almeno 24 h il tappo di colla formatosi viene tagliato alle dimensioni di 0.5 mm e successivamente levigato fino a fargli assumere una forma conica finalizzata a evitare un possibile danneggiamento tissutale.

Si prosegue preparando due capillari di silica fusa (Polymicrotechnologies Inc. Phoenix, Arizona, USA; diametro esterno 140 μm , diametro interno 50 μm), dei quali uno con la punta a becco di flauto, l'altro con una delle estremità privata del rivestimento.

Entrambe le siliche vengono inserite negli appositi aghetti (ago 22G per iniezioni ipodermiche) della lunghezza di 1,2 cm, presenti nel Push-pull connector (plastic one, Roanoke, VA USA). La silica modellata a becco di flauto costituisce l'ingresso per il Ringer che perfonde la fibra da dialisi;

l'altra silica corrisponde invece all'uscita del dializzato. Una goccia di colla epossidica fissa le due siliche agli aghi del push pull connector e successivamente vengono inserite all'interno della membrana Hospal dotata del tappo di forma conica levigato.

Il giorno dell'esperimento si procede dapprima a rimozione della dummy cannula, successivamente si avvita la fibra da microdialisi nella cannula guida (inserita nell'encefalo del ratto durante la sessione chirurgica).

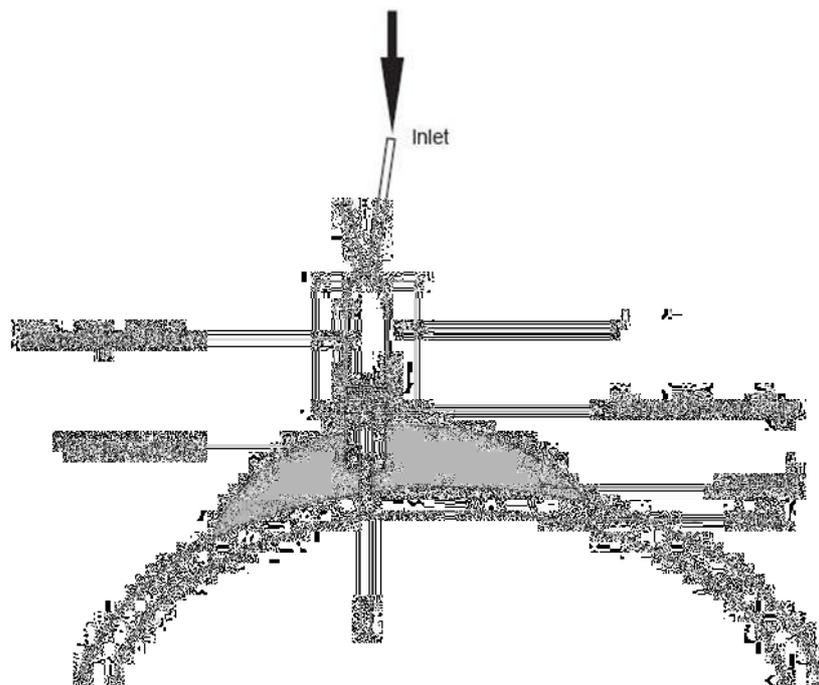


Figura 14: Schema della cannula guida impiantata nella teca cranica con la fibra da microdialisi inserita.

L'inserimento della fibra è un passaggio estremamente delicato poiché avviene nel ratto sveglio, e plausibilmente in movimento, per cui bisogna prestare attenzione a non danneggiare la fibra. Terminato l'esperimento la fibra viene svitata dalla cannula guida, sulla quale verrà reinserita una dummy cannula sterile.



Figura 15: *A) cannula guida; B) push pull; C) dummy cannula*

Sessione chirurgica

La chirurgia è finalizzata all'inserimento, nell'area cerebrale di interesse, della cannula guida sulla quale, il giorno dell'esperimento, verrà avvitata la fibra da microdialisi.

Prima dell'inizio della chirurgia i ratti vengono anestetizzati con una dose di 400 mg/kg i.p. di Cloralio Idrato e posizionati su un apparato stereotassico che permette il raggiungimento delle aree cerebrali di interesse con l'ausilio di un sistema di coordinate basato su due punti: *bregma* (punto di incontro tra l'osso frontale e le ossa parietali) e *lambda* (punto d'incontro tra l'osso parietale e occipitale) tratte dall'atlante *Paxinos e Watson (1998)*; l'atlante è un prezioso strumento da cui estrapolare le coordinate per poter raggiungere i nuclei cerebrali di interesse. Le coordinate vengono espresse in termini di antero-posteriorità e lateralità, rispetto a un punto di riferimento che costituisce "lo zero"; questo punto è rappresentato dal bregma.

Nel nostro studio le coordinate per l'impianto della cannula guida sono state le seguenti:

- per la shell del NAc +2,00 mm di anteriorità, +1,00 mm di mediolateralità dal bregma e -3,6 mm di verticalità dalla dura madre;
- per il core del NAc: +1,60 mm di anteriorità e 1,90 mm di mediolateralità dal bregma e -3,40 mm di verticalità dalla dura madre.

L' Anteriorità (A) è la distanza lungo l'asse anteriore del bregma;

La Lateralità (L) è la distanza del bregma lungo un asse medio-laterale

La Verticalità (V) è la distanza della dura madre lungo l'asse dorso-ventrale dalla punta da dialisi



Figura 16: Apparecchio stereotassico utilizzato in laboratorio

Dopo aver sistemato l'animale e dopo adeguata disinfezione, si pratica un' incisione della cute e dei tessuti superficiali, fino a esposizione della teca cranica; si procede praticando un piccolo foro nella zona di impianto e si perfora delicatamente la dura madre. A questo punto si abbassa lentamente e delicatamente la cannula guida all'interno del cervello sino a raggiungimento della verticalità prestabilita. La parte metallica della sonda, che rimane completamente all'esterno, viene fissata alla teca cranica con del cemento dentale vetro-ionomerico (Glass Ionomer Cement, CX-Plus, Ilic, Milan, Italy).



Figura 17: ratto posizionato sullo stereotassico con la teca cranica e dura madre esposte.

Per dare modo all'animale di riprendersi dall'anestesia e dall'intervento appena concluso, viene trasferito in una gabbia con cibo e acqua ad libitum.

Nel tempo intercorrente dall'impianto all'esperimento di microdialisi, sulla

cannula guida si avvita una dummy cannula col fine di evitare l'ingresso di impurezze all'interno della cannula guida. Ogni giorno durante la manipolazione si procederà a svitare e riavvitare le dummy cannula allo scopo di verificare la pervietà della cannula cronica e per abituare l'animale a questo tipo di operazioni, permettendogli anche di prendere confidenza con gli operatori.

Per i primi cinque giorni successivi alla chirurgia, i ratti vengono sottoposti giornalmente a terapia antibiotica con 1 ml/kg s.c. di Gentamicina Solfato (40 mg/ml) al fine di evitare la comparsa di infezioni dovute alla pratica chirurgica.

Al termine della chirurgia, per gli animali inizia un periodo di convalescenza (10 giorni) durante il quale ricevono cibo e acqua ad libitum.

Conclusosi il periodo di convalescenza, può iniziare il training durante il quale continua la manipolazione degli animali affinché sviluppino un comportamento conciliante e mansueto, importante in fase di esperimento. Durante il training il regime di cibo è di 15 g al giorno con acqua ad libitum. Seguendo questo regime alimentare i ratti mantengono un peso inferiore del $10\% \pm 3$ rispetto al peso iniziale.

Self administration

Sostanze utilizzate

Durante l'auto-somministrazione sono state utilizzate soluzioni di Saccarosio (Inagra Srl, San Maurizio (RE) al 20% e soluzioni di Etanolo (Alcool 95° purissimo; Silvio Carta Srl, Oristano) al 10% in saccarosio al 20%.



Figura 18: bottiglia di alcool purissimo a 95°

Protocollo di auto-somministrazione: Training

Gli animali, prima di essere sottoposti all'esperimento, svolgono un periodo di training (allenamento) durante il quale imparano ad associare le cues (stimoli) uditive e visive al consumo della soluzione alcolica, cosa che permette l'instaurarsi del condizionamento.

Le sessioni di auto-somministrazione delle soluzioni di etanolo sono svolte facendo uso di gabbie acusticamente isolate (Coulburn Instruments, Allentown, NJ USA) dotate di 2 fori (nose-pokes) posti in posizione simmetrica ad un'altezza di 2 cm dal pavimento della gabbia.



Figura 19: gabbie utilizzate per la self-administration

I due nose-pokes sono provvisti di due fotocellule attivate dall'inserimento del muso dell'animale. Tra i due nose-pokes è presente un beverino collegato a una siringa collocata esternamente alla gabbia e contenente la soluzione alcolica o zuccherina che viene così erogata.

I due nose-pokes hanno funzione e illuminazione differente: il nose-poke illuminato da una luce giallo-verde è definito attivo poiché l'inserimento del muso dell'animale viene rilevato dalla fotocellula inducendo l'attivazione della siringa per l'erogazione della soluzione di etanolo. Il nose-poke illuminato con la luce rossa è definito inattivo poiché il ratto non può esercitare alcun controllo sul rilascio di soluzione etanolica. La differente illuminazione dei due nose-pokes costituisce lo stimolo discriminativo.

La sessione di auto-somministrazione è monitorata da un sistema computerizzato (Graphic State 2 software, collbourn instrument, PA, USA) che consente a fine sessione di avere un computo dei nose-pokes attivi e inattivi.

Gli animali sono sottoposti alla sessione di training, della durata di 1h, per un periodo di 3 settimane, una volta al giorno, esclusi i weekends.

Nel corso del training l'animale viene sottoposto a due stimoli: uno sonoro,

della durata di pochi secondi, e uno visivo, la luce giallo-verde che si accende all'interno del nose-pokes attivo, sempre per pochi secondi. La luce rossa, relativa al nose-pokes inattivo, invece non è percepita dal ratto. Solo in seguito a inserimento del muso del ratto nel nose-pokes attivo, avverrà l'attivazione della fotocella che permette l'erogazione della soluzione di etanolo dalla siringa. In questo modo, attraverso l'allenamento, si realizza il condizionamento degli animali.

I ratti sono stati suddivisi, casualmente, in due gruppi sperimentali:

1. gruppo etanolo: questi animali hanno ricevuto la soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20%.
2. gruppo controlli: questi animali hanno ricevuto la soluzione di saccarosio al 20%. I controlli quindi bevono la soluzione costituita dallo stesso veicolo (saccarosio al 20%) in cui, agli animali dell'altro gruppo, è veicolato il principio attivo (etanolo al 10%).

Questa suddivisione degli animali in gruppi viene mantenuta, oltre che durante le settimane di training, anche durante i tre giorni di esperimento.

Per il protocollo relativo a questo studio abbiamo utilizzato una schedula a rapporto fisso FR1, in cui per un nose-poke l'animale riceve una erogazione di soluzione (etanolica o zuccherina a seconda del gruppo di appartenenza del ratto); il rapporto è quindi di 1:1.

Esperimento di microdialisi e self-administration

Gli esperimenti di microdialisi vengono condotti, per ogni ratto, in tre sessioni consecutive di tre giorni, con inizio ogni giorno a partire dalle 9:00 AM; l'esperimento avviene all'interno delle gabbie per la self-administration descritte nel paragrafo precedente.

Come avveniva per le sessioni di training, gli animali vengono prelevati dalle loro gabbie e posti nella gabbia per la self-administration, che per ogni ratto dovrà essere la stessa per i tre giorni di esperimento (che è anche la stessa gabbia in cui ha condotto il training). Terminato l'esperimento ogni ratto tornerà nella gabbia dove quotidianamente alloggia.

Si procede con l'inserimento della fibra da microdialisi, previo svitamento della dummy cannula; a questo punto l'animale viene collegato ad una pompa di infusione per microdialisi (BAS Pump, UK) dotata di siringhe Hamilton per microdialisi, che pompano la soluzione di Ringer (ad un flusso costante di 1 μ l/min) all'interno della fibra da microdialisi nel cervello del ratto. In questo modo si compie la microdialisi che, come già spiegato precedentemente, consente il campionamento dei neurotrasmettitori presenti nelle aree cerebrali in cui è localizzata la fibra. Le siringhe sono collegate tramite un tubo di polietilene (PE-50, Portex Ltd, Kent, UK) ad uno swivel a due vie (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) montato su un sostegno mobile posto sopra la gabbia per la self-administration.

I ratti ricevono il trattamento farmacologico solo dopo che i valori basali di dopamina si sono stabilizzati, quindi si procede con i prelievi del dializzato ogni 10 minuti, recuperando 10 microlitri di dializzato (eventualmente portati a volume con l'aggiunta del Ringer);recuperato il dializzato, questo viene iniettato in HPLC. Ottenuto il basale può partire la sessione di self-administration che consente di osservare come variano i livelli di DA in

relazione agli stimoli cui l'animale viene sottoposto.

[1°GIORNO]

Durante il primo giorno di esperimento, l'animale viene posto nella stessa gabbia per la self-administration utilizzata durante le settimane di training. Si prelevano i campioni di dializzato dalla shell e dal core ogni 10 minuti fino ad ottenimento del valore basale di DA. A questo punto viene fatta partire la sessione di auto-somministrazione, esattamente come descritto in relazione al training. L'obiettivo del primo giorno di esperimento è il monitoraggio dei livelli di DA durante l'accoppiamento dello stimolo primario e degli stimoli condizionati ad esso.

[2° GIORNO]

Durante il secondo giorno di esperimento i ratti vengono sottoposti al suono e all'accensione dei nose-pokes senza poter ricevere la soluzione etanolica; in altre parole vengono presentati agli animali i soli stimoli visivi e uditivi (stimoli secondari) che in fase di training l'animale associa allo stimolo primario. Il ratto quindi smette di associare lo stimolo visivo e uditivo al consumo di soluzione alcolica, entrando nella fase di estinzione, in cui l'animale smette di lavorare perchè capisce che all'inserimento del muso nel nose-poke non segue più la sua ricompensa.

[3° GIORNO]

Durante l'ultimo giorno di esperimento gli animali ricevono in maniera passiva (non-contingente) la soluzione alcolica che viene erogata dall'operatore; quindi l'animale beve passivamente senza dover lavorare per ricevere la ricompensa, in assenza degli stimoli uditivi e visivi. La quantità di soluzione alcolica erogata dall'operatore è stabilita calcolando la media

dei millilitri di etanolo che gli animali si sono auto-somministrati durante le settimane di training e il primo giorno di esperimento. L'erogazione della soluzione alcolica avviene manualmente da parte dell'operatore che, a intervalli di tempo costanti e prestabiliti, gira una rotella inserita nel sistema di erogazione collocato esternamente alla gabbia.

Le condizioni poste in essere durante il terzo giorno di esperimento permettono di correlare le variazioni della dopamina relative al solo consumo di etanolo ovvero dello stimolo primario.

Analisi HPLC del dializzato

Nella microdialisi cerebrale la metodica di elezione per l'analisi del dializzato è rappresentata dalla cromatografia liquida su colonna ad elevata prestazione o HPLC.

Per l'analisi del contenuto in DA del dializzato, a intervalli di 10 minuti abbiamo raccolto 10 microlitri di dializzato che sono stati iniettati, tramite una siringa, nell'HPLC.

L' HPLC utilizzato nei nostri esperimenti è dotato di colonna cromatografica a fase inversa (Supelcosil Lc 18-DB, 15 cm, 5 μ m, Supelco) e di detector coulometrico (ESA, Coulochem II, Bedford MA, USA) con cella analitica ad alta sensibilità (mod. 5014 B ESA).

Il primo elettrodo del detector viene posizionato a +125 mV (ossidazione), il secondo a -175 mV (riduzione).

La fase mobile utilizzata è un tampone (pH 5.5) contenente NaH_2PO_4 50 mM, octilsolfato di sodio 2,4 mM, EDTA 5 mM, metanolo 16%, Na_2HPO_4 5 mM, precedentemente degasato e posto su miscelatore automatico; tale fase mobile viene pompata tramite una pompa Jasco PU 1580, ad un flusso costante di 1ml/min.

Il programma utilizzato per la lettura del cromatogramma è l'ESA CDS.

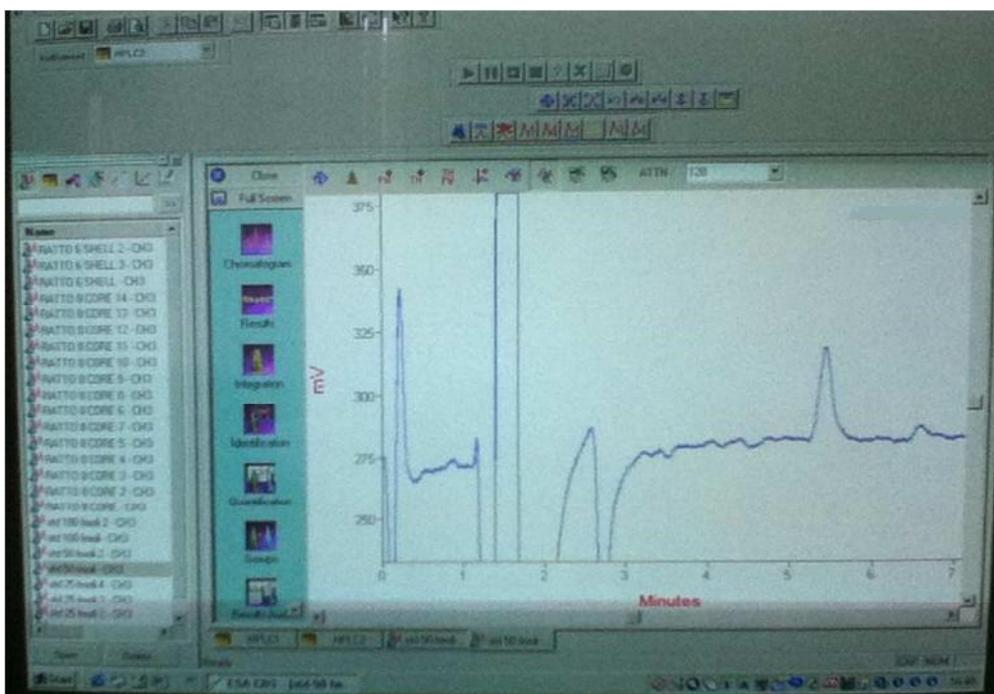


Figura 20: picco di DA rilevato dall'HPLC e letto da ESA CDS.

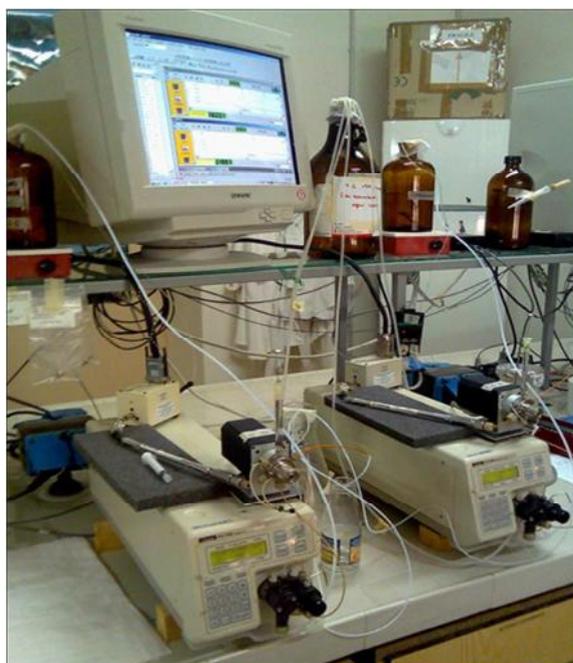


Figura 21: attrezzature utilizzate durante un esperimento di microdialisi cerebrale.

Prima di iniettare il dializzato nell' HPLC, è necessario iniettare uno standard di dopamina a concentrazioni di 25 fmoli, 50fmoli e 100fmoli. In questo modo diventa possibile il confronto dei picchi visualizzati nel cromatogramma con i tempi di eluizione per confermare che sia effettivamente presente DA nel campione di dializzato.

Istologia

Post mortem è necessario verificare il corretto posizionamento del probe da dialisi, per cui terminato l'esperimento i ratti vengono anestetizzati con una soluzione satura di cloralio idrato e quindi sacrificati. Si procede con il prelievo del cervello che viene trasferito all'interno di un vial contenente una soluzione di formaldeide al 4%. Trascorsi almeno 5 giorni i cervelli vengono affettati in sezioni coronali di spessore pari a 100 μ m, mediante l'impiego di un vibratomo.



Figura 22: il vibratomo

Tale procedura si rende necessaria per stabilire se il posizionamento della fibra è stato eseguito correttamente e quindi per essere certi che i risultati ottenuti siano effettivamente attribuibili all'area cerebrale di nostro interesse; infatti dall'analisi al microscopio delle fettine di tessuto è possibile rintracciare la traccia relativa alla fibra e con l'ausilio dell'atlante di *Paxinos e Watson* (1998) valutare la corretta posizione della fibra.

I dati ottenuti da ratti i cui probe non risultavano correttamente posizionati sono stati scartati.

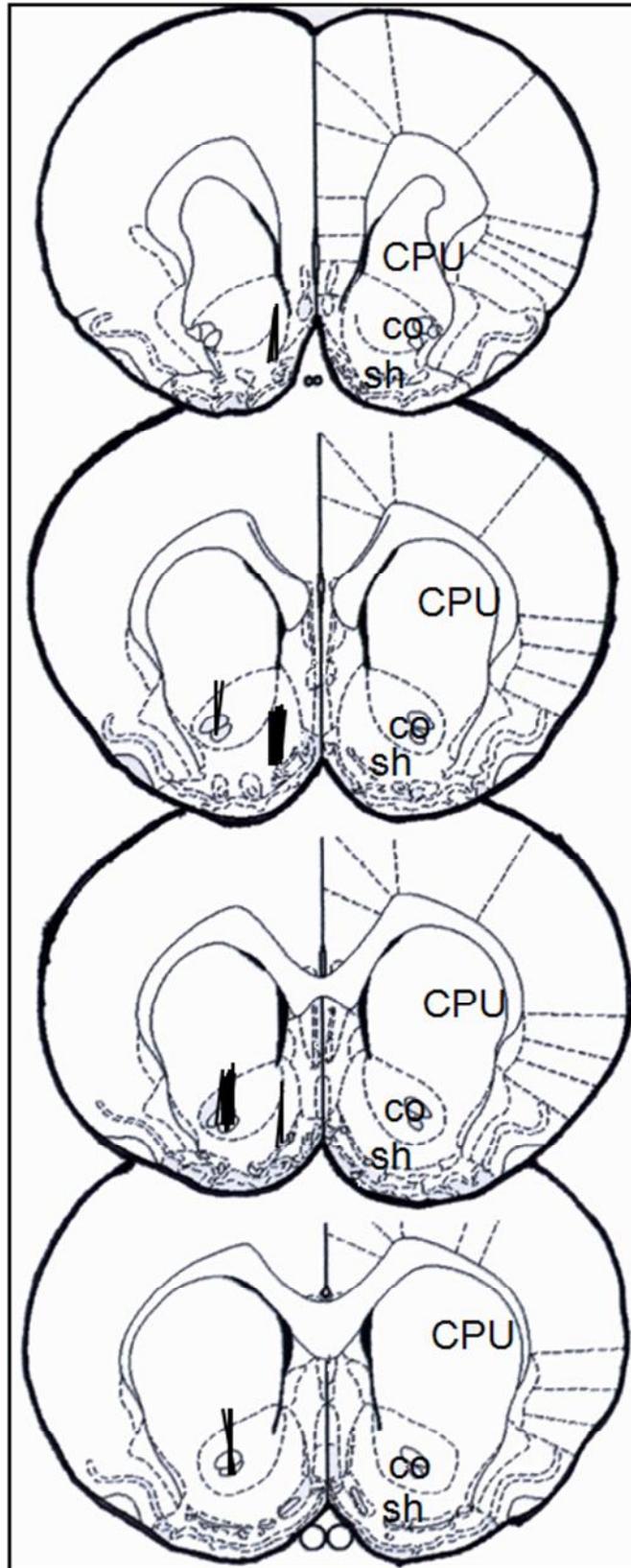


Figura 23: rappresentazione schematica, tratta dall'atlante di Paxinos e Watson, delle aree cerebrali nelle quali sono state inserite le sonde per la microdialisi.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati di microdialisi cerebrale e di auto-somministrazione è stata effettuata mediante il programma “statistica per Windows”. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) a due o tre vie a seconda degli esperimenti. I trattamenti che hanno mostrato variazioni significative sono stati sottoposti al post-hoc di Tuckey; sono state considerate significative tutte le variazioni con $p < 0.05$. Tutti i risultati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di base. È stata considerata come linea basale, espressa come 100%, la media della concentrazione di DA (espressa come numero di fentomoli/10 min) dei primi 3 campioni stabili ovvero con una variazione tra l'uno e l'altro di non più del 10%.

RISULTATI

Nose pokes attivi e inattivi eseguiti durante il training per la self-administration di una soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20% con un protocollo FR 1 in animali impiantati nella shell e nel core del NAc.

La figura mostra come, al procedere dell'allenamento, gli animali acquisiscano un comportamento operante per la auto-somministrazione di una soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20%, in quanto il numero dei nose pokes attivi aumenta progressivamente nel tempo.

L'ANOVA a tre vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore acquisizione ($F_{1,16}=133,23$; $p<0.01$), giorni ($F_{16,256}=5,74$; $p<0.01$) e una significativa interazione acquisizione/giorni ($F_{16,256}=7,52$; $p<0.01$). Il test di Tukey ha mostrato che il numero dei nose pokes attivi risulta maggiore rispetto a quello dei nose pokes inattivi e che aumenta col passare dei giorni di allenamento. Ha mostrato inoltre che non ci sono differenze tra il numero dei nose pokes attivi degli animali impiantati nella shell rispetto a quelli degli animali impiantati nel core.

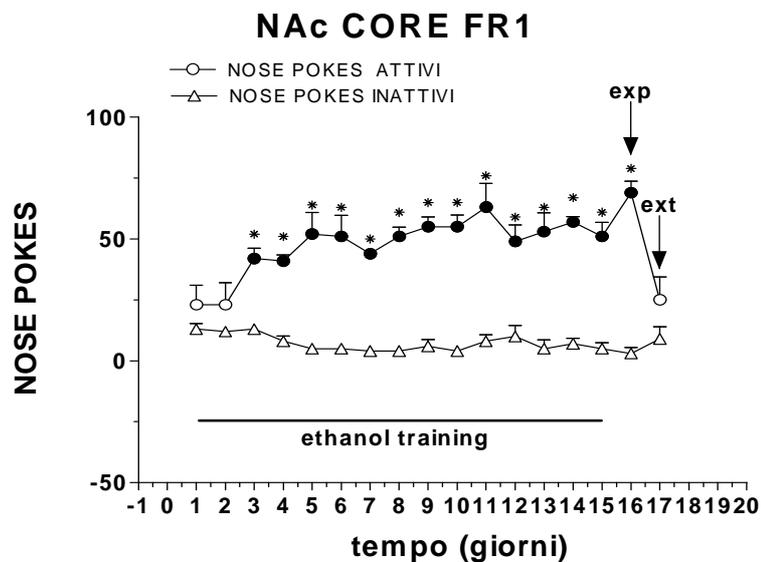
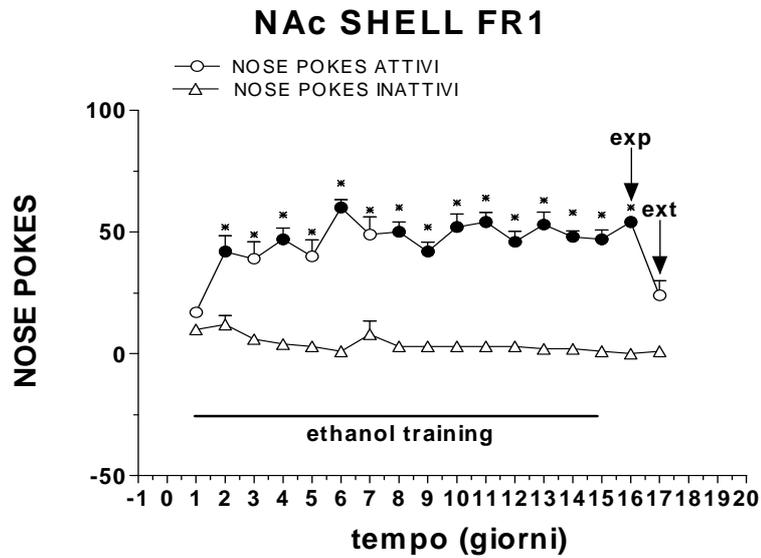


Figura 24: Risposte cumulative (nose pokes) durante le 2 settimane di training di auto-somministrazione di una soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20% con protocollo FR1 in ratti impiantati nella shell e nel core del NAc.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti.

Simboli pieni, $p < 0.05$ rispetto ai valori basali;

*, $p < 0.05$ rispetto ai nose pokes inattivi.

Nose pokes attivi e inattivi eseguiti durante il training per la self-administration di una soluzione di saccarosio al 20% con un protocollo FR 1 in animali impiantati nella shell e nel core del NAc.

La figura mostra come, al procedere dell'allenamento, gli animali acquisiscano un comportamento operante per la auto somministrazione di una soluzione di saccarosio al 20%, in quanto il numero dei nose pokes attivi aumenta progressivamente nel tempo.

L'ANOVA a tre vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore acquisizione ($F_{1,8} = 321,05$; $p < 0.01$), giorni ($F_{16,136} = 34,51$; $p < 0.01$) e una significativa interazione acquisizione/giorni ($F_{16,136} = 33,85$; $p < 0.01$). Il test di Tukey ha mostrato che il numero dei nose pokes attivi risulta maggiore rispetto a quello dei nose pokes inattivi e che aumenta col passare dei giorni di allenamento. Ha mostrato inoltre che non ci sono differenze tra il numero dei nose pokes attivi degli animali impiantati nella shell rispetto a quelli degli animali impiantati nel core.

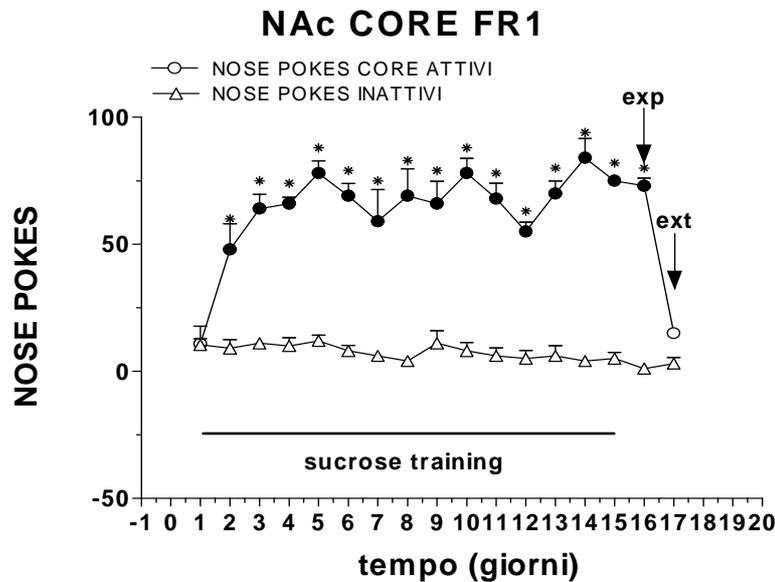
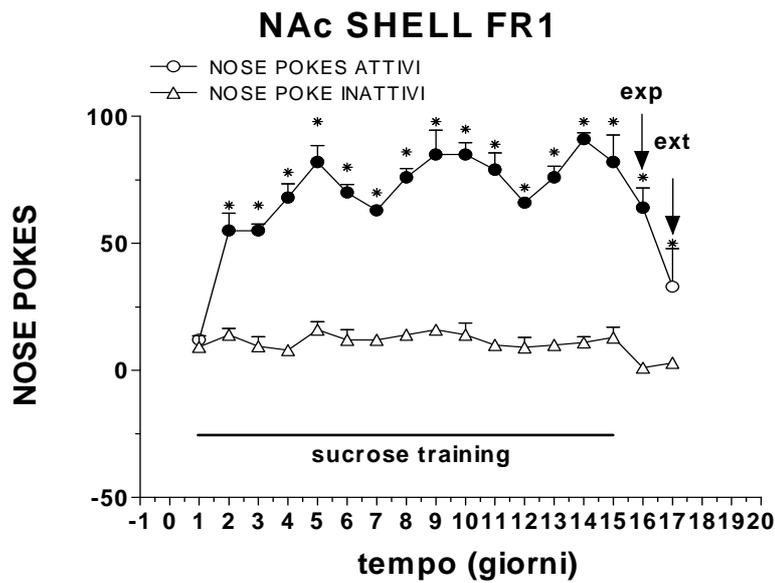


Figura 25: Risposte cumulative (nose pokes) durante le 2 settimane di training di auto-somministrazione di una soluzione di saccarosio al 20% con protocollo FR1 in ratti impiantati nella shell e nel core del NAc.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti.

Simboli pieni, $p < 0.05$ rispetto ai valori basali;

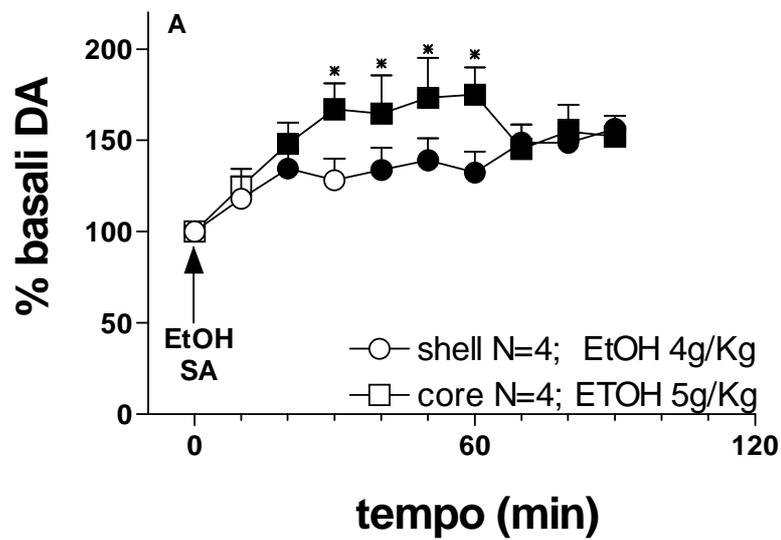
*, $p < 0.05$ rispetto ai nose pokes inattivi.

Andamento del rilascio di DA nella shell e nel core del NAc durante la self-administration di una soluzione di Etanolo al 10% in saccarosio al 20% e della soluzione di controllo di saccarosio al 20%.

Nella figura sono riportate le curve della risposta della DA nella shell e nel core del NAc durante l'auto-somministrazione di una soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20% (A) e durante l'auto-somministrazione di una soluzione di solo saccarosio al 20% (B).

L'ANOVA a tre vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore trattamento ($F_{1,10}=25.86$; $p=0.0005$), tempo ($F_{9,90}=8.97$; $p<0.01$), e una significativa interazione area/tempo ($F_{9,90}=4.32$; $p<0.01$), trattamento/tempo ($F_{9,90}=18.39$; $p<0.01$), area/trattamento/tempo ($F_{9,90}=5.52$; $p<0.01$). Il test di Tukey ha mostrato che dopo auto-somministrazione di una soluzione contenente etanolo si ottiene un incremento significativo del rilascio di DA nella shell e nel core del NAc, maggiore però in quest'ultimo. Ha mostrato anche che dopo auto-somministrazione di una soluzione zuccherina gli aumenti di DA nella shell sono inferiori rispetto a quelli ottenuti con l'etanolo e che invece nel core non si osserva alcun aumento.

auto-somministrazione etanolo 1° giorno



auto-somministrazione saccarosio 1° giorno

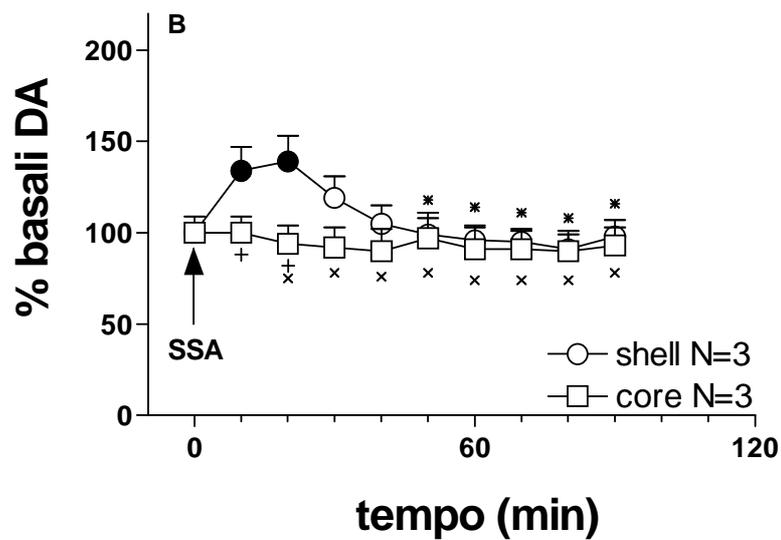


Figura 26: Andamento del rilascio di DA nella shell (cerchi) e nel core (quadrati) del NAc durante la self-administration di una soluzione di Etanolo al 10% in saccarosio al 20% (A) e di saccarosio al 20% (B).

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno tre ratti.

Simboli pieni, $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *, $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nella shell dei ratti trattati; +, $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nella shell dei ratti di controllo; x, $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nel core dei ratti trattati

Andamento della DA extracellulare nella shell e nel core del NAc durante la presentazione degli stimoli condizionati associati all'erogazione della soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20% e della soluzione di controllo di saccarosio al 20%.

La figura mostra la risposta della trasmissione DAergica nella shell e nel core del NAc durante la presentazione degli stimoli condizionati uditivo (tono) e visivo (luce) associati alla somministrazione di una soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20% (A) e alla somministrazione di una soluzione di solo saccarosio al 20% (B).

L'ANOVA a tre vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore area ($F_{1,10}=84.73$; $p=0.000003$, trattamento ($F_{1,10}=17.08$; $p=0.002$), tempo ($F_{9,90}=42.30$; $p<0.01$), e una significativa interazione area/trattamento ($F_{1,10}=12.08$; $p=0.006$), area/tempo ($F_{9,90}=16.02$; $p<0.01$), trattamento/tempo ($F_{9,90}=30.39$; $p<0.01$), area/trattamento /tempo ($F_{9,90}=11.95$; $p<0.01$). Il post hoc test ha mostrato che la presentazione delle cues associate alla auto-somministrazione di una soluzione contenente etanolo determina un incremento significativo del rilascio di DA nella shell del NAc, e solo l'aumento di un punto della curva nel core. Ha mostrato anche che dopo presentazione delle cues associate alla auto-somministrazione di una soluzione zuccherina gli aumenti di DA nella shell sono inferiori rispetto a quelli ottenuti durante la presentazione delle cues associate all'etanolo. Nel core non si osserva alcun aumento.

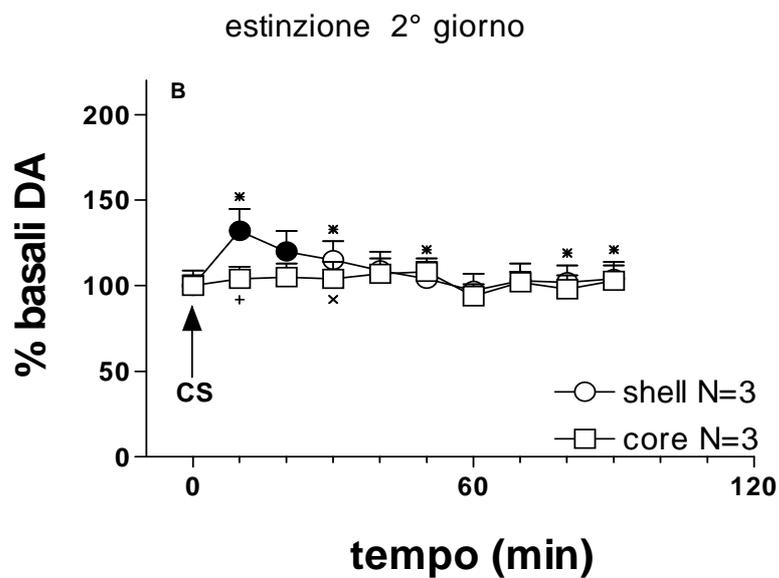
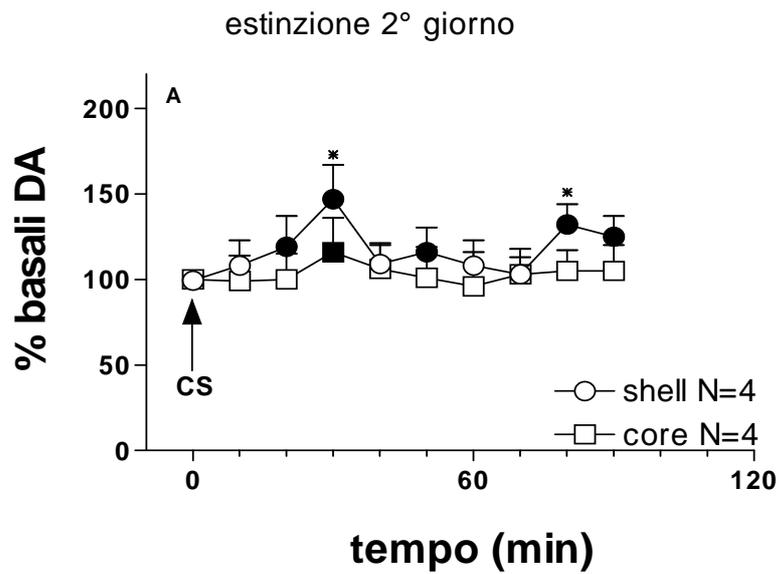


Figura 27 : Risposta della DA nella shell (cerchi) e nel core (quadrati) del NAc durante la presentazione degli stimoli condizionati associati all'erogazione di una soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20% (A) e di saccarosio al 20% (B).

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno tre ratti.

Simboli pieni, $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *, $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nella shell dei ratti trattati; +, $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nella shell dei ratti di controllo; x, $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nel core dei ratti trattati

Andamento del rilascio di DA nella shell e nel core del NAc durante l'erogazione non contingente di una soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20% e della soluzione di controllo di saccarosio al 20%.

Nella figura sono riportate le curve della risposta della DA nella shell e nel core del NAc durante la somministrazione non contingente, ossia passiva da parte dell'operatore, di una soluzione di etanolo al 10% in saccarosio al 20% (A) e di solo saccarosio al 20% (B).

L'ANOVA a tre vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore trattamento ($F_{1,10}=11.11$; $p=0.007$), tempo ($F_{9,90}=264.57$; $p<0.01$), e una significativa interazione area/tempo ($F_{9,90}=54.83$; $p<0.01$), trattamento/tempo ($F_{9,90}=131.61$; $p<0.01$), area/trattamento /tempo ($F_{9,90}=72.48$; $p<0.01$). Il post hoc test ha mostrato che il consumo di una soluzione contenente etanolo erogata in maniera non contingente determina un incremento significativo del rilascio di DA sia nella shell che nel core del NAc. Ha mostrato che anche dopo consumo di una soluzione zuccherina ottenuta passivamente si ottiene un aumento di DA nella shell superiore nella prima parte della curva, ma inferiore nella seconda, rispetto agli aumenti ottenuti durante il consumo della soluzione di etanolo. Il test di Tukey mostra ancora che nel core del gruppo di controllo (grafico B) gli aumenti sono inferiori nella seconda parte della curva rispetto agli aumenti ottenuti dopo consumo della soluzione contenente etanolo.

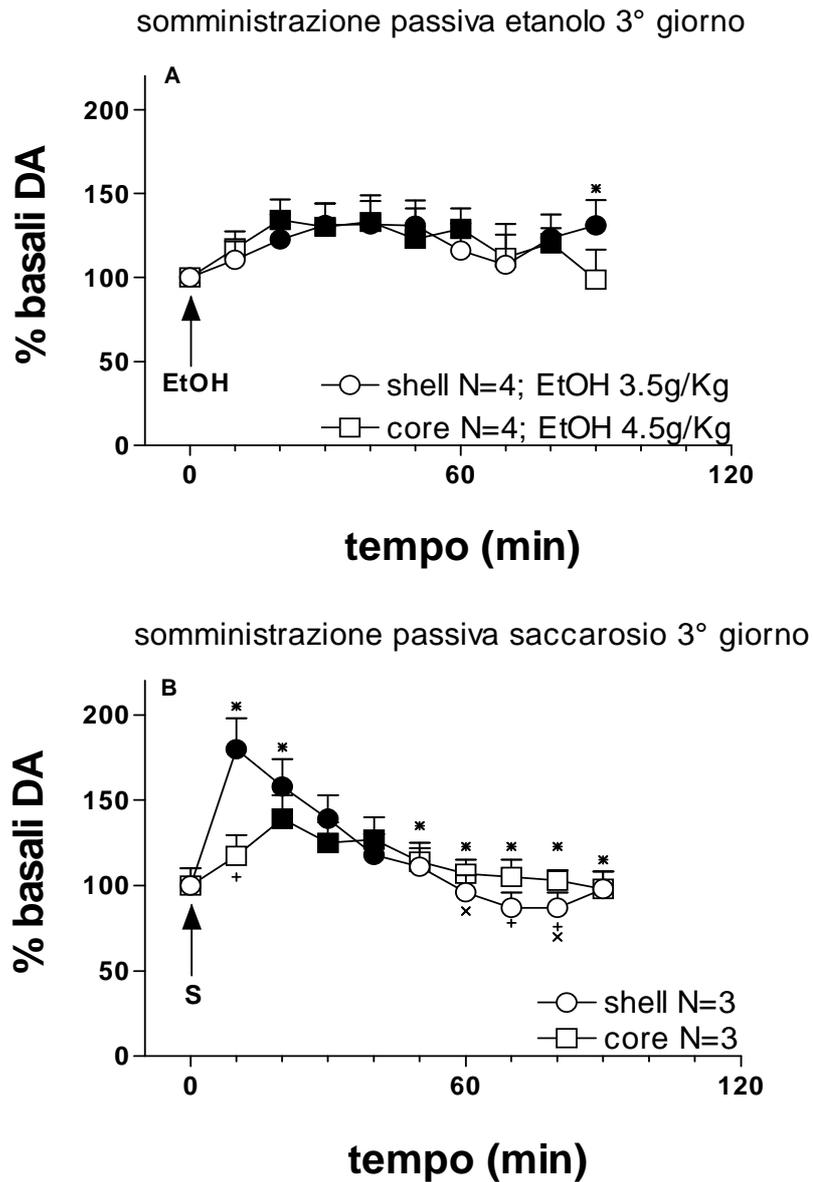


Figura 28: Risposta della DA nella shell (cerchi) e nel core (quadrati) del NAc durante l'erogazione non contingente dell'etanolo (A) e del saccarosio al 20% (B).

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno tre ratti.

Simboli pieni, $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *, $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nella shell dei ratti trattati; +, $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nella shell dei ratti di controllo; x, $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nel core dei ratti trattati

DISCUSSIONE

L'Istituto Superiore di Sanità riporta che un giovane su quattro tra i 15 e i 29 anni, in Europa, muore a causa dell'alcol, primo fattore di rischio di invalidità, mortalità prematura e malattia cronica nei giovani. Tra il 40 e il 60% di tutte le morti nella regione europea dovute a ferite intenzionali e accidentali sono attribuibili, secondo l'Oms Europa, al consumo di alcol che costa alla società, nel complesso, una quantità pari al 2-5% del Pil e rappresenta il 9% della spesa sanitaria nei Paesi europei.

Sono più di 20mila i morti ogni anno in Italia per abuso di alcol e per problemi alcol-correlati, secondo dati pubblicati dal ministero della Salute. L'alcol è la causa di quasi la metà delle morti sulla strada, in seguito a incidenti stradali, prima causa di morte per gli uomini sotto i 40 anni. Più del 14% della popolazione, infatti, dichiara consumi alcolici eccedenti questi limiti. Preoccupante, in particolare, il dato che indica un incremento nel numero di consumatori e consumatrici di bevande alcoliche fuori pasto nella fascia di età tra i 14 e i 17 anni.

L'abuso di alcol, così come delle altre droghe, ha gravi conseguenze per il singolo che ne abusa come la perdita del lavoro, il fallimento scolastico, l'impossibilità di svolgere una normale vita familiare e affettiva, ma anche per la società in cui egli vive, in quanto può indurre comportamenti violenti, abusi, abbandoni, perdite di opportunità sociali, incapacità di costruire legami affettivi e relazioni stabili, invalidità, incidenti sul lavoro e sulla strada.

Il meccanismo d'azione dell'etanolo nel Sistema Nervoso Centrale interessa diversi sistemi neurali con il coinvolgimento di numerosi neurotrasmettitori. E' ben noto che la sua somministrazione determina un incremento della trasmissione DAergica nel NAc (*Imperato e Di Chiara, 1986*) ed in particolare nella shell del NAc (*Bassareo e coll., 2003*), al pari degli altri farmaci d'abuso che possiedono meccanismi d'azione diversi (*Pontieri e coll., 1995; 1996; Tanda e coll., 1997; Aragona e coll., 2008*).

L'utilizzo cronico di un farmaco d'abuso porta all'instaurarsi della tossicodipendenza che, come ben noto, viene sostenuta dagli stimoli condizionati che fanno da

corollario all'utilizzo dei farmaci d'abuso e che sono i maggiori responsabili della ricaduta (relapse) nell'utilizzo del farmaco stesso (*Stewart e coll., 1984; Robinson e Berridge 1993; Shaham e coll., 2003; Everitt e coll., 1999; Ciccocioppo e coll., 2002; Volkow e coll., 2003*).

Durante il nostro lavoro abbiamo studiato le modificazioni della trasmissione DAergica nella shell e nel core del NAc durante un paradigma di auto-somministrazione di etanolo, adoperando come via di somministrazione quella normalmente utilizzata dall'uomo: la via orale. La metodica della self-administration è molto utile ed efficace nello studio delle proprietà dei farmaci d'abuso in quanto mima alla perfezione tutte le varie fasi del comportamento motivato che l'individuo tossicodipendente mette in atto per procurarsi la sostanza d'abuso. Abbiamo infatti una fase appetitiva durante la quale l'animale viene esposto agli stimoli condizionati all'erogazione dell'alcool e durante la quale può lavorare per ottenerla, segue una fase consumatoria in cui finalmente può ricevere la ricompensa (alcool) e consumarla.

I nostri animali sono stati quindi sottoposti ad un protocollo FR1 di auto-somministrazione di etanolo al 10% in saccarosio al 20%, utilizzato per rendere più appetibile la soluzione alcoolica, mentre gli animali del gruppo di controllo sono stati sottoposti ad un protocollo FR1 di auto-somministrazione di una soluzione di saccarosio al 20%.

Durante il protocollo di auto-somministrazione il ratto impara ad associare degli stimoli neutri, come un suono o una luce, ad un lavoro che deve compiere per ottenere la ricompensa. Alla fine dell'apprendimento strumentale l'animale esegue quindi un comportamento operante finalizzato ad ottenere la soluzione di alcol e saccarosio o il solo saccarosio.

Studiare le modificazioni della DA nelle varie fasi del comportamento operante, ossia durante la fase di auto-somministrazione, poi durante la sola presentazione degli stimoli condizionati ed infine durante la somministrazione non contingente di etanolo ci ha permesso di valutare con maggior chiarezza il ruolo del NAc nelle varie

fasi del comportamento motivato e quindi nell'apprendimento.

Durante la sessione di auto-somministrazione di etanolo utilizzando una schedula FR1, abbiamo osservato un incremento prolungato nel tempo della DA sia nella shell che nel core del NAc, significativamente maggiore però in quest'ultima area. La auto-somministrazione invece di una soluzione di saccarosio al 20%, determina un potenziamento della trasmissione DAergica solo nella shell.

Un altro importante risultato emerso dal nostro studio è che la presentazione delle cues associate alla auto-somministrazione di etanolo producono un aumento della DA sia nella shell che nel core, maggiore però nella shell, mentre quelle associate al saccarosio stimola la liberazione di DA solo nella shell.

I dati della risposta della trasmissione DAergica agli stimoli condizionati ai farmaci d'abuso con paradigma strumentale risultano in contrasto con quanto osservato nei nostri studi precedenti nei quali invece era stato utilizzato un paradigma pavloviano (*Bassareo e coll., 2007 e 2011*). Mentre nei precedenti studi era stata messa in luce l'implicazione esclusiva della sola shell nella risposta agli stimoli condizionati ai farmaci, i nuovi dati mostrano un potenziamento della trasmissione DAergica anche nel core, in accordo coi dati pubblicati in letteratura (*Ito e coll., 2000; Phillips e coll., 2003; Roitman e coll., 2004*).

Possiamo quindi concludere che la trasmissione DAergica nel NAc viene stimolata con modalità diverse a seconda del tipo di protocollo di condizionamento sperimentale utilizzato, in accordo con quanto asserito nei precedenti lavori già pubblicati dal nostro gruppo (*Bassareo e coll., 2007; 2011*).

Quando la soluzione di etanolo viene erogata dall'operatore in maniera non contingente e quindi inaspettata per l'animale, si verifica un aumento di DA prolungato nel tempo sia nella shell che nel core del NAc. Anche la somministrazione passiva di saccarosio da luogo ad un potenziamento della trasmissione DAergica in entrambe le aree ma con una time course diversa da quella dell'alcool: abbiamo un aumento rapido che termina dopo 40 min.

I maggiori aumenti ottenuti nella fase di auto-somministrazione ci fanno ipotizzare

che quando l'animale si auto-somministra la ricompensa il suo stato di eccitazione (arousal) sia maggiore. Esso infatti si trova in uno stato di aspettativa, in quella fase del comportamento motivato che viene definita anticipatoria nella quale tutti i sensi sono allertati. In questa condizione appare plausibile che il sistema DAergico risponda con un'implicazione della shell e del core in risposta agli stimoli condizionati differente rispetto a quanto accade nel condizionamento classico, in cui lo stato di arousal non è così elevato.

Dal nostro studio appare quindi importante il coinvolgimento della trasmissione DAergica nella shell e nel core del NAc nelle varie fasi del comportamento operante per la auto-somministrazione dell'etanolo.

BIBLIOGRAFIA

- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Quarta edizione (DSM IV).
- Annunziato L., Di Renzo G. (2010). *Trattato di farmacologia*. Idelson-Gnocchi, prima edizione.
- Aragon C.M., Abitbol M., Amit Z. (1986). *Acetaldehyde may mediate reinforcement and aversin produced by ethanol. An examination using a conditioned taste-aversion paradigm*. *Neuropharmacology* 25(1): 79-83.
- Aragona B.J., Cleaveland N.A., Stuber G.D., Day J.J., Carelli R.M., and Wightman R.M. (2008) *Preferential enhancement of dopamine transmission within the nucleus accumbens shell by cocaine is due to a direct increase in phasic dopamine release events*. *Neurosci.* 28(35): 8821-8831
- Babbini M., Gaiardi M. *Le proprietà di stimolo dei farmaci: la farmacologia della gratificazione e dell'avversione*. In: P. Nencini il controllo farmacologico del comportamento. 1992 Ed UTET
- Bassareo V., Di Chiara G. (1997). *Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum*. *Journal of Neuroscience* 17, 851-861.
- Bassareo V., Di Chiara G., (1999). *Modulation of feeling-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state*. *European Journal of Neuroscience* 11, 4389-4397 (b).
- Bassareo V., De Luca M.A., Di Chiara G. (2002). *Differential expression of motivational stimulus properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex*. *The Journal of Neuroscience* 11, 4709-4719.
- Bassareo V., De Luca M.A., Aresu M., Aste A., Ariu T., Di Chiara G. (2003). *Differential adaptive properties of accumbens shell dopamine responses to*

- ethanol as a drug and as a motivational stimulus*. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1465-1472
- Bassareo V., De Luca M.A., Di Chiara G. (2007). *Differential impact of pavlovian drug conditioned stimuli on in vivo dopamine transmission in the rat accumbens shell and core and in the prefrontal cortex*. *Psychopharmacology (Berl)*, 191(3): 689-703.
 - Bassareo V., Musio P., Di Chiara G. (2010). *Reciprocal responsiveness of nucleus accumbens shell and core dopamine to food- and drug conditioned stimuli*. *Psychopharmacology (Berl)*, In press.
 - Bassareo V., Musio P., Di Chiara G. (2011). *Reciprocal responsiveness of nucleus accumbens shell and core dopamine to food- and drug-conditioned stimuli*. *Psychopharmacology (Berl)*. 214(3):687-97.
 - Behar K, Rothman D, Peterson K, et al. *Preliminary evidence of reduced cortical GABA levels in localized 1H NMR spectra of alcohol dependent and hepatic encephalopathy patients*. *Am J Psychiatry* 1999; 156:952-954.
 - Berridge K.C., Robinson T.E. (1998). *What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience*. *Brain Research Reviews* 28, 309–369.
 - Carboni E., Imperato A., Perezzi L. e Di Chiara G., *Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats*, *Neuroscience* 1989; 28:653-661
 - Casarett e Doull's *Tossicologia I fondamenti dell'azione delle sostanze tossiche* 7ed.
 - Ciccocioppo R., Martin-Fardon R., Weiss F. (2002). *Effect of selective blockade of $\mu 1$ and δ opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats*. *Neuropsychopharmacology* 27(3):391–399.

- Clementi F., Fumagalli G., Nicosia, Paoletti, (2004). *Farmacologia generale e molecolare; il meccanismo d'azione dei farmaci*. UTET, terza edizione.
- Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H.: *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, 7th Edition. New York, Oxford University Press, 1996.
- Di Chiara G. (1998). *A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use*. J Psychopharmacol. 12(1):54-67.
- Di Chiara G. (1999). *Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder*. Eur J Pharmacol. 375(1-3):13-30.
- Di Chiara G. (2002). *Nucleus Accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction*. Behav Brain Res 137,75.
- Di Chiara G., Imperato A. (1988). *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats*. Proc Natl Acad Sci USA 85,5274.
- Di Chiara G., Tanda G., Frau R., Carboni E. (1993). *On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes*. Psychopharmacology (Berl). 112(2-3):398-402.
- Di Chiara G., Bassareo V., Fenu S., De Luca MA, Spina L., Cadoni C., Acquas E., Carboni E., Valentini V., Lecca D.,: *Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection*. Neuropharmacol. 47:227-241, 2004
- Di Chiara G. (2005). *Dopamine, Motivation and Reward in Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol. 21: Dopamine*. Elsevier, Amsterdam.
- Di Chiara G., *Dopamine, Motivation and Reward*, in «Handbook of Chemical Neuroanatomy», vol. 21: *Dopamine*, Elsevier, Amsterdam 2005; Id. *Il piacere: optional o necessità biologica?*, in *Saperi umani e consulenza filosofica*, a cura di V. Gessa Kurotscka e G. Cacciatore, Meltemi, Roma 2007.
- Diamond I., Nagy L., Mochly- Rosen D., and Gordon A. *The role of adenosine transport in ethanol- induced cellular tolerance and dependence. Possible*

- biologic and genetic markers of alcoholism. Ann.N.Y. Acad.Sci 1991, 625:473-487*
- Diana M., Peana A.T., Sirca D., Lintas A., Melis M., Enrico P., (2008). *Crucial role of acetaldehyde in alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. Ann N Y Acad Sci 1139:307-17.*
 - Enrico P., Sirca D., Mereu M., Peana A.T., Lintas A., Golosio A., Diana M. (2009). *Acetaldehyde sequestering prevents ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine transmission. Drug Alcohol Depend 100(3):265-71*
 - Eriksson C.J. (2001). *The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). Alcohol Clin Exp Res. 25(5 Suppl ISBRA):15S-32S.*
 - Everitt B.J., Parkinson J.A., Olmstead M.C., Arroyo M., Robledo P., Robbins T.W. (1999). *Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. Ann N Y Acad Sci. 877:412-38.*
 - Gianoulakis C., *Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse, Curr. Top. Med. Chem. 2004; 4:39–50*
 - Grant K.A., Lovinger D.M. *Cellular and behavioral neurobiology of alcohol: receptor-mediated neuronal processes. Clin Neurosci 1995; 3:155-164*
 - Goodman & Gilman (2006). *Le basi farmacologiche della terapia. McGraw-Hill, undicesima edizione.*
 - Heimer L., De Olmos J., Alheid G.F., Zaborszky L., *Perestroika in the basal forebrain: opening the border between neurology and psychiatry, in «Progress in brain research», 87, 1991, pp. 109-165.*
 - Heimer L., Zaham D.S., Churchill L., Kalivas P.W., Wohltmann C. (1991). *Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. Neuroscience 41(1): 89-125.*
 - Heimer L., Alheid G.F., De Olmos J.S., Groenewegwn H.J., Haber S.N., Harlan R.E., Zaham D.S. (1997). *The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 9(3):354-381.*
 - Herz A. *Endogenous opioid systems and alcohol addiction.*

Psychopharmacology 1997;129(2):99-111

- Konorski J. (1967) *Integrative Activity of the brain*. Chicago University of Chicago press.
- Kostowski, Bienkowski *Discriminative stimulus effects of ethanol: neuro pharmacological characterization Alcohol. 17(1): 63-80, Jan 1999*
- Imperato A., Di Chiara G. (1986). *Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol*. J Pharmacol Exp Ther 239(1): 219-28.
- Ito R., Dalley J.V., Howes S.R., Robbins T.W., Everitt B.J. (2000). *Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats*. J Neurosci 20: 7489-7495.
- Johanson C.E. *Modelli animali di farmacodipendenza: gli studi di auto-somministrazione* In: P. Nencini il controllo farmacologico del comportamento. 1992 Ed UTET
- Littleton J., *Alcohol and neurotransmitters*. Clin. Endocrinol. Metab. 7(2):369-84, jul 1978
- Lheureux P., Askenasi R. Efficacy of flumazenil in acute alcohol intoxication: double-blind placebo -controlled evaluation. Hum Exp Toxicol 1991; 10:235-239
- Melis M., Enrico P., Peana A.T., Diana M. (2007). *Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine systems*. Eur J Neurosci 26(10):2824-33.
- Nutt (1999) *Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists*. British Journal of Psychiatry, 175,114-119
- Olds J, Milner P. *Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain*. J. Comp. Physiol. Psychol, 47: 419-426,1954
- Paxinos G., Watson C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed.

Academic, New York.

- Phillips A.G., Ahn S., Howland J.G. (2003). *Amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior.* *Neurosci Biobehav Rev.* Oct;27(6):543-54. Review.
- Pontieri F.E., Tanda G., Di Chiara G. (1995). *Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens.* *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 12304.
- Pontieri F.E., Tanda G., Orzi F., Di Chiara G. (1996). *Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs.* *Nature*, 382, 255-257.
- Potokar J., Coupland N., Glue P., et al., *Flumazenil in alcohol withdrawal: a double-blind placebo -controlled study.* *Alcohol Alcohol* 1997; 32: 605-611
- Quettermont E., De Witte P., *Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections.* *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 68(3): 449-54
- Quettermont E., Grant K.A., Correa M., Arizzi M.N., Salamone J.D., Tambour S., Aragon C.M., McBride W.J., Rodd Z.A., Goldstein A., Zaffaroni A., Li T.K., Pisano M., Diana M. (2005). *The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol.* *Alcohol Clin Exp Res* 29(2):221-34.
- Robinson T.E., Berridge K.C. (1993). *The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction.* *Brain Res Brain Res Rev.* 18(3):247-291.
- Roitman M.F., Stuber G.D., Phillips P.E.M., Wightman R.M. and Carelli R.M. (2004) *Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking.* *J Neurosci.* 24(6):1265-1271
- Smith B.R., Amit Z. and Splawinsky J., *Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde,* *Alcohol* 1984; 193–195.
- Smith B.R., Aragon C.M.G., Amit Z. (1997). *Catalase and the production of brain acetaldehyde: a possible mediator of the psychological effects of ethanol.*

Addict Biol 2:277-289.

- Stewart J., de Wit H., Eikelboom R. (1984). *Role of unconditioned and conditioned drug affects in the self-administration of opiates and stimulants.* Psychol Rev 91:251–268.
- Tabakoff, Hoffman. *Alcohol tolerance and dependence.* Amsterdam: Rigter H, Crabbe J eds., Elsevier, 1980, pp. 112
- Tanda G., Bassareo V., Di Chiara G. (1996). *Mianserin markedly and selectively increases extracellular dopamine in the prefrontal cortex as compared to the nucleus accumbens of the rat.* Psychopharmacology (Berl).
- Tanda G., Pontieri F.E., Frau R., Di Chiara G. (1997). *Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamina trasmission by a common $\mu 1$ opioid receptor mechanism.* Science, 276, 2048-2050123:127-130.
- Volkow N.D., Wang G.J., Ma Y., Fowler J.S., Zhu W., Maynard L., Telang F., Vaska P., Ding Y.S., Wong C., Swanson J.M. (2003). *Expectation enhances the regional brain metabolic and reinforcing effects of stimulants in cocaine abusers.* J Neurosci 23(36):11461–11468.
- Wise R. *The anhedonia hypothesis: mark III.* Behav Brain Science 1985;8:178-86.
- Woodworth RS (1981). *Dynamic psychology.* New York : Columbia University press.