

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE E DIPARTIMENTO DI
BIOLOGIA SPERIMENTALE

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche

Corso di Dottorato in Neuroscienze

XX° CICLO 2004-2007

Studio dell'effetto dell'attivazione del recettore GABA_B sul consumo di alcol e sulle proprietà motivazionali dell'alcol nel ratto

Dottorando:
Dr.ssa Paola Maccioni

Tutor:
Prof. Walter Fratta

Coordinatore del Dottorato:
Prof. Walter Fratta

Direttore della scuola:
Prof. Giovanni Biggio

Area 05 - Scienze Biologiche - SSD BIO/14 Farmacologia

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 5 |
| 1.1. Neurotrasmissione GABA – recettori GABA_B e loro struttura | 5 |
| 1.2. Ligandi del recettore GABA_B | 6 |
| 1.2.1. <i>Agonisti diretti</i> | 6 |
| 1.2.2. <i>Modulatori allosterici positivi</i> | 7 |
| 1.3. Recettore GABA_B e tossicodipendenze | 8 |
| 1.4. Recettore GABA_B e alcolismo (preclinica e clinica) | 9 |
| 1.5. Ratti <i>Sardinian alcohol-preferring</i> come modello di eccessivo consumo di alcol | 10 |
| 1.6. Obiettivi | 14 |
| 1.6.1. <i>Prosecuzione degli studi preclinici sul baclofen</i> | 14 |
| a) Auto-somministrazione orale di alcol (proprietà di rinforzo) | 14 |
| b) <i>Breakpoint</i> per l'alcol (proprietà motivazionali) | 15 |
| c) <i>Reinstatement</i> per l'alcol (alcohol-seeking o relapse-like behavior) | 18 |
| 1.6.2. <i>Caratterizzazione degli effetti anti-alcol di GS39783</i> | 20 |
| 2. MATERIALI E METODI | 21 |
| 2.1. <u>Esperimento 1</u>: Effetto del baclofen sull'auto-somministrazione di alcol | 22 |
| 2.2. <u>Esperimento 2</u>: Effetto del baclofen sul <i>breakpoint</i> per l'alcol | 24 |
| 2.3. <u>Esperimento 3</u>: Effetto del baclofen sul <i>extinction/reinstatement</i> per l'alcol | 27 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.4. | <u>Esperimento 4</u>: Effetto del GS39783 sul consumo di alcol misurato con la procedura della libera scelta tra due bottiglie | 30 |
| 2.5. | <u>Esperimento 5</u>: Effetto del GS39783 sull'auto-somministrazione di alcol | 32 |
| 2.6. | <u>Esperimento 6</u>: Effetto del GS39783 sul <i>breakpoint</i> per l'alcol | 33 |
| 3. | <i>RISULTATI</i> | 34 |
| 3.1. | <u>Esperimento 1</u>: Effetto del baclofen sull'auto-somministrazione di alcol | 34 |
| 3.2. | <u>Esperimento 2</u>: Effetto baclofen sul <i>breakpoint</i> per l'alcol | 38 |
| 3.3. | <u>Esperimento 3</u>: Effetto del baclofen sul <i>extinction/reinstatement</i> per l'alcol | 40 |
| 3.4. | <u>Esperimento 4</u>: Effetto del GS39783 sul consumo di alcol misurato con la procedura della libera scelta tra due bottiglie | 44 |
| 3.5. | <u>Esperimento 5</u>: Effetto del GS39783 sull'auto-somministrazione di alcol | 47 |
| 3.6. | <u>Esperimento 6</u>: Effetto del GS39783 sul <i>breakpoint</i> per l'alcol | 51 |
| 4. | <i>DISCUSSIONE</i> | 53 |
| | <u>Esperimento 1</u>: Effetto del baclofen sull'auto-somministrazione di alcol | 53 |
| | <u>Esperimento 2</u>: Effetto baclofen sul <i>breakpoint</i> per l'alcol | 55 |
| | <u>Esperimento 3</u>: Effetto del baclofen sul <i>extinction/reinstatement</i> per l'alcol | 56 |
| | <u>Esperimento 4</u>: Effetto del GS39783 sul consumo di alcol misurato con la procedura | 58 |

| | |
|---|-----------|
| della libera scelta tra due bottiglie | |
| <u>Esperimenti 5 e 6: Effetto del GS39783 sull'auto-somministrazione e sul <i>breakpoint</i> per l'alcol</u> | 59 |
| <u>Meccanismo d'azione</u> | 63 |
| <u>Note conclusive</u> | 64 |
| 5. BIBLIOGRAFIA | 66 |

1. INTRODUZIONE

1.1. Neurotrasmissione GABA – recettori GABA_B e loro struttura

L'acido γ -amminobutirrico (GABA) è il maggiore neurotrasmettitore a funzione inibitoria nel sistema nervoso centrale. Il GABA attiva due diversi tipi di recettori ionotropici: GABA_A e GABA_C, ed un tipo di recettori metabotropici: recettori GABA_B. I recettori GABA_B appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alla proteina G; come gli altri membri di questa famiglia, i recettori GABA_B hanno una struttura molecolare caratterizzata da 7 domini transmembrana ed un grande dominio N-terminale localizzato nella parte extracellulare e che serve al legame con il neurotrasmettitore. Recenti studi hanno dimostrato che il recettore GABA_B è un eterodimero composto da due subunità chiamate GABA_{B1} e GABA_{B2}.

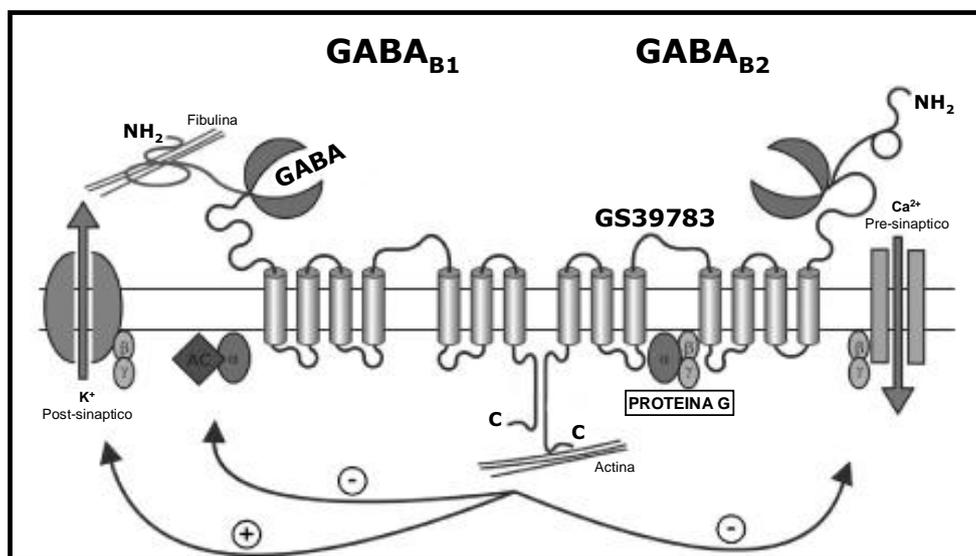


Fig. 1.1. Struttura eterodimerica del recettore GABA_B. Sono visibili le due subunità (GABA_{B1} e GABA_{B2}) ciascuna con i propri 7 domini transmembrana, accoppiate per via delle rispettive parti intracellulari C-terminali. Il dominio di legame per il GABA è localizzato nel dominio extracellulare della subunità GABA_{B1}. Il dominio *heptahelical* della subunità GABA_{B2} contiene un sito di modulazione allosterica positiva così come il sito dell'accoppiamento alla proteina G. Il recettore è accoppiato indirettamente con i canali per il K⁺ e il Ca²⁺, il primo dei quali predomina a livello post-sinaptico mentre il secondo a livello presinaptico (modificata da Emerson, 2007)

Studi di *binding* recettoriale hanno dimostrato che il sito di legame del neurotrasmettitore è localizzato nella subunità GABA_{B1}; per il normale funzionamento del recettore, è comunque richiesta la coespressione di entrambe le subunità (Pin e coll., 2004).

I recettori GABA_B esplicano la loro funzione favorendo dapprima il legame del guanosin-trifosfato (GTP) alla proteina G; tale legame comporta l'attivazione della proteina G che, a sua volta, può regolare l'attività di effettori specifici. Tra gli effettori sono compresi enzimi come l'adenil-ciclastasi e le fosfolipasi A₂, C e D, canali come quelli per calcio, potassio e sodio e alcune proteine di trasporto. L'attivazione del recettore GABA_B decresce l'attività dell'adenil-ciclastasi, incrementando la conduttanza di potassio, riducendo la conduttanza del calcio (Fig. 1.1.) e promuovendo l'iperpolarizzazione neuronale (Duttar e Nicoll, 1988; Nicoll, 2004). I recettori GABA_B quindi, inibendo l'eccitazione neuronale, impediscono l'attività della proteina chinasi C e il conseguente rilascio di neurotrasmettitori (Bowery e Enna, 2000).

1.2. Ligandi del recettore GABA_B

1.2.1. Agonisti diretti

L'agonista prototipo del recettore GABA_B, baclofen (β -[clorophenil]GABA; Lioresal[®]), sebbene sia stato sintetizzato nel 1962 e introdotto nella pratica clinica circa 30 anni fa, rimane ancora oggi uno dei più potenti e selettivi ligandi per la stimolazione del recettore GABA_B. Per molte decadi i soli agonisti del recettore GABA_B conosciuti erano lo stesso GABA e il baclofen. Il baclofen viene sintetizzato come un analogo del GABA, avente un anello lipofilico paraclorofenilico (Faigle e Keberle, 1972), che ne facilita l'attraversamento della barriera emato-encefalica.

In clinica il baclofen viene ampiamente usato nel trattamento della spasticità e della rigidità muscolare in pazienti con compromissione della corda spinale, nella sclerosi multipla, nella sclerosi amiotrofica laterale e nella paralisi cerebrale (Bowery e coll., 1993; Misgeld e coll., 1995). Alcune evidenze cliniche suggeriscono inoltre che il baclofen possiede effetti ansiolitici (Millan, 2003) ed antidepressivi (Brambilla e coll., 2003; Krystal e coll., 2002).

Nel corso degli anni, sono stati sintetizzati numerosi agonisti del recettore GABA_B, alcuni dei quali efficaci anche in vivo;

quelli maggiormente utilizzati nella pratica sperimentale sono il CGP27492 ed il CGP44532 (Bowery e coll., 2002; Froestl e coll., 2003).

1.2.2. Modulatori allosterici positivi

Recentemente è stata identificata una classe di molecole con funzione di modulatori allosterici positivi sul recettore GABA_B.

I risultati di recenti studi hanno permesso infatti di identificare l'esistenza di un sito di modulazione allosterica positiva nella struttura molecolare del recettore GABA_B e di stabilire come alcuni ligandi di questo sito si comportino come modulatori allosterici positivi, ovvero facilitano il legame tra il neurotrasmettitore GABA (o gli agonisti diretti) con il proprio sito di legame. I modulatori allosterici positivi non alterano la funzione del recettore in assenza di GABA (o di agonisti diretti) (Mombereau e coll., 2004). Specificatamente, la somministrazione farmacologica dei modulatori allosterici positivi del recettore GABA_B in presenza di un agonista diretto sposta la curva concentrazione-risposta verso sinistra, ovvero incrementa la potenza dell'agonista. La modulazione allosterica positiva dei recettori metabotropici è un fenomeno di recente identificazione, e offre un nuovo strumento nella manipolazione farmacologica dei recettori accoppiati alla proteina G, agendo in un sito topograficamente distinto dalla regione di legame ortosterica della proteina recettore; il sito di legame dei modulatori allosterici positivi, infatti, è stato recentemente localizzato nella regione transmembranale dalla subunità GABA_{B2} (Binet e coll., 2004).

I modulatori allosterici positivi presentano, almeno teoricamente, una serie di vantaggi rispetto agli agonisti diretti, in quanto la loro azione si esplica in maniera "fisiologica" ovvero attraverso il potenziamento dell'effetto del GABA presente nella sinapsi e non in maniera diretta sul recettore; in accordo con tale ipotesi, è stato osservato che alcuni modulatori allosterici positivi efficaci in vivo (vedi dopo) possiedono un indice terapeutico più alto, rispetto agli agonisti diretti, nel roditore di laboratorio (Cryan e coll., 2004).

Modulatori allosterici positivi di recente sintesi ed efficaci in vivo sono: 2,6-Di-*tert*-butil-4-(3-idrossi-2,2-dimetil-propil)-fenolo (CGP7930) e il N,N'-dicitlopentil-2-metilsulfanil-5-nitro-pirimidin-4,6-diammina (GS39783). È stato riportato che questi composti inducono effetti comportamentali simili a quelli osservati con gli agonisti diretti, inclusi gli effetti

sull'auto-somministrazione di alcune sostanze d'abuso, quali la cocaina e la nicotina (Smith e coll., 2004; Filip e coll., 2007). Il CGP7930 e il GS39783 incrementano sia la potenza che la massima efficacia del GABA a livello del recettore GABA_B.

1.3. Recettore GABA_B e tossicodipendenze

Secondo l'*American Psychiatric Association*, la dipendenza da sostanze viene definita come la ricaduta cronica al disturbo; le sue principali caratteristiche sono: (a) comportamento compulsivo nella ricerca e nel consumo della sostanza, (b) perdita del controllo sul consumo, (c) comparsa di uno stato emozionale negativo (es. disforia, ansia, irritabilità) prima della disponibilità della sostanza.

Nel corso degli anni, sono stati sviluppati e validati numerosi modelli sperimentali di tossicodipendenza; tali modelli sono fondati sull'osservazione che anche gli animali di laboratorio assumono le stesse sostanze di cui abusa l'uomo. Questi modelli sperimentali hanno notevolmente contribuito alla comprensione dei meccanismi neurobiologici alla base dello sviluppo delle tossicodipendenze.

Le sostanze d'abuso hanno la potente proprietà di fungere da rinforzi positivi, ovvero stimolare la ripetizione del comportamento che precedentemente ha portato all'assunzione della sostanza; tale straordinaria proprietà è stata sfruttata nelle pratiche sperimentali per indurre gli animali di laboratorio a compiere uno specifico "lavoro" (o una specifica – e talvolta anche complessa – procedura) al fine di ottenere la sostanza, anche in animali da essa non dipendenti.

Differenti studi preclinici e alcuni studi clinici preliminari hanno valutato il potenziale degli agonisti del recettore GABA_B nella farmacoterapia dell'abuso e della dipendenza da sostanze. Il primo dato appare nel brevetto sul baclofen depositato da Ciba-Geigy (ora chiamata Novartis) nel 1978; tale documento descrive la capacità del baclofen di attenuare la crisi di astinenza naloxone-indotta in scimmie rese dipendenti da morfina, e di ridurre l'auto-somministrazione di morfina nel ratto. Numerosi altri studi preclinici confermano che il baclofen, così come altri agonisti del recettore GABA_B, possa promuovere l'astinenza di diverse sostanze d'abuso.

È noto infatti come il baclofen, ad esempio, sia in grado di ridurre (a) l'acquisizione, il mantenimento ed il *reinstatement* dell'auto-somministrazione endovenosa di cocaina nel ratto (Brebner e coll., 1999; 2000a; 2000b;

2002; Campbell e coll., 1999; 2002; Roberts e coll., 1996; 1997; Shoaib e coll., 1998); (b) l'acquisizione ed il mantenimento dell'auto-somministrazione endovenosa di eroina nel ratto (Xi e Stein, 1999; Brebner e coll., 2002); (c) lo sviluppo di "conditioned place preference" (ovvero la preferenza per uno specifico ambiente dovuta alla precedente associazione tra gli stimoli esteroceettivi di quello specifico ambiente e gli stimoli interoceettivi della sostanza in esame) per la morfina nel ratto (Tsuji e coll., 1996); (d) la stimolazione motoria (ovvero il correlato animale dell'euforia) indotta da cocaina, amfetamina e morfina nel ratto (Kalivas e coll., 1990; Phillis e coll., 2001; Woo e coll., 2001; Leite-Morris e coll., 2002; Bartoletti e coll., 2004); (e) l'auto-somministrazione endovenosa di amfetamina e metamfetamina nel ratto (Ranaldi e Poeggel, 2002; Brebner e coll., 2005); (f) l'auto-somministrazione endovenosa di nicotina nel ratto e nel topo (Corrigall e coll., 2000; 2001; Fattore e coll., 2002) (g) l'auto-somministrazione endovenosa di acido gamma-idrossibutirrico (GHB) nel topo (Fattore e coll., 2001).

Considerati insieme, i risultati di questi studi suggeriscono che la stimolazione diretta o indiretta dei recettori GABA_B ha la capacità di sopprimere il consumo di sostanze d'abuso quali cocaina, nicotina, eroina e alcol. Anche se molte questioni rimangono ancora poco chiare, i substrati neuronali attraverso i quali le sostanze d'abuso producono i propri effetti di rinforzo positivo sono gli stessi di quelli utilizzati dai rinforzi naturali (cibo, acqua, sesso, contatto materno). Esaminare come gli agonisti del recettore GABA_B influenzino i comportamenti motivati contribuirebbe a svelare il meccanismo d'azione delle sostanze d'abuso.

1.4. Recettore GABA_B e alcolismo (preclinica e clinica)

Numerosi e recenti risultati sperimentali e dati clinici preliminari suggeriscono che il recettore GABA_B può essere considerato un importante substrato neuronale che controlla i comportamenti di assunzione di alcol, le proprietà motivazionali dell'alcol (in ratti) e il desiderio per l'alcol, o *craving* (nell'uomo); inoltre si ritiene che il recettore GABA_B sia parte del substrato neuronale alla base della sintomatologia della crisi di astinenza da alcol. In maniera specifica, dati preclinici evidenziano come gli agonisti del recettore GABA_B, baclofen e CGP44532, sopprimano l'acquisizione (Colombo e coll., 2002) e il mantenimento (Colombo e coll., 2000; Daoust e coll., 1987; Perfumi e

coll., 2002; Petry, 1997) del comportamento consumatorio di alcol nei ratti, così come l'aumento del consumo di alcol che si manifesta nei ratti dopo un periodo di astinenza dall'alcol (Carai e coll., 2005; Colombo e coll., 2006b). È stato anche riportato che sia il baclofen che altri agonisti del recettore GABA_B come SKF 97541 riducono l'auto-somministrazione orale di alcol in ratti e topi esposti a differenti procedure di condizionamento operante (Anstrom e coll., 2003; Besheer e coll., 2004; Janak e coll., 2003; Liang e coll., 2006; Maccioni e coll., 2005; Walter e coll., 2007). Il baclofen sopprime anche le proprietà appetitive e motivazionali dell'alcol misurate nei ratti con la procedura dell'*extinction responding* (Colombo e coll., 2003).

Più recentemente sono stati condotti diversi studi sulle proprietà "anti-alcol" dei modulatori allosterici positivi del recettore GABA_B, tra cui il CGP7930 e il GS39783. È stato riportato come queste molecole sopprimano in maniera dose-dipendente l'acquisizione e il mantenimento del comportamento consumatorio di alcol e l'auto-somministrazione di alcol nei ratti (Orrù e coll., 2005; Liang e coll., 2006; Maccioni e coll., 2007), confermando il contributo del recettore GABA_B in fenomeni quali la scoperta e l'acquisizione di quegli effetti psicofarmacologici dell'alcol che inducono e che sostengono il comportamento consumatorio di alcol nel ratto.

Studi clinici preliminari sembrano estendere all'alcolista gli effetti del baclofen, poiché è stato osservato come il baclofen riduca il numero giornaliero di *drink* alcolici, promuova l'astinenza dall'alcol e riduca il desiderio irrefrenabile a consumare l'alcol in soggetti alcol-dipendenti (Addolorato e coll., 2002; Flannery e coll., 2004; Ameisen, 2005; Agabio e coll., 2007; Bucknam, 2007).

1.5. Ratti *Sardinian alcohol-preferring* come modello di eccessivo consumo di alcol

La linea di ratti *Sardinian alcohol-preferring* (sP), accoppiata alla linea di ratti *Sardinian alcohol-non preferring* (sNP), rappresenta una delle poche coppie di linee di ratti al mondo selezionate per differente preferenza e consumo di alcol. I ratti sP sono stati selezionati al fine di riprodurre alcuni aspetti fondamentali dell'alcolismo, inclusi l'elevato consumo di alcol, la ricaduta in seguito ad un periodo di astinenza dall'alcol e la forte motivazione al consumo di alcol; il modello che ne è derivato è di grande utilità per: 1) lo studio delle basi neurobiologiche dell'alcolismo; 2) lo *screening* di nuovi potenziali rimedi farmacologici.

Per la selezione della linea sP e sNP è stato utilizzato un programma selettivo bidirezionale (*selective breeding program*) che ha preso inizio nel 1981. La selezione è partita da una popolazione di ratti di ceppo *Wistar*. I ratti venivano esposti ad un regime di libera scelta tra due bottiglie (Fig. 1.5.), una contenente la soluzione alcolica al 10% (vol/vol; alcol puro in acqua) l'altra acqua, senza alcuna precedente esposizione alla soluzione alcolica.

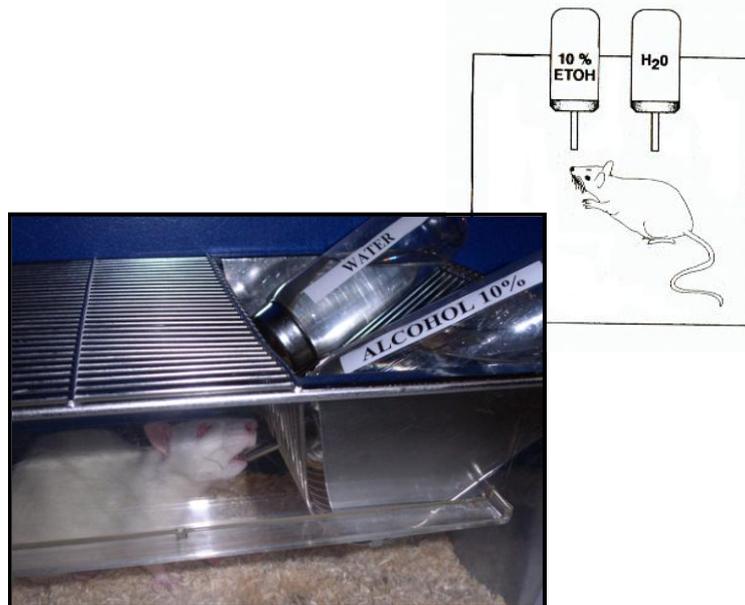


Fig. 1.5. Ratto della linea sP, esposto alla procedura della libera scelta tra due bottiglie contenenti, rispettivamente, alcol 10% vol/vol e acqua.

I consumi di alcol e acqua venivano registrati giornalmente e i soggetti che mostravano i valori più estremi nella preferenza e nel consumo di alcol venivano selezionati e fatti accoppiare. Specificamente i ratti che mostravano elevati consumi di alcol venivano fatti accoppiare per produrre la linea sP, viceversa quelli che mostravano bassi consumi di alcol venivano fatti accoppiare per produrre la linea di ratti sNP.

Ad ogni generazione figliare tutti i ratti appartenenti a ciascuna linea dovevano soddisfare il criterio di selezione imposto dal programma. Il criterio di selezione prevedeva nei ratti sP: (a) un consumo giornaliero di alcol uguale o superiore a 4 grammi di alcol puro per chilogrammo di peso corporeo; (b) la preferenza, definita come il rapporto tra i volumi consumati di soluzione alcolica e acqua, uguale o superiore a 2:1. Il criterio di selezione prevedeva nei ratti sNP: (a) il consumo giornaliero di alcol uguale o inferiore a 1 grammo di alcol puro per chilogrammo di peso corporeo; (b)

la preferenza uguale o inferiore a 0.2:1. Il processo di selezione è stato considerato concluso intorno alla quarantesima generazione, quando il 100% dei ratti soddisfecero il criterio di selezione imposto.

Quando esposti ad un regime di libera scelta tra una soluzione alcolica (10% vol/vol) e acqua con illimitato accesso per 24 ore al giorno, i ratti sP consumano grandi quantità di alcol raggiungendo in pochi giorni 6-7 g/kg/giorno, consumo che viene mantenuto stabilmente nel tempo (Serra e coll., 2003). Questo consumo giornaliero di alcol corrisponde nell'uomo a 8-14 *drink* alcolici standard (dove per *drink* alcolico si intende una bevanda contenente 12 g di alcol puro, ad esempio come un boccale di birra da 370 ml, un bicchiere di vino da 150 ml, o 40 ml di un superalcolico). Nei ratti sP la preferenza verso la soluzione alcolica sale in pochi giorni al 90-95% e rimane stabile nel tempo. In accordo con le abitudini di maggiore attività notturna dei ratti, i ratti sP consumano più dell'80% della quantità giornaliera di alcol durante le 12 ore della fase di buio del loro ciclo luce-buio. Di particolare interesse, questi animali tendono a frazionare nel tempo le fasi di consumo dell'alcol in tre-quattro episodi, con pause di 2-3 ore, distribuiti nella fase di buio (Agabio e coll., 1996); il primo episodio si registra immediatamente dopo l'inizio della fase di buio, con un consumo di circa 1.5 g/kg nella prima ora e alcolemia di circa 100 mg%. L'osservazione della distribuzione temporale del consumo giornaliero di alcol nei ratti sP risulta essere in accordo con le caratteristiche farmacocinetiche dell'alcol: in ciascun episodio di 30-60 minuti questi animali consumano quantità d'alcol sufficienti per percepirne specifici effetti psicofarmacologici.

Diversi studi hanno suggerito che i ratti sP possiedono un meccanismo centrale di regolazione del consumo di alcol, il quale promuove e limita il loro comportamento consumatorio. Il consumo di alcol viene inizialmente promosso fino a che specifici effetti dell'alcol sono percepiti; e inoltre il consumo viene poi limitato probabilmente per evitare gli effetti avversi che potrebbero essere avvertiti in seguito all'ingestione di elevate quantità di alcol.

Il fenomeno della ricaduta dopo un periodo di astinenza e la perdita di controllo nei confronti dell'alcol sono tra le maggiori caratteristiche dell'abuso di alcol e dell'alcolismo (O'Brein, 1997). Infatti l'alcolista può alternare periodi di controllato consumo di alcol (con consumi relativamente bassi di alcol o astinenza completa) con periodi di intensa assunzione di alcol e perdita di controllo (Schuckit, 1995). Il modello animale usato per gli studi sperimentali della ricaduta è l'*alcohol deprivation effect*, definito come il

temporaneo incremento nel consumo volontario di alcol che si verifica dopo un periodo di astinenza dall'alcol (Spanagel, 2005). Nei ratti sP, numerosi esperimenti indicano che l'*alcohol deprivation effect* si manifesta con consumi di alcol circa doppi nella prima ora di riesposizione alla soluzione alcolica dopo un periodo di deprivazione.

Il comportamento consumatorio di alcol nei ratti sP sottoposti a studi dove venivano usate procedure operanti di auto-somministrazione (Vacca e coll., 2002) hanno inoltre permesso di fornire importanti informazioni relative alle proprietà di rinforzo positivo dell'alcol in questi ratti.

Il consumo di alcol nei ratti sP produce inoltre alcuni specifici effetti comportamentali. Il consumo volontario di alcol in questi ratti induce infatti chiari effetti psicofarmacologici, quali l'effetto ansiolitico (Colombo e coll., 1995) e la stimolazione dell'attività locomotoria (Colombo e coll., 1998). Utilizzando validati modelli sperimentali, è stato osservato come i ratti "*alcohol-naive*" (ossia ratti mai esposti alla soluzione alcolica prima dell'esperimento) della linea sP siano "ansiosi" quando paragonati ai ratti della linea sNP. Gli stessi test condotti su ratti "*alcohol-experienced*" (ratti che hanno avuto libero accesso alla soluzione alcolica al 10%, per almeno 14 giorni) hanno evidenziato l'effetto ansiolitico dell'alcol assunto volontariamente dai ratti sP. Questo risultato suggerisce l'esistenza di un meccanismo di auto-medicazione dell'innata ansia mediante il consumo volontario di alcol.

Inoltre evidenze sperimentali hanno permesso di caratterizzare l'effetto euforizzante dell'alcol anche nei ratti sP. Specificatamente, ad un gruppo di ratti sP è stato consentito di assumere alcol volontariamente in brevi sessioni giornaliere, dopo le quali i ratti manifestavano un marcato incremento dell'attività locomotoria spontanea rispetto a un gruppo di ratti della stessa linea esposti alla sola acqua. La stimolazione dell'attività locomotoria nel ratto è considerata essere l'omologo dell'euforia – indotta dalle sostanze d'abuso – nell'uomo, in quanto entrambi gli effetti sono mediati dallo stesso sistema neuronale (Wise e Bozarth, 1987).

1.6. Obiettivi

1.6.1. Prosecuzione degli studi preclinici sul baclofen

a) Auto-somministrazione orale di alcol (proprietà di rinforzo)

Utilizzando la procedura della libera scelta tra due bottiglie, al ratto non è richiesto di compiere alcun "lavoro" o sforzo per avere accesso all'alcol, poiché deve soltanto leccare la soluzione alcolica dalla bottiglia offerta; in studi farmacologici questa procedura permette di ottenere solo dei dati relativi all'effetto del farmaco in esame sugli aspetti consumatori e non fornisce informazioni su altri aspetti del comportamento ingestivo di alcol nei ratti. Viceversa, le procedure operanti, dove il ratto deve compiere uno specifico "lavoro", così come premere una leva per avere accesso all'alcol e poterlo consumare (Fig. 1.6.1.), possono fornire anche informazioni sull'effetto del farmaco, sulle proprietà di rinforzo dell'alcol.

Procedura operante di auto-somministrazione

Pressioni sulla leva



Ottenimento del rinforzo

Fig. 1.6.1. Foto esemplificative delle due fasi principali della procedura di auto-somministrazione in un ratto della linea sP: alle 4 pressioni sulla leva per l'alcol (FR4) segue l'erogazione di una goccia (0.1 ml) di alcol (15% vol/vol).

Il rinforzo, viene infatti definito come un qualsiasi evento operante che incrementa la possibilità nel ratto che si verifichi una risposta; quindi per proprietà di rinforzo dell'alcol si intende la capacità dell'alcol di dirigere e sostenere nel ratto un comportamento specifico, come ad

esempio premere una leva. I ratti della linea sP costituiscono un appropriato modello per questo tipo di indagine, poiché acquisiscono facilmente un comportamento condizionato che li porta a premere una leva (risposta) al fine di ottenere l'alcol (rinforzo) (*lever-pressing behavior*) e mantengono tale comportamento di auto-somministrazione di alcol a livelli stabili (vedi Fig. 1.6.2.) (Vacca e coll. 2002).

Sessione di auto-somministrazione di alcol

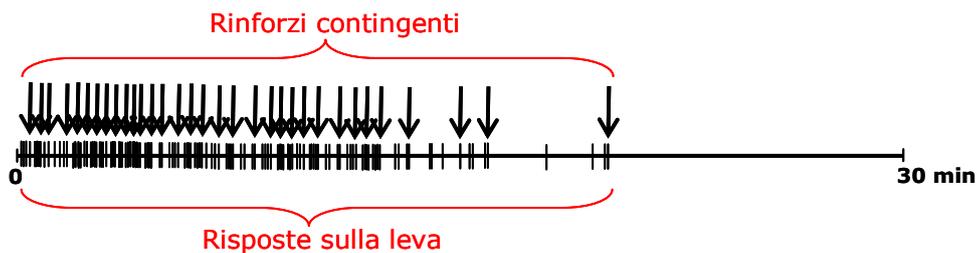


Fig. 1.6.2. Illustrazione rappresentativa di una sessione (30 minuti) di auto-somministrazione di alcol (15% vol/vol) condotta da un ratto della linea sP. L'animale viene allenato a premere una leva utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (*fixed ratio schedule of reinforcement*) pari a 4 (FR4; una risposta sulla leva equivale al rilascio di un rinforzo). Al termine il ratto avrà premuto la leva 132 volte, ottenuto 33 rinforzi e consumato circa 0.85 g/kg di alcol.

Questa parte del progetto di ricerca intende determinare l'effetto della somministrazione di baclofen sull'auto-somministrazione di alcol nei ratti sP, estendendo a ratti geneticamente alcol-preferenti quanto osservato in precedenza in ratti o topi non selezionati per la preferenza per l'alcol (Petry, 1997; Anstrom e coll., 2003; Janak e Gill, 2003; Besheer e coll., 2004; Czachowski e coll., 2006; Liang e coll., 2006; Walker e Koob, 2007)

b) *Breakpoint per l'alcol (proprietà motivazionali)*

Esistono differenti procedure operanti che permettono un'indagine più fine del comportamento animale legato agli effetti dell'alcol a livello del sistema nervoso centrale. Per la valutazione del desiderio fortissimo e sovente irrefrenabile (*craving*) che spinge l'alcolista a consumare le bevande alcoliche, vengono utilizzate diverse procedure sperimentali che riflettono, nell'animale di laboratorio, alcuni degli aspetti della patologia umana. Tali modelli sperimentali animali possono essere classificati in due categorie, a seconda della presenza o assenza dell'alcol (Markou e coll., 1993).

Le misure di *craving* fornite dai modelli animali possono essere considerate costituite di due componenti: (a) la capacità dell'alcol di servire da rinforzo (incentivo incondizionato) e (b) la capacità dell'alcol di assegnare significato motivazionale e incentivante a stimoli precedentemente neutri, per promuovere un comportamento di ricerca e di assunzione dell'alcol (incentivo condizionato). Le misure dell'intensità del *craving* fornite da modelli che si servono della presenza dell'alcol come rinforzo non sono in grado di dissociare il *craving* (approccio alla risposta; intensità dell'associazione stimolo-risposta; incentivo condizionato) dalle proprietà di rinforzo (incremento della probabilità che in seguito alle conseguenze della risposta si verifichi la risposta successiva; grandezza dell'associazione risposta-rinforzo; incentivo incondizionato).

In base a quanto detto, è stato proposto che il *craving*, tradotto in comportamento di ricerca (*seeking-behavior*), correlato al contesto dove l'alcol viene assunto (comportamento di assunzione o *taking-behavior*), incrementa l'efficacia dell'alcol come rinforzo (Markou e coll., 1993). Tuttavia una stima del *craving* più appropriata viene fornita da quei modelli sperimentali dove al comportamento di ricerca non è accoppiato un comportamento di assunzione dell'alcol (Markou e coll., 1993).

Modelli sperimentali che forniscono una misura del *craving* sono: il *breakpoint* e l'*extinction responding*.

Il *breakpoint* viene usato estensivamente in studi dove si vuole determinare le proprietà incentivo-motivazionali di una sostanza d'abuso; la misura del *craving* viene espressa attraverso l'incentivo incondizionato (ad esempio l'alcol, presente come rinforzo) e le proprietà dell'incentivo condizionato; quindi il comportamento di assunzione dell'alcol è accoppiato al comportamento di ricerca dello stesso, e si traduce in un aumento dell'efficacia dell'alcol inteso come rinforzo, dal quale scaturisce un aumentato *craving*.

L'*extinction responding* fornisce una valutazione degli aspetti condizionanti del comportamento di ricerca. Tale valutazione è relativamente indipendente dalle proprietà dell'alcol come incentivo incondizionato (poiché non avviene alcun consumo durante il test) ed è legata alle proprietà incentivo-motivazionali di stimoli condizionanti associati alla somministrazione dell'alcol.

Entrambi i test sperimentali vengono eseguiti dopo che gli animali mostrano un comportamento di ricerca dell'alcol stabile nel tempo. I ratti vengono precedentemente allenati

a premere una leva per ottenere l'alcol secondo un programma di richiesta fissa del rinforzo (*fixed ratio schedule of reinforcement, FR*). Il raggiungimento della risposta richiesta è pertanto seguito contingentemente dalla presentazione dell'alcol (sessioni di auto-somministrazione). Il test di *breakpoint* utilizza uno schema variabile basato su un rapporto progressivo, ossia un programma di richiesta progressiva del rinforzo (*progressive ratio schedule of reinforcement, PR*), intesa come una richiesta sempre maggiore delle risposte necessarie per l'ottenimento del rinforzo successivo (secondo Richardson e Roberts, 1996: 4, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, ecc.). Il valore di *breakpoint* è definito come (a) il più basso numero di pressioni richieste sulla leva non raggiunto dal ratto (Rodd e coll., 2003), nel corso della sessione, oppure (b) il più alto raggiunto (Hodos e coll., 1963), ed è diretto a valutare l'efficacia del rinforzo (*reinforcing efficacy*) della sostanza d'abuso in questione (l'alcol nella presente sperimentazione) (Fig. 1.6.3.).

Sessione di *breakpoint*

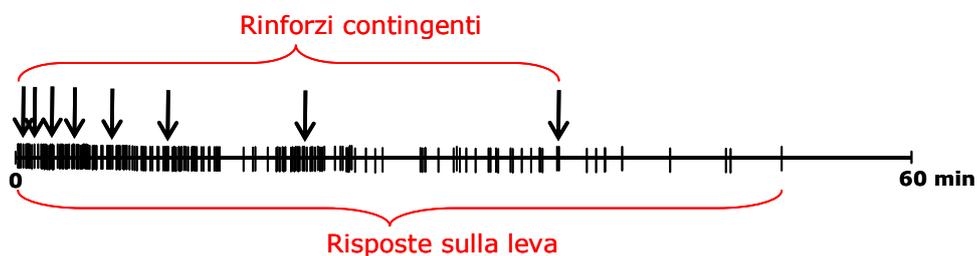


Fig. 1.6.3. Illustrazione rappresentativa di una sessione (60 minuti) di *breakpoint* per l'alcol (15% vol/vol) condotta da un ratto della linea sP. L'animale in esame, precedentemente allenato a premere una leva utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4), il giorno del test di *breakpoint* è sottoposto ad un programma di richiesta progressiva del rinforzo (*progressive ratio schedule of reinforcement, PR*, dove la risposta richiesta per ottenere il rinforzo successivo viene incrementata come segue: 4, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, ecc.). Al termine della sessione, il ratto avrà premuto la leva 165 volte, ottenuto 8 rinforzi e consumato circa 0.1 g/kg di alcol.

Al contrario, nella procedura dell'*extinction responding*, le proprietà motivazionali dell'alcol (*seeking-behavior*), nell'animale da laboratorio precedentemente condizionato vengono valutate stimando la persistenza del comportamento di ricerca in assenza di una risposta contingente rinforzata; in altre parole viene registrato il numero massimo di pressioni sulla leva che il ratto compie

alla ricerca dell'alcol, senza che la sua disponibilità abbia luogo (Fig. 1.6.4.).

Sessione di *extinction responding*

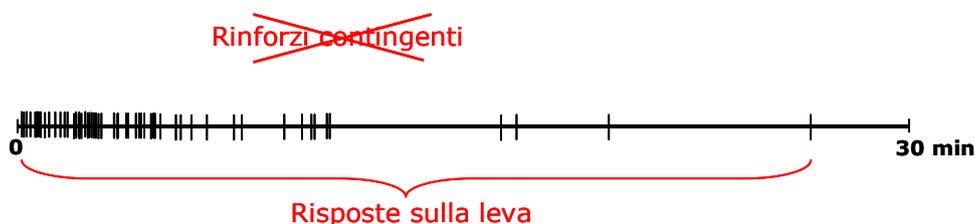


Fig. 1.6.4. Illustrazione rappresentativa di una sessione test (30 minuti) di *extinction responding* per alcol (15% vol/vol) in un ratto della linea sP. L'animale in esame è stato precedentemente allenato a premere una leva utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (*fixed ratio schedule of reinforcement*) pari a 4 (FR4; quattro risposte sulla leva equivale al rilascio di un rinforzo); durante la sessione di estinzione della risposta sulla leva non c'è ottenimento della risposta contingente (nessuna disponibilità di alcol). Al termine della sessione, il ratto avrà premuto 58 volte.

Studi recenti hanno dimostrato che il baclofen sopprime l'*extinction responding* per l'alcol sia nei ratti sP (Colombo e coll., 2003b) che in ratti *Long-Evans* (questi ultimi non selezionati per l'elevato consumo e preferenza per l'alcol) (Leite-Morris e Czachowski, 2006). Scopo di questa parte del progetto è quindi quella di estendere tali studi alla procedura del *breakpoint*.

A tale fine si utilizzeranno ratti sP precedentemente condizionati a premere una leva al fine di ottenere l'alcol, e poi esposti alla procedura del PR nella sessione in cui viene saggiato l'effetto del baclofen.

c) *Reinstatement per l'alcol (alcohol-seeking o relapse-like behavior)*

Al fine di comprendere meglio le basi neurobiologiche della ricaduta e di identificare potenziali rimedi farmacologici, sono state proposte e validate due procedure sperimentali che riproducono negli animali di laboratorio i principali aspetti della ricaduta: il già citato *alcohol deprivation effect* (vedi paragrafo 1.5.) e la ripresa del comportamento operante di ricerca dell'alcol (*reinstatement*), che a sua volta si divide in tre categorie a seconda del costrutto del condizionamento: (a) ripresa alcol-indotta (*alcohol-induced*

reinstatement), (b) ripresa stimolo-indotta (*cue-induced reinstatement*), e (c) ripresa stress-indotta (*stress-induced reinstatement*).

La procedura del *reinstatement*, si basa su un condizionamento classico, dove ad una serie di stimoli ambientali, esterni o interni, viene associata l'azione di rinforzo dell'alcol. Stimoli ambientali ripetutamente accoppiati con il rinforzo primario (alcol) possono acquisire, tramite processi di condizionamento classico, proprietà di rinforzo tali da promuovere il forte desiderio per l'alcol e un comportamento di ricerca durante un periodo di deprivazione dall'alcol (ricaduta). Un rinforzo condizionato viene definito come un qualsiasi stimolo, motivazionalmente neutro in un primo momento, che acquista proprietà motivazionali quando accoppiato a un rinforzo primario (Hilgard e Marquis, 1961). Nel modello sperimentale del *cue-induced reinstatement*, gli animali sono dapprima portati ad associare una serie di stimoli neutri (quali -ad esempio- luci, odori, suoni) con le pressioni compiute sulla leva per la presentazione dell'alcol, in normali sessioni di auto-somministrazione. Questo periodo di condizionamento è poi seguito da un periodo in cui la risposta sulla leva viene virtualmente estinta con (a) ripetute sessioni di *extinction responding* [*between-session procedure* (Lê e coll., 2006)] o (b) all'interno di una singola sessione di *extinction responding* [*within-session procedure* (Bienkowski e coll., 2000)]. La successiva riesposizione ai soli stimoli condizionanti, promuove in questi stessi animali una ripresa nel comportamento di ricerca dell'alcol (vedi Lê e Shaham, 2002; Katz e Higgins, 2003; Epstein e coll., 2006) che si manifesta come una ripresa delle risposte sulla leva (Fig. 1.6.5.).

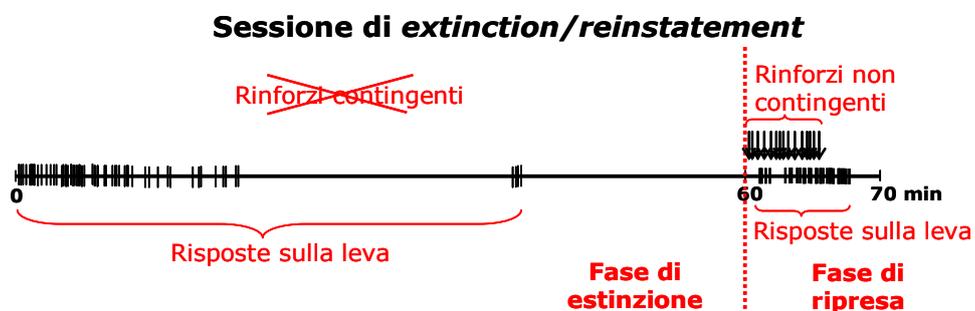


Fig. 1.6.5. Illustrazione rappresentativa di una sessione test (70 minuti) di *extinction/reinstatement* (usando la procedura *within-session*, Maccioni e coll. 2007) per alcol (15% vol/vol) in un ratto della linea sP. L'animale in esame viene precedentemente allenato a premere una leva utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (*fixed ratio schedule of reinforcement*) pari a 4 (FR4; quattro risposte sulla leva

equivale al rilascio di un rinforzo). Il test è costituito da due fasi: (a) fase di estinzione, durante la quale alle risposte sulla leva non viene contingentemente rilasciato alcol; (b) fase di ripresa, durante la quale, al ratto veniva presentato per 15 volte un complesso di stimoli (compresa la presentazione di alcol) precedentemente associati alla disponibilità dell'alcol. Al termine della sessione il ratto avrà premuto 55 volte durante la fase di estinzione e 39 volte durante la fase di ripresa.

Le proprietà "anti-ricaduta" del baclofen sono state studiate finora utilizzando soltanto il paradigma dell'*alcohol deprivation effect* (Colombo e coll., 2003a; 2006b). L'obiettivo di questa parte del progetto è quindi quello di saggiare l'effetto "anti-ricaduta" del baclofen anche con la procedura del *reinstatement* in ratti sP.

1.6.2. Caratterizzazione degli effetti anti-alcol di GS39783

La recente sintesi di modulatori allosterici positivi, come ad esempio il GS39783 ed il CGP7930, offre nuovi spunti e strumenti alle indagini farmacologiche sul recettore GABA_B, incluso il suo ruolo nel controllo del comportamento di consumo dell'alcol. I primi studi sono stati condotti allo scopo di determinare l'effetto del GS39783 sul comportamento consumatorio di alcol in ratti sP esposti alla libera scelta tra alcol ed acqua, e di compararlo con quello di agonisti diretti del recettore GABA_B come il baclofen. Come ipotizzato, la somministrazione ripetuta di GS39783 sopprimeva l'acquisizione e il mantenimento del comportamento consumatorio dell'alcol nei ratti sP (Orrù e coll., 2005). Inoltre, saggiato in procedure operanti come l'auto-somministrazione di alcol, il CGP7930 esercitava nel ratto un effetto riducente delle proprietà di rinforzo dell'alcol (Liang e coll. 2006) simile a quello osservato dopo trattamento con il baclofen nel ratto e nel topo (Anstrom e coll., 2003; Janak e Gill, 2003; Besheer e coll., 2004; Walker e Koob, 2007).

Pertanto, il presente progetto di ricerca si proponeva anche di determinare, e comparare al baclofen, l'effetto della somministrazione del GS39783 sull'auto-somministrazione di alcol e sul *breakpoint* per l'alcol nei ratti sP.

2. MATERIALI E METODI

Per le sperimentazioni sono stati utilizzati ratti maschi della linea sP, appartenenti alle generazioni dalla 59^a alla 66^a, aventi tutti 75 giorni di età all'inizio di ciascuno studio e il cui peso corporeo si aggirava approssimativamente tra 350 g e 600 g rispettivamente all'inizio ed alla fine dello studio. I ratti alloggiavano in gabbie comuni standard, quattro per ciascuna gabbia, provviste di un letto di segatura di legno, con un ciclo luce-buio di 12h:12h, ad una temperatura costante di $22 \pm 2^\circ\text{C}$, e ad una umidità relativa dell'ambiente di circa il 60%. Il cibo (Mucedola, Settimo Milanese, MI, Italia) e l'acqua erano sempre disponibili in ciascuna gabbia, eccetto in alcuni brevi periodi specificati di seguito.

Ciascuno studio utilizzava speciali gabbie (gabbia di Skinner, Med Associates, Georgia, VT) per lo studio del comportamento operante. Tali gabbie erano localizzate all'interno di strutture insonorizzate che permettono l'isolamento dall'esterno, ventilate al fine di ottenere un'opportuna aerazione e di produrre un rumore di fondo.

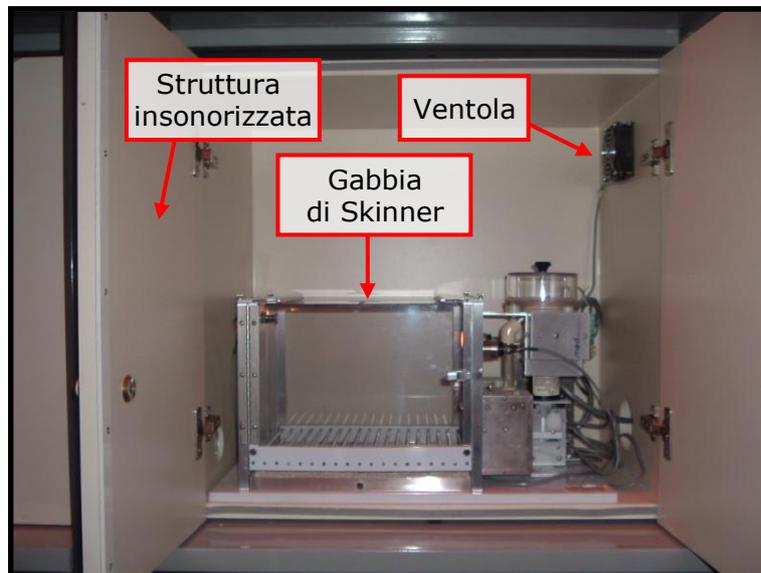


Fig. 2. Foto dove è possibile identificare la Gabbia di Skinner, la struttura insonorizzata che la contiene e la ventola.

Alcuni componenti della gabbia, quali ad esempio il sistema di erogazione dell'alcol, le luci associate all'erogazione dell'alcol o dell'acqua, la presenza di una o più leve, dipendeva dalla procedura sperimentale condotta. Prima di tutte le sperimentazioni i ratti venivano abituati alla

manipolazione e alla somministrazione intraperitoneale o intragastrica.

2.1. **Esperimento 1: Effetto del baclofen sull'auto-somministrazione di alcol**

Le sessioni di allenamento ed il test sperimentale venivano condotte in gabbie di Skinner dove la parete posteriore era dotata di una luce che provvedeva all'illuminazione dell'interno della gabbia durante la sessione; la parete frontale era munita di: (a) una leva, (b) un ricettacolo da cui l'animale aveva accesso all'alcol attraverso un piccolo contenitore metallico (della capienza di 0.1 ml) che viene reso disponibile dall'attivazione del *liquid dipper* (sistema meccanico per l'erogazione di liquidi costituito da un'asta, il cui sollevamento permette al contenitore metallico di venire esposto all'interno della gabbia dopo essersi riempito con la soluzione alcolica da un contenitore di fluidi posto subito sotto l'asta), (c) stimolo luminoso subito sopra la leva (Fig. 2.1.)

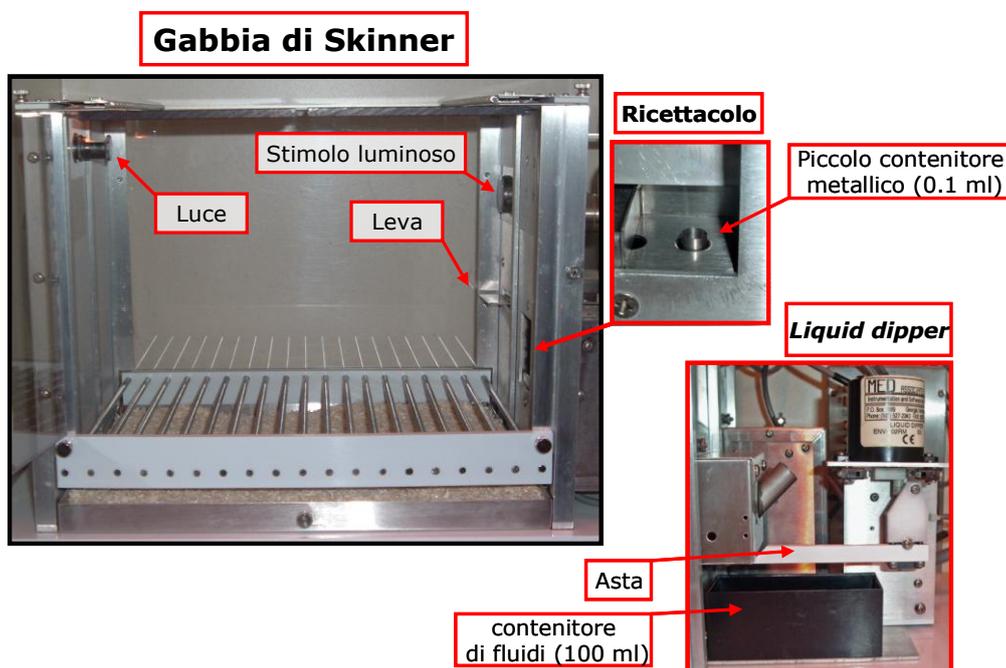


Fig. 2.1. Foto di una Gabbia di Skinner, in cui è possibile vedere il dettaglio dei suoi componenti.

Ogni raggiungimento della risposta richiesta era associata al flash dello stimolo luminoso, sopra la leva, ed alla presentazione del rinforzo, ossia all'esposizione del contenitore metallico del *liquid dipper* all'interno della

gabbia. Le sessioni di auto-somministrazione duravano 30 minuti e erano condotte 6 giorni alla settimana (da lunedì a sabato) durante la fase di buio del ciclo luce-buio.

I ratti sono stati allenati a premere la leva mediante la procedura di induzione denominata "*sucrose fading procedure*" (Samson, 1986). In breve, per 4 giorni consecutivi i ratti sono portati ad associare la pressione sulla leva all'erogazione di una goccia di saccarosio al 10% (p/vol). Successivamente i ratti sono stati divisi in due gruppi; per gli animali di un gruppo, 24 sessioni consecutive servivano per ridurre la concentrazione del saccarosio fino ad arrivare a 0%, e aumentare la concentrazione di alcol fino al 15% (vol/vol). Il programma di richiesta fissa del rinforzo veniva inizialmente mantenuto a 1 (FR1; una risposta sulla leva equivale al rilascio di un rinforzo). Dopo questa prima fase di iniziazione l'FR veniva incrementato fino ad FR4 in 4 sessioni. La soluzione alcolica al 15% (vol/vol) e FR4 sono le condizioni tenute nella successiva fase di mantenimento.

In un secondo gruppo di animali, dopo aver associato la pressione sulla leva al saccarosio al 10% (p/vol), in 15 sessioni consecutive l'FR veniva incrementato a FR4 e la concentrazione di saccarosio ridotta fino a 0.3% (p/vol); queste condizioni venivano tenute anche nella successiva fase di mantenimento.

Dopo 7-8 sessioni della fase di mantenimento, durante le quali si osservava uno stabile e costante comportamento di richiesta del rinforzo tradotto come numero totale delle risposte sulla leva e consumi di alcol e saccarosio costanti, i ratti di ciascun gruppo "alcol" e "saccarosio" ($n=8-12$), venivano sottoposti al trattamento con il baclofen. In ciascuna curva dose-risposta tutte le dosi di baclofen venivano saggiate in ciascun animale, secondo il disegno del quadrato-latino. Le sessioni sperimentali venivano condotte il sabato dopo 5 giorni consecutivi dove si registrava il comportamento di auto-somministrazione di base (nessun trattamento farmacologico). Il baclofen (Novartis, Basilea, Svizzera) veniva disciolto in 2 ml/kg di soluzione fisiologica e iniettato per via intraperitoneale alle dosi di 0, 1.7 e 3 mg/kg 30 minuti prima dell'inizio della sessione.

Le variabili misurate sono state le seguenti: numero totale delle risposte sulla leva; consumo totale di alcol o saccarosio (espresso rispettivamente in g/kg e ml/kg; valore determinato dal numero totale dei rinforzi ottenuti); latenza alla prima risposta sulla leva (espressa in secondi; ossia il periodo di tempo che intercorre tra l'inizio della sessione e la prima pressione effettuata sulla leva); consumo di alcol o saccarosio nel primo episodio (*bout*) (espresso

rispettivamente in g/kg e ml/kg, e definito come la quantità di soluzione alcolica o di saccarosio consumata prima che ci sia una pausa nel comportamento di risposta sulla leva lunga almeno un minuto).

I dati relativi all'effetto del baclofen su ciascuna variabile sono stati analizzati statisticamente utilizzando l'ANOVA ad una via per misure ripetute, seguita dal test di *Newman-Keuls* per l'analisi *post hoc*. Quando i ratti non emettevano alcuna risposta sulla leva, la media della latenza (riportata nel grafico) veniva calcolata escludendo quello specifico valore; tale valore, comunque veniva inserito nell'analisi statistica (1800 secondi, ovvero l'intera durata della sessione), poiché la sua mancanza avrebbe impedito l'elaborazione dell'ANOVA per misure ripetute.

2.2. Esperimento 2: Effetto del baclofen sul breakpoint per l'alcol

Le sessioni di allenamento ed il test sperimentale venivano condotte in gabbie di Skinner dove la parete frontale è equipaggiata con (a) due leve retrattili, (b) un ricettacolo, localizzato tra le due leve, che consentiva la doppia erogazione dei fluidi, e (c) due luci, posizionate al di sopra di ciascuna leva (una verde ed una bianca), che fungevano da stimoli luminosi per il condizionamento operante. Il ricettacolo, all'interno della gabbia di Skinner, era connesso attraverso dei tubi di polietilene alle siringhe di erogazione montate su delle pompe di iniezione, poste al di fuori delle gabbie di Skinner (Fig. 2.2.). Per metà dei ratti, la leva destra era associata all'alcol (o al saccarosio), e il raggiungimento della risposta richiesta (a) attivava la pompa di iniezione con conseguente erogazione di una goccia (0.1 ml) di alcol (o di saccarosio), (b) accensione dello stimolo luminoso verde per un periodo di 3 secondi (periodo di tempo impiegato per l'erogazione dell'alcol o del saccarosio); per questi ratti la leva sinistra era associata all'erogazione dell'acqua, e il raggiungimento della risposta richiesta (a) attivava la pompa di iniezione con conseguente erogazione di una goccia (0.1 ml) di acqua, (b) accensione dello stimolo luminoso bianco per un periodo di 3 secondi. Per la seconda metà dei ratti, le condizioni erano esattamente opposte [leva sinistra: alcol (o saccarosio); leva destra: acqua]. Le sessioni di auto-somministrazione duravano 30 minuti ed erano condotte giornalmente e per 5 giorni alla settimana (dal lunedì al venerdì) durante la fase di buio del ciclo luce-buio.

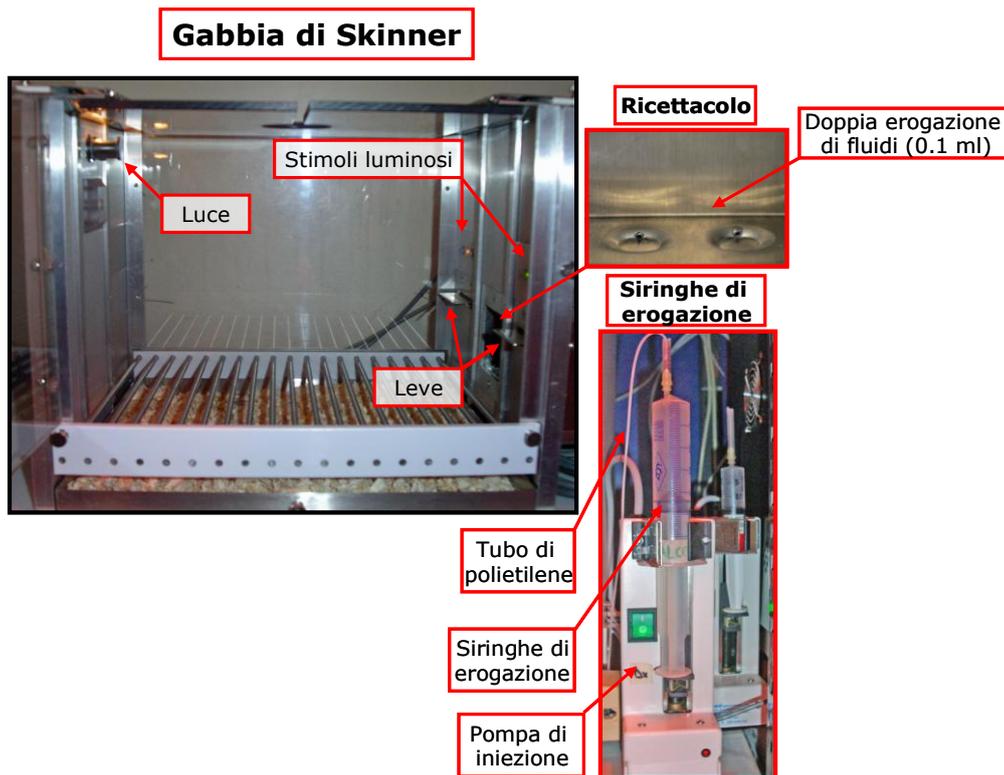


Fig. 2.2. Foto di una Gabbia di Skinner, in cui è possibile vedere il dettaglio dei suoi componenti.

I ratti sono stati divisi in due gruppi. Il primo gruppo ($n=32$) era da prima esposto nella gabbia d'alloggio (*homecage*) al regime di libera scelta tra due bottiglie "alcol (10%, vol/vol) ed acqua" (non operante) con illimitato accesso per 24 ore/giorno per 10 giorni consecutivi. Immediatamente dopo il regime di libera scelta, i ratti sono stati allenati a premere una leva utilizzando un programma di FR1, usando una versione modificata della procedura di induzione di Samson (Samson, 1986). Brevemente, le risposte sulla leva sono state inizialmente associate ad una soluzione contenente saccarosio al 3% (p/vol) e alcol al 5% (vol/vol) per due sessioni consecutive. Successivamente, per 8 sessioni consecutive, la concentrazione del saccarosio veniva gradualmente diminuita fino ad arrivare a 0% e la concentrazione di alcol veniva incrementata fino ad una concentrazione finale del 15% (vol/vol). L'FR1 veniva mantenuto per tutta questa fase iniziale. A seguire, i ratti sono stati esposti a 5 sessioni consecutive durante le quali la leva dell'"alcol" e quella dell'"acqua" venivano alternate. Durante queste 5 sessioni di alternanza, l'acqua era disponibile sempre a FR1, mentre l'FR per la presentazione dell'alcol veniva incrementato a FR2 e FR4. Da questo punto in poi, entrambe le leve erano contemporaneamente disponibili (fase di mantenimento) e le sessioni venivano

condotte con FR4 per la leva dell'“alcol” e con FR1 per la leva dell'“acqua”.

Un secondo gruppo di animali ($n=32$) veniva allenato a premere la leva per ottenere saccarosio. Le risposte sulla leva erano inizialmente associate ad una soluzione di saccarosio al 3% (p/vol), FR1 per 2 sessioni consecutive. Nelle successive 4 sessioni, l'FR veniva incrementato a FR2 e FR4. I ratti sono stati poi esposti a 5 sessioni consecutive durante le quali la leva del “saccarosio” e quella dell'“acqua” venivano alternate. Durante queste 5 sessioni l'acqua era disponibile sempre a FR1, mentre l'FR per la presentazione del saccarosio veniva incrementato a FR2 e FR4. Da questo punto in poi, entrambe le leve erano contemporaneamente disponibili (fase di mantenimento) e le sessioni sono state condotte con FR4 per la leva del “saccarosio” e con FR1 per la leva dell'“acqua”.

Dopo approssimativamente 20 sessioni di auto-somministrazione appartenenti alla fase di mantenimento, i ratti di entrambi i gruppi (“alcol” e “saccarosio”) sono stati selezionati per il test sperimentale. Specificamente, sono stati selezionati 9 ratti di ciascun gruppo, che mostravano uno stabile comportamento di risposta sulla leva durante le ultime 5 sessioni (criterio di selezione: meno del 10% di variazione nel numero di pressioni sulla leva nelle ultime 3 sessioni di auto-somministrazione rispetto al valore medio dell'intera fase di mantenimento per il gruppo “alcol”; meno del 20% di variazione nel numero di pressioni sulla leva nelle ultime 3 sessioni di auto-somministrazione rispetto al valore medio dell'intera fase di mantenimento per il gruppo “saccarosio”).

Il test sperimentale saggiava l'effetto del baclofen utilizzando un programma di PR. Nella sessione sperimentale (dalla durata di 60 min), le risposte richieste sulla leva dell'“alcol” o del “saccarosio” al fine di ottenere il rinforzo venivano incrementate progressivamente durante lo svolgimento della sessione in accordo con la procedura proposta da Richardson e Roberts (1996), dove la risposta richiesta veniva incrementata come segue: 4, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, ecc. La variabile misurata era il *breakpoint* per l'alcol (o per il saccarosio), definito come il più basso valore di richiesta del rinforzo non raggiunto dal ratto. Le sessioni sperimentali venivano condotte il venerdì, tutte le dosi di baclofen venivano saggiate secondo il disegno del quadrato latino. Quattro sessioni di auto-somministrazione (dal lunedì al giovedì), e in condizioni standard (30 min, FR4) di mantenimento senza alcun trattamento farmacologico venivano interposte tra le sessioni sperimentali. Dopo

ciascuna sessione sperimentale di PR, i consumi di alcol (o saccarosio) e le risposte richieste ritornavano ai valori di base registrati (ovvero quelli della fase di mantenimento) già nella prima sessione successiva. Il baclofen (Novartis, Basilea, Svizzera) era disciolto in 2 ml/kg di soluzione fisiologica e iniettato per via intraperitoneale alle dosi di 0, 1 e 3 mg/kg 30 minuti prima dell'inizio della sessione.

Le variabili misurate sono state le seguenti: numero totale di risposte sulla leva; valore di *breakpoint*; consumo totale di alcol o saccarosio (espresso rispettivamente in g/kg e ml/kg; valore determinato dal numero totale dei rinforzi ottenuti). L'elaborazione statistica dei dati di ciascuna variabile è stata eseguita utilizzando l'ANOVA ad una via per misure ripetute, seguita dal test di *Newman-Keuls* per l'analisi *post hoc*.

2.3. Esperimento 3: Effetto del baclofen sull'*extinction/reinstatement* per l'alcol

La procedura sperimentale dell'*extinction/reinstatement*, così come le sessioni di auto-somministrazione che precedevano il test, sono state condotte in gabbie di Skinner equipaggiate come segue: la parete posteriore con una luce che permetteva l'illuminazione dell'interno della gabbia durante la sessione; la parete frontale con due leve retrattili tra cui era localizzato un ricettacolo da cui l'animale aveva accesso all'alcol attraverso il funzionamento del *liquid dipper* (per le caratteristiche tecniche del *liquid dipper* si veda il paragrafo 2.1.). Solo una leva (leva "attiva") attivava il *liquid dipper*. Le pressioni sulla leva "inattiva" venivano registrate ma nessun rinforzo veniva erogato. La posizione della leva "attiva" (sinistra o destra) veniva assegnata a random a ciascun animale. Durante i periodi "off", l'asta del *liquid dipper* era abbassata e la coppetta era posizionata all'interno della vaschetta. In una sessione standard di auto-somministrazione, il raggiungimento delle risposte richieste (vedi di seguito) risultava nello spostamento dell'asta verso l'alto e nell'esposizione (per 5 secondi) della soluzione alcolica all'interno del ricettacolo della gabbia di Skinner (periodo "on").

Le gabbie erano anche munite di due grandi luci (bianche) localizzate una subito sopra la leva "attiva" l'altra subito sopra il ricettacolo del *liquid dipper*. L'inizio della sessione veniva segnalato dall'accensione della luce della gabbia e dall'inserzione delle due leve. La disponibilità del rinforzo al raggiungimento della risposta richiesta era accoppiata a: (a) rumore prodotto dal movimento dell'asta dalla posizione

“off” alla posizione “on”; (b) flash delle due luci per 5 secondi, e (c) spegnimento, per 5 secondi, della luce che illuminava la gabbia di Skinner (Fig. 2.3.). Nel loro insieme, questi stimoli costituivano un vero e proprio complesso discriminativo di stimoli associato alla presentazione dell'alcol come rinforzo.

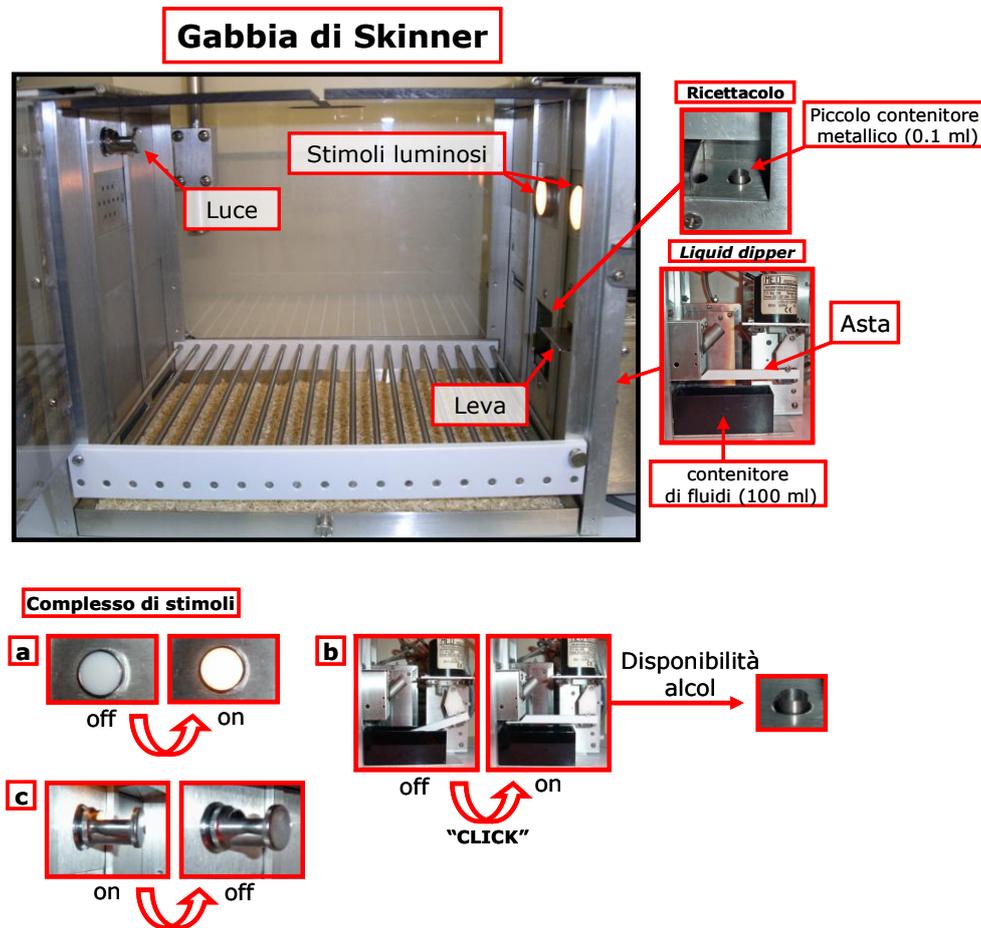


Fig. 2.3. Foto di una Gabbia di Skinner, in cui è possibile vedere il dettaglio dei suoi componenti. Al di sotto è riportato il complesso di stimoli associato all'esposizione dell'alcol. La presentazione dell'alcol è accoppiata: (a) flash delle due luci per 5 secondi (da off a on); (b) attivazione del *liquid dipper* (da off a on) con conseguente innalzamento dell'asta e produzione di un suono simile ad un "CLICK"; (c) spegnimento della luce che illumina il box (da on a off).

La procedura sperimentale prevedeva inizialmente l'esposizione dei ratti, alloggiati nella loro *home cage*, ad un regime di libera scelta tra due bottiglie, una contenente una soluzione alcolica al 10% (vol/vol) e l'altra contenente acqua, con illimitato accesso per 24 ore/giorno e per 10 giorni consecutivi. Immediatamente dopo questa fase di prima esposizione all'alcol, i ratti sono stati allenati a premere la leva "attiva", utilizzando il medesimo protocollo

sperimentale descritto nel paragrafo 2.2. Le uniche differenze tra le due procedure erano (a) la presenza di una leva "inattiva" in sostituzione di quella associata all'acqua e (b) il sistema di erogazione. In accordo con il criterio selettivo (meno del 10% di variazione nel numero di pressioni sulla leva nelle ultime tre sessioni di auto-somministrazione rispetto al valore medio dell'intera fase di mantenimento per il gruppo "alcol"), 9/10 ratti sono stati selezionati per il test dell'*extinction/reinstatement* all'interno di una singola sessione.

Nello specifico il test includeva due fasi: una fase di *extinction responding* ed una fase di *reinstatement*. Il test di *extinction/reinstatement* era disegnato per studiare l'effetto della somministrazione del baclofen sulla fase di *reinstatement*. A questo scopo, la soluzione fisiologica e il baclofen sono stati somministrati prima della fase di *reinstatement* attraverso un catetere impiantato permanentemente che permetteva la somministrazione del farmaco dall'esterno della gabbia di Skinner, senza alcuna manipolazione dell'animale durante il test. A tale scopo, gli animali sono stati sottoposti ad un intervento chirurgico per l'impianto intraperitoneale di un catetere (CamCath, Cambridge, UK) la cui fuoriuscita si trovava nel dorso tra le scapole. L'intervento chirurgico era eseguito sotto anestesia indotta da 4 ml/kg di Equithesin (i.p.). Durante l'intervento, l'antibiotico rifamycin (5 mg/ratto) veniva somministrato localmente, una sola volta, mentre l'antimicrobico enrofloxacin veniva somministrato alla dose di 2.5 mg/ratto (i.m.) una volta al giorno per 5 giorni consecutivi dopo l'intervento chirurgico.

Ai ratti veniva concesso un periodo di recupero post-chirurgico di 7 giorni, prima di riprendere le sessioni di auto-somministrazione. Al fine di garantire il libero passaggio di fluidi attraverso il catetere, veniva somministrato giornalmente un determinato volume di soluzione eparinata sterile (5%, vol/vol). Dopo di che, gli animali sono stati esposti a 7 sessioni di auto-somministrazione, durante le quali mostrarono una rapida ripresa del comportamento di risposta sulla leva "attiva", riproducendo i valori osservati precedentemente nella fase di mantenimento.

Successivamente, i ratti sono stati esposti a due sessioni di *extinction/reinstatement*, secondo la procedura *within-session*; 5 sessioni standard di auto-somministrazione di alcol separavano le due sessioni sperimentali (condotte il sabato). Ciascuna sessione di *extinction/reinstatement* durava 70 minuti ed era composta da una fase di *extinction responding* di 60 minuti ed una fase di *reinstatement* di 10 minuti. Nella fase di *extinction*, il *liquid dipper* e le due

grandi luci erano rispettivamente "off" e spente, le pressioni sulla leva "attiva" non avevano come conseguenza l'erogazione di alcun fluido. Se un ratto eseguiva ≤ 5 pressioni sulla leva "attiva" negli ultimi 10 minuti trascorsi soddisfaceva il criterio di estinzione (Maccioni e coll., 2007); tutti i 9 ratti avevano raggiunto questo criterio. Nella fase di *reinstatement*, un complesso di stimoli associato all'alcol costituito da: (a) flash delle due luci per 5 secondi (da off a on); (b) attivazione del *liquid dipper* (da off a on) con conseguente innalzamento dell'asta e produzione di un suono simile ad un "CLICK"; (c) spegnimento della luce che illumina la gabbia (da on a off); della durata di 7.5 secondi, veniva presentato in accordo con un programma di richiesta variabile del tempo (VT) di 15 secondi (VT15-s) per 15 volte. La vaschetta appartenente al *liquid dipper* era riempita di alcol al 15% (vol/vol) così da includere nel complesso di stimoli anche la componente olfattiva e gustatoria dell'alcol. Si noti che la dose di alcol consumata da ciascun animale durante la presentazione dei 15 complessi di stimoli era sufficientemente bassa da non produrre effetti farmacologici, come suggerito dai bassi livelli ematici di alcol (<10 mg%) (Maccioni e coll., 2007). Il tempo totale della presentazione del complesso di stimoli non contingente era di circa 4.7 minuti, e le condizioni della fase di *extinction responding* venivano mantenute per il restante tempo della fase di *reinstatement*.

La soluzione fisiologica ed il baclofen (Novartis, Basilea, Svizzera; disciolto in soluzione fisiologica) sono stati somministrati via catetere, il quale era connesso ad un sistema munito di *swivel*, e collegato alla siringa di erogazione al di fuori della struttura insonorizzata. Il volume di somministrazione utilizzato era 2 ml/kg. La soluzione fisiologica ed il baclofen sono stati somministrati 30 minuti prima della fase di *reinstatement*. La dose di baclofen utilizzata è stata di 3 mg/kg; questa dose è stata selezionata sulla base di precedenti risultati che dimostravano la totale assenza di effetti sedativi o di incoordinazione motoria (Colombo e coll., 2003).

2.4. Esperimento 4: Effetto del GS39783 sul consumo di alcol misurato con la procedura della libera scelta tra due bottiglie

I ratti sP erano alloggiati uno per gabbia. La procedura sperimentale prevedeva l'esposizione del ratto al regime di libera scelta tra due bottiglie contenenti rispettivamente una soluzione alcolica al 10% (vol/vol) in acqua e acqua;

entrambe le bottiglie erano disponibili con illimitato accesso per 24 ore/die. Le bottiglie venivano riempite ogni giorno con acqua e soluzione alcolica fresche, e la loro posizione nella mangiatoia della gabbia veniva invertita (sinistra e destra) giornalmente. Il consumo di alcol, acqua e cibo venivano monitorati tutti i giorni, immediatamente prima dell'inizio della fase di buio, registrando il peso delle due bottiglie e dei pellet di cibo (accuratezza 0.1 g).

Sono stati condotti due esperimenti distinti, il primo – denominato di acquisizione – prevedeva l'utilizzo di ratti mai esposti all'alcol prima dell'inizio del trattamento col baclofen (*alcohol-naive*) e permetteva di valutare l'effetto del farmaco sull'acquisizione del comportamento consumatorio; il secondo utilizzava invece ratti *alcohol-experienced*, ovvero ratti esposti alla libera scelta tra alcol ed acqua per diverse settimane prima dell'inizio del trattamento col baclofen (questa procedura riproduce la fase "attiva" dell'alcolismo umano).

Nel primo esperimento, ovvero quello di "acquisizione", i ratti sono stati divisi in quattro gruppi ($n=10$) in base al loro peso corporeo. La presentazione dell'alcol avveniva all'inizio della fase di buio del giorno 1. I ratti ricevevano il primo trattamento con il GS39783 (0, 6.25, 12.5 e 25 mg/kg) 60 minuti prima della presentazione dell'alcol. La somministrazione del farmaco è stata ripetuta una volta al giorno per 5 giorni consecutivi. Il GS39783 (Novartis, Basilea, Svizzera) veniva sospeso in Tween 80 (1%, p/vol) in acqua distillata e veniva somministrato per via intragastrica (utilizzando un sondino metallico) nel volume di 2 ml/kg. Le dosi di GS39783 sono state scelte sulla base di esperimenti preliminari, mirati a produrre il massimo effetto senza l'induzione di alcun effetto sedativo. Il consumo giornaliero di alcol, acqua e cibo è stato registrato nei 5 giorni del trattamento così come nei 24 giorni successivi al trattamento.

Nel secondo esperimento, ovvero quello di "mantenimento", i ratti sono stati esposti al regime di libera scelta tra alcol ed acqua per 4 settimane consecutive prima dell'inizio del trattamento col GS39783. I ratti sono stati divisi in tre gruppi ($n=7-8$) in base al peso corporeo, ai consumi giornalieri di alcol e cibo nei 3 giorni precedenti all'inizio della fase sperimentale. Gli animali venivano trattati, per via intragastrica, con il GS39783 (0; 50 e 100 mg/kg; disciolto come descritto in precedenza), una volta al giorno, 60 minuti prima dello spegnimento della luce, per 5 giorni consecutivi. Il consumo giornaliero di alcol, acqua e cibo è stato registrato nei 5 giorni del trattamento e nei 6 giorni successivi.

2.5. Esperimento 5: Effetto del GS39783 sull'auto-somministrazione di alcol

La procedura sperimentale consisteva in sessioni di auto-somministrazione condotte in gabbie di Skinner attrezzate come descritto in dettaglio nel paragrafo 2.2. Anche la procedura di *training* dei ratti all'auto-somministrazione di alcol e saccarosio era identica a quella precedentemente descritta nel paragrafo 2.2., fatta eccezione per il gruppo degli animali del "saccarosio" dove venivano impiegate in aggiunta altre 3 sessioni per portare la concentrazione del saccarosio da 3% a 0.3% (p/vol).

Dopo approssimativamente 20 sessioni di auto-somministrazione (fase di mantenimento), i ratti di entrambi i gruppi ("alcol" and "saccarosio") sono stati selezionati per l'esperimento con il GS39783 utilizzando i criteri descritti in precedenza (paragrafo 2.2.). Tutte le dosi di GS39783 venivano saggiate in ciascun ratto di entrambi i gruppi ("alcol" e "saccarosio") secondo il disegno del quadrato latino. Quattro sessioni standard di auto-somministrazione venivano interposte tra le sessioni sperimentali. Il GS39783 (Novartis, Basilea, Svizzera) è stato preparato come descritto in precedenza e somministrato per via intragastrica alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 60 minuti prima dell'inizio della sessione.

Le variabili misurate erano le seguenti: numero totale delle risposte sulla leva; consumo totale di alcol o saccarosio (espresso rispettivamente in g/kg e ml/kg); latenza alla prima risposta sulla leva (espressa in secondi); consumo di alcol o saccarosio nel primo episodio (*bout*; espresso in g/kg e ml/kg rispettivamente).

L'elaborazione statistica dei dati di ciascuna variabile, relativa all'effetto del GS39783, è stata condotta utilizzando l'ANOVA ad una via per misure ripetute, seguita da dal test di *Newman-Keuls* per l'analisi *post hoc*.

2.6. Esperimento 6: Effetto del GS39783 sul *breakpoint* per l'alcol

La procedura sperimentale consisteva in sessioni di auto-somministrazione condotte in gabbie di Skinner attrezzate come descritto in precedenza (paragrafo 2.2.). Anche la procedura di *training* dei ratti all'auto-somministrazione di alcol e saccarosio era identica a quella precedentemente descritta nel paragrafo 2.2.

Dopo approssimativamente 20 sessioni di auto-somministrazione (fase di mantenimento), i ratti di entrambi i gruppi ("alcol" e "saccarosio") sono stati selezionati per l'esperimento con il GS39783 secondo i criteri specificati in precedenza (paragrafo 2.2.). Sono stati selezionati 12 ratti per gruppo. Il test sperimentale saggiava l'effetto del GS39783 (Novartis, Basilea, Svizzera) utilizzando il programma di PR. Nella sessione sperimentale (dalla durata di 60 minuti), le risposte richieste sulla leva dell'"alcol" o del "saccarosio" al fine di ottenere il rinforzo venivano incrementate progressivamente secondo lo schema descritto in precedenza (paragrafo 2.2.). Le variabili misurate erano: (a) numero totale delle risposte sulla leva associata all'alcol (o al saccarosio); (b) *breakpoint* per l'alcol (o per il saccarosio), definito come il più basso valore di richiesta del rinforzo non raggiunta dal ratto. Le sessioni sperimentali venivano condotte il venerdì, tutte le dosi di baclofen venivano testate in ciascun ratto secondo il disegno del quadrato latino. Quattro sessioni standard di auto-somministrazione venivano interposte tra le sessioni sperimentali. Dopo ciascuna sessione sperimentale di PR, i consumi di alcol (o saccarosio) e il numero di risposte richieste ritornavano rapidamente ai valori di base registrati nella fase di mantenimento. Il GS39783 (Novartis, Basilea, Svizzera) è stato disciolto come descritto in precedenza (paragrafo 2.4.) e somministrato per via intragastrica alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 60 minuti prima dell'inizio della sessione.

L'elaborazione statistica dei dati è stata condotta utilizzando l'ANOVA ad una via per misure ripetute, seguita dal test di *Newman-Keuls* per l'analisi *post hoc*.

3. RISULTATI

3.1. Esperimento 1: Effetto del baclofen sull'auto-somministrazione di alcol

In accordo con precedenti osservazioni (Vacca e coll., 2002), tutti i ratti selezionati hanno acquisito e mantenuto un costante comportamento di auto-somministrazione di alcol e saccarosio. Durante la sessione sperimentale il numero totale delle risposte sulla leva per l'alcol e per il saccarosio nei ratti trattati con la soluzione fisiologica (controlli) erano simili (circa 110-130; Fig. 3.1.1., pannelli A e B); questo risultato suggeriva che, nei ratti sP, l'alcol al 15% (vol/vol) e il saccarosio allo 0.3% (p/vol) hanno proprietà di rinforzo comparabili quando confrontati in un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4).

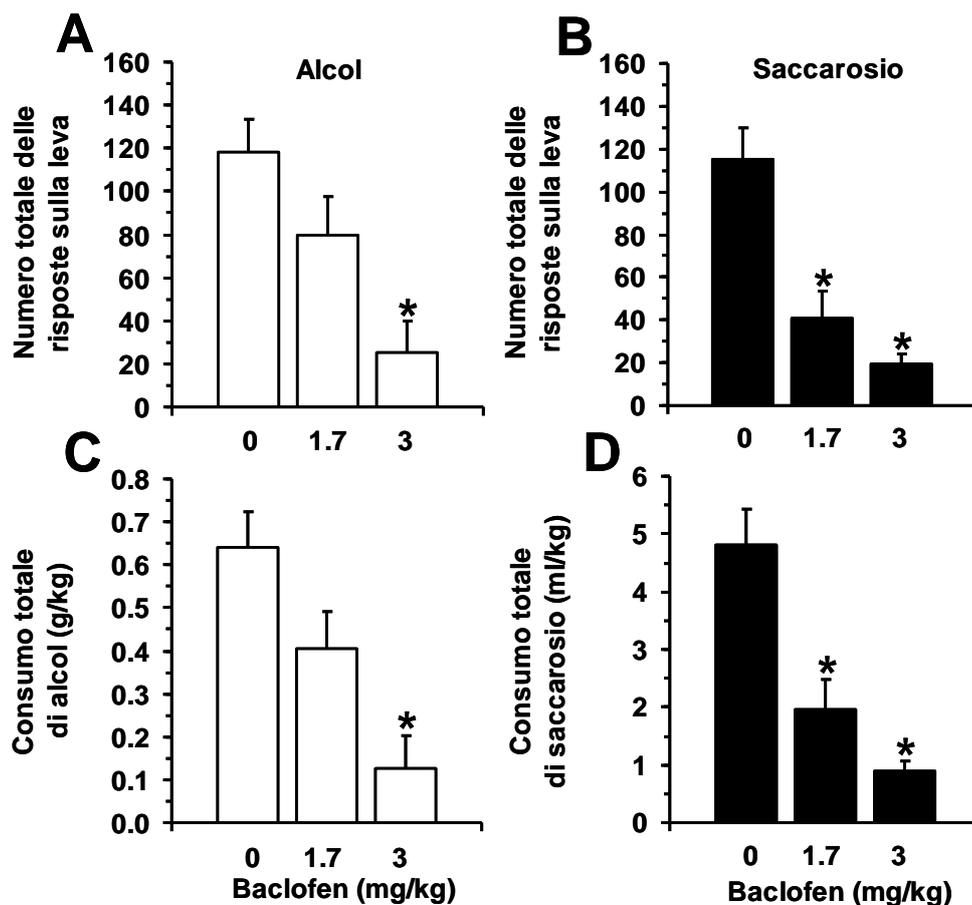


Fig. 3.1.1. Effetto del trattamento con l'agonista del recettore $GABA_B$, baclofen, sul numero totale di risposte per l'alcol o per il saccarosio (pannelli A e B) così come il consumo totale di alcol e saccarosio (pannelli C e D) nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* allenati

a premere una leva per una soluzione alcolica (15%, vol/vol) o per il saccarosio (0.3%, p/vol), utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4), in sessioni giornaliere di 30 minuti. Ciascuna barra rappresenta la media \pm S.E.M. di $n=12$ ratti per il gruppo dell'“alcol” e $n=8$ ratti per il gruppo del “saccarosio”. * $P<0.05$ rispetto ai ratti trattati con soluzioni fisiologica (test di *Newman-Keuls*).

Il trattamento con il baclofen produceva una riduzione dose-dipendente del numero totale delle risposte sulla leva per l'alcol [$F(2,35)=9.36$, $P<0.005$] (Fig. 3.1.1. pannello A). Il numero delle risposte sulla leva negli animali del gruppo “alcol” trattati con il baclofen alle dosi 1.7 e 3 mg/kg era inferiore rispettivamente del 30% e 80%, rispetto a quello registrato negli animali trattati con la soluzione fisiologica. Nel gruppo di ratti trattati con la dose 3 mg/kg di baclofen, 5/12 ratti non hanno effettuato alcuna pressione sulla leva. La riduzione del numero di risposte sulla leva indotta dal baclofen era accoppiata ad una proporzionale riduzione nella quantità di alcol auto-somministrato [$F(2,35)=10.19$, $P<0.001$] (Fig. 3.1.1. pannello C).

Il trattamento con il baclofen induceva anche una riduzione dose-dipendente del numero totale delle risposte sulla leva del saccarosio [$F(2,23)=20.79$, $P<0.0001$] (Fig. 3.1.1. pannello B). Il numero delle risposte sulla leva negli animali del gruppo “saccarosio” trattati con il baclofen alle dosi 1.7 e 3 mg/kg era inferiore rispettivamente di circa il 60% e 80%, rispetto a quello registrato negli animali trattati con la soluzione fisiologica. La riduzione del numero di risposte sulla leva indotta dal baclofen era associata ad una proporzionale riduzione della quantità di saccarosio auto-somministrato [$F(2,23)=21.33$, $P<0.001$] (Fig. 3.1.1. pannello D).

La latenza alla prima risposta per la leva dell'“alcol” incrementava notevolmente nei ratti trattati con il baclofen [$F(2,35)=33.90$, $P<0.001$] (Fig. 3.1.2. pannello A); nei 7/12 dei ratti trattati con la dose 3 mg/kg che effettuavano almeno una pressione sulla leva, la media dei valori della latenza era approssimativamente 13 volte superiore rispetto a quella registrata nei ratti trattati con la soluzione fisiologica. Al contrario, l'incremento nella latenza alla prima risposta per il saccarosio non raggiungeva la significatività statistica [$F(2,23)=1.29$, $P>0.05$] (Fig. 3.1.2. pannello B). Il trattamento con il baclofen sopprimeva anche in maniera dose-dipendente il consumo di alcol [$F(2,35)=4.83$, $P<0.05$] (Fig. 3.1.2. pannello C) e di saccarosio [$F(2,23)=27.97$, $P<0.0001$] (Fig. 3.1.2. pannello D) durante il primo *bout*.

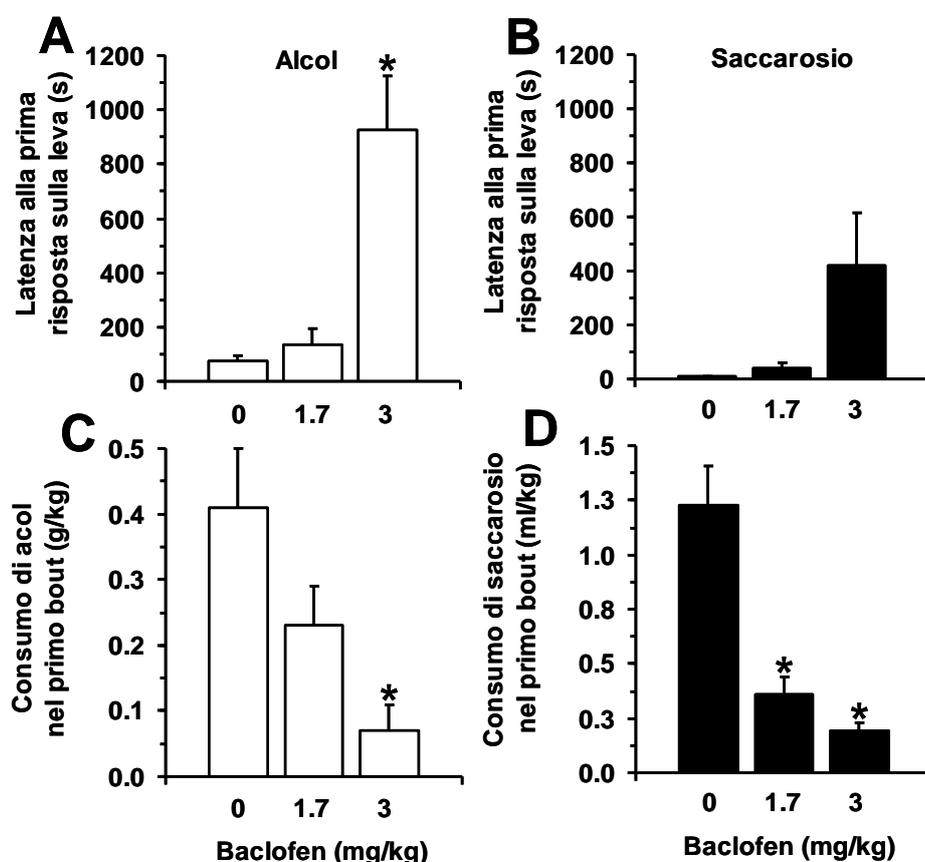


Fig. 3.1.2. Effetto del trattamento con l'agonista del recettore GABA_B, baclofen, sulla latenza alla prima pressione per l'alcol e per il saccarosio (pannelli A e B) così come il consumo di alcol e saccarosio (pannelli C e D) durante il primo *bout* (definito come l'ammontare di alcol o saccarosio consumato prima che ci sia una pausa nel comportamento di risposta sulla leva lunga almeno un minuto) nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* allenati a premere una leva per una soluzione alcolica (15%, vol/vol) o per il saccarosio (0.3%, p/vol), utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4), in sessioni giornaliere di 30 minuti. Ciascuna barra rappresenta la media \pm S.E.M. di $n=12$ ratti per il gruppo dell'"alcol" ($n=7$ nel gruppo di ratti trattati con la dose di 3 mg/kg di baclofen nel pannello A, poiché 5 ratti non effettuano nessuna risposta sulla leva) e $n=8$ ratti per il gruppo del "saccarosio" ($n=7$ nel gruppo di ratti trattati con la dose di 1.7 mg/kg di baclofen nel pannello B, poiché 1 ratto non effettua nessuna risposta sulla leva). * $P < 0.05$ rispetto ai ratti trattati con soluzione fisiologica (test di *Newman-Keuls*).

L'analisi del *pattern* cumulativo delle pressioni sulla leva, mostrato nella Fig. 3.1.3., indica che il baclofen, oltre a ridurre il comportamento di risposta sulla leva dell'alcol e del saccarosio, è efficace anche nel ridurre la frequenza della risposta sia per l'alcol che per il saccarosio. In accordo con i dati sulla latenza alla prima pressione (Fig. 3.1.2., pannelli A e B), questo effetto è particolarmente rilevante

nell'esperimento "alcol", dove il comportamento di *lever-pressing* dei ratti iniziava dopo 5-6 min dall'inizio della sessione (Fig. 3.1.3. pannello A).

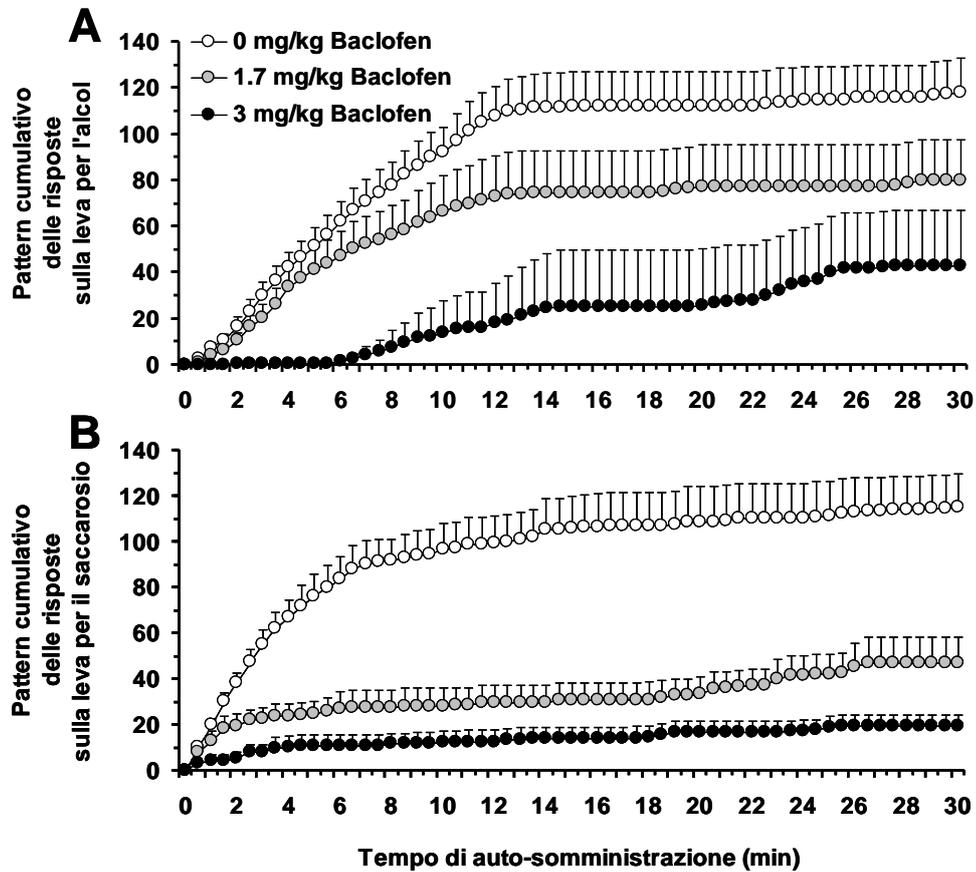


Fig. 3.1.3. Effetto del trattamento con l'agonista del recettore GABA_B, baclofen, sul *pattern* cumulativo delle risposte sulla leva per l'alcol (pannello A) o saccarosio (pannello B) nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* allenati a premere una leva per una soluzione alcolica (15%, vol/vol) o per il saccarosio (0.3%, p/vol), utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4), in sessioni giornaliere di 30 minuti. Ciascun punto rappresenta la media \pm S.E.M. del numero cumulativo di risposte durante ciascun intervallo di 30-s dell'intera sessione in $n=12$ ratti per il gruppo dell'"alcol" e $n=8$ ratti per il gruppo del "saccarosio".

3.2. Esperimento 2: Effetto del baclofen sul *breakpoint* per l'alcol

Tutti i ratti selezionati hanno acquisito e mantenuto un costante comportamento di auto-somministrazione di alcol e saccarosio. Il trattamento con il baclofen produceva una riduzione significativa e dose-dipendente del numero totale delle risposte sulla leva [F(2,26)=8.74, $P<0.005$] (Fig. 3.2. pannello A) e del valore di *breakpoint* per l'alcol [F(2,26)=10.31, $P<0.0005$] (Fig. 3.2. pannello C). I ratti trattati con la soluzione fisiologica effettuavano circa 180 pressioni sulla leva dell'"alcol", tale numero corrispondeva ad un valore di *breakpoint* di circa 50. Il numero totale di risposte sulla leva dell'"alcol" ed il valore di *breakpoint* per l'alcol nei ratti trattati con 1 e 3 mg/kg di baclofen erano inferiori rispettivamente di circa il 30% e il 55%, di quelli registrati nei ratti trattati con la soluzione fisiologica (Fig. 3.2. pannelli A e C). L'analisi al *post hoc* rivelava che sia il numero totale delle risposte sulla leva e il valore di *breakpoint* per l'alcol erano significativamente ridotti in entrambi i gruppi di ratti trattati con le due dosi di baclofen. Nei ratti trattati con la soluzione fisiologica del gruppo "saccarosio", il numero totale delle risposte sulla leva del "saccarosio" ed il valore di *breakpoint* erano approssimativamente di 160 e 45, valori comparabili con quelli registrati nei ratti trattati con la soluzione fisiologica del gruppo "alcol", suggerendo che l'alcol al 15% (vol/vol) e il saccarosio al 3% (p/vol), hanno capacità motivazionali simili nei ratti sP.

Il trattamento con il baclofen produceva una riduzione significativa e dose-dipendente del numero totale delle risposte sulla leva [F(2,26)=8.91, $P<0.005$] (Fig. 3.2. pannello B) e del *breakpoint* per il saccarosio [F(2,26)=10,44; $P<0,005$] (Fig. 3.2. pannello D). L'analisi *post hoc* rivelava che soltanto la dose di 3 mg/kg di baclofen riduceva significativamente il numero totale delle risposte sulla leva e il valore di *breakpoint* per il saccarosio.

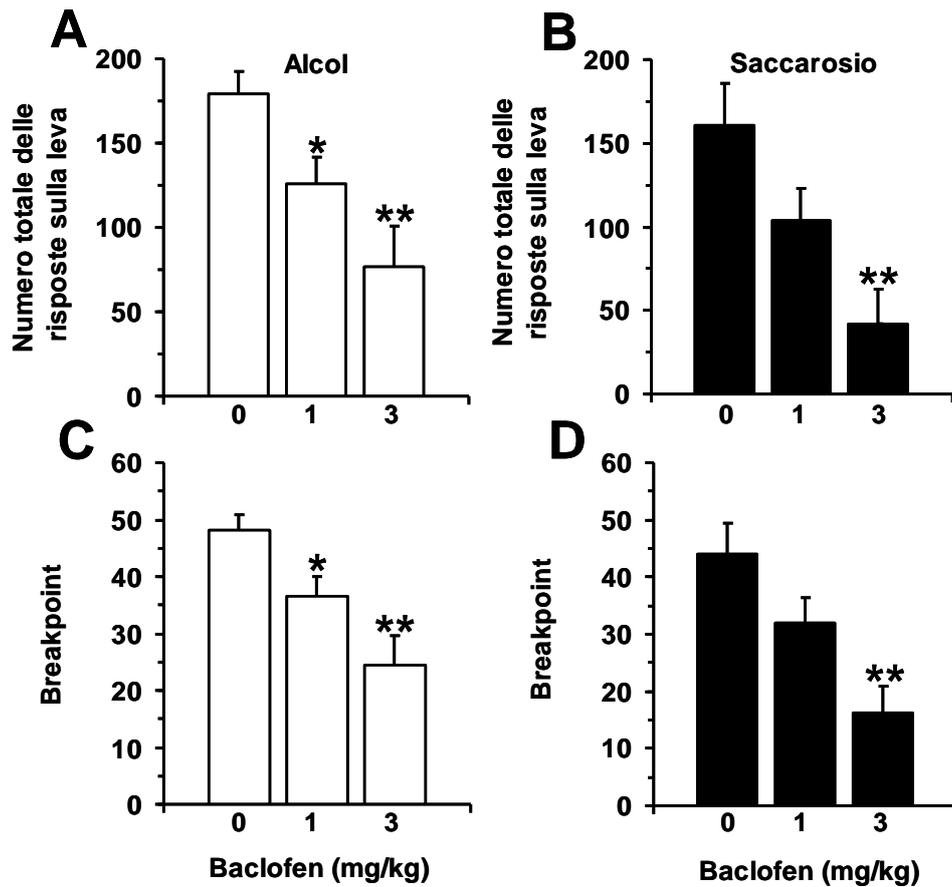


Fig. 3.2. Effetto del trattamento con l'agonista del recettore GABA_B, baclofen, sul numero totale delle risposte sulla leva per l'alcol (pannello A) o del saccarosio (pannello B), e il *breakpoint* per l'alcol (pannello C) o saccarosio (pannello D) nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* (sP). I ratti sono stati allenati a premere una leva per la soluzione alcolica al 15% vol/vol, in acqua) o saccarosio (3% p/vol, in acqua) utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4) in sessioni giornaliere di 30 minuti. Una volta che il comportamento di auto-somministrazione si era stabilizzato, i ratti venivano esposti ad un programma di richiesta progressiva del rinforzo, dove la risposta veniva incrementata progressivamente durante la sessione di 60 minuti. Il *breakpoint* era definito come la più bassa risposta richiesta non raggiunta da ciascun ratto. La soluzione fisiologica e il baclofen (1 e 3 mg/kg) sono iniettate intraperitonealmente 30 minuti prima dell'inizio della sessione test. Tutte le dosi di baclofen sono testate in ciascun ratto secondo quadrato latino. Ciascuna barra è la media di \pm S.E.M. di $n=9$ ratti *: $P<0.05$ and **: $P<0.01$ rispetto ai ratti trattati con soluzione fisiologica (test di *Newman-Keuls*).

3.3. Esperimento 3: Effetto del baclofen sull'*extinction/reinstatement* per l'alcol

Prima dell'inizio delle sessioni sperimentali di *extinction/reinstatement*, tutti gli animali rispondevano stabilmente e preferenzialmente sulla leva "attiva" (166.5 ± 18.6 risposte/sessione durante le 7 sessioni dopo l'intervento chirurgico, corrispondenti all'auto-somministrazione di 0.99 ± 0.11 g/kg/sessione) rispetto alla leva "inattiva" (0.9 ± 0.1 risposte/sessione).

Il valore medio di *extinction responding* sulla leva "attiva" era di circa 70, senza differenze significative ($P > 0.05$) tra i due gruppi di ratti che successivamente avrebbero ricevuto la soluzione fisiologica o il baclofen (Fig. 3.3.1. pannello A). Questo valore di *extinction responding* era simile a quello registrato in precedenti studi nei ratti della linea sP (Vacca e coll., 2002; Colombo e coll., 2003b) e conferma l'ipotesi che l'alcol, in tali ratti, abbia forti capacità motivazionali tali da promuovere un intenso comportamento di richiesta dell'alcol. L'estinzione del comportamento di ricerca era rapido: in entrambi i gruppi di animali la maggior parte delle risposte sulla leva veniva infatti emesso durante i primi 15 minuti della sessione. Le risposte sulla leva "inattiva", registrate in entrambi i gruppi durante la fase di *extinction responding*, erano considerate trascurabili (< 2).

Nella fase di *reinstatement*, la ripetuta presentazione del complesso di stimoli associato all'alcol promuoveva, nei ratti trattati con la soluzione fisiologica, un comportamento di ricerca per l'alcol che si manifestava con una ripresa del *lever-pressing* precedentemente estinto. Specificatamente, in questo gruppo di ratti la ripresa della risposta sulla leva "attiva" era pari a circa 40 risposte, valore che risultava essere in accordo con quanto osservato, in condizioni sperimentali virtualmente identiche, in un precedente studio di caratterizzazione della ripresa del comportamento di ricerca nei ratti sP (Maccioni e coll., 2007).

La somministrazione di 3 mg/kg di baclofen riduceva significativamente ($P < 0.01$) e di circa il 60% il valore di *reinstatement* sulla leva "attiva" rispetto al valore ottenuto nei ratti di controllo (Fig. 3.3.1. pannello B).

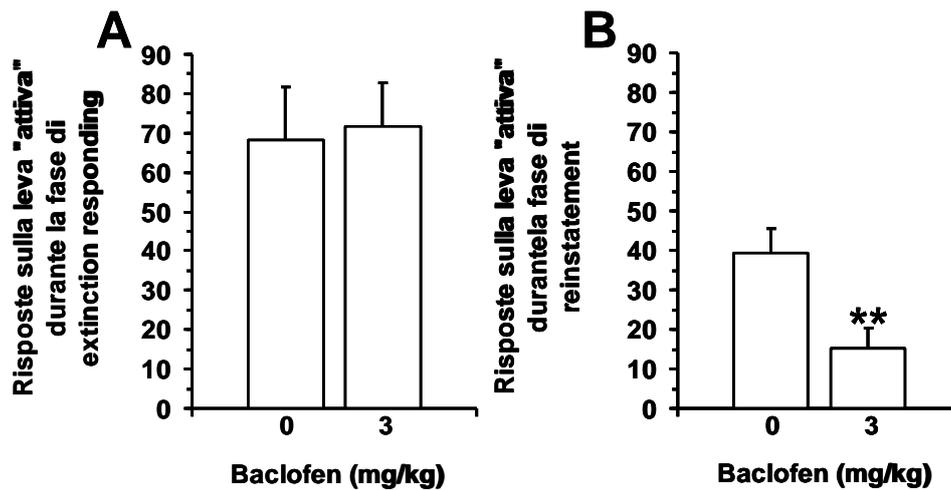


Fig 3.3.1. Numero delle risposte sulla leva "attiva" durante la fase di *extinction responding* (pannello A) e durante la fase *reinstatement* (pannello B) della sessione di *extinction/reinstatement* nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring*. I ratti sono stati allenati a premere una leva per una soluzione alcolica (15%, vol/vol) utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4), in sessioni giornaliere di 30 minuti. La durata delle sessioni di *extinction/reinstatement* erano di 70 minuti. Nei primi 60 minuti (fase di *extinction responding*) la risposta sulla leva non viene rinforzata; nei successive 10 minuti (fase di *reinstatement*), un complesso di stimoli associati all'alcol della durata di 7.5 s, veniva presentato per 15 volte, in accordo con un programma di richiesta variabile del tempo di 15 s; anche in questa fase le pressioni sulla leva non venivano mai rinforzate. L'agonista del recettore GABA_B, baclofen, veniva somministrato per *via* di un catetere intraperitoneale permanente, 30 min prima della fase di *reinstatement*. Ciascun ratto è stato sottoposto alle due sessioni di *extinction/reinstatement*, secondo il disegno della *within-session*. Le barre rappresentano la media \pm S.E.M. di $n=9$ ratti. **: $P<0.01$ rispetto ai ratti trattati con la soluzione fisiologica (test di *Mann-Whitney*).

Uno dei ratti trattati con il baclofen non effettuava alcuna risposta sulla leva "attiva" durante la fase di *reinstatement*. La latenza alla prima pressione sulla leva "attiva" era approssimativamente 8 volte più lunga nei ratti trattati con il baclofen rispetto a quelli trattati con la soluzione fisiologica ($P<0.005$) (Fig. 3.3.2. pannello A). La frequenza nella risposta era approssimativamente 2.5 volte più lenta nei ratti trattati con il baclofen rispetto a quelli trattati con la soluzione fisiologica ($P<0.05$) (Fig. 3.3.2. pannello B). Inoltre, l'intervallo di tempo impiegato per la risposta sulla leva "attiva" durante la fase di *reinstatement* era circa il 65% più breve nei ratti trattati con il baclofen rispetto a quelli trattati con la soluzione fisiologica ($P<0.001$) (Fig. 3.3.2. pannello C). Infine, le risposte sulla leva "inattiva" erano trascurabili (<3) in entrambi i gruppi di ratti anche durante la fase di *reinstatement*.

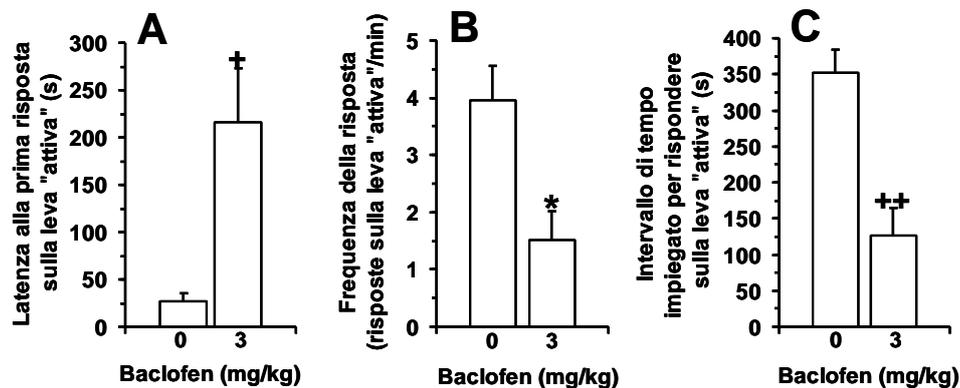


Fig. 3.3.2. Latenza alla prima pressione sulla leva "attiva" (espresso in s; pannello A), la frequenza della risposta sulla leva "attiva" (espresso come il numero di risposte/min; pannello B), e l'intervallo di tempo della risposta sulla leva "attiva" (espressa in s; pannello C) durante la fase di *reinstatement* della sessione di *extinction/reinstatement* nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* (sP). I ratti sono stati allenati a premere una leva per una soluzione alcolica (15%, vol/vol), utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4), in sessioni giornaliere di 30 minuti. La durata delle sessioni di *extinction/reinstatement* erano di 70 minuti. Nei primi 60 minuti (fase di *extinction responding*) la risposta sulla leva non viene rinforzata; nei successive 10 minuti (fase di *reinstatement*), un complesso di stimoli associati all'alcol della durata di 7.5 s, veniva rilasciato per 15 volte, in accordo con un programma di richiesta variabile del tempo di 15 s, anche in questa fase le pressioni sulla leva non venivano mai rinforzate. L'agonista del recettore GABA_B, baclofen, veniva somministrato per *via* di un catetere intraperitoneale permanente, 30 min prima della fase di *reinstatement*. Ciascun ratto è stato sottoposto alle due sessioni di *extinction/reinstatement*, secondo il disegno della *within-session*. Nel gruppo di ratti trattati con il baclofen, un ratto non riprende a premere la leva; nell'analisi della "latenza", a questo animale è stato assegnato il valore di 592.5 s (ossia, il valore totale della fase di *reinstatement*, 600 s, meno il tempo della presentazione del primo complesso di stimoli); al contrario è stato incluso nell'analisi della frequenza della risposta e nell'intervallo di tempo impiegato per la risposta sulla leva "attiva". Le barre sono la media \pm S.E.M. di $n=8-9$ ratti. *: $P<0.05$; +: $P<0.005$; and ++: $P<0.001$; rispetto ai ratti trattati con soluzione fisiologica (test di *Mann-Whitney*).

La Fig. 3.3.3. mostra i *pattern* cumulativi delle pressioni sulla leva "attiva" durante la fase di *reinstatement* sia del gruppo di ratti trattati con la soluzione fisiologica sia del gruppo di ratti trattati con il baclofen. L'ANOVA rivelava un significativo effetto del trattamento con il baclofen, e dell'interazione tra il fattore trattamento ed il fattore tempo, nella fase di *reinstatement*, sul *pattern* cumulativo della risposta

$$[F_{\text{trattamento}}(1,16)=12.67, \quad P<0.005;$$

$F_{tempo}(19,304)=29.35, P<0.0001; F_{interazione}(19,304)=7.49, P<0.0001]$. In accordo con i dati riportati precedentemente, il baclofen ritardava l'inizio della ripresa della risposta, riduceva la frequenza della risposta (come indicato dalla minore pendenza della retta estrapolata dalla curva di risposta) e il valore complessivo delle risposte sulla leva "attiva".

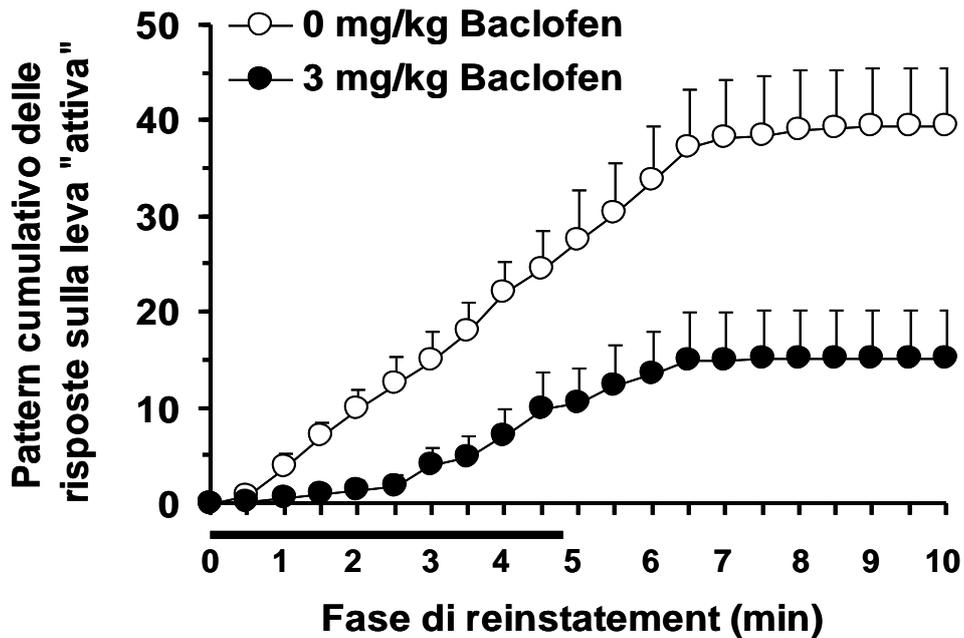
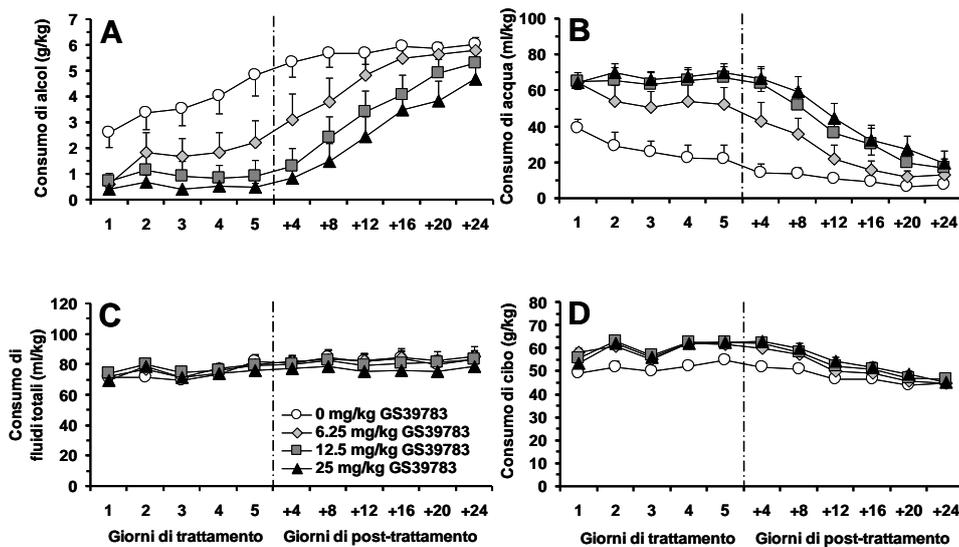


Fig. 3.3.3. *Pattern* cumulativi delle pressioni sulla leva "attiva" durante la fase di *reinstatement* delle sessioni di *extinction/reinstatement* nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* (sP). I ratti sono stati allenati a premere una leva per una soluzione alcolica (15%, vol/vol), utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4), in sessioni giornaliere di 30 minuti. La durata delle sessioni di *extinction/reinstatement* erano di 70 minuti. Nei primi 60 minuti (fase di *extinction responding*) la risposta sulla leva non viene rinforzata; nei successive 10 minuti (fase di *reinstatement*), un complesso di stimoli associati all'alcol della durata di 7.5 s, viene rilasciato per 15 volte, in accordo con un programma di richiesta variabile del tempo di 15 s, anche in questa fase le pressioni sulla leva non venivano mai rinforzate. L'agonista del recettore GABA_B, baclofen, veniva somministrato per *via* di un catetere intraperitoneale permanente, 30 min prima della fase di *reinstatement*. Tutti i ratti sono stati suddivisi in maniera bilanciata in due sessioni sperimentali, secondo il disegno della *within-session*. La linea nera orizzontale sotto l'asse delle ascisse indica l'intervallo di tempo durante il quale il complesso di stimoli veniva ripetutamente presentato. I punti sono la media \pm S.E.M. of $n=9$ ratti.

3.4. Esperimento 4: Effetto del GS39783 sul consumo di alcol misurato con la procedura della libera scelta tra due bottiglie

Nell'esperimento di "acquisizione" (ratti *alcohol-naive*), la media giornaliera del consumo di alcol nei ratti trattati con il veicolo raggiungeva 5-6 g/kg/giorno [che risulta essere la quantità di alcol usualmente consumata in un periodo di 24 ore dai ratti sP (Colombo e coll., 2002)] nel giro di 4-5 giorni dall'inizio dell'esposizione al regime di libera scelta tra le due bottiglie (Fig. 3.4.1. pannello A). La somministrazione ripetuta di GS39783 riduceva in maniera dose-dipendente il consumo giornaliero di alcol e induceva una soppressione dell'acquisizione del comportamento consumatorio di alcol [$F(3,144)=7.77$, $P<0.0005$] (Fig. 3.4.1. pannello A); nei gruppi di ratti trattati con le dosi 12.5 e 25 mg/kg di GS39783, la media giornaliera del consumo di alcol era stabilmente più bassa di 1 g/kg durante tutti i 5 giorni del periodo di trattamento.

Il consumo giornaliero di acqua era più alto nei ratti trattati con il GS39783 rispetto a quello dei ratti trattati con il veicolo [$F(3,144)=8.84$, $P<0.0005$] (Fig. 3.4.1. pannello B), così che il consumo dei fluidi totali non risultava essere alterato dal trattamento con il GS39783 [$F(3,144)=0.23$, $P<0.05$] (Fig. 3.4.1. pannello C). Il consumo giornaliero di cibo era più alto nei ratti trattati con il GS39783 rispetto ai ratti trattati con il veicolo [$F(3,144)=5.83$, $P<0.005$] (Fig. 3.4.1. pannello D).



3.4.1. Effetto della somministrazione ripetuta del modulatore allosterico positivo del recettore GABA_B, GS39783, sull'acquisizione del comportamento consumatorio di alcol in ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* (sP), *alcohol-naive*. Il GS39783 (0, 6.25, 12.5, 25 mg/kg; i.g.), è stato somministrato una volta al giorno (60 minuti prima dello spegnimento della luce), per 5 giorni consecutivi. Alcol (10% v/v) e acqua venivano offerti sotto il regime della libera scelta tra due bottiglie, con illimitato accesso per 24 h/giorno a partire da 60 minuti dopo la somministrazione del GS39783. Il cibo era sempre disponibile. Il consumo di alcol, acqua e cibo veniva registrato ogni giorno immediatamente prima dello spegnimento della luce. La linea tratteggiata indica il termine del periodo dei 5 giorni di trattamento e l'inizio del periodo di successivo al trattamento. Ciascun punto è la media ± S.E.M. of $n=10$ ratti.

Successivamente al periodo di trattamento, il consumo giornaliero di alcol nei ratti trattati rispettivamente con 6.25, 12.5 e 25 mg/kg di GS39783 raggiungeva i livelli dei consumi di alcol dei ratti di controllo in 9, 15 e 24 giorni [$F(3,828)=5.76$, $P<0.005$] (Fig. 3.4.1. pannello A). Il consumo giornaliero di acqua negli animali trattati con il GS39783 diminuiva progressivamente [$F(3,828)=7.97$, $P<0.0005$] (Fig. 3.4.1. pannello B), così che il consumo giornaliero di fluidi totali rimaneva inalterato tra i gruppi [$F(3,828)=0.58$, $P>0.05$] (Fig. 3.4.1. pannello C). Il consumo giornaliero di cibo, che era inizialmente più alto negli animali trattati con il GS39783, raggiungeva i livelli di controllo nei giorni successivi al trattamento [$F(3,828)=3.80$, $P<0.05$] (Fig. 3.4.1 pannello D).

Nell'esperimento di "mantenimento", le medie giornaliere dei consumi di alcol nei ratti trattati con il veicolo si aggiravano sui 6 g/kg. La somministrazione ripetuta di 100 mg/kg di GS39783 riduceva il consumo giornaliero di alcol del 30-40% quando paragonato al consumo dei ratti trattati con il veicolo [$F(2,76)=6.03$, $P<0.01$] (Fig. 3.4.2. pannello A); questo effetto era evidente, comunque, solo nei primi 2 giorni di trattamento.

Un incremento nel consumo giornaliero di acqua [$F(2,76)=9.12$, $P<0.005$] (Fig. 3.4.2. pannello B) compensava la riduzione del consumo di alcol, così che i fluidi totali rimanevano invariati [$F(2,76)=0.82$, $P>0.05$] (Fig. 3.4.2. pannello C). Il trattamento con il GS39783 non alterava il consumo giornaliero di cibo [$F(2,76)=2.71$, $P>0.05$] (Fig. 3.4.2. pannello D).

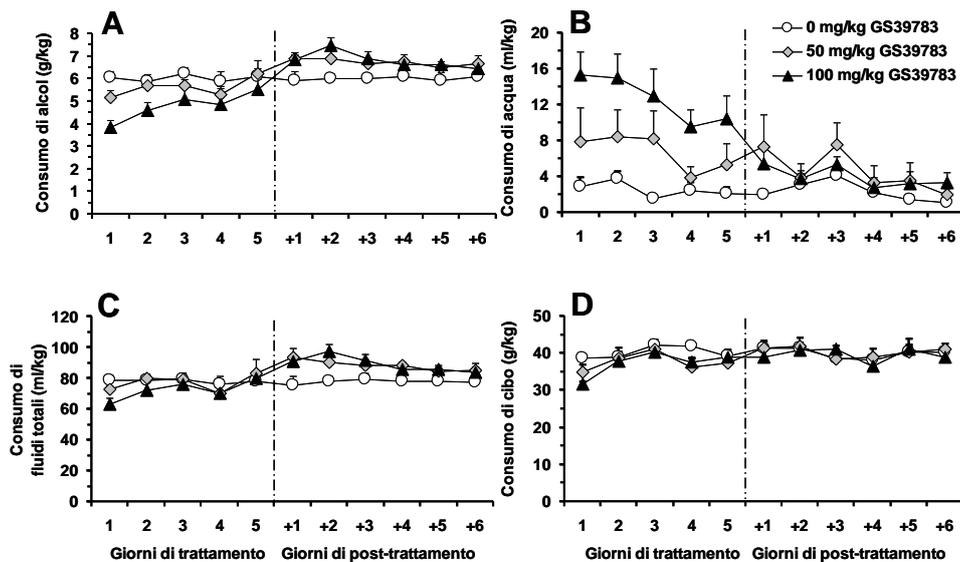


Fig. 3.4.2. Effetto della somministrazione ripetuta del modulatore allosterico positivo del recettore GABA_B, GS39783, sul mantenimento del comportamento consumatorio di alcol in ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* (sP). Il GS39783 (0, 50, 100 mg/kg; i.g.), è stato somministrato una volta al giorno (60 minuti prima dello spegnimento della luce), per 5 giorni consecutivi. Alcol (10% v/v) e acqua venivano offerti sotto il regime della libera scelta tra due bottiglie, con illimitato accesso per 24 h/giorno a partire da 60 minuti dopo la somministrazione del GS39783. Il cibo era sempre disponibile. Il consumo di alcol, acqua e cibo veniva registrato ogni giorno immediatamente prima dello spegnimento della luce. La linea tratteggiata indica il termine del periodo dei 5 giorni di trattamento e l'inizio del periodo di successivo al trattamento. Ciascun punto è la media \pm S.E.M. of $n=10$ ratti.

Nei primi due giorni dopo il termine del trattamento con il GS39783, il consumo giornaliero di alcol era più alto nei ratti precedentemente trattati con il GS39783 rispetto ai ratti trattati con il veicolo [$F(2,95)=3.84$, $P<0.05$] (Fig. 3.4.2. pannello A). Per quanto riguarda i consumi giornalieri di acqua [$F(2,95)=0.78$, $P>0.05$] (Fig. 3.4.2. pannello B) e di cibo [$F(2,95)=0.11$, $P>0.05$] (Fig. 3.4.2. pannello D), non si registravano differenze tra i gruppi. Come conseguenza all'incremento nel consumo di alcol e dell'assenza di variazioni nel consumo di acqua, i consumi giornalieri dei fluidi totali tendevano ad essere più alti nei ratti precedentemente trattati con il GS39783 rispetto ai ratti trattati precedentemente con il veicolo [$F(2,95)=4.40$, $P<0.05$] (Fig. 3.4.2. pannello C).

3.5. Esperimento 5: Effetto del GS39783 sull'auto-somministrazione di alcol

Tutti i ratti selezionati acquisivano e mantenevano il comportamento di auto-somministrazione di alcol e saccarosio. Nei ratti trattati con il veicolo (ratti di controllo) il numero totale delle risposte sulla leva per l'alcol (15% vol/vol) e per il saccarosio (0.3% p/vol) era molto simile (si aggirava tra le 150-180 pressioni in 30 minuti di sessione, Fig. 3.5.1 pannelli A e B) come già detto precedentemente (esperimento 1), avendo alcol e saccarosio proprietà di rinforzo simili quando sottoposti ad un programma di richiesta fissa del rinforzo.

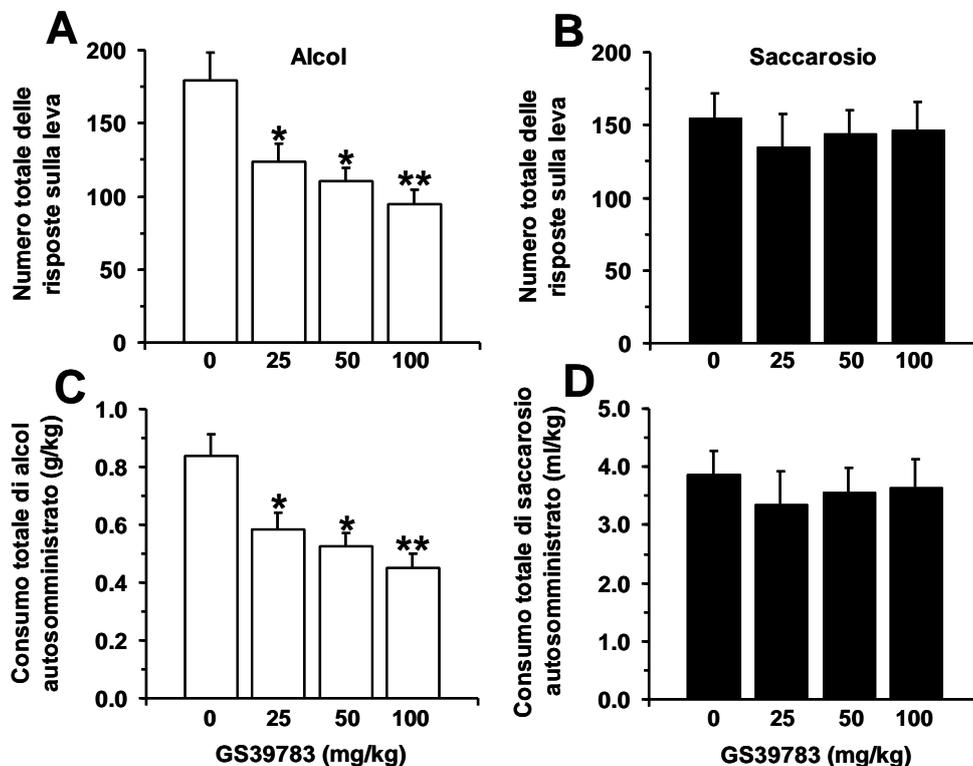


Fig. 3.5.1. Effetto del trattamento con differenti dosi (somministrate intragastricamente) del modulatore allosterico positivo del recettore GABA_B, GS39783, sul numero totale delle risposte sulla leva per l'alcol (pannello A) o per il saccarosio (pannello B), il consumo totale di alcol auto-somministrato (pannello C), o saccarosio (pannello D) nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* (sP) allenati a premere una leva per una soluzione alcolica (15%, vol/vol, FR4) o per il saccarosio (0.3%, p/vol, FR4), e acqua (FR1), in sessioni giornaliere di 30 minuti. Ciascuna barra rappresenta la media \pm S.E.M. di $n=12$ ratti per il gruppo dell'"alcol" e $n=8$ ratti per il gruppo del "saccarosio". * $P < 0.05$ e ** $P < 0.005$ rispetto ai ratti trattati con il veicolo (test di *Newman-Keuls*).

Le risposte sulla leva dell'acqua erano trascurabili (<2) sia nel gruppo "alcol" che nel gruppo "saccaroso", durante l'intera fase di mantenimento, così come in entrambi i gruppi trattati con il veicolo durante la sessione sperimentale.

Il trattamento con il GS39783 induceva una riduzione dose-dipendente del numero totale delle risposte sulla leva dell'"alcol" [$F(3,44)=7.64, P<0.0005$] (Fig. 3.5.1. pannello A). Specificatamente, il numero delle risposte sulla leva nei gruppi di ratti "alcol" trattati con 25, 50 e 100 mg/kg di GS39783 era inferiore rispettivamente di circa 30, 40, 50%, di quelli registrati nei ratti trattati con il veicolo. L'analisi *post hoc* rivelava che tutte e tre le dosi di GS39783 riducevano - rispetto al valore del controllo - il numero totale delle risposte sulla leva per l'alcol (25 mg/kg, $P<0.05$, 50 mg/kg, $P<0.05$; 100 mg/kg, $P<0.005$). La riduzione indotta dal GS39783 nel numero totale delle risposte sulla leva per l'alcol risultava in una proporzionale riduzione della quantità di alcol auto-somministrata [$F(3,44)=8.48, P<0.0005$] (Fig. 3.5.1. pannello C). La latenza alla prima pressione sulla leva dell'"alcol" non veniva alterata in maniera significativa dal trattamento con il GS39783 [$F(3,44)=0.68, P>0.05$] (Fig. 3.5.2. pannello A). Contrariamente, il trattamento con il GS39783 produceva una riduzione della quantità di alcol auto-somministrato nel corso del primo *bout* della sessione [$F(3,44)=3.73, P<0.05$] (Fig. 3.5.2. pannello C). L'analisi *post hoc* rivelava che questa riduzione raggiungeva la significatività statistica solo alla dose di 100 mg/kg di GS39783 (25 mg/kg, $P>0.05$, 50 mg/kg, $P>0.05$, 100 mg/kg, $P<0.05$). Infine, l'auto-somministrazione di acqua non veniva alterata in seguito al trattamento con il GS39783 [$F(3,44)=0.95, P>0.05$] (dati non riportati).

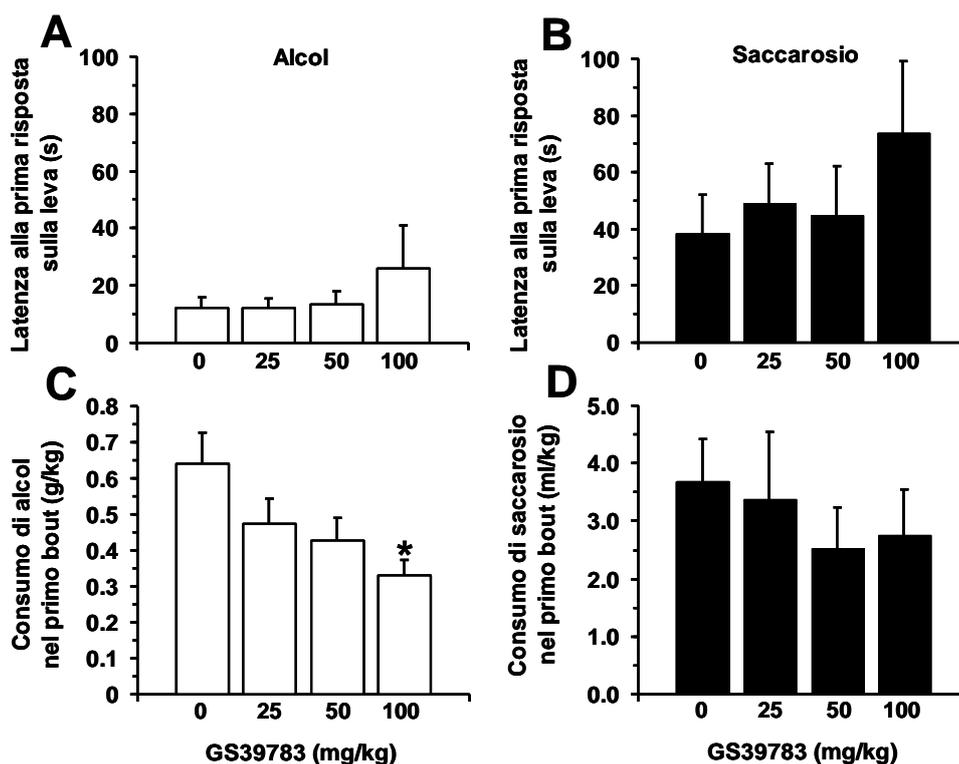


Fig. 3.5.2. Effetto del trattamento con differenti dosi (somministrate intragastricamente) del modulatore allosterico positivo del recettore GABA_B, GS39783, sulla latenza alla prima pressione (espressa in s) per l'alcol (pannello A) e per il saccarosio (pannello B) così come il consumo di alcol (pannello C) e saccarosio (pannello D) durante il primo *bout* (definito come l'ammontare di alcol o saccarosio consumato prima che ci sia una pausa nel comportamento di risposta sulla leva lunga almeno un minuto) nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* allenati a premere una leva per una soluzione alcolica (15%, vol/vol, FR4) o per il saccarosio (0.3%, p/vol, FR4) e per l'acqua (FR1), in sessioni giornaliere di 30 minuti. Ciascuna barra rappresenta la media \pm S.E.M. di $n=12$ ratti per ciascun gruppo. * $P<0.05$ rispetto ai ratti trattati con il veicolo (test di *Newman-Keuls*).

La Fig. 3.5.3. pannello A, mostra il *pattern* cumulativo delle risposte dell'auto-somministrazione di alcol dopo il trattamento con il GS39783; in accordo con i dati sopra indicati, il trattamento con il GS39783 non aveva alcun effetto sulla frequenza iniziale delle pressioni sulla leva "attiva", mentre si riduceva in maniera dose-dipendente il valore con il quale la risposta per l'alcol raggiungeva il suo *plateau*.

Per contro, il trattamento con il GS39783 non alterava (a) il numero totale delle risposte per il saccarosio [$F(3,44)=0.19$, $P>0.05$] (Fig. 3.5.1. pannello B), (b) la quantità di saccarosio auto-somministrato [$F(3,44)=0.12$, $P>0.05$] (Fig. 3.5.1. pannello D), (c) la latenza alla prima pressione sulla leva del "saccarosio" [$F(3,44)=0.78$, $P>0.05$] (Fig. 3.5.2.

pannello B), (d) la quantità di saccarosio auto-somministrato nel corso del primo *bout* [$F(3,44)=0.32$, $P>0.05$] (Fig. 3.5.2. pannello D). L'analisi del *pattern* cumulativo delle risposte dell'auto-somministrazione di saccarosio dopo il trattamento con il GS39783 indica che non c'era alterazione in alcuna delle fasi della sessione (Fig. 3.5.3. pannello B). Il trattamento con il GS39783 non alterava neanche la risposta sulla leva dell'acqua [$F(3,44)=0.92$, $P>0.05$] (dati non mostrati).

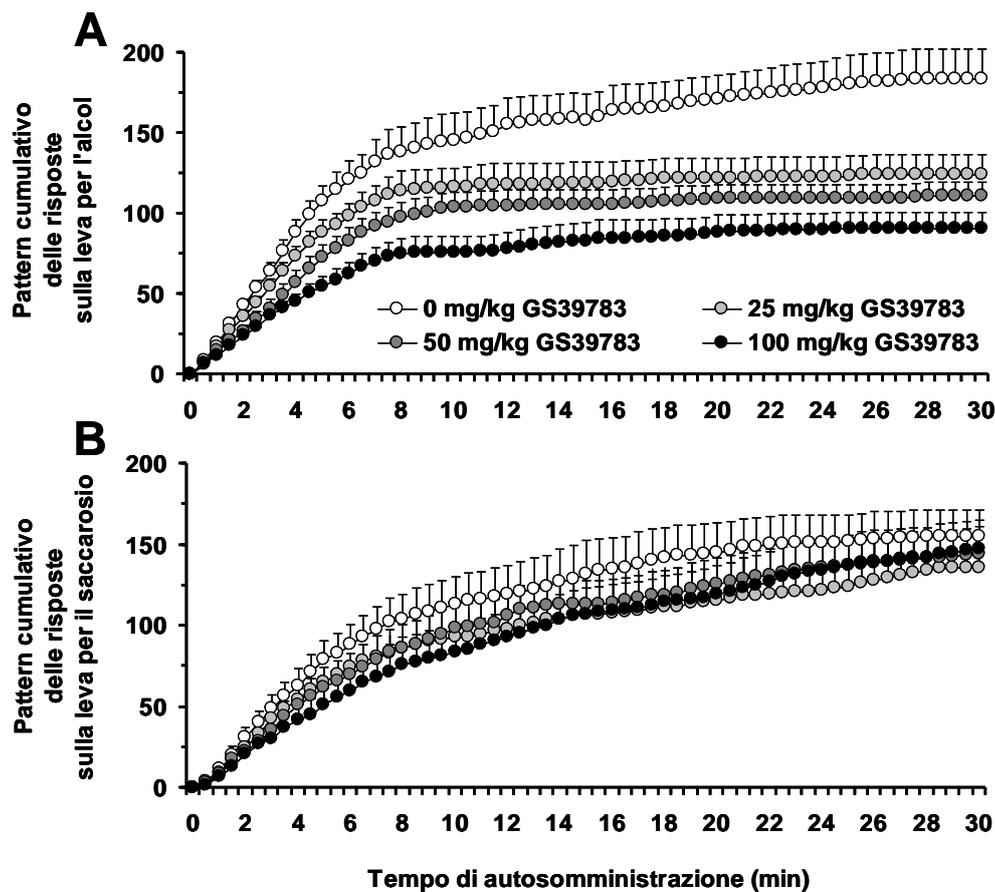


Fig. 3.5.3. Effetto del trattamento con differenti dosi (somministrate intragastricamente) del modulatore allosterico positivo del recettore GABA_B GS39783, sul *pattern* cumulativo delle risposte sulla leva per l'alcol (pannello A) o saccarosio (pannello B) nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* allenati a premere una leva per una soluzione alcolica (15% vol/vol, FR4) o per il saccarosio (0.3% p/vol, FR4) e per l'acqua (FR1), in sessioni giornaliere di 30 minuti. Ciascun punto rappresenta la media \pm S.E.M. del numero cumulativo di risposte durante ciascun intervallo di 30-s dell'intera sessione in $n=12$ ratti per ciascun gruppo.

3.6. Esperimento 6: Effetto del GS39783 sul *breakpoint* per l'alcol

Il trattamento con il GS39783 risultava in una riduzione significativa e dose-dipendente del numero totale delle risposte sulla leva [F(3,47)=4.77, $P<0.01$] (Fig. 3.6. pannello A) e del *breakpoint* per l'alcol [F(3,47)=5.10, $P<0.01$] (Fig. 3.6. pannello C). Nei ratti trattati con il veicolo il numero di pressioni sulla leva dell'“alcol” ed il valore di *breakpoint* era simile a quanto osservato nell'esperimento con il baclofen (vedi Esperimento 2). Il numero totale di risposte sulla leva ed il *breakpoint* per l'alcol nei ratti trattati con le dosi di GS39783 di 25, 50 e 100 mg/kg era inferiore rispettivamente di circa 25%, 30% e 40%, rispetto al valore registrato nei ratti trattati con il veicolo (Fig. 3.6. pannello A).

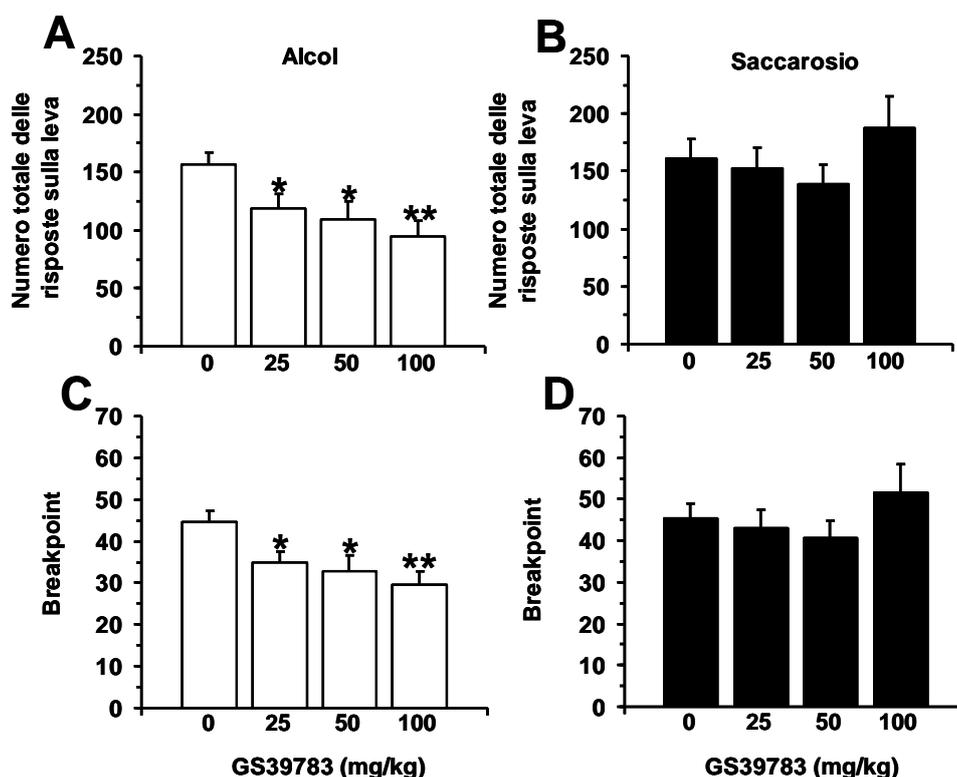


Fig. 3.6. Effetto del trattamento con il modulatore allosterico positivo del recettore GABA_B, GS39783, sul numero totale delle risposte sulla leva per l'alcol (pannello A) o per il saccarosio (pannello B), e il *breakpoint* per l'alcol (pannello C) o per il saccarosio (pannello D) nei ratti della linea *Sardinian alcohol-preferring* (sP). I ratti sono stati allenati a premere una leva per la soluzione alcolica al 15% vol/vol, in acqua) o saccarosio (3% p/vol, in acqua) utilizzando un programma di richiesta fissa del rinforzo (FR4) in sessioni giornaliere di 30 minuti. Una volta che il comportamento di auto-somministrazione si era stabilizzato, i ratti venivano esposti ad un programma di richiesta progressiva del rinforzo, dove la risposta veniva incrementata progressivamente in durante la

sessione di 60 minuti. Il *breakpoint* era definito come la più bassa risposta richiesta non raggiunta da ciascun ratto. L'acqua o il GS39783 (25, 50, e 100 mg/kg) sono somministrate intragastricamente 60 minuti prima dell'inizio della sessione test. Tutte le dosi di GS39783 sono testate per ciascun ratto secondo quadrato latino. Ciascuna barra è la media di \pm S.E.M. di $n=12$ ratti *: $P<0.05$ and **: $P<0.01$ rispetto ai ratti trattati con il veicolo (test di *Newman-Keuls*).

L'analisi *post hoc* rivelava che sia il numero totale delle risposte sulla leva che il *breakpoint* per l'alcol erano significativamente ridotti in tutti i tre gruppi di ratti trattati con il GS39783.

Nei ratti di controllo del gruppo "saccarosio", il numero totale delle risposte e il *breakpoint* per il saccarosio erano comparabili con quelli registrati nei ratti di controllo del gruppo "alcol", così come con i valori registrati nell'esperimento con il baclofen. Il trattamento con il GS39783 non alterava il numero totale delle risposte sulla leva [$F(3,47)=1.32$, $P>0.05$] (Fig. 3.6. pannello B) e il *breakpoint* per il saccarosio [$F(3,47)=1.29$, $P>0.05$] (Fig. 3.6. pannello D).

4. DISCUSSIONE

Esperimento 1: Effetto del baclofen sull'auto-somministrazione di alcol

Il trattamento con il baclofen, agonista diretto del recettore GABA_B, risultava in una riduzione dose-dipendente dell'auto-somministrazione orale di alcol, nei ratti alcol-preferenti della linea sP. La risposta alcol-rinforzata, espressa come il numero delle pressioni sulla leva dell'“alcol” a cui corrisponde l'erogazione di alcol, veniva ridotta di circa l'80% nei ratti trattati con 3 mg/kg di baclofen (rispetto a quanto registrato nei ratti di controllo trattati con la soluzione fisiologica). La quantità di alcol auto-somministrata durante il primo *bout* della sessione, così come la complessiva quantità di alcol consumata, erano anch'esse ridotte in maniera dose-dipendente dal trattamento col baclofen. Nel gruppo di ratti trattati con 3 mg/kg di baclofen, 5/12 ratti non hanno effettuato alcuna pressione sulla leva per l'alcol durante l'intera sessione sperimentale. Questi risultati suggeriscono che il baclofen riduceva gli effetti rinforzanti dell'alcol, ed estendono a procedure operanti di auto-somministrazione di alcol i precedenti risultati sulla capacità del baclofen di sopprimere il consumo volontario di alcol in ratti sP esposti alla libera scelta tra due bottiglie contenenti, rispettivamente, una soluzione alcolica e l'acqua (Colombo e coll., 2000; 2002; 2003a; 2003b).

Un aspetto importante negli studi sull'effetto di un determinato farmaco sull'auto-somministrazione di alcol è costituito dalla specificità di tale effetto. A tale scopo, nel presente studio, l'effetto del baclofen sull'auto-somministrazione di alcol è stato confrontato all'effetto delle stesse dosi di baclofen sull'auto-somministrazione di una soluzione di saccarosio (ovvero, un rinforzo alternativo). Si noti che la soluzione alcolica al 15% (vol/vol) e quella di saccarosio al 0.3% (p/vol) utilizzate nel presente studio possedevano proprietà di rinforzo simili, poiché rinforzavano livelli di comportamento virtualmente equivalenti. Il trattamento con il baclofen produceva anche una marcata riduzione della risposta saccarosio-rinforzata, suggerendo pertanto la modesta specificità dell'effetto del farmaco sull'auto-somministrazione di alcol. Questa mancata specificità è simile a quella osservata precedentemente da Anstrom e coll. (2003) e Janak e Gill (2003) in ratti *Long-*

Evans esposti all'auto-somministrazione di alcol e di saccarosio.

Come riportato sopra, 3 mg/kg di baclofen sopprimevano completamente la risposta alcol-rinforzata di 5 ratti su 12. Nei rimanenti 7 ratti, questa dose di baclofen produceva un evidente aumento della latenza alla risposta alcol-rinforzata, come indicato dall'incremento di circa 10 volte del tempo trascorso tra l'avvio della sessione e la prima risposta sulla leva di questo gruppo di ratti, quando paragonati a quelli trattati con la soluzione fisiologica. Questo ritardo è molto ben visibile nella Fig. 3.1.3. pannello A, che descrive il *pattern* cumulativo della risposta, e suggerisce che il baclofen ha la capacità di ridurre la motivazione dei ratti ad iniziare la ricerca ed il consumo di alcol. Questo effetto è piuttosto specifico per le proprietà motivazionali dell'alcol, poiché tutti i ratti appartenenti al gruppo "saccarosio", trattati con il baclofen, iniziavano a premere la leva immediatamente dopo l'inizio della sessione, senza manifestare alcun apprezzabile ritardo alla prima pressione. Questi risultati sono in accordo con quanto osservato in precedenti studi, che dimostravano come dosi di baclofen all'interno dello stesso *range* di quello usato per questa serie di esperimenti, sopprimeva in maniera dose-dipendente e specificatamente l'*extinction responding* per l'alcol in ratti sP (Colombo e coll., 2003b). L'*extinction responding* per l'alcol – definito come il massimo numero di pressioni sulla leva (precedentemente rinforzata con l'alcol) effettuate dal ratto in assenza dell'alcol rappresenta un validato indice delle proprietà motivazionali dell'alcol (Markou e coll., 1993; Vacca e coll., 2002).

In ulteriore accordo con i risultati del presente studio, la somministrazione di baclofen produceva una marcata inibizione della risposta per l'alcol durante la parte iniziale della sessione operante anche nei ratti *Long-Evans* usati nello studio di Anstrom e coll., (2003). È interessante notare che il baclofen induce una riduzione nell'auto-somministrazione endovenosa di cocaina nei ratti, accoppiata con un periodo di completa soppressione della risposta proprio nella fase iniziale della sessione (Brebner e coll., 2000a).

L'apparente maggiore efficacia del baclofen nel sopprimere le proprietà motivazionali dell'alcol piuttosto che le componenti di rinforzo del comportamento di auto-somministrazione dell'alcol suggeriscono (a) una possibile dissociazione dei meccanismi neuronali che sono alla base di tali fenomeni, e (b) che le componenti motivazionali sono particolarmente sensibili all'attivazione farmacologica dei recettori GABA_B.

Con la dovuta cautela richiesta quando si paragonano dati generati in studi sui ratti a quelli ottenuti in studi clinici, la riduzione baclofen-indotta nella motivazione ad iniziare a consumare l'alcol è comparabile alla soppressione del pensiero ossessivo-compulsivo per l'alcol osservata nell'alcolista in trattamento con il baclofen (Addolorato e coll., 2000; 2002; Flannery e coll., 2004; Ameisen, 2005; Agabio e coll., 2007; Bucknam, 2007).

Precedenti osservazioni sperimentali dimostrano che le dosi di baclofen utilizzate nel presente studio sono inferiori a quelle che interferiscono con l'attività locomotoria spontanea nei ratti sP, come dimostrato in due esperimenti precedenti dove i ratti erano esposti, dopo somministrazione di baclofen, in un *open field arena* (Colombo e coll., 2003a; 2003b); questi risultati suggeriscono che la riduzione nella risposta per l'alcol osservata nel presente studio non è da attribuire, in alcuna misura, all'incoordinazione motoria o alla sedazione baclofen-indotta (che potrebbero teoricamente alterare la normale capacità dell'animale di premere la leva).

Esperimento 2: Effetto del baclofen sul *breakpoint* per l'alcol

Il trattamento con il baclofen induceva una riduzione del *breakpoint* per l'alcol (indice delle sue proprietà motivazionali) nei ratti sP. Questi risultati suggeriscono che la stimolazione del recettore GABA_B, riduceva la motivazione dei ratti sP a consumare l'alcol. I risultati ottenuti nel presente studio sono in accordo con l'effetto riducente osservato in studi di a) *extinction responding* per l'alcol in ratti sP (Colombo e coll., 2003b) e in ratti *Long-Evans* (Leite-Morris e Czachowski, 2006), b) *breakpoint* per l'alcol in ratti *Wistar* (Walker e Koob, 2007).

Le dosi di baclofen (1 e 3 mg/kg, i.p.) saggiate nel presente studio erano inferiori a quelle che producono ipomotilità e incoordinazione motoria (Colombo e coll., 2003a; 2003b), permettendo pertanto di escludere che la riduzione del *breakpoint* per l'alcol fosse, anche soltanto in parte, attribuibile ad un effetto sedativo del baclofen.

Esperimento 3: Effetto del baclofen sull'*extinction/reinstatement* per l'alcol

La ripetuta presentazione non contingente di un complesso di stimoli precedentemente associato all'alcol promuoveva la ripresa del comportamento di risposta sulla leva per l'alcol, precedentemente estinto, nei ratti sP trattati con la soluzione fisiologica. Questi dati replicano quelli ottenuti in un recente studio di caratterizzazione del fenomeno del *reinstatement* per l'alcol nei ratti sP (Maccioni e coll., 2007), dove la ripetuta presentazione del complesso di stimoli associato all'alcol era in grado di promuovere una robusta ripresa del comportamento di ricerca dell'alcol.

Il trattamento con 3 mg/kg di baclofen, somministrati durante la sessione quando la risposta per l'alcol era già completamente estinta, produceva una marcata soppressione della successiva fase di ripresa della risposta. Il numero medio delle risposte sulla leva "attiva" (ovvero quella accoppiata alla precedente disponibilità dell'alcol) nei ratti trattati con il baclofen era meno della metà di quella registrata nei ratti trattati con la soluzione fisiologica. Inoltre, la somministrazione di baclofen induceva una latenza alla prima pressione durante la fase di *reinstatement* che risultava essere circa 8 volte più lunga rispetto a quella osservata nei ratti di controllo, suggerendo come il baclofen riducesse anche la motivazione alla ricerca dell'alcol.

La somministrazione di baclofen riduceva anche alcuni altri parametri correlati alla ricerca dell'alcol, come la frequenza di risposte sulla leva "attiva" e l'intervallo di tempo durante il quale i ratti rispondevano sulla leva. Questi risultati suggeriscono che il comportamento di ricerca dell'alcol nei ratti trattati con il baclofen era meno intenso e meno esteso nel tempo rispetto a quanto osservato nei ratti di controllo. Queste osservazioni sono ancor più chiare osservando la Fig. 3.3.3., nella quale è mostrato il *pattern* cumulativo delle risposte sulla leva "attiva", durante la fase di *reinstatement*, dei ratti di controllo e dei ratti trattati con il baclofen. Specificatamente, i ratti trattati con il veicolo iniziavano a premere la leva "attiva" immediatamente dopo la presentazione del primo complesso di stimoli associato all'alcol e tale comportamento era mantenuto con una frequenza costante per circa 7 minuti (incluso anche il periodo di circa 2.5 minuti dopo il rilascio dell'ultimo complesso di stimoli associato all'alcol). Per contro, i ratti trattati con il baclofen mostravano una iniziale fase in cui non si verificava alcuna risposta sulla leva "attiva"; inoltre, l'analisi della curva del *cumulative responding* indicava una

ridotta pendenza (indice di una ridotta frequenza nella risposta) e un valore di *plateau* inferiore.

Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che il baclofen esercitava un effetto inibitorio nella fase di inizio ed in quella di mantenimento del comportamento di ricerca dell'alcol. L'incremento nella latenza alla prima risposta sulla leva "attiva" durante la fase di *reinstatement* era simile a quanto osservato nell'esperimento 1, dove la somministrazione intraperitoneale di 3 mg/kg di baclofen incrementava, di circa 13 volte, la latenza alla prima pressione per l'alcol, suggerendo una soppressione della motivazione a iniziare a consumare l'alcol.

I dati di questo esperimento estendono al modello del *reinstatement* le proprietà anti-ricaduta del baclofen; precedenti studi infatti dimostrano che dosi di baclofen comprese tra 1 e 3 mg/kg sopprimevano completamente l'incremento del consumo di alcol che si manifesta dopo un periodo di deprivazione (*alcohol deprivation effect*) in ratti sP (Colombo e coll., 2003a; 2006b), dimostrando l'efficacia del baclofen nei due modelli sperimentali, attualmente esistenti e validati, di ricaduta (Markou e coll., 1993; Spanagel, 2005).

Nel loro complesso, questi risultati suggeriscono che il recettore GABA_B è parte del substrato neuronale che media il comportamento di ricaduta verso l'alcol nei ratti sP. La capacità del baclofen di bloccare la ripresa del comportamento di ricerca dell'alcol si estende anche ad altre sostanze d'abuso: infatti il baclofen (o il CGP44532, un altro agonista diretto del recettore GABA_B) sopprime la ripresa del comportamento di ricerca per la cocaina (Campbell e coll., 1999; Di Ciano e Everitt, 2003), per l'eroina (Di Ciano e Everitt, 2003; Spano e coll., 2007), e per la nicotina (Paterson e coll., 2005) nei ratti. Inoltre un recente studio evidenzia che il trattamento con il baclofen o il CGP44532 riduce la ripresa del comportamento di ricerca per la cocaina, prodotto da piccole dosi di cocaina, anche in primati non umani (Weerts e coll., 2007).

Esperimento 4: Effetto del GS39783 sul consumo di alcol misurato con la procedura della libera scelta tra due bottiglie

I risultati dell'esperimento di "acquisizione" indicano che la ripetuta somministrazione del GS39783, un modulatore allosterico positivo del recettore GABA_B, previene in maniera dose-dipendente l'acquisizione del comportamento consumatorio di alcol in ratti mai esposti precedentemente all'alcol (*alcohol-naive*). Infatti la media giornaliera del consumo di alcol nel gruppo di ratti trattati con 12.5, 25 mg/kg di GS39783 rimaneva stabilmente al di sotto di 1 g/kg per l'intero periodo di trattamento di 5 giorni, contrariamente al consumo giornaliero di alcol dei ratti trattati con la soluzione fisiologica che rapidamente raggiungeva la media di 5-6 g/kg.

I risultati dell'esperimento di "mantenimento" indicano che la ripetuta somministrazione del GS39783 produceva una riduzione dose-dipendente del consumo giornaliero di alcol in ratti che già avevano assunto alcol per diverse settimane prima dell'inizio dell'esperimento (ratti *alcohol-experienced*). Durante i primi giorni di trattamento la media dei consumi di alcol nei ratti trattati con la dose di 100 mg/kg di GS39783 era di circa il 40% inferiore di quella registrata nei ratti trattati con il veicolo. Si osservava però la tendenza verso un rapido sviluppo di tolleranza nel corso del trattamento.

Il GS39783 risultava essere più potente ed efficace nel sopprimere l'acquisizione del comportamento consumatorio rispetto al mantenimento dello stesso. Questo diverso profilo è stato osservato anche in precedenti sperimentazioni che hanno investigato l'effetto di farmaci di differenti classi sull'acquisizione o il mantenimento del comportamento consumatorio nei ratti sP (Colombo e coll., 2000; 2002). E' probabile che questa differente efficacia possa essere secondaria ad alterazioni, indotte dal consumo cronico di alcol, nella funzionalità dei sistemi recettoriali che mediano gli effetti dell'alcol; questi processi neuroadattativi potrebbero ridurre la potenza e dell'efficacia dei farmaci saggiati. In alternativa, il consumo di alcol nei ratti *alcohol-experienced*, ma non in quelli *alcohol-naive*, potrebbe essere condizionato da una serie di stimoli esterni, come ad esempio l'inizio della fase di buio del ciclo luce-buio, e questa risposta potrebbe essere relativamente insensibile al trattamento farmacologico.

I risultati del presente esperimento replicano quanto precedentemente osservato con gli agonisti diretti del recettore GABA_B. Baclofen e CGP44532 sopprimono infatti,

in maniera dose-dipendente, sia l'acquisizione che il mantenimento del comportamento consumatorio in ratti sP (Colombo e coll., 2000; 2002). Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che l'attivazione del recettore GABA_B, sia attraverso l'attivazione del sito di legame del neurotrasmettitore sia attraverso l'attivazione del sito di modulazione allosterica positiva, sopprime l'acquisizione e il mantenimento degli effetti psicofarmacologici dell'alcol che sostengono il comportamento consumatorio di alcol nei ratti sP. I risultati di questo studio suggeriscono che il GS39783 potenzi l'azione endogena del GABA sul recettore GABA_B, in maniera comparabile all'attivazione del recettore effettuata dagli agonisti diretti.

La somministrazione di GS39783 stimolava il consumo di cibo; questo effetto era particolarmente evidente nell'esperimento dell'"acquisizione". Questo incremento nel consumo di cibo potrebbe essere spiegato come una compensazione, in termini di consumo di calorie, del ridotto consumo di alcol: la riduzione del consumo di alcol, indotta dal trattamento col GS39783, era associata ad una riduzione delle calorie assunte con l'alcol che quindi venivano integrate con un incremento nel consumo di cibo. Questi dati sono anche in accordo con diverse osservazioni sperimentali che dimostrano come l'attivazione del recettore GABA_B indotta da dosi basse o moderate di baclofen stimoli il consumo di cibo in ratti esposti a diverse procedure sperimentali (Ebenezer e Pringle, 1992; Ebenezer, 1995; Statford e Kelley, 1997; Ward e coll., 2000; Higgs and Barber, 2004; Ebenezer e Patel, 2004).

Esperimenti 5-6: Effetto del GS39783 sull'auto-somministrazione e sul *breakpoint* per l'alcol

La somministrazione acuta di GS39783 riduceva in maniera dose-dipendente l'auto-somministrazione orale di alcol nei ratti sP. La somministrazione della dose più alta induceva, sia nelle risposte sulla leva che nel consumo di alcol, un dimezzamento dei valori rispetto a quelli dei ratti trattati con il veicolo. Questi risultati, relativi alle proprietà di rinforzo dell'alcol, sono una estensione di quanto precedentemente osservato sulla capacità del GS39783 di sopprimere il consumo di alcol, in ratti sP esposti a procedure non operanti come il regime di libera scelta tra alcol ed acqua (esperimento 4). I risultati dello studio di auto-somministrazione sono in accordo con quanto riportato recentemente da Liang e coll. (2006) che hanno dimostrato che la somministrazione acuta di CGP7930 (un altro

modulatore allosterico positivo del recettore GABA_B) riduceva in maniera dose-dipendente la risposta per l'alcol nei ratti della linea Indiana *alcohol-preferring* P allenati a premere la leva per ottenere l'alcol. I risultati dello studio di Liang e colleghi (2006), insieme con i risultati ottenuti in questo studio, suggeriscono che i due modulatori allosterici del recettore GABA_B attivi in vivo siano in grado di sopprimere le proprietà di rinforzo dell'alcol in modelli animali di eccessivo consumo di alcol.

La riduzione GS39783-indotta nel consumo di alcol nella procedura della libera scelta (esperimento 4) e il ridotto comportamento di risposta sulla leva dell'alcol in condizioni operanti nei ratti sP sono in accordo con i dati precedentemente ottenuti sull'effetto del baclofen sui comportamenti relativi al consumo e all'auto-somministrazione di alcol (Colombo e coll., 2000; esperimento 1). Nel loro insieme questi dati suggeriscono che l'attivazione del recettore GABA_B, sia da parte di agonisti diretti sia per via dell'azione di modulatori allosterici positivi, sopprime diverse modalità di assunzione di alcol nei ratti sP. La somiglianza degli effetti indotti dal GS39783 a quelli indotti dal baclofen suggerisce che il GS39783 potenzi l'azione del GABA endogeno sul recettore GABA_B in maniera simile all'attivazione esercitata dall'agonista diretto.

I risultati relativi allo studio dell'effetto del GS39783 sull'auto-somministrazione di alcol indicano che l'effetto riducente del GS39783 sulle risposte sulla leva è specifico per l'alcol, in quanto il trattamento con il GS39783 non altera, anche solo minimamente, le risposte per il saccarosio. Questa specificità costituisce la maggiore differenza tra l'effetto sopprimente del GS39783 e quello del baclofen sull'auto-somministrazione di alcol: infatti il trattamento con il baclofen riduceva in maniera simile sia l'auto-somministrazione di alcol che quella di saccarosio nei ratti sP (esperimento 1), così come in altre linee di ratti (Anstrom e coll., 2003; Janak e Gill, 2003). Per contro, l'attivazione del recettore GABA_B attraverso il sito di modulazione allosterica positiva sembra esercitare differenti effetti sull'auto-somministrazione di alcol o di saccarosio.

Un ulteriore esame dell'effetto riducente del GS39783 sull'auto-somministrazione di alcol rivela che il farmaco non alterava l'onset alla prima risposta sulla leva dell'alcol. Questo è reso visibile dal grafico sulla latenza alla prima pressione (Fig. 3.5.2 pannello A) così come dal grafico che mostra il *pattern* cumulativo delle risposte per l'alcol (Fig. 3.5.2 pannello A). Quest'ultimo grafico indica infatti come il trattamento con il GS39783 risulti in una curva con una pendenza ridotta rispetto a quella ottenuta dopo

trattamento con veicolo; tale ridotta pendenza è indicativa di una ridotta frequenza delle pressioni sulla leva. Al trattamento con il GS39783 è associato anche un ridotto valore di *plateau*. Il trattamento con il GS39783 produceva una riduzione dose-dipendente anche sul primo *bout* di alcol auto-somministrato (Fig. 3.5.2 pannello A).

Per contro come osservato in precedenza (Esperimenti 1 e 3), il baclofen esercitava un chiaro effetto sulla latenza alla prima risposta sulla leva dell'alcol. Queste disparità qualitative dell'effetto del baclofen e del GS39783 sul comportamento di auto-somministrazione suggeriscono l'esistenza di un differente contributo, da parte dei diversi siti di legame presenti sul recettore GABA_B, alle proprietà motivazionali e di rinforzo dell'alcol. Specificatamente, l'attivazione del sito di modulazione allosterica positiva potrebbe produrre un effetto più prominente sul potere rinforzante dell'alcol piuttosto che sulle componenti motivazionali, mentre l'attivazione del sito di legame per il neurotrasmettitore potrebbe produrre un effetto equivalente su entrambi i fenomeni. Questa disparità non era completamente inaspettata, in quanto una simile dissociazione è stata osservata nello studio dell'effetto del baclofen, del GS39783 e del CGP7930 sull'auto-somministrazione di cocaina nei ratti: il baclofen induceva una riduzione della risposta per la cocaina associata ad un aumento del periodo di latenza alla prima risposta sulla leva (Brebner e coll., 2000), mentre questo effetto era molto meno pronunciato, o addirittura assente, dopo la somministrazione di GS39783 o CGP7930 (Smith e coll., 2004).

Un recente studio dimostra che il GS39783, somministrato in acuto alla dose di 200 mg/kg i.g., non dava origine a alcun effetto di rilassamento muscolare e ipomotilità (Cryan e coll., 2004). Questi risultati tendono ad escludere che l'effetto riducente del GS39783 sull'auto-somministrazione di alcol, osservato nel presente studio, possa essere attribuito ad incoordinazione motoria o a sedazione. L'assenza di effetto di 100 mg/kg di GS39783 sulla risposta per il saccarosio conferma che l'effetto riducente sull'auto-somministrazione di alcol era unicamente dovuto alla capacità del GS39783 di sopprimere le proprietà di rinforzo per l'alcol.

I risultati dell'esperimento 6 indicano che il baclofen ed il GS39783 differiscono nella specificità del loro effetto riducente sul *breakpoint* per l'alcol. Infatti il baclofen produceva una riduzione del *breakpoint* per il saccarosio (incluso nel disegno sperimentale come rinforzo alternativo) comparabile a quella registrata nel *breakpoint* per l'alcol,

mentre il GS39783 era totalmente privo di ogni effetto sul *breakpoint* per il saccarosio.

I risultati di precedenti studi suggeriscono che questa differente specificità del baclofen e del GS39783 si estenda anche all'effetto riducente di entrambe i farmaci sulle proprietà di rinforzo dell'alcol: il trattamento con il baclofen riduceva in maniera simile sia l'auto-somministrazione di alcol che quella di saccarosio in ratti *Long-Evans* (Anstrom e coll., 2003; Janak e Gill, 2003) e sP (esperimento 1); al contrario, il trattamento con il GS39783 riduceva l'auto-somministrazione di alcol senza alterare l'auto-somministrazione di saccarosio in ratti sP (Maccioni e coll., 2007). Nel loro insieme, questi risultati confermano l'ipotesi precedentemente avanzata sul diverso contributo del sito di legame per il GABA nel recettore GABA_B e del sito di legame per i modulatori allosterici positivi alle proprietà di rinforzo e motivazionali dell'alcol e di altri stimoli.

Sulla base di queste considerazioni, il GS39783 sembrerebbe possedere il profilo ideale per un farmaco capace di sopprimere il *craving* per l'alcol, in quanto ridurrebbe la motivazione a consumare l'alcol senza esercitare alcuna influenza sugli altri comportamenti appetitivi o consumatori.

Meccanismo d'azione

La letteratura scientifica dimostra, in maniera pressoché incontrovertibile, che gli effetti gratificanti della maggior parte delle sostanze d'abuso sono mediati dall'attivazione del sistema dopaminergico mesolimbico (Koob, 1992; Weiss e Porrino, 2002). Tale sistema è costituito da neuroni che originano nell'area ventrale del tegmento (VTA) e proiettano i propri assoni nel *nucleus accumbens* (NAc) (Fig. 4.1.).

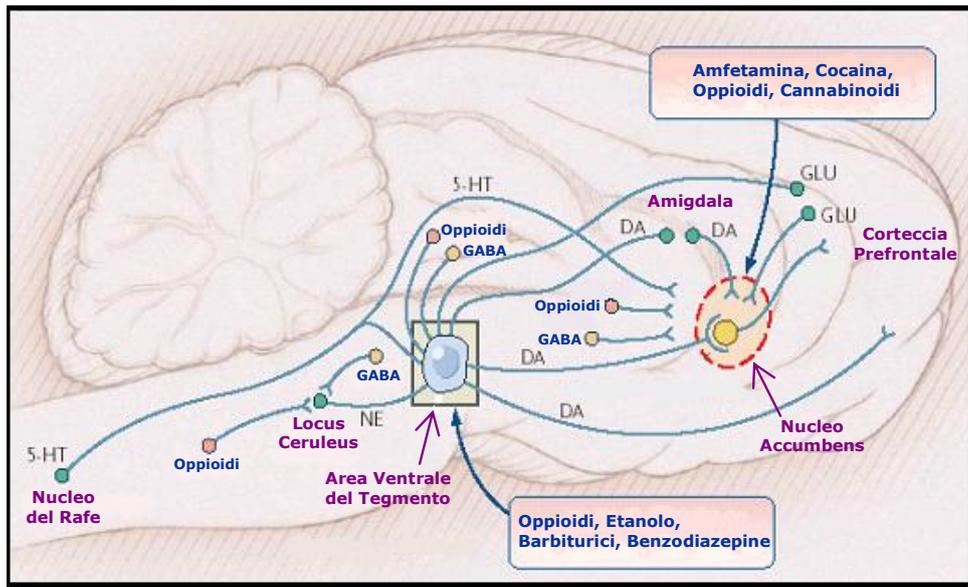


Fig. 4.1. Illustrazione del cervello di un roditore, con rappresentazione dei circuiti neurali che mediano gli effetti gratificanti degli stimoli naturali e delle sostanze d'abuso.

È stato ipotizzato che i recettori $GABA_B$ localizzati nella VTA (Bowery e coll., 1987), sia nel corpo cellulare dei neuroni dopaminergici che nelle terminazioni afferenti di neuroni glutamatergici, possano costituire il sito delle azioni del baclofen sul consumo di alcol, sull'auto-somministrazione operante di alcol e sulle proprietà motivazionali dell'alcol. L'attivazione di tali recettori da parte del baclofen potrebbe infatti inibire l'incremento, indotto dall'alcol, della funzionalità della trasmissione dopaminergica mesolimbica (Fig. 4.2.).

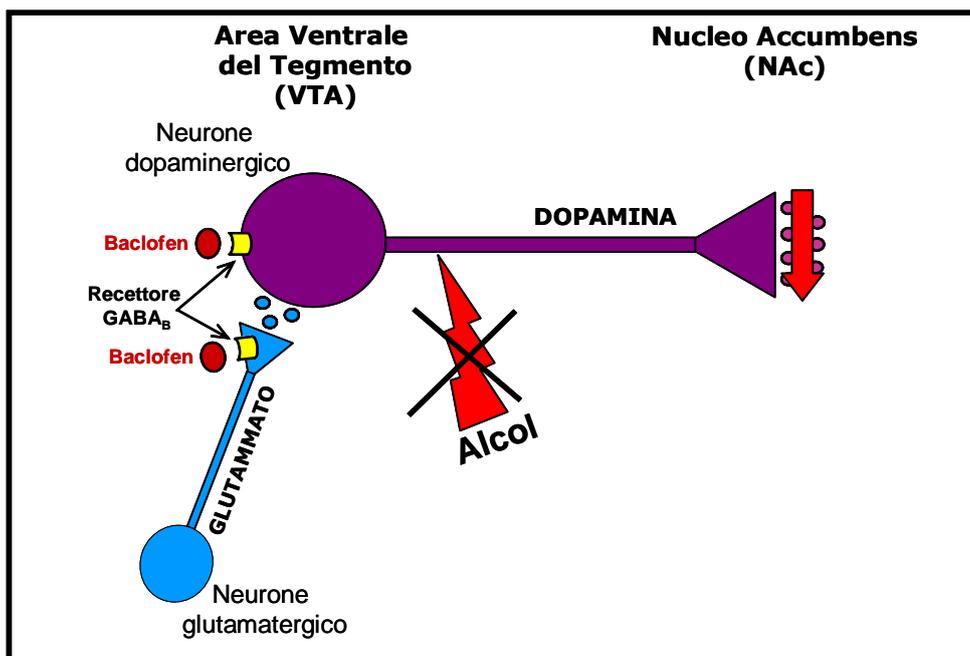


Fig. 4.2. Schema esemplificativo del possibile meccanismo dell'azione inibitrice del baclofen sulla stimolazione alcol-indotta dei neuroni dopaminergici mesolimbici

In accordo con questa ipotesi, recenti studi di microdialisi hanno dimostrato che la somministrazione di baclofen riduceva l'aumento, stimolato dall'assunzione volontaria di alcol, dei livelli extracellulari di dopamina nello shell del NAc del ratto sP (Colombo e coll., 2004a). Per esaminare il contributo della neurotrasmissione dopaminergica agli aspetti motivazionali o appetitivi dell'alcol, un recente studio di microdialisi cerebrale ha previsto la micro-iniezione di baclofen nella VTA di ratti allenati a premere la leva per l'alcol (Leite-Morris e coll., 2006). Le micro-iniezioni di baclofen sono avvenute immediatamente prima di una sessione di *extinction responding*. È stato osservato che la somministrazione intra-VTA di baclofen sopprimeva in maniera concentrazione-dipendente il valore di *extinction responding*. Questo dato rafforza l'ipotesi che il recettore GABA_B sia parte del circuito mesolimbico che sta alla base delle proprietà motivazionali.

Alternativamente, è stato suggerito che il baclofen potrebbe interferire con i meccanismi corticotalamici che sostengono l'attivazione comportamentale necessaria per iniziare la risposta per una sostanza d'abuso, incluso l'alcol (Anstrom e coll., 2003). Un'alta densità di recettori GABA_B è stata osservata in diverse aree del cervello come la corteccia frontale, l'ippocampo, e il talamo (Anstrom e coll., 2003). Questa ipotesi potrebbe spiegare la peculiare capacità del

baclofen di sopprimere l'interesse iniziale del ratto per l'alcol.

Note conclusive

I risultati degli esperimenti condotti suggeriscono che l'attivazione del recettore GABA_B, sia attraverso il sito di legame del neurotrasmettitore che attraverso il sito di modulazione allosterica positiva, inibisce diversi comportamenti alcol-correlati in ratti alcol-preferenti. Specificatamente, l'agonista diretto baclofen e il modulatore allosterico positivo GS39783 sopprimono il consumo di alcol, l'auto-somministrazione operante di alcol, le proprietà di rinforzo e motivazionali dell'alcol e il comportamento di ricerca dell'alcol nei ratti *Sardinian alcohol-preferring*. Questi risultati, nel loro insieme, dimostrano il coinvolgimento del recettore GABA_B nei meccanismi di controllo della ricerca e del consumo di alcol e delle sue proprietà motivazionali ed appetitive. Inoltre, i risultati relativi alle sperimentazioni col baclofen dimostrano come esso possa costituire, in quanto farmaco già introdotto nella pratica clinica per altre indicazioni, un possibile rimedio terapeutico nel trattamento della dipendenza da alcol. Gli studi clinici preliminari condotti sino ad oggi (Addolorato e coll., 2002; Flannery e coll., 2004; Ameisen, 2005; Agabio e coll., 2007; Bucknam, 2007) apparentemente costituiscono un'estensione dei risultati del presente studio, in quanto dimostrano che il baclofen riduce il consumo di bevande alcoliche e il *craving* per l'alcol nel paziente alcolista.

5. BIBLIOGRAFIA

Addolorato G., Caputo F., Capristo E., Colombo G., Gessa G. L., Gasbarrini G. Ability of baclofen in reducing alcohol craving and intake: II Preliminary clinical evidence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24, 67-71 (2000)

Addolorato G., Caputo F., Capristo E., Domenicali M., Bernardi M., Janiri L., Agabio R., Colombo G., Gessa G. L., Gasbarrini G. Baclofen efficacy in reducing alcohol craving and intake a preliminary double-blind randomised controlled study. *Alcohol Alcohol.* 37, 504-508 (2002)

Agabio R., Cortis G., Fadda F., Gessa G. L., Lobina C., Reali R., Colombo G. Circadian drinking pattern of Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol.* 31, 385-388 (1996)

Agabio R., Marras P., Addolorato G., Carpiniello B., Gessa G. L. Baclofen suppresses alcohol intake and craving for alcohol in a schizophrenic alcohol-dependent patient: a case report. *J. Clin. Psychopharmacol.* 27, 319-320 (2007)

Ameisen O. Complete and prolonged suppression of symptoms and consequences of alcohol-dependence using high-doses baclofen: a self-case report of a physician. *Alcohol Alcohol.* 40, 147-150 (2005)

Anstrom K. K., Cromwell T., Markowski T., Woodward D. J. Effect of baclofen on alcohol and sucrose self-administration in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27, 900-908 (2003)

Bartoletti M., Gubellini C., Ricci F., Gaiardi M. The GABA_B agonist baclofen blocks the expression of sensitisation to the locomotor stimulant effect of amphetamine. *Behav. Pharmacol.* 15, 397-401 (2004)

Besheer J., Lepoutre V., Hodge C. W. GABA_B receptor agonists reduce operant ethanol self-administration and enhance ethanol sedation in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology* 174, 358-366 (2004)

Bienkowski P., Koros E., Kostowski W., Bogucka-Bonikowska A. Reinstatement of ethanol seeking in rats: behavioural analysis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 123-128 (2000)

Binet, V., Brajon C., Le Corre L., Archer F., Pin J. P., Prézénau L. The heptaelical domain of GABA_{B2} is activated

directly by CGP7930, a positive allosteric modulator of the GABA_B receptor. *J. Biol. Chem.* 279, 29085-29091 (2004)

Bowery N. G., Hudson A. L., Price G. W. GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20, 365-383 (1987)

Bowery N.G. GABA_B receptor pharmacology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33, 109-147 (1993)

Bowery N. G., Enna S. J. γ -Aminobutyric acid_B receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 2-7 (2000)

Bowery N. G. Bettler B., Froestl W., Gallagher J. P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T.I., Enna S. J. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid_B receptors: structure and function. *Pharmacol. Rev.* 54, 247-264 (2002)

Brambilla P., Perez J., Barale F., Schettini G., Soares J. C. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 8 721-737 (2003)

Brebner K., Froestl W., Andrews M., Phelan R., Roberts D. C. S. The GABA_B agonist CGP 445332 decreases cocaine self-administration in rats: Demonstration using a progressive ratio and a discrete trials procedure. *Neuropsychopharmacology* 38, 1797-1804 (1999)

Brebner K., Phelan R., Roberts D. C. S. Effect of baclofen on cocaine self-administration in rats reinforced under fixed-ratio 1 and progressive-ratio schedules. *Psychopharmacology* 148, 314-321 (2000a)

Brebner K., Phelan R., Roberts D. C. S. Intra-VTA baclofen attenuates cocaine self-administration on a progressive ratio schedule of reinforcement *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 857-862 (2000b)

Brebner K., Childress A. R., Roberts D. C. S. A potential role for GABA_B agonists in the treatment of psychostimulant addiction. *Alcohol Alcohol.* 37, 478-484 (2002)

Brebner K., Ahn S., Phillips A. G. Attenuation of d-amphetamine self-administration by baclofen in the rat: behavioral and neurochemical correlates. *Psychopharmacology* 177, 409-417 (2005)

Bucknam W. Suppression of symptoms of alcohol dependence and craving using high dose baclofen. *Alcohol Alcohol.* 42, 158-160 (2007)

Campbell U. C., Lac S. T., Carroll M. E. Effect of baclofen on maintenance and reinstatement of intravenous cocaine self-administration in rats *Psychopharmacology* 143 (2), 209-214 (1999)

Campbell U. C., Morgan A. D., Carroll M. E. Sex differences in the effects of baclofen on the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Drug Alcohol Depend.* 66, 61-69 (2002)

Carai M. A. M., Agabio R., Addolorato G., Gessa G. L., Colombo G. Baclofen: preclinical data. In: Spanagel R., Mann K. (Eds.), *Drugs for Relapse - Prevention of Alcoholism*. Birkäuser Verlag, Basel, Switzerland, 163-170 (2005)

Colombo G., Agabio R., Lobina C., Reali R., Zocchi A., Fadda F., Gessa G. L. Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. *Physiol. Behav.* 57, 1181-1185 (1995)

Colombo G., Agabio R., Lobina C., Reali R., Vacca G., Gessa G. L. Stimulation of locomotor activity by voluntary consumed alcohol in Sardinian alcohol-preferring rats. *Eur. J. Pharmacol.* 357, 109-113 (1998)

Colombo G., Agabio R., Carai M. A., Lobina C., Pani M., Reali R., Addolorato G., Gessa G. L. Ability of baclofen in reducing alcohol intake and withdrawal severity: Preclinical evidence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24 (1), 58-66 (2000)

Colombo G., Serra S., Brunetti G., Atzori G., Pani M., Vacca G., Addolorato G., Froestl W., Carai M. A. M., Gessa G. L. The GABA_B receptor agonists baclofen and CGP 44532 prevent acquisition of alcohol drinking behavior in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol.* 37, 499-503 (2002)

Colombo G., Serra S., Brunetti G., Vacca G., Carai M. A. M., Gessa G. L. Suppression by baclofen of alcohol deprivation effect in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats *Drug Alcohol Depend.* 7, 105-108 (2003a)

Colombo G., Vacca G., Serra S., Brunetti G., Carai M. A. M., Gessa G. L. Baclofen suppresses motivation to consume alcohol in rats. *Psychopharmacology* 167, 221-224 (2003b)

Colombo G., Addolorato G., Agabio R., Carai M. A. M., Pibiri F., Serra S., Vacca G., Gessa G. L. Role of GABA_B receptor in alcohol dependence: Reducing effect of baclofen on alcohol intake and alcohol motivational properties in rats and amelioration of alcohol withdrawal syndrome and alcohol craving in human alcoholics. *Neurotox. Res.* 6, 403-414 (2004)

Colombo G., Serra S., Vacca G., Carai M. A. M., Gessa G. L. Baclofen-induced suppression of alcohol deprivation effect in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats exposed to different alcohol concentrations. *Eur. J. Pharmacol.* 550, 123-126 (2006b)

Corrigall W. A., Coen K.M., Adamson K. L., Chow B. L., Zhang J. Response of nicotine self-administration in the rat to manipulations of mu-opioid and gamma-aminobutyric acid receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology* 149, 107-114 (2000)

Corrigall M. S., Coen K. M., Zhang J., Adamson K. L. GABA mechanism in the pedunculo-pontine tegmental nucleus influence particular aspects of nicotine self-administration selectively in the rats. *Psychopharmacology* 158, 190-197 (2001)

Cryan J. F., Kelly P. H., Chaperon F., Gentsch C., Mombereau C., Lingenhoehl K., Froestl W., Bettler B., Kaupmann K. and Spooren W. P. J. M. Behavioral Characterization of the novel GABA_B receptor-positive modulator GS39783 (N,N'-Dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine): anxiolytic-like activity without side effects associated with baclofen or benzodiazepines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 952-963 (2004).

Czachowski C. L., Legg B. H., Stansfield K. H. Ethanol and sucrose seeking and consumption following repeated administration of the GABA_B agonist baclofen in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 812-818 (2006)

Daoust M., Saligaut C., Lhuintre J. P., Moore N., Flipo J. L., Boismare F. GABA transmission, but not benzodiazepine

receptor stimulation, modulates ethanol intake by rats. *Alcohol* 4, 469-472 (1987)

Di Ciano P., Everitt B. J. The GABA(B) receptor agonist baclofen attenuates cocaine- and heroin-seeking behavior by rats. *Neuropsychopharmacology* 28, 510-518 (2003)

Duttar P., Nicoll R.A. A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. *Nature* 332, 156-158 (1988)

Ebenezer I. S., Pringle A. K. The effect of systemic administration of baclofen on food intake in rats. *Neuropharmacology* 31, 39-42 (1992)

Ebenezer I. S. Intraperitoneal administration of baclofen increases consumption of both solid and liquid diets in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 273, 183-185 (1995)

Ebenezer I. S., Patel S. M. Effects of the GABA_B receptor agonists baclofen and 3-aminopropylphosphoric acid (3-APA) on food intake in rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 26, 627-630 (2004)

Emerson P. C. GABA_B receptor: structure and function. *Prog. Brain Res.* 160, 43-57 (2007)

Epstein D. H., Preston K. L., Stewart J., Shaham Y. Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology* 189, 1-16 (2006)

Faigle J. W., Keberle H. The chemistry and kinetics of Lioresal. *Postgrad. Med. J.* 5 (suppl) 9-13 (1972)

Fattore L., Cossu G., Martellotta M. C., Deiana S., Fratta W. Baclofen antagonized intravenous self-administration of nicotine in mice and rats. *NeuroReport* 12, 2243-2246 (2001)

Fattore L., Cossu G., Martellotta M. C., Fratta W. Baclofen antagonized intravenous self-administration of nicotine in mice and rats. *Alcohol Alcohol.* 37, 495-498 (2002)

Filip M., Frankowska M., Przegaliński E. Effects of GABA(B) receptor antagonist, agonists and allosteric positive modulator on the cocaine-induced self-administration and drug discrimination. *Eur. J. Pharmacol.* 574, 148-57 (2007)

Flannery B. A., Garbut J. C., Cody M. W., Renn W., Grace K., Osborne M., Cosby K., Morreale M., Trivette A. Baclofen for alcohol dependence: a preliminary open-label study. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 28, 1517-1523 (2004)

Froestl W., Bettler B., Bittiger H., Heid J., Kaupmann K., Mickel S. J., Strub D. Ligands for expression cloning and isolation of GABA(B) receptor. *Farmacology* 58, 173-183 (2003).

Higgs S., Barber D. J. Effect of baclofen on feeding behaviour examined in the runway. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 405-408 (2004)

Hilgard E. R., Marquis D. G. *Hilgard and Marquis' conditioning and Learning*, 2nd ed., Appleton-Century-Crofts, New York (1961)

Hodos W., Kalman G. Effects of increment size and reinforcer volume on progressive ratio performance. *J. Exp. Anal. Behav.* 6, 387-392 (1963)

Hyytiä P., Kiianmaa K. Suppression of ethanol responding by centrally administered CTOP and naltrindole in AA and Wistar rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 25-33 (2001)

Hyytiä P., Sinclair J. D. Responding for oral ethanol after naloxone treatment by alcohol preferring AA rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17, 631-636 (1993)

Janak P. H., Gill T. M. Comparison of the effects of allopregnanolone with direct GABAergic agonists on ethanol self-administration with and without concurrently available sucrose. *Alcohol* 30, 1-7 (2003)

June H. L., McCane S. R., Zink R. W., Portoghese P. S., Li T. K., Froehlich J. C. The delta 2-opioid receptor antagonist naltriben reduces motivated responding for ethanol. *Psychopharmacology* 147, 81-89 (1999)

Kalivas P.W., Duffy P. Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse* 5, 48-58 (1990)

Katz J. L., Higgins S. T. The validity of the reinstatement model of craving and relapse to drug use. *Psychopharmacology* 168, 21-30 (2003)

Koob G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 177-184 (1992)

Krystal J. H., Sanacora G., Blumberg H., Anand A., Charney D. S., Marek G. Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Mol. Psychiatry* 7, S71-S80 (2002)

Lê A. D., Shaham Y. Neurobiology of relapse to alcohol in rats. *Pharmacol. Ther.* 94, 137-156 (2002)

Lê A. D., Funk D., Harding S., Juzysch W., Fletcher P. J., Shaham Y. Effects of dexfenfluramine and 5-HT₃ receptor antagonists on stress-induced reinstatement of alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology* 186, 82-92 (2006)

Leite-Morris K. A., Fukudome E. Y., Kaplan G. B. Opiate-induced motor stimulation is regulated by gamma-aminobutyric acid type B receptors found in the ventral tegmental area in mice. *Neurosci. Lett.* 317, 119-122 (2002)

Leite-Morris K. A., Czachowski C. L. Intra-ventral tegmental area microinjections of a GABA receptor agonist dose-dependently attenuate ethanol seeking in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 182A (2006)

Liang J. H., Chen F., Krstew E., Cowen M. S., Carrol F. Y., Crawford D., Beat P. M., Lawrence A. J. The GABA_B receptor allosteric modulator CGP7930, like baclofen, reduces operant self-administration of ethanol in alcohol-preferring rats. *Neuropharmacology* 50, 632-639 (2006)

Maccioni P., Serra S., Vacca G., Orrù A., Pes D., Agabio R., Addolorato G., Carai M. A. M., Gessa G. L., Colombo G. Baclofen-induced reduction of alcohol reinforcement in alcohol-preferring rats. *Alcohol* 36, 161-168 (2005)

Maccioni P., Pes D., Orrù A., Froestl W., Gessa G. L., Carai M. A. M., Colombo G. Reducing effect of the positive allosteric modulator of the GABA_B receptor, GS39783, on alcohol self-administration in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology* 193, 171-178 (2007)

Markou A., Weiss F., Gold L. H., Caine S. B., Schulteis G., Koob G. F. Animal models of craving. *Psychopharmacology* 112, 163-182 (1993)

Millan M. J. The neurobiology and control of anxious states. *Prog. Neurobiol.* 70, 83-244 (2003)

Misgeld U., Bijak M., Jarolimek W. A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 46, 423-62 (1995).

Mombereau C., Kaupmann K., Froestl W., Sansing G., Van der Putten H. and Cryan J. F. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABAB receptors in the modulation of anxiety and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 29, 1050-1062 (2004)

Nicoll R.A. My close encounter with GABA_B receptor. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1667-1674 (2004)

O'Brein C. P. A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science* 278, 66-70 (1997)

Orrù A., Lai P., Lobina C., Maccioni P., Piras P., Scanu L., Froestl W., Gessa G. L., Carai M. A. M., Colombo G. Reducing effect of the positive allosteric modulators of the GABA_B receptor, CGP7930 and GS39783, on alcohol intake in alcohol-preferring rats. *Eur. J. Pharmacol.* 525, 105-111 (2005)

Paterson N. E., Froestl W., Markou A. Repeated administration of the GABA_B receptor agonist CGP44532 decreased nicotine self-administration, and acute administration decreased cue-induced reinstatement of nicotine-seeking in rats. *Neuropsychopharmacology* 30, 119-128 (2005)

Perfumi M., Santoni R., Ciccocioppo R., Massi M. Blockade of γ -aminobutyric acid receptors does not modify the inhibition of ethanol intake induced by *Hypericum perforatum* in rats. *Alcohol Alcohol.* 37, 540-546 (2002)

Petry N. M. Benzodiazepines-GABA modulation of concurrent ethanol and sucrose reinforcement in the rats. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 5, 183-194 (1997)

Phillis B. D., Ong J., White J. M., Bonnielle C. Modification of d-amphetamine-induced responses by baclofen in rats. *Psychopharmacology* 153, 277-84 (2001)

Pin J. P., Kniazeff J., Binet V., Liu J., Maurel D., Galvez T., Duthey B., Havlickova M., Blahos J., Prézeau L., Rondard P. Activation mechanism of the heterodimeric GABA_B receptor. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1565-1572 (2004)

Ranaldi R., Poeggel K. Baclofen decreases methamphetamine self-administration in rats. *NeuroReport* 13, 1107-1110 (2002)

Richardson N. R., Roberts D. C. S. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J. Neurosci. Meth.* 66, 1-11 (1996)

Roberts D. C., Andrews M. M., Vickers G. J. Baclofen attenuates the reinforcing effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology* 15, 417-423 (1996)

Roberts D. C., Andrews M. M. Baclofen suppression of cocaine self-administration: demonstration using a discrete trials procedure. *Psychopharmacology* 131, 271-277 (1997)

Rodd A. Z., Bell R. L., Kuc K. A., Murphy J. M., Lumeng L., Li T-K., McBride W. J. Effect of repeated alcohol deprivations on operant ethanol self-administration by alcohol-preferring (P) rats. *Neuropsychopharmacology* 28, 1614-1621 (2003)

Samson H. H. Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substituting procedure in food- and water-sated rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10, 436-442 (1986)

Samson H. H., Czachowski C. L., Chappell A., Legg B. Measuring the appetite strength of ethanol: use of an extinction trial procedure. *Alcohol* 31, 77-86 (2003)

Schuckit M. A. Drug and Alcohol Abuse: a Clinical Guide to Diagnosis and Treatment, 4th Edition. Plenum Publishing Corporation, New York (1995)

Serra S., Brunetti G., Vacca G, Lobina C., Carai M. A. M., Gessa G. L., Colombo G. Stable preference for high alcohol concentrations after alcohol deprivation in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. *Alcohol* 29, 101-108 (2003)

Shoaib M., Swanner L. S., Beyer C. E., Goldberg S. R. Schindler C. W. The GABA_B agonist baclofen modifies cocaine self-administration in rats. *Behav. Pharmacol.* 9, 195-206 (1998)

Slawecki C. J., Hodge C. W., Samson H. H. Dopaminergic and opiate agonists and antagonists differentially decrease multiple schedule responding maintained by sucrose/ethanol and sucrose. *Alcohol* 14, 281-294 (1997)

Smith M. A., Yancey D. L., Morgan D., Liu Y., Froestl W., Roberts D. C. Effects of positive allosteric modulators of the GABA_B receptor on cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 173, 105-111 (2004)

Spanagel R. How to measure relapse in animals. In: Spanagel R, Mann K. eds. *Drugs for Relapse Prevention of Alcoholism*, pp 13 -21, Basel: Birkäuser Verlag (2005)

Spano M. S., Fattore L., Fratta W., Fadda P. The GABA_B receptor agonist baclofen prevents heroin-induced reinstatement of heroin-seeking behavior in rats. *Neuropharmacology* 52, 1555-1562 (2007)

Statford T. R. and Kelley A. E. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J. Neurosci.* 17, 4434-4440 (1997)

Tsuji M., Nakagawa Y., Ishibashi Y., Yoshii T., Takashima T., Shimada M., Suzuki T. Activation of ventral tegmental GABA_B receptors inhibits morphine-induced place preference in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 313, 169-173 (1996)

Vacca G., Serra S., Brunett G., Carai M. A. M., Samson H. H., Gessa G. L., Colombo G. Operant self-administration of alcohol in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26, 1678-1685 (2002)

Walker B. M., Koob G. F. The γ -aminobutyric acid-B receptor agonist baclofen attenuates responding for ethanol in ethanol-dependent rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 31, 11-18 (2007)

Ward B. O., Somerville E. M., Clifton P. G. Intra-accumbens baclofen selectively enhances feeding behavior in the rat. *Physiol. Behav.* 68, 463-468 (2000)

Weerts E. M., Froestl W., Kaminski B. J., Griffiths R. R. Attenuation of cocaine-seeking by GABA_B receptor agonists baclofen and CGP44532 but not the GABA reuptake inhibitor tiagabine in baboons. *Drug Alcohol Depend.* 89, 2006-213 (2007)

Weiss F.,Porrino L. J. Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. *J. Neurosci.* 22, 3332-3337 (2002)

Wise R. A., Bozarth M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol. Rev.* 94, 469-492 (1987)

Woo S. H., Kim H. S., Yun J. S., Lee M. K.,Oh K. W.,Seong Y. H., Oh S. K., Jang C. G. Inhibition of baclofen on morphine-induced hyperactivity, reverse tolerance and postsynaptic dopamine receptor supersensitivity. *Pharmacol. Res.* 43, 335-340 (2001)

Xi Z. X. , Stein E. A. Baclofen inhibits heroin self-administration behavior and mesolimbic dopamine release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1369-1374 (1999)