



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE**  
Ciclo XXVIII

**Studio dell'Effetto dell'Inibitore Selettivo della Dopamina  $\beta$ -Idrossilasi,  
Nepicastat, su Modelli Animalisti di "*Alcohol Addiction*" e "*Chocolate  
Addiction*"**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO-14

Presentata da:	Dott. Alessandro Zaru
Coordinatore Dottorato	Prof. Walter Fratta
Tutor	Dott.ssa Anna Lisa Muntoni

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

<b>ABSTRACT</b>	pag. 1
<b>1. INTRODUZIONE</b>	pag. 3
<b>1.1. Reward</b>	pag. 3
1.1.1. <i>Comportamento motivato</i>	pag. 4
<b>1.2. La dopamina</b>	pag. 5
<b>1.3. Il sistema dopaminergico</b>	pag. 5
1.3.1. <i>Recettori dopaminergici</i>	pag. 7
<b>1.4. Dopamina e reward</b>	pag. 7
<b>1.5. Le “patologie del piacere”</b>	pag. 8
<b>1.6. Gli inibitori della dopamina <math>\beta</math>-idrossilasi</b>	pag. 9
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b>	pag. 12
<b>2.1. Modelli animali</b>	pag. 12
2.1.1. <i>Protocolli sperimentali</i>	pag. 13
2.1.2. <i>Ratti Sardinian Alcohol-Preferring: un modello di eccessivo consumo di alcol</i>	pag. 15
2.1.3. <i>Self administration di cioccolato: un modello animale di “cioccolismo”</i>	pag. 16
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	pag. 17
<b>3.1. Preparazione dei farmaci</b>	pag. 17
<b>3.2. Test sui comportamenti alcol-correlati</b>	pag. 18
3.2.1. <i>Animali</i>	pag. 18
3.2.2. <i>Esperimento 1 - Alcohol Deprivation Effect</i>	pag. 18
3.2.3. <i>Esperimento 2 - Operant, Oral Alcohol Self-Administration</i>	pag. 19
3.2.4. <i>Esperimento 3 - Operant, Food Self-Administration</i>	pag. 21
3.2.5. <i>Esperimento 4 - Spontaneous Locomotor Activity</i>	pag. 22
<b>3.3. Test sui comportamenti cioccolato-correlati</b>	pag. 23
3.3.1. <i>Animali</i>	pag. 23
3.3.2. <i>Soluzione di cioccolato</i>	pag. 23
<u>a) <i>Trattamento col nepicastat</i></u>	pag. 24
3.3.3. <i>Esperimento 5 - Operant, Chocolate Self-Administration</i>	pag. 24
3.3.4. <i>Esperimento 6 - Operant, Food Self-Administration</i>	pag. 25

3.3.5. <i>Esperimento 7 - Progressive ratio</i>	pag. 26
3.3.6. <i>Esperimento 8 - Extinction respondig e Reinstatement</i>	pag. 27
3.3.7. <i>Esperimento 9 - Spontaneous Locomotor Activity</i>	pag. 28
<b><u>b) Trattamento col disulfiram</u></b>	pag. 29
3.3.8. <i>Esperimento 10 - Operant, Chocolate Self-Administration</i>	pag. 29
3.3.9. <i>Esperimento 11 - Operant, Food Self-Administration</i>	pag. 30
3.3.10. <i>Esperimento 12 - Progressive ratio</i>	pag. 31
3.3.11. <i>Esperimento 13 - Extinction respondig e Reinstatement</i>	pag. 31
3.3.12. <i>Esperimento 14 - Spontaneous Locomotor Activity</i>	pag. 33
<b>4. RISULTATI</b>	pag. 33
<b>4.1. Effetto del nepicastat sui comportamenti alcol correlati</b>	pag. 33
4.1.1. <i>Esperimento 1 - Alcohol Deprivation Effect</i>	pag. 33
4.1.2. <i>Esperimento 2 - Operant, Oral Alcohol Self-Administration</i>	pag. 36
4.1.3. <i>Esperimento 3 - Operant, Food Self-Administration</i>	pag. 36
4.1.4. <i>Esperimento 4 - Spontaneous Locomotor Activity</i>	pag. 37
<b>4.2. Effetto del nepicastat sui comportamenti cioccolato-correlati</b>	pag. 37
4.2.1. <i>Esperimento 5 – Operant, Chocolate Self-Administration</i>	pag. 37
4.2.2. <i>Esperimento 6 – Operant, Food Self-Administration</i>	pag. 38
4.2.3. <i>Esperimento 7 – Progressive ratio</i>	pag. 39
4.2.4. <i>Esperimento 8 – Extinction responding e Reinstatement</i>	pag. 40
4.2.5. <i>Esperimento 9 – Spontaneous Locomotor Activity</i>	pag. 43
<b>4.3. Effetto del disulfiram sui comportamenti cioccolato-correlati</b>	pag. 43
4.3.1. <i>Esperimento 10 – Operant, Chocolate Self-Administration</i>	pag. 43
4.3.2. <i>Esperimento 11 – Operant, Food Self-Administration</i>	pag. 45
4.3.3. <i>Esperimento 12 – Progressive ratio</i>	pag. 46
4.3.4. <i>Esperimento 13 – Extinction responding e Reinstatement</i>	pag. 48
4.3.5. <i>Esperimento 14 – Spontaneous Locomotor Activity</i>	pag. 50
<b>5. DISCUSSIONE</b>	pag. 51
<b>5.1. Effetto del nepicastat sui comportamenti alcol-correlati</b>	pag. 51
<b>5.2. Effetto del nepicastat sui comportamenti cioccolato-correlati</b>	pag. 52
<b>5.3. Effetto del disulfiram sui comportamenti cioccolato-correlati</b>	pag. 53

**6. POSSIBILI EFFETTI NEUROFISIOLOGICI DELL'INIBIZIONE DELLA DBH** pag. 54

**7. CONCLUSIONI** pag. 55

**8. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE** pag. 56

## ABSTRACT

**Background:** Nepicastat is a selective dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH) inhibitor that has been found to suppress the reinstatement of cocaine-seeking behaviour triggered in rats by cocaine priming, environmental cues previously paired with cocaine availability, and stress.

The present studies were designed to extend to different alcohol-like behaviours the investigation into the “anti-addictive” properties of nepicastat. Moreover, we investigated whether nepicastat was capable of modifying the reinforcing and motivational properties of a chocolate solution and preventing the reinstatement of chocolate seeking in rats.

**Methods:** Sardinian alcohol-preferring (sP) rats, selectively bred for excessive alcohol consumption, were exposed to different procedures of alcohol-motivated behaviours while Wistar rats were exposed to a series of procedures of use in evaluating the reinforcing and motivational properties of the chocolate solution.

**Results:** *Effect on alcohol:* Acute treatment with nepicastat (0, 25, 50, and 100 mg/kg, i.p.) completely suppressed the “alcohol deprivation effect” (i.e., the temporary increase in alcohol intake occurring after a period of abstinence; model of alcohol relapse episodes) in sP rats exposed to the 2-bottle choice regimen, and dose dependently and selectively reduced oral alcohol self-administration in sP rats trained to lever-respond for alcohol (15% v/v) on a fixed ratio (FR) 4 schedule of reinforcement. Finally, combination of nepicastat (0, 50, and 100 mg/kg, i.p.) and alcohol (2 g/kg, intragastrically) did not alter spontaneous locomotor activity in sP rats.

*Effect on chocolate solution:* Acute treatment with nepicastat (0, 25, 50, and 100 mg/kg, i.p.) produced a dose-related inhibition of operant self-administration of the chocolate solution in rats under FR10 and progressive ratio schedules of reinforcement (indexes of the reinforcing and motivational properties of the chocolate solution, respectively). The effect of nepicastat on the reinstatement of chocolate seeking was studied in rats in which lever-responding had been extinguished by removing the chocolate solution for approximately 8 consecutive daily sessions. Nepicastat dose-dependently suppressed the reinstatement of lever-responding triggered by a ‘priming’ of the chocolate solution together with cues previously associated with availability of the reward. In a separate group of food-restricted rats trained to lever-respond for regular food pellets, nepicastat reduced FR10 lever-responding with the same potency as for the chocolate solution. Spontaneous locomotor activity was not modified by nepicastat doses that reduced self-

administration of the chocolate solution and regular food pellets and suppressed reinstatement of chocolate seeking. Notably, data on the suppressing effect of nepicastat on chocolate-related behaviors were reproduced by treatment with disulfiram (0, 25, 50 and 100 mg/kg, i.p.), another DBH inhibitor. The different time-course of the suppressing effect of disulfiram on chocolate-related behaviors may suggest a dual mechanism of action, including the involvement of a substrate other than DBH.

**Conclusions:** (a) These data extend to alcohol- and food-related behaviours the capacity of nepicastat to suppress different behaviours motivated by natural stimuli and drugs of abuse; (b) DBH is a promising target for pharmacotherapies targeting cocaine and alcohol dependence as well as eating disorders; (c) These data provide additional proof that food and drugs of abuse share the same neural pathways in producing their rewarding, reinforcing, and stimulating properties.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Reward

Un reward (ricompensa) è tutto ciò che consideriamo e percepiamo come piacevole e che ha effetti positivi sul comportamento ovvero che lo inducono e lo rinforzano. Tutti i giorni siamo spinti a ripetere azioni naturali come ad esempio mangiare, bere, fare sesso, per il piacere che conseguentemente percepiamo, o che prevediamo di provare prima ancora di svolgere l'azione stessa: “[...] to await a pleasure, is itself a pleasure [...]” (G. E. Lessing).

Le regioni del cervello coinvolte nel reward e nel rinforzo positivo sono state identificate negli anni '50 da Olds e Milner (Olds e Milner, 1954).

Nell'esperimento che portò a questa scoperta, dei ratti, ai quali venne impiantato un elettrodo in una specifica area del cervello, impararono a premere una leva per autosomministrarsi una scarica elettrica. Questa scarica elettrica a) era in grado di produrre piacere, b) li ricompensava del lavoro svolto e c) li incentivava a continuare a premere la leva; la scarica elettrica aveva quindi un potere rinforzante sul comportamento acquisito.

L'area del cervello oggetto dello studio fu il fascicolo pro-encefalico mediale (MFB), un fascio complesso di assoni che include proiezioni serotoninergiche afferenti dal nucleo del rafe, proiezioni noradrenergiche afferenti dal locus ceruleus ed inoltre proiezioni dopaminergiche afferenti dall'area ventrale del tegmento (VTA).

Di sua natura il sistema del reward produce la giusta motivazione che spinge gli animali, e l'uomo, ad imparare e ripetere comportamenti che sono essenziali per la sopravvivenza dell'individuo e/o della specie, come l'assunzione di cibo ed acqua o l'espletamento di comportamenti sessuali. Tutte queste azioni sono in grado di attivare, con diverse intensità, i centri del piacere (Hernandez e Hoebel, 1988).

Come gli stimoli naturali, anche le droghe d'abuso sono in grado di attivare i centri del piacere ma lo fanno in maniera notevolmente più potente dei reward naturali (Wise, 2002).

Nel corso degli anni, sul rapporto esistente tra reward e comportamento, sono stati sviluppati e validati numerosi modelli sperimentali preclinici di tossicodipendenza e di disturbi del comportamento alimentare. Questi modelli sperimentali hanno notevolmente contribuito, e contribuiranno ancora, alla comprensione dei meccanismi neurobiologici alla base dello sviluppo delle “patologie del piacere”.

### 1.1.1. *Comportamento motivato*

Il comportamento motivato può essere definito come la serie di azioni che gli animali o l'uomo mettono in atto sotto la spinta della necessità o del desiderio; esse si traducono in una ricerca continua di quegli stimoli che sono in grado di dare effetti gratificanti. Viceversa, nel caso di stimoli spiacevoli o dolorosi, il comportamento sarà soggetto ad attenuazione o all'estinzione.

Possiamo identificare nel comportamento motivato tre fasi principali:

- fase incentiva (o appetitiva) in cui lo stimolo viene raggiunto;
- fase consumatoria in cui si beneficia degli effetti gratificanti dello stimolo;
- fase post-consumatoria in cui al consumo seguono sensazioni di soddisfazione e appagamento.

Nei protocolli comportamentali preclinici utili a saggiare le proprietà d'abuso delle sostanze sono sempre fondamentali, ai fini del comportamento motivato, le associazioni tra lo stimolo primario gratificante e gli stimoli detti neutri. Tale associazione può essere di due tipi:

- a) Condizionamento pavloviano – l'apprendimento associativo, sulla base della teoria dell' incentive learning, avviene in seguito a condizionamento classico o pavloviano, dal nome del suo scopritore Ivan Pavlov. Pavlov dimostrò che se stimoli neutri, come il suono del campanello (stimolo condizionato), precedono regolarmente la presentazione di cibo (stimolo non condizionato), diventano predittivi del suo arrivo tanto da indurre la salivazione nell'animale (risposta condizionata al suono del campanello). L'associazione dei due stimoli, fa sì che lo stimolo condizionato funga da segnale anticipatorio per lo stimolo non condizionato. Se invece al suono del campanello non segue più la presentazione del cibo, allora l'animale smette di rispondere e si parla di estinzione della risposta. Il grado di condizionamento raggiungibile dipende da quanto lo stimolo non condizionato è nuovo e inaspettato, e dal fatto che non sia avvenuta una precedente associazione con lo stimolo condizionato. Nel momento in cui lo stimolo non condizionato diventa prevedibile, il grado di apprendimento sarà nullo;
- b) Condizionamento operante – nel condizionamento operante l'animale impara ad attuare un determinato comportamento al fine di ricevere una ricompensa. Nei protocolli di auto-somministrazione il ratto impara velocemente a compiere un lavoro (es. premere una leva) per auto-somministrarsi lo stimolo gratificante.

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

## **1.2. La dopamina**

Uno dei neurotrasmettitori essenziali nel sistema del reward è la dopamina (DA).

La DA è una catecolamina endogena sintetizzata all'interno delle terminazioni nervose dei neuroni dopaminergici a partire dalla tirosina, aminoacido che attraversa la barriera ematoencefalica grazie ad un trasporto attivo. La biosintesi della dopamina avviene secondo due step:

1. conversione della L-tirosina nell'intermedio L-diidrossifenilalanina (L-DOPA) per azione della tirosina idrossilasi;
2. conversione della L-DOPA in DA per azione della L-decarbossilasi.

A livello delle terminazioni nervose la DA viene immagazzinata all'interno di vescicole di deposito grazie ad un trasportatore attivo e successivamente rilasciata nello spazio sinaptico grazie ad un meccanismo esocitotico calcio-dipendente innescato dalla depolarizzazione della membrana.

Lo spegnimento del segnale, ovvero la conclusione degli eventi post-sinaptici o pre-sinaptici legati all'azione della DA, può avvenire in due modi:

- a) ricaptazione della DA dallo spazio sinaptico attraverso un trasportatore di membrana ad alta affinità per la DA (DAT, dopamine transporter) e successiva internalizzazione nelle vescicole;
- b) degradazione della DA ad opera delle monoaminoossidasi (MAO) o delle catecol-O-metil transferasi (COMT), che porta rispettivamente alla formazione dei due metaboliti, acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC) e acido 3-metossi-4-idrossifenilacetico (HVA).

La DA è inoltre un precursore della noradrenalina (NA) che viene biosintetizzata in seguito a decarbossilazione della DA stessa ad opera dell'enzima dopamina  $\beta$ -idrossilasi (DBH).

## **1.3. Il sistema dopaminergico**

Negli anni '50 si ipotizzò che la DA fosse solo un precursore delle altre catecolamine NA e adrenalina (AD). Tuttavia ricerche successive mostrarono che la DA era un neurotrasmettitore a sé stante (Carlsson et al., 1958; Carlsson 1959).

Con l'avvento delle metodiche a fluorescenza Falck-Hillarp (1961) divenne possibile visualizzare e studiare la distribuzione neuronale dei differenti neurotrasmettitori nel cervello (Falck et al., 1962); grazie a questa metodica si scoprì che i neuroni della DA sono organizzati in diverse vie che hanno origine nella parte centrale del cervello e proiettano sia nella regione corticale sia in quella proencefalica.

È possibile distinguere le seguenti vie dopaminergiche:

- via nigrostriatale – i neuroni hanno i corpi cellulari nella substantia nigra e proiettano principalmente allo striato dorsale cioè al caudato ed al putamen (Anden et al., 1964). Questa via è particolarmente importante per gli effetti locomotori e la sua degenerazione porta a severi disturbi motori che sfociano poi nella malattia di Parkinson (Ungerstedt e Arbuphnott, 1970);
- via tuberoinfundibolare – origina nel nucleo arcuato dell'ipotalamo e proietta all'eminenza mediana dove, liberando DA direttamente nei vasi del sistema portale ipofisario, inibisce la secrezione di prolattina;
- via mesocorticolimbica – i corpi cellulari di questa via originano nella VTA e mandano le loro proiezioni verso: corteccia prefrontale (PFC), giro del cingolo, nucleo accumbens (NAcb), amigdala, nucleo del letto della stria terminale, ippocampo, tubercolo olfattivo e setto (Dahlström e Fuxe, 1974; Ungerstedt, 1971). La via mesocorticolimbica è il fulcro delle emozioni e del meccanismo di reward di cibo e droghe (Sesack et al., 1989).

Nell'ambito delle dipendenze si fa riferimento al termine "reward system" per indicare un circuito costituito da un fascio di neuroni che partendo dalla VTA, attraverso lunghe proiezioni assoniche, proiettano sia alla corteccia neofrontale che al sistema limbico ed in particolare al NAcb. Nel NAcb, ed in particolare in una subregione detta shell, la DA è il mediatore chimico del piacere la cui magnitudo è proporzionale alla quantità di DA rilasciata. La subregione del NAcb, detta core, sarebbe invece coinvolta nell'espressione motoria dei comportamenti motivati e negli aspetti direzionali e strumentali della motivazione. (Di Chiara et al., 1999).

In conclusione il reward system è quindi primariamente coinvolto nei meccanismi e nelle modificazioni neurochimiche che sono alla base delle tossicodipendenze e dei disturbi del comportamento alimentare.

### 1.3.1. Recettori dopaminergici

I recettori dopaminergici sono cinque e tutti appartenenti alla grande famiglia dei recettori metabotropici, ovvero legati alla proteina G. Questi recettori possono essere divisi in due gruppi sulla base delle proprietà strutturali e farmacologiche:

- I recettori D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> hanno una lunga catena C-terminale intracellulare e sono membri della classe definita farmacologicamente come D<sub>1</sub>-like. Essi stimolano la formazione di AMP ciclico e l'idrolisi di fosfatidilinositolo;
- I recettori D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> hanno in comune la terza ansa intracellulare molto lunga e sono membri della classe definita farmacologicamente come D<sub>2</sub>-like. Essi riducono la formazione di AMP ciclico e modulano correnti di K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>.

Entrambi i gruppi sono espressi in distinte popolazioni neuronali lungo il sistema nervoso. I recettori D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> sono abbondantemente espressi nello striato, i recettori D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub> sono in gran parte al di fuori dello striato, mentre l'espressione del recettore D<sub>3</sub> è bassa nel caudato e nel putamen e più abbondante nel NAcb e nel tubercolo olfattorio.

Nel NAcb i D<sub>1</sub>-like sono espressi sui neuroni GABAergici, che coesprimono la sostanza P e la dinorfina, e proiettano alla VTA ed alla substantia nigra. I recettori D<sub>2</sub>-like sono collocati sui neuroni della via striato pallida che coesprimono encefalina.

Sia i D<sub>1</sub>-like che i D<sub>2</sub>-like sono post-sinaptici ma i D<sub>2</sub>-like sono anche espressi in sede pre-sinaptica sugli stessi neuroni dopaminergici dove fungono da autorecettori modulando il tono dopaminergico (Le Foll et al., 2009).

### 1.4. Dopamina e reward

La DA esercita un ruolo modulatorio chiave nel controllo dei meccanismi associati al perseguimento del reward e nel controllo delle emozioni e dei processi cognitivi (Le Moal, 1995). Tuttavia quale sia l'effettivo ruolo della DA in questi processi non è ancora perfettamente noto. Ad oggi le correnti interpretative sono due:

- a) la teoria di Wise vede la DA implicata principalmente nel mediare il processo di valutazione della ricompensa e le attribuisce un ruolo nel mediare il piacere (liking) (Wise et al., 1978, 1982, 2004, 2006);
- b) la teoria di Berridge (Berridge et al., 1989) e Salamone (Salamone et al., 2005) vede la DA implicata nell'attribuzione della salienza incentiva (wanting) e nell'allocazione dello sforzo alla risposta, e dunque nell'attivazione comportamentale e nella motivazione.

Wise postulò la sua ipotesi quando osservò che gli antipsicotici sono in grado di ridurre la risposta operante (pressione di una leva) finalizzata all'ottenimento di cibo o di altre ricompense (*"no dopamine, no pleasure"*). Studi successivi misero però il tutto in discussione in quanto si osservò che in ratti con lesioni dei neuroni dopaminergici del sistema mesocorticolimbico veniva abolita la componente rinforzante legata al reward ma non venivano alterate le tipiche espressioni facciali (fixed action patterns) in risposta all'infusione intraorale di soluzioni dolci, considerate indice di impatto edonico. Sulla base di queste osservazioni, Berridge e coll. conclusero che, in contrasto con l'ipotesi formulata da Wise, la DA non mediasse le proprietà gratificanti del cibo e dei rinforzi. Berridge e Robinson proposero che la DA, piuttosto che mediare il piacere, fosse coinvolta nel mediare la componente motivazionale. A conferma di ciò topi knock-out dopamina-deficienti conservano la capacità di scegliere una soluzione dolce (rispetto all'acqua) nonostante si astengano da qualsiasi approccio che richieda un minimo sforzo (Cannon e Palmiter, 2003).

Queste ultime interpretazioni riconoscono un ruolo della DA nell'attivazione delle risposte finalizzate ad un obiettivo (Robbins e Everitt, 2007), ma ignorano, o addirittura negano, il possibile ruolo della DA nella valutazione della ricompensa e nel piacere.

Successivamente Berridge, per trovare un punto di incontro tra l'ipotesi di Wise e la sua, ha suggerito il concetto di "reboosting", un processo attraverso il quale il contatto con la ricompensa ricarica il livello di attribuzione di salienza incentiva agli stimoli associati (Berridge, 2007). Questo non può non implicare un ruolo della DA nella valutazione della ricompensa.

### **1.5. Le "patologie del piacere"**

Sono diverse le sostanze che sono in grado di indurre piacere e forse proprio questa flessibilità può essere all'origine dei disturbi ad essa legati.

I disturbi del piacere riguardano il piacere detto appetitivo, ovvero quello che è associato all'eccitazione comportamentale e che è in grado di facilitare l'apprendimento incentivo pavloviano e quindi di indurre rinforzo positivo. Il piacere appetitivo è mediato dalla stimolazione della trasmissione dopaminergica (DAergica) nella shell del NAc.

La tossicodipendenza è un disturbo della motivazione che ha origine da un'abnorme effetto delle droghe, o dei farmaci, sui meccanismi neurochimici e neurofisiologici che stanno alla base del piacere appetitivo (Di Chiara, 2005).

Come detto in precedenza, i farmaci e le sostanze d'abuso hanno in comune la proprietà di stimolare la trasmissione DAergica nella shell del NAcb ma questa proprietà è omologa a quella di stimoli gratificanti primari di natura gustativa come i cibi palatabili (ad esempio, il cioccolato) (Bassareo et al., 2002). Tuttavia esiste fortunatamente una fondamentale differenza tra gli stimoli prodotti dai farmaci d'abuso e quelli legati agli stimoli gustativi: la stimolazione della trasmissione DAergica nella shell del NAcb da parte dei farmaci d'abuso non è sottoposta agli stessi meccanismi adattativi cui è sottoposta quella prodotta dagli stimoli gustativi.

Infatti l'eccesso di rilascio di DA nella shell del NAcb indotto da un cibo palatabile è attenuata in seguito a ripetute esposizioni (Bassareo e Di Chiara, 1997; Bassareo et al., 2002) suggerendo un ruolo chiave della novelty (novità) nelle risposte del reward (Spanagel e Weiss, 1999). Le ripetute esposizioni alle droghe d'abuso non producono gli stessi adattamenti ed i livelli di DA nella shell del NAcb non sono soggetti ad un attenuamento rinforzo dopo rinforzo (Di Chiara, 2002). Una situazione analoga, però, può essere riscontrata in tutta una serie di disturbi della motivazione caratterizzati da compulsione come i disturbi del comportamento alimentare (Di Chiara, 2005; Rada et al., 2005). In questi disturbi è possibile ipotizzare una disfunzione individuale di quegli stessi meccanismi neuroadattativi delle risposte dopaminergiche che nella tossicodipendenza sarebbero alla base di un anormale apprendimento incentivo degli stimoli associati alle droghe.

In sostanza la stimolazione costante del sistema mesocorticolimbico potrebbe produrre cambiamenti neuroadattativi nelle tossicodipendenze come anche nei disturbi comportamentali dell'alimentazione caratterizzati da compulsione. A conferma di ciò, grazie a studi di tomografia ad emissione di positroni (PET) si è messo in evidenza che vi è una riduzione del numero dei recettori D<sub>2</sub> nei cocainomani (Volkow et al., 1993), in chi abusa di metamfetamina (Volkow et al., 2001), negli eroinomani (Wang et al., 1997), negli alcolisti (Volkow et al., 1996) ma anche, con entità minore, in pazienti affetti da compulsive overeating (Wang et al., 2004).

Disfunzioni a livello della via mesocorticolimbica possono avere un enorme impatto in parecchi comportamenti collegati alle droghe d'abuso ed al cibo palatabile, includenti ad esempio aumentata vulnerabilità alla drug addiction ed overeating di cibo palatabile in quegli individui con una base genetica di bassa risposta del circuito del reward della dopamina (Kenny, 2011; Blum et al., 2012; Stice et al., 2011, 2012).

In conclusione è ormai assodato che tossicodipendenze e disturbi dell'alimentazione hanno in comune l'attivazione di vie neuronali sovrapponibili (Volkow et al., 2011) e sono oggi inquadrati da linee guida simili tanto da dividerne parzialmente la farmacoterapia. (Volkow e Wise, 2005).

### **1.6. Gli inibitori della dopamina $\beta$ -idrossilasi**

La DBH è l'enzima che converte la DA in NA e, pur rivestendo un ruolo importante nei livelli endogeni di queste catecolamine, non è mai stato un target di rilievo per lo sviluppo di nuovi farmaci per la cura delle "patologie del piacere".

Tra le molecole che sono in grado di inibire la DBH l'unica che ha raggiunto il commercio è stata il disulfiram ma non grazie a questo meccanismo d'azione bensì alla sua capacità di inibire irreversibilmente l'enzima aldeide deidrogenasi (ALDH), enzima responsabile della conversione dell'acetaldeide in acetato nel metabolismo dell'alcol. Il disulfiram è infatti uno dei farmaci approvati per la cura dell'alcolismo. L'effetto terapeutico del disulfiram è principalmente legato al timore, da parte dell'alcolista, di sviluppare sintomi sgradevoli quando assunto in concomitanza con l'assunzione di alcol; ha quindi un'azione deterrente sul consumo di alcol (Skinner et al., 2014). Gli effetti sgradevoli avvertiti sono: battito cardiaco accelerato, gonfiore al viso, brusco calo della pressione e arrossamento del volto (Krampe, 2010). Questi sintomi sono dovuti ad un accumulo di acetaldeide dovuta all'inibizione dell'ALDH.

Proprio a causa del suo meccanismo d'azione la più frequente causa di abbandono della terapia con disulfiram è l'irrefrenabile voglia di bere (craving) (Krampe, 2010). Per questo motivo il successo del trattamento con questo farmaco dipende molto dalla terapia psicologico-comportamentale alla quale esso è associato. Tali protocolli terapeutici integrati sono complessi e richiedono da una parte il coinvolgimento di diverse figure professionali con elevate competenze specifiche e dall'altra un'importante motivazione da parte del soggetto da trattare.

Per questo motivo gli studi sono volti alla ricerca di un farmaco che abbia un meccanismo d'azione alternativo e più mirato alle cause neurofisiologiche della dipendenza da alcol.

L'inibizione della DBH è invece il meccanismo proposto per spiegare l'efficacia del disulfiram nel trattamento dell'abuso di cocaina (Barth e Malcolm, 2010; Kosten et al., 2013; Pani et al., 2010). Il disulfiram, al di fuori del suo uso contro l'alcolismo, è stato inizialmente usato nei pazienti che abusano di alcol e cocaina. Questa cura si basava sull'ipotesi che l'alcol fungesse da primer per il consumo di cocaina (Higgins et al., 1993;

Carroll et al., 2000). Successivamente però venne scoperto che il disulfiram aveva più ragione di esistere come farmaco anti-cocaina in quanto era in grado di ridurre la frequenza e la quantità di cocaina assunta nei cocainomani non abusanti di alcol; ciò suggerisce che il disulfiram abbia un'azione diretta sulla dipendenza da cocaina (Hameedi et al., 1995; Mccance-Katz et al., 1998; George et al., 2000; Carroll et al., 2004). L'efficacia del disulfiram nel trattamento della dipendenza da cocaina è stato attribuito ad un incremento della DA cerebrale dovuto appunto all'inibizione della DBH; questo incremento della DA non farebbe altro che compensare la riduzione del tono dopaminergico riscontrato nei pazienti cocainomani, cosa che probabilmente è alla base della perdita di controllo durante le crisi di astinenza (Volkow et al., 2009). Alternativamente è stato suggerito che l'eccessivo rilascio di DA seguito all'uso di cocaina, durante il trattamento con disulfiram, possa indurre nel cocainomane effetti negativi come ansia e disforia invece che effetti piacevoli ed euforia (McCance-Kantz e al., 1998; Kosten et al., 2002).

A confermare che l'inibizione della DBH possa essere un buon target per la sintesi di nuovi farmaci per la cura delle "patologie del piacere" ci sono i recenti studi preclinici su un altro inibitore selettivo della DBH, il nepicastat.

Il nepicastat, inizialmente studiato per lo scompenso cardiaco congestizio, possiede la stessa abilità del disulfiram di sopprimere nei ratti il reinstatement per la cocaina scatenato da stimoli differenti: priming di cocaina, cues ambientali precedentemente accoppiati alla cocaina e stress (Schroeder et al., 2010, 2013). Né il disulfiram né il nepicastat però sarebbero in grado di avere un effetto sulle proprietà rinforzanti della cocaina in modelli operanti nel ratto, suggerendo che i meccanismi neuronali che sottendono ai due fenomeni siano distinti (Schroeder et al., 2010).

L'effetto soppressivo sul reinstatement da parte di nepicastat e disulfiram sono stati attribuiti alla conseguente deplezione di NA dovuta all'inibizione della DBH, suggerendo che la NA rivesta un ruolo solo nel reinstatement da cocaina ma fondamentalmente non nel suo consumo (Schroeder et al., 2010, 2013).

Recentemente è stato scoperto che il nepicastat riduce la quantità ed il rilascio di NA nella PFC mediale e nella shell del NAcb e che incrementa la quantità ed il rilascio della DA nella PFC mediale ma non nella shell (Devoto et al., 2014).

Basandoci su questi studi possiamo affermare che il nepicastat sembra essere un unicum come profilo farmacologico, essendo in grado di manipolare sia il sistema noradrenergico che quello dopaminergico in due aree cerebrali che ricoprono un ruolo fondamentale nel

mediare le proprietà rinforzanti e ricompensanti sia per gli stimoli naturali sia per le droghe d'abuso (Koob e Le Moal, 2006).

## **2. SCOPO DELLO STUDIO**

Alla luce di quanto precedentemente discusso, lo scopo di questa tesi è stato quello di estendere gli studi preclinici sull'inibitore selettivo della DBH, nepicastat, dai modelli di abuso di cocaina a modelli preclinici di altre "patologie del piacere" come l'alcolismo ed il "cioccolismo", disturbo della sfera del comportamento alimentare con sintomi riscontrabili anche in tutte le più note dipendenze da droghe d'abuso (Bruinsma e Taren, 1999; Meule, 2011). A questo scopo sono stati utilizzati rispettivamente a) una linea di ratti alcol preferenti, i ratti Sardinian Alcohol Preferring (sP), b) un modello di auto-somministrazione operante (operant self-administration) di una soluzione di cioccolato capace di indurre un comportamento con tratti simili a quello indotto dalle sostanze d'abuso.

Sono stati utilizzati con entrambi dei protocolli sperimentali atti a mettere in evidenza aspetti fondamentali caratterizzanti le sostanze d'abuso:

- la capacità di indurre rinforzo (reinforcement);
- la capacità di generare un desiderio fortissimo ed irrefrenabile (craving);
- la capacità di dare ricaduta dopo un periodo di astinenza (relapse).

Come inibitore della DBH, sui protocolli sperimentali utilizzati nell'operant self-administration di cioccolato, è stato inoltre saggiato il disulfiram allo scopo di:

- a) verificare se condividesse col nepicastat la capacità di sopprimere i comportamenti cioccolato-correlati;
- b) considerare eventuali differenze o similitudini con gli effetti del nepicastat al fine di ottenere importanti informazioni sui substrati neurofisiologici coinvolti nel craving per le sostanze d'abuso e per i rewards naturali.

### **2.1. Modelli animali e protocolli sperimentali**

Negli studi preclinici i modelli animali ci permettono di visualizzare ciò che non può essere osservato direttamente. Un concetto importante utilizzato per caratterizzare un modello sperimentale è quello di validità, intesa come il grado di utilità di un modello nel raggiungere lo scopo sperimentale prestabilito. Tra i diversi tipi di validità utilizzati per

descrivere un modello sperimentale ricordiamo a) construct validity, b) face validity, c) reliability e d) predictive validity.

- a) La construct validity, si basa sulla presenza di omologie tra il modello sperimentale e la patologia umana, e si riferisce all'interpretabilità e al potere chiarificatore del modello stesso (Koob e Le Moal, 2006);
- b) La face validity è la capacità del modello di rappresentare un particolare aspetto della patologia umana considerata (McKinney, 1988);
- c) Il termine reliability si riferisce alla stabilità e alla riproducibilità dei fenomeni misurati da un determinato modello animale (Geyer e Markou, 2002);
- d) Per predictive validity si intende la possibilità di fare delle previsioni riguardo alla patologia umana sulla base dei risultati degli studi effettuati sul modello sperimentale; più precisamente questa proprietà si riferisce alla capacità di un modello animale di identificare nuovi farmaci con potenziale efficacia terapeutica nelle patologie umane (McKinney, 1988).

Gli esperimenti condotti in questa tesi sono basati sui seguenti protocolli sperimentali e modelli animali.

### *2.1.1. Protocolli sperimentali*

Tre distinte fasi del comportamento di assunzione (drug taking) possono essere studiate usando l'operant self-administration: l'acquisizione, il mantenimento e il ripristino del comportamento operante (reinstatement) dopo un periodo di estinzione forzato (extinction phase).

Gli animali volontariamente si auto-somministrano sostanze che hanno nell'uomo un alto potenziale di abuso. Quando si dà ad un animale il libero accesso ad una sostanza d'abuso, i pattern dell'assunzione gradualmente mutano verso schemi comportamentali che sono propri dell'uomo; la self-administration è in grado proprio di mettere in evidenza questi aspetti, dando una misura del potenziale d'abuso di una sostanza.

Durante l'acquisizione, gli animali vengono sottoposti ad un training per apprendere il comportamento operante (operant behaviour) che consiste nel premere una leva per ottenere il reward e quindi la sostanza ricercata e desiderata (lever-responding). Tutte le sostanze che hanno un rinforzo positivo ed effetti gratificanti sono adatte a questi studi e vengono auto-somministrate dagli animali arrivando a generare un pattern comportamentale stabile e riproducibile (fase di mantenimento).

Nel cosiddetto “schema a rapporto fisso semplice”, ciascuna pressione della leva produce il rilascio di una dose della sostanza (fixed ratio 1, FR1); la risposta richiesta all’animale (response requirement, RR) quindi è pari ad una pressione. Dopo un periodo di assunzione stabile, l’RR può essere incrementato (FR1, FR2, etc), sessione dopo sessione, fintanto che l’animale è disposto a lavorare per la sostanza offerta e ciò è legato alla capacità della sostanza di produrre rinforzo. Se l’interesse dello studio è invece mettere in evidenza le proprietà incentivo-motivazionali della sostanza e la sua capacità di indurre craving (desiderio fortissimo e sovente irrefrenabile) è possibile utilizzare, una volta che gli animali hanno mostrato un comportamento di ricerca stabile nel tempo, due protocolli differenti:

- Schema a rapporto progressivo (progressive ratio, PR) – Questo protocollo è caratterizzato dall’incremento, reward dopo reward, dell’RR all’interno della sessione di self-administration; il lavoro richiesto per ottenere la sostanza viene quindi incrementato progressivamente (per esempio secondo Richardson e Roberts, 1996: RR: 4, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, ecc.). In questo protocollo quindi il comportamento di assunzione della sostanza (taking behaviour) è accoppiato al comportamento di ricerca (seeking behaviour) della stessa che si traduce in un’intensificazione del rinforzo dal quale scaturisce un aumento del craving. L’indice utilizzato per misurare la performance durante una sessione di PR è il breakpoint. Il valore di breakpoint può essere definito come (a) il più basso numero di pressioni richiesto sulla leva non raggiunto dal ratto (Rodd et al., 2003) nel corso della sessione, oppure (b) il più alto raggiunto (Hodos et al., 1963), ed è diretto a valutare l’efficacia del rinforzo (reinforcing efficacy) della sostanza d’abuso in questione;
- Extinction responding – Questo protocollo è caratterizzato dall’indisponibilità della sostanza. Gli animali infatti, durante la sessione sperimentale, premono la leva senza mai ottenere il reward. Manca quindi la componente rinforzante della sostanza ed il risultato fornisce una valutazione degli aspetti condizionanti del comportamento di ricerca.

Per mimare invece la ricaduta che avviene nell’uomo, il reinstatement del seeking behaviour è un protocollo largamente usato. In questo modello, gli animali vengono prima sottoposti al training e, quando hanno raggiunto un comportamento stabile, vengono sottoposti:

a) a tante sessioni di extinction responding quante ne sono richieste a ciascun ratto per raggiungere il criterio scelto (inteso come il massimo numero di pressioni sulla leva) [between-session procedure (Lê et al., 2006)]. Si assiste così ad un graduale “spegnimento” del craving e del seeking behaviour. Nella sessione successiva a quella in cui hanno raggiunto il criterio di estinzione, i ratti vengono sottoposti a stimoli che sono in grado di determinare il reinstatement (nuovo picco di seeking behaviour)

b) ad una singola sessione di extinction responding [within-session procedure (Bienkowski et al., 2000)] subito dopo la quale vengono presentati gli stimoli.

Questi stimoli possono essere di diversa natura: esposizione a stress (Shaham et al., 1996; Erb et al., 1996; Shalev et al., 2000), stimoli precedentemente accoppiati con la sostanza auto-somministrata (Meil e See, 1996; Weiss et al., 2000) o l'esposizione acuta alla sostanza auto-somministrata (de Wit e Stewart, 1981).

Un altro modello di ricaduta usato in questa tesi è un modello non operante: l'effetto da deprivazione di alcol (alcohol deprivation effect). Questo modello è stato messo a punto al fine di comprendere meglio le basi neurobiologiche della ricaduta da alcol e di identificare potenziali rimedi farmacologici. L'alcohol deprivation effect è definito come il temporaneo incremento nel consumo volontario di alcol, che si verifica dopo un periodo di astinenza dallo stesso, ed è stato proposto come un modello animale di ricaduta che mima quello umano (Martin-Fardon e Weiss, 2013) Nei ratti sP, numerosi esperimenti indicano che l'alcol deprivation effect si manifesta con consumi di alcol circa doppi nella prima ora di riesposizione alla soluzione alcolica dopo un periodo di deprivazione (e.g., Agabio et al., 2000; Serra et al., 2003).

La face validity e la predictive validity dei modelli di operant self-administration e dei modelli animali di ricaduta per le sostanze d'abuso sono ad oggi considerate significative (Fuchs et al., 1998; Epstein et al., 2006; Panlilio et al., 2007; O'Connor et al., 2011).

### *2.1.2. Ratti Sardinian Alcohol-Preferring: un 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.

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/die, consumo che viene mantenuto stabilmente nel tempo (Serra et al., 2003).

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

Gli esperimenti eseguiti per testare il nepicastat su questo modello sono stati:

- Esperimento 1 – Effetto da deprivazione di alcol (alcohol deprivation effect), protocollo sperimentale usato per saggiare l'effetto del nepicastat sulla ricaduta da alcol;
- Esperimento 2 – Auto-somministrazione orale operante di alcol, (operant, alcohol self-administration), protocollo utilizzato per saggiare l'effetto del nepicastat sulle proprietà di rinforzo dell'alcol;
- Esperimento 3 – Auto-somministrazione operante di cibo (operant, food self-administration), protocollo sperimentale di “controllo” usato per valutare la selettività degli effetti del nepicastat sull'alcol;
- Esperimento 4 – Attività locomotoria spontanea (spontaneous locomotor activity), protocollo utilizzato per saggiare potenziali effetti sedativi del nepicastat da solo ed in associazione con l'alcol.

### *2.1.3. Self-administration di cioccolato: un modello animale di “cioccolismo”*

Questo modello animale si basa sulle grandi proprietà motivazionali e di rinforzo di una soluzione di Nesquik al 5% v/v (Maccioni et al., 2008, 2010; Zaru et al., 2012, 2013; Colombo et al., 2014). I ratti acquisiscono molto velocemente l'operant behaviour e mantengono giornalmente alti livelli di lever-responding a FR10 (più di 2000 pressioni in 60 min.). Raggiunto il numero di pressioni richiesto per avere il rinforzo (RR) il meccanismo di un sipper estrude dentro la gabbia il beccuccio di una bottiglietta e per 5 sec. i ratti hanno accesso alla soluzione di cioccolato riuscendo a bere circa 3 ml/kg a rinforzo per un totale medio a fine sessione di 60-70 ml/kg. Questo comportamento operante assume aspetti compulsivo-simili, assimilabili ad un binge eating.

Questa procedura si presta a diversi protocolli sperimentali come il PR, l'extinction responding, ed il reinstatement indotto da stimoli ambientali.

Gli esperimenti eseguiti su questo modello sono stati:

- Esperimenti 5 e 10 – Auto-somministrazione operante di cioccolato (operant, chocolate self-administration) protocollo utilizzato per saggiare l'effetto di nepicastat e disulfiram sulle proprietà di rinforzo positivo della soluzione di cioccolato;
- Esperimenti 6 e 11 – Auto-somministrazione operante di cibo (operant, food self-administration) protocollo sperimentale di "controllo" usato per valutare la selettività dell'effetto di nepicastat e disulfiram su un cibo palatabile come è il cioccolato;
- Esperimenti 7 e 12 – Progressive ratio protocollo utilizzato per saggiare l'effetto di nepicastat e disulfiram sulle proprietà incentivo-motivazionali della soluzione di cioccolato;
- Esperimenti 8 e 13 – Reinstatement protocollo utilizzato per saggiare l'effetto di nepicastat e disulfiram sulle proprietà della soluzione di cioccolato di indurre reinstatement;
- Esperimenti 9 e 14 – Attività locomotoria spontanea (spontaneous locomotor activity) protocollo utilizzato per saggiare potenziali effetti sedativi di nepicastat e disulfiram.

### **3. MATERIALI E METODI**

Le procedure sperimentali impiegate nel precedente studio sono in accordo con la legge italiana sulla protezione degli animali usati per esperimenti e altre ragioni di tipo scientifico.

#### **3.1. Preparazione dei farmaci**

- Nepicastat – il nepicastat (SYN117, Biotie, Turku, Finlandia) è stato sospeso in salina con lo 0.3% di DMSO e lo 0.3% di Tween 80 e somministrato per via intraperitoneale (i.p.) (volume di iniezione 2 ml/kg) alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 3h prima del test (eccetto come descritto più avanti). Il dose range scelto, la via di somministrazione ed il tempo di pretrattamento sono stati scelti sia sulla base di studi preliminari eseguiti in laboratorio sia sulla base di quanto riportato in letteratura in particolare riguardo agli effetti soppressivi sul reinstatement da cocaina (Schroeder et al., 2010; Schroeder et al., 2013);

- Disulfiram – il disulfiram (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania) è stato sospeso in salina con alcune gocce di Tween 80 e somministrato per via i.p. (volume di iniezione 2 ml/kg) alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 2h prima del test (eccetto come descritto più avanti). Il dose range scelto, la via di somministrazione ed il tempo di pretrattamento sono stati scelti sulla base di quanto riportato in letteratura in particolare riguardo agli effetti soppressivi sul reinstatement da cocaina (Schroeder et al., 2010).

### 3.2. Test sui comportamenti alcol-correlati

#### 3.2.1. *Animali*

Sono stati utilizzati ratti sP maschi dell'80<sup>a</sup> generazione che all'inizio delle sperimentazioni avevano un'età di circa 75 giorni.

I ratti sono stati alloggiati 4 per gabbia (home cage) tranne che nell'esperimento 1 dove, dall'età di 60 giorni, sono stati alloggiati in gabbie singole standard; tutte le gabbie erano provviste di un letto di segatura di legno.

Tutti gli animali:

- erano soggetti ad un ciclo luce-buio di 12h:12h con temperatura costante di 22±2°C ed umidità relativa dell'ambiente di circa il 60%;
- avevano cibo standard (5001 LabDiet; International Product Supplies, Londra, Regno Unito) e acqua di rubinetto *ad libitum* (eccetto come descritto più avanti);
- sono stati assiduamente manipolati per l'iniezione i.p. ed intragastrica (i.g.) dove richiesto.

In ciascun esperimento è stato usato un set indipendente di ratti.

#### 3.2.2. *Esperimento 1 - Alcohol Deprivation Effect*

##### Fase 1 – apprendimento

All'inizio tutti i ratti (n=45) sono stati esposti, con accesso illimitato 24h su 24h per 4 settimane consecutive, alla libera scelta tra 2 bottiglie: alcol 10% v/v e acqua.

Il consumo di acqua, cibo ed alcol è stato monitorato giornalmente.

##### Fase 2 – deprivazione

Dopo le due settimane i ratti sono stati divisi in due gruppi in maniera tale che fossero bilanciati i consumi di cibo, alcol ed acqua negli ultimi 7 giorni prima del test.

Un gruppo di ratti (n=36) è stato deprivato di alcol per 14 giorni consecutivi durante i quali l'unico fluido disponibile era l'acqua (ratti alcol-deprivati). Il secondo gruppo di ratti (n=9)

ha continuato ad avere accesso illimitato all'alcol e all'acqua (ratti non alcol-deprivati), con unica eccezione per le 6h prima dell'inizio del test sperimentale (l'alcol è stato infatti rimosso per garantire che il livello dell'alcolemia fosse a zero all'inizio del test).

### Fase 3 – fase test

- *Ratti alcol-deprivati* – alla fine del quattordicesimo giorno di deprivazione i 36 ratti sono stati divisi in 4 sottogruppi ai quali sono state somministrate le 4 dosi di nepicastat (0, 25, 50, and 100 mg/kg) 3h prima della nuova disponibilità dell'alcol;
- *Ratti non alcol-deprivati* – in concomitanza con i ratti del gruppo precedente, i 9 ratti sono stati trattati col veicolo usato per preparare il nepicastat 3h prima della nuova disponibilità dell'alcol.

Le variabili misurate sono state il consumo di alcol (g/kg), l'acqua (ml/kg) ed il cibo (g/kg). Le registrazioni sono state fatte 60 min. dopo l'introduzione dell'alcol, questo perché si è visto che i primi 60 min. sono i più significativi per il comportamento legato all'alcohol deprivation effect nei ratti sP (es. Agabio et al., 2000; Serra et al., 2003).

I dati di ciascuna variabile sono stati analizzati come segue:

- comparazione tra i gruppi di controllo del gruppo “ratti non alcol-deprivati” ed i gruppi di controllo del gruppo “ratti alcol-deprivati” con un test *t di Student* a due code o un test di *Mann–Whitney*;
- comparazione tra i subgruppi del gruppo “ratti alcol-deprivati” trattati con le dosi di nepicastat (compreso il veicolo) con un'ANOVA ad una via seguita dal test di *Dunnett* o dal test di *Kruskal–Wallis* per l'analisi *post hoc*.

### 3.2.3. *Esperimento 2 - Operant, Oral Alcohol Self-Administration*

*Apparati* – Le sessioni di alcohol self-administration sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna gabbia è stato equipaggiato con due leve retrattili, un ricettacolo con due coppette per contenere i liquidi e due stimoli luminosi (uno verde ed uno bianco) montati sopra ciascuna leva. Le coppette per il liquido erano collegate a due siringhe azionate da pompe automatizzate collocate fuori dalla gabbia. Un'altra luce era posizionata nella parte alta centrale del pannello posteriore. Per metà dei ratti la leva destra era associata all'alcol. Al raggiungimento dell' RR:

1. si attivava la pompa dell'alcol con l'erogazione di 0.1 ml;
2. si accendeva la luce verde per 2 sec. durante l'erogazione.

Per questi ratti la leva sinistra era associata alla pompa erogante l'acqua ed il raggiungimento dell'RR produceva l'attivazione della pompa dell'acqua con l'erogazione di 0.1 ml e la contemporanea accensione della luce verde sempre per 2 sec..

Lo studio è stato disegnato per avere la seconda metà degli animali nelle condizioni diametralmente opposte (ovvero leva destra acqua e leva sinistra alcol).

*Procedura sperimentale* – La procedura usata è identica a quella che convenzionalmente è stata impiegata nei ratti sP (es. Maccioni et al., 2012). In particolare, i ratti (n=16) sono stati inizialmente esposti, nella home cage, alla libera scelta tra alcol (10% v/v) ed acqua per un accesso illimitato di 10 giorni. Successivamente i ratti sono stati introdotti in gabbie operanti per iniziare la fase di apprendimento (training) dell'operant behaviour utile ad ottenere l'alcol. Le sessioni di self-administration sono state fatte durate 30 min. (con la sola eccezione della prima sessione di training che è stata fatta durare 120 min.) e sono state condotte 5 giorni a settimana (dal lunedì al venerdì). I ratti erano privati di acqua durante le 18h precedenti la prima sessione di training. All'inizio i ratti sono stati esposti a FR1 per il 10% di alcol (v/v) per quattro giorni consecutivi; alle sessioni nove e dieci la soluzione di alcol è stata portata alla concentrazione finale del 15% (v/v). I ratti sono stati successivamente esposti a quattro sessioni in cui a giorni alterni avevano disponibile o solo l'alcol o solo l'acqua. L'FR per l'acqua richiedeva una pressione, FR1, mentre per l'alcol 4 pressioni, FR4.

Dopo questa fase transitoria entrambe le leve, e quindi sia l'alcol che l'acqua, erano sempre disponibili. Affinché l'operant behaviour si stabilizzasse si è proceduti con una fase di mantenimento di venti sessioni. Per il test sono stati scelti i 12 ratti che hanno mostrato il comportamento più stabile negli ultimi cinque giorni precedenti il test. Durante il test sperimentale l'alcol veniva erogato ad un RR pari a 4, mentre l'acqua ad un RR pari ad 1.

Le sessioni di test sono state fatte durate 30 min. e sono state condotte il venerdì.

Il nepicastat, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 3h prima l'inizio della sessione sperimentale.

Tutte le quattro dosi sono state testate in ciascun ratto secondo uno schema sperimentale a quadrato latino (Latin square design). Tra una sessione sperimentale e l'altra sono intercorse quattro sessioni regolari di self-administration (da lunedì a giovedì) senza trattamento.

Le variabili misurate sono state:

- il numero totale di risposte sulle leve (lever-responses);
- il totale dell'alcol e dell'acqua autosomministrati in ml/kg (alcohol e water intake).

I dati di ciascuna variabile sono stati analizzati con un'ANOVA ad una via seguita dal *Newman Keuls* come *post hoc*.

#### 3.2.4. *Esperimento 3 - Operant, Food Self-Administration*

*Apparati* – Le sessioni di food self-administration sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna camera era equipaggiato con una leva retrattile, una mangiatoia per il cibo, ed uno stimolo luminoso rosso montato sopra la leva. Al raggiungimento dell'RR:

1. si attivava il food dispenser che rilasciava un pellet da 45mg (5001 LabDiet; International Product Supplies, London, la cui composizione era identica a quella che i ratti avevano ad libitum nella loro home cage);
2. si accendeva la luce rossa durante l'erogazione.

*Procedura sperimentale* – Un set indipendente di ratti (n=20) è stato utilizzato per il test sulla food self-administration. Per facilitare l'acquisizione dell'operant behaviour, ed il mantenimento dello stesso, i ratti erano soggetti ad un regime di leggera deprivazione. Il tutto è stato calibrato per ottenere una baseline di pressioni, sulla leva per i pellets di cibo, equiparabile a quella generata dall'alcol nell'esperimento di self-administration.

Le sessioni di auto somministrazione sono state condotte cinque giorni a settimana durante le prime 4h della fase di buio del ciclo luce/buio. Le sessioni di self-administration sono state fatte durare 30 min. Durante le prime due sessioni i ratti erano ad FR1. L'FR fu progressivamente incrementato da FR1 a FR4 in quattro sessioni. Successivamente, sono state fatte venti sessioni aggiuntive di mantenimento a FR4.

Per il test sono stati scelti i 12 ratti che hanno mostrato il comportamento più stabile negli ultimi cinque giorni precedenti il test.

Durante il test sperimentale i pellets di cibo venivano erogati ad un RR pari a 4.

Le sessioni di test sono state fatte durate 30 min. e sono state condotte il venerdì.

Il nepicastat, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 3h prima l'inizio della sessione sperimentale.

Tutte le quattro dosi sono state testate in ciascun ratto secondo uno schema sperimentale a quadrato latino (Latin square design). Tra una sessione sperimentale e l'altra sono intercorse quattro sessioni regolari di self-administration (da lunedì a giovedì) senza trattamento.

Le variabili misurate sono state:

- il numero totale di risposte sulle leve (lever-responses);
- il totale dei pellets di cibo autosomministrati in g/kg (food intake).

I dati di ciascuna variabile sono stati analizzati con un'ANOVA ad una via seguita dal *Newman Keuls* come *post hoc*.

### 3.2.5. Esperimento 4 - Spontaneous Locomotor Activity

*Apparati* – L'attività locomotoria (intesa come deambulazione) è stata misurata dal computer sulla base del numero di passaggi davanti alle fotocellule (spazio tra le fotocellule 40mm) in box di plexiglas (480x480x400 mm) muniti di fotocellule collegate ad un computer (Motil TSE, Bad Homburg, Germania).

*Procedura sperimentale* – Nel giorno del test i pellets di cibo sono stati rimossi dalla home cage 4h prima della somministrazione dell'alcol, per assicurarsi che i ratti avessero lo stomaco vuoto al momento della somministrazione dell'alcol. I ratti sono stati divisi in sei gruppi (n=12), raggruppati in modo tale che avessero un peso corporeo medio simile.

Il nepicastat, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 3h prima dell'inizio della sessione sperimentale.

Tre ore dopo la somministrazione del nepicastat ai ratti è stato somministrato per via intragastrica alcol al 20% v/v, in acqua distillata, alle dosi 0 e 2 g/kg. Questa via di somministrazione è stata scelta sulla base di precedenti studi preliminari incentrati sulla dose che desse leggeri segni di ipolocomozione nei ratti sP.

Cinque minuti dopo la somministrazione dell'alcol, i ratti sono stati messi nei box per il test di motilità. Questi box erano sistemati in una stanza vicina allo stabulario.

Le sessioni di attività locomotoria sono state condotte su gruppi indipendenti di ratti, nella prima metà della fase di buio del ciclo luce/buio.

I ratti erano tutti *naive* al box, per garantire un'alta baseline di motilità così da magnificare possibili effetti soppressivi legati al trattamento. Le sessioni sono state fatte durare 30 min. e l'attribuzione ai box è stata random. Alla fine di ogni sessione i box venivano puliti.

Le variabili misurate sono state:

- numero delle conte ogni 5 min. nell'arco dei 30 min. di sessione;
- numero totale di conte nei 30 min..

I dati ricavati ogni 5 min. sono stati analizzati con una ANOVA a due vie (fattori trattamento e tempo) con le misure ripetute per il fattore tempo; i dati derivanti dal numero

totale di conte, intese come interruzioni delle fotocellule, sono stati analizzati con una ANOVA ad una via.

### **3.3. Test sui comportamenti cioccolato-correlati**

#### *3.3.1. Animali*

Sono stati utilizzati ratti Wistar maschi adulti (Charles River Laboratories, Calco, Italia). I ratti sono stati alloggiati 4 per gabbia (home cage) tranne che nell'esperimento 4 dove sono stati alloggiati in gabbie singole standard; tutte le gabbie erano provviste di un letto di segatura di legno.

Tutti gli animali:

- erano soggetti ad un ciclo luce-buio di 12h:12h con temperatura costante di  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  ed umidità relativa dell'ambiente di circa il 60%;
- avevano cibo standard cod. 4RF21 (Mucedola, Settimo Milanese, Italia), eccetto nell'esperimento 6 dove avevano il cibo cod. 5001 (LabDiet; International Product Supplies, Londra, Regno Unito), e acqua di rubinetto *ad libitum* eccetto come descritto più avanti;
- sono stati assiduamente manipolati per l'iniezione i.p..

In ciascun esperimento è stato usato un set indipendente di ratti.

#### *3.3.2. Soluzione di cioccolato*

La soluzione di cioccolato è stata preparata con polvere di Nesquik® (Nestlè) diluita in acqua di rubinetto alla concentrazione del 5% (p/v). Questa concentrazione è stata selezionata sulla base di precedenti esperimenti nei quali è stata largamente preferita tra un ampio numero di concentrazioni (Maccioni et al., 2008).

La soluzione è stata preparata giornalmente e le bottiglie del sipper (vedi più avanti) sono state agitate prima di ogni sessione per prevenire lo sviluppo di depositi. Questa soluzione di cioccolato dà un apporto energetico pari a 0.8 kJ/g.

a) Trattamento col nepicastat

3.3.3. *Esperimento 5 - Operant, Chocolate Self-Administration*

*Apparati* – Le sessioni di chocolate self-administration sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna gabbia è stato equipaggiato con una leva retrattile, uno stimolo luminoso verde montato sopra la leva ed un pannello forato attraverso cui passava il beccuccio di un sipper (250ml di capacità) situato fuori dalla gabbia. Un'altra luce era posizionata nella parte alta centrale del pannello posteriore. Al raggiungimento dell' RR:

1. si attivava il sipper con esposizione del beccuccio per 5 sec.;
2. si accendeva contestualmente la luce verde per 5 sec..

*Procedura sperimentale* – Per facilitare l'acquisizione dell'operant behaviour i ratti sono stati privati dell'acqua nella loro home cage nelle 12h precedenti la prime sessioni operanti. Le sessioni di self-administration sono state condotte giornalmente 7 giorni a settimana durante le prime 4h della fase di buio del ciclo luce/buio. Le sessioni sono state fatte durare 30 min.

Durante le prime due sessioni i ratti erano ad FR1. L'FR fu progressivamente incrementato da FR1 a FR10 in dieci sessioni. Successivamente, sono state fatte dieci sessioni aggiuntive di mantenimento a FR10.

In questo esperimento sono stati usati 12 ratti. Durante le sessioni di test, l'RR è rimasto ad FR10. Le sessioni sono state fatte durare 30 min. e sono state condotte di venerdì con sei sessioni di mantenimento da sabato a giovedì. Le baseline erano costanti ed identiche a quelle registrate nei ratti di controllo dell'esperimento.

Il nepicastat, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 3h prima l'inizio della sessione sperimentale.

Tutte le quattro dosi sono state testate in ciascun ratto secondo uno schema sperimentale a quadrato latino (Latin square design). Tra una sessione sperimentale e l'altra sono intercorse sei sessioni regolari di self-administration (da sabato a giovedì) senza trattamento.

Le variabili misurate sono state:

- il numero totale di risposte sulle leve (lever-responses);
- il totale di soluzione di cioccolato auto-somministrata in ml/kg (chocolate intake) stimata pesando le bottigliette prima e dopo la sessioni (0.1 g di accuratezza).

I dati di ciascuna variabile sono stati analizzati con un'ANOVA ad una via con misure ripetute seguita dal test di *Newman Keuls* come *post hoc*.

#### 3.3.4. *Esperimento 6 - Operant, Food Self-Administration*

*Apparati* – Le sessioni di food self-administration sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna gabbia è stato equipaggiato con una leva retrattile, uno stimolo luminoso verde montato sopra la leva ed una mangiatoia per i pellets di cibo (cibo base 5TUM International Product Supplies Limited Pellets) la composizione del quale era identica al cibo disponibile nella home cage. Un'altra luce era posizionata nella parte alta centrale del pannello posteriore. Al il raggiungimento dell'RR:

1. si attivava un food dispenser che rilasciava un pellet di cibo da 45mg;
2. si accendeva contestualmente la luce verde per 2 sec..

*Procedura sperimentale* – Per facilitare l'acquisizione dell'operant behaviour i ratti erano soggetti ad un regime di leggera deprivazione. Il tutto è stato calibrato per ottenere una baseline di pressioni sulla leva per i pellets di food equiparabile a quella generata dal cioccolato nell'esperimento di self-administration. Le sessioni di self-administration sono state condotte giornalmente, 7 giorni a settimana, durante le prime 4h della fase di buio del ciclo luce/buio. Le sessioni sono state fatte durare 30 min..

In questo esperimento sono stati usati 12 ratti. Durante le prime due sessioni i ratti erano ad FR1. L'FR fu progressivamente incrementato da FR1 a FR10 in dieci sessioni. Successivamente, sono state fatte dieci sessioni aggiuntive di mantenimento a FR10.

Durante le sessioni di test, l'RR è rimasto ad FR10. Le sessioni sono state fatte durare 30 min. e sono state condotte di venerdì con sei sessioni di mantenimento da sabato a giovedì. Le baseline erano costanti ed identiche a quelle registrate nei ratti di controllo dell'esperimento.

Il nepicastat, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 3h prima dell'inizio della sessione sperimentale.

Tutte le quattro dosi sono state testate in ciascun ratto secondo uno schema sperimentale a quadrato latino (latin square design). Tra una sessione sperimentale e l'altra sono intercorse sei sessioni regolari di self-administration (da sabato a giovedì) senza trattamento.

Le variabili misurate sono state:

- il numero totale di risposte sulle leve (lever-responses);
- il totale pellets autosomministrata in g/kg (food intake).

I dati di ciascuna variabile sono stati analizzati con un'ANOVA ad una via con misure ripetute seguita dal *Newman Keuls* come *post hoc*.

### 3.3.5. Esperimento 7- Progressive ratio

*Apparati* – Le sessioni di progressive ratio sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna gabbia è stato equipaggiato con una leva retrattile, uno stimolo luminoso verde montato sopra la leva ed un pannello forato attraverso cui passava il beccuccio di un sipper (250 ml di capacità) situato fuori dalla gabbia. Un'altra luce era posizionata nella parte alta centrale del pannello posteriore. Al raggiungimento dell'RR:

1. si attivava il sipper con esposizione del beccuccio per 5 sec.;
2. si accendeva contestualmente la luce verde per 5 sec..

*Procedura sperimentale* – In questo esperimento sono stati usati 9 ratti. Durante il test sperimentale l'RR è stato incrementato progressivamente, sessione dopo sessione, riadattando lo schema proposto da Richardson e Roberts (Richardson e Roberts, 1996); l'RR era incrementato come segue: 10, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, etc.

Le sessioni sono state fatte durare 60 min. e sono state condotte di venerdì con sei sessioni di mantenimento da sabato a giovedì.

Il nepicastat, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 3h prima l'inizio della sessione sperimentale.

Tutte le quattro dosi sono state testate in ciascun ratto secondo uno schema sperimentale a quadrato latino (Latin square design). Tra una sessione sperimentale e l'altra sono intercorse sei sessioni regolari di self-administration (da sabato a giovedì) senza trattamento.

Le variabili misurate sono state:

- il numero delle pressioni sulla leva;
- il valore di breakpoint per la soluzione di cioccolato definito come il più basso RR non raggiunto dai ratti (Maccioni et al., 2006; Rodd et al., 2003; Oster et al., 2006; Madden et al., 2007).

I dati di ciascuna variabile sono stati analizzati con un'ANOVA ad una via con misure ripetute seguita dal *Newman Keuls* come *post hoc*.

### 3.3.6. *Esperimento 8 - Extinction respondig e Reinstatement*

*Apparati* – Le sessioni di extinction respondig e reinstatement sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna gabbia è stato equipaggiato con una leva retrattile, uno stimolo luminoso verde montato sopra la leva ed un pannello forato attraverso cui passava il beccuccio di un sipper (250 ml di capacità) situato fuori dalla gabbia. Un'altra luce era posizionata nella parte alta centrale del pannello posteriore. L'attivazione della luce verde e del sipper è stata programmata come descritto in seguito.

*Procedura sperimentale* – In questo esperimento sono stati usati 32 ratti divisi in 4 gruppi di 8 animali in base al numero delle pressioni sulla leva ed all'ammontare della soluzione di cioccolato consumata nelle cinque sessioni precedenti della fase di mantenimento. Alla fine della fase di mantenimento i ratti di tutti i gruppi sono stati sottoposti a più sessioni di extinction responding ciascuna delle quali è stata fatta durare 60 min. Queste sessioni erano caratterizzate dalla non disponibilità della soluzione di cioccolato. In particolare gli stimoli luminosi erano spenti e la leva era sì disponibile ma non collegata all'erogazione del rinforzo. Il criterio per definire un ratto estinto è stato: meno di 30 pressioni eseguite in tre sessioni consecutive. Il giorno dopo il raggiungimento del criterio di estinzione ogni singolo ratto è stato sottoposto alla sessione di reinstatement all'inizio della quale è stato presentato il complesso di stimoli precedentemente associato alla disponibilità della soluzione di cioccolato. Questo complesso di stimoli era composto da:

1. il rumore prodotto dall'introduzione del sipper nella gabbia operante;
2. l'accensione dello stimolo luminoso;
3. la disponibilità della soluzione di cioccolato per 5 sec..

Questa associazione di stimoli è stata presentata per dieci volte in un arco di tempo di 100". Immediatamente dopo la presentazione del complesso di stimoli la leva veniva introdotta dentro la gabbia, la luce della gabbia veniva accesa e venivano registrate le pressioni sulla leva che non erano però legate all'erogazione del rinforzo.

Il nepicastat, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 3h prima dell'inizio della sessione sperimentale.

La variabile misurata è stata il numero di pressioni sulla leva durante la fase di test.

I dati sull'effetto del nepicastat su questa variabile sono stati analizzati da un'ANOVA a due vie [fase (extinction/reinstatement); trattamento (dosi di nepicastat)] con misure ripetute sul fattore fase seguita dal test di *Newman Keuls* come *post hoc*.

Un'ulteriore analisi ha riguardato il numero di sessioni richiesti per raggiungere il criterio di estinzione; questi dati sono stati analizzati con una ANOVA ad una via.

### 3.3.7. *Esperimento 9 - Spontaneous Locomotor Activity*

*Apparati* – L'attività locomotoria (intesa come deambulazione) è stata misurata dal computer sulla base del numero di passaggi davanti alle fotocellule (spazio tra le fotocellule 40mm) in box di plexiglas (480x480x400 mm) muniti di fotocellule collegate ad un computer (Motil TSE, Bad Homburg, Germania).

*Procedura sperimentale* – Il giorno del test i ratti sono stati divisi in 2 gruppi composti da 4 sottogruppi di 8/9 animali, raggruppati in modo tale che avessero un peso corporeo simile. Le sessioni di attività locomotoria sono state condotte nella prima metà della fase di buio del ciclo luce/buio.

I ratti erano tutti "naive" al box per garantire un'alta baseline di motilità, così da magnificare possibili effetti soppressivi legati al trattamento. Le sessioni sono state fatte durare 30 min. e l'attribuzione ai box è stata random. Alla fine di ogni sessione i box venivano puliti. Il nepicastat, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato, a seconda del gruppo sperimentale, 3h o 24h prima dell'inizio del test alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg.

La variabile misurata è stata il numero totale di conte nei 30 min., intese come interruzioni delle fotocellule

I dati dell'effetto del nepicastat ricavati da ciascun gruppo sono stati analizzati da separate ANOVA ad una via.

## b) Trattamento col disulfiram

### 8.3.8. *Esperimento 10 - Operant, Chocolate Self-Administration*

*Apparati* – Le sessioni di chocolate self-administration sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna gabbia è stato equipaggiato con una leva retrattile, uno stimolo luminoso verde montato sopra la leva ed un pannello forato attraverso cui passava il beccuccio di un sipper (250ml di capacità) situato fuori dalla gabbia. Un'altra luce era posizionata nella parte alta centrale del pannello posteriore. Al raggiungimento dell' RR:

1. si attivava il sipper con esposizione del beccuccio per 5 sec.;
2. si accendeva contestualmente la luce verde per 5 sec..

*Procedura sperimentale* – Per facilitare l'acquisizione dell'operant behaviour i ratti sono stati privati dell'acqua nella loro home cage nelle 12h precedenti le prime sessioni operanti. Le sessioni di self-administration sono state condotte giornalmente 7 giorni a settimana, durante le prime 4h della fase di buio del ciclo luce/buio. Le sessioni sono state fatte durare 20 min.

Durante le prime due sessioni i ratti erano ad FR1. L'FR fu progressivamente incrementato da FR1 a FR10 in dieci sessioni. Successivamente, sono state fatte dieci sessioni aggiuntive di mantenimento a FR10.

In questo esperimento sono stati usati 32 ratti divisi in quattro gruppi di 8 (n=8), in modo che la media delle cinque sessioni precedenti il test fosse simile. Durante le sessioni di test, l'RR è rimasto ad FR10. La sessione di test è stata effettuata alla fine della fase di mantenimento ed è stata fatta durare 20 min..

Il disulfiram, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 2h prima dell'inizio della sessione sperimentale.

Le variabili misurate, registrate per sei sessioni consecutive, sono state:

- il numero totale di risposte sulle leve (lever-responses);
- il totale di soluzione di cioccolato auto-somministrata in ml/kg (chocolate intake) stimata pesando le bottigliette prima e dopo le sessioni (0.1 g di accuratezza).

I dati di ciascuna variabile sono stati analizzati con un'ANOVA a due vie (trattamento; tempo) con misure ripetute seguita dal test di *Newman Keuls* come *post hoc*.

### 3.3.9. *Esperimento 11 - Operant, Food Self-Administration*

*Apparati* – Le sessioni di food self-administration sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna gabbia è stato equipaggiato con una leva retrattile, uno stimolo luminoso verde montato sopra la leva ed una mangiatoia per i pellets di cibo (cibo base 5TUM International Product Supplies Limited Pellets), la composizione del quale era identica al cibo disponibile nella home cage. Un'altra luce era posizionata nella parte alta centrale del pannello posteriore. Al raggiungimento dell'RR:

1. si attivava un food dispenser che rilasciava un pellet di cibo da 45mg;
2. si accendeva contestualmente la luce verde per 2 sec..

*Procedura sperimentale* – Per facilitare l'acquisizione dell'operant behaviour, i ratti erano soggetti ad un regime di leggera deprivazione. Il tutto è stato calibrato per ottenere una baseline di pressioni sulla leva per i pellets di food equiparabile a quella generata dal cioccolato nell'esperimento di self-administration. Le sessioni di self-administration sono state condotte giornalmente 7 giorni a settimana durante le prime 4h della fase di buio del ciclo luce/buio. Le sessioni sono state fatte durare 20 min.

Durante le prime due sessioni i ratti erano ad FR1. L'FR fu progressivamente incrementato da FR1 a FR10 in dieci sessioni. Successivamente, sono state fatte dieci sessioni aggiuntive di mantenimento a FR10.

In questo esperimento sono stati usati 32 ratti divisi in quattro gruppi di 8 (n=8) in modo che la media delle cinque sessioni precedenti il test fosse simile. Durante le sessioni di test, l'RR è rimasto ad FR10. La sessione di test è stata effettuata alla fine della fase di mantenimento ed è stata fatta durare 20 min.

Il disulfiram, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 2h prima dell'inizio della sessione sperimentale.

Le variabili misurate, registrate per sei sessioni consecutive, sono state:

- il numero totale di risposte sulle leve (lever-responses);
- il totale pellets autosomministrata in g/kg (food intake).

I dati di ciascuna variabile sono stati analizzati con un'ANOVA a due vie (trattamento; tempo) con misure ripetute seguita dal test di *Newman Keuls* come *post hoc*.

### 3.3.10. Esperimento 12 - Progressive ratio

*Apparati* – Le sessioni di progressive ratio sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna gabbia è stato equipaggiato con una leva retrattile, uno stimolo luminoso verde montato sopra la leva ed un pannello forato attraverso cui passava il beccuccio di un sipper (250 ml di capacità) situato fuori dalla gabbia. Un'altra luce era posizionata nella parte alta centrale del pannello posteriore. Al raggiungimento dell'RR:

1. si attivava il sipper con esposizione del beccuccio per 5 sec.;
2. si accendeva contestualmente la luce verde per 5 sec..

*Procedura sperimentale* – In questo esperimento sono stati usati 32 ratti divisi in quattro gruppi di 8 (n=8) in modo che la media delle cinque sessioni precedenti il test fosse simile. Durante il test sperimentale l'RR è stato incrementato progressivamente, sessione dopo sessione, riadattando lo schema proposto da Richardson e Roberts (Richardson e Roberts, 1996); l'RR era incrementato come segue: 10, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, etc.

La sessione di test è stata effettuata alla fine della fase di mantenimento ed è stata fatta durare 60 min. Il disulfiram, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 48h prima l'inizio della sessione sperimentale. Il tempo di pretrattamento è stato scelto sulla base degli esperimenti n°10 e n°14. Nessuna sessione è stata effettuata all'interno di questo intervallo di tempo.

Le variabili misurate sono state:

- il numero delle pressioni sulla leva;
- il valore di breakpoint per la soluzione di cioccolato definito come il più basso RR non raggiunto dai ratti (Maccioni et al., 2006; Rodd et al., 2003; Oster et al., 2006; Madden et al., 2007).

I dati di ciascuna variabile sono stati analizzati con un'ANOVA ad una via con misure ripetute seguita dal *Newman Keuls* come *post hoc*.

### 3.3.11. Esperimento 13 - Extinction responding e Reinstatement

*Apparati* – Le sessioni di extinction responding e reinstatement sono state condotte in gabbie operanti modulari (Med Associates, St. Albans, VT, USA) sistemate in box ventilati che attenuano i rumori.

Il pannello frontale di ciascuna gabbia è stato equipaggiato con una leva retrattile, uno stimolo luminoso verde montato sopra la leva ed un pannello forato attraverso cui passava il beccuccio di un sipper (250 ml di capacità) situato fuori dalla gabbia. Un'altra luce era posizionata nella parte alta centrale del pannello posteriore. L'attivazione della luce verde e del sipper è stata programmata come descritto in seguito.

*Procedura sperimentale* – In questo esperimento sono stati usati 32 ratti divisi in 4 gruppi da 8 animali in base al numero delle pressioni sulla leva ed all'ammontare della soluzione di cioccolato consumata nelle cinque sessioni precedenti della fase di mantenimento. Alla fine della fase di mantenimento i ratti di tutti i gruppi sono stati sottoposti a più sessioni di extinction responding, ciascuna delle quali è stata fatta durare 60 min. Queste sessioni erano caratterizzate dalla non disponibilità della soluzione di cioccolato. In particolare gli stimoli luminosi erano spenti e la leva era sì disponibile ma non collegata all'erogazione del rinforzo. Il criterio per definire un ratto estinto è stato: meno di 30 pressioni eseguite in tre sessioni consecutive. Il giorno dopo il raggiungimento del criterio di estinzione ogni singolo ratto è stato sottoposto alla sessione di reinstatement all'inizio della quale è stato presentato il complesso di stimoli precedentemente associato alla disponibilità della soluzione di cioccolato. Questo complesso di stimoli era composto da:

1. il rumore prodotto dall'introduzione del sipper nella gabbia operante;
2. l'accensione dello stimolo luminoso;
3. la disponibilità della soluzione di cioccolato per 5 sec..

Questa associazione di stimoli è stata presentata per dieci volte in un arco di tempo di 100 sec.. Immediatamente dopo la presentazione del complesso di stimoli la leva veniva introdotta dentro la gabbia, la luce della gabbia veniva accesa e venivano registrate le pressioni sulla leva che non erano però legate all'erogazione del rinforzo.

Il disulfiram, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato alle dosi di 0, 25, 50 e 100 mg/kg 48h prima dell'inizio della sessione sperimentale. Il tempo di pretrattamento è stato scelto sulla base degli esperimenti n°10 e n°14. Nessuna sessione è stata effettuata all'interno di questo intervallo di tempo.

La variabile misurata è stata il numero di pressioni sulla leva durante la fase di test.

I dati sull'effetto del disulfiram su questa variabile sono stati analizzati da un'ANOVA a due vie [fase (extinction/reinstatement); trattamento (dosi di disulfiram)] con misure ripetute sul fattore fase seguita dal test di *Newman Keuls* come *post hoc*.

Un'ulteriore analisi ha riguardato il numero di sessioni richieste per raggiungere il criterio di estinzione; questi dati sono stati analizzati con una ANOVA ad una via e col Log Rank test.

### 3.3.12. *Esperimento 14 - Spontaneous Locomotor Activity*

*Apparati* – L'attività locomotoria (intesa come deambulazione) è stata misurata dal computer sulla base del numero di passaggi davanti alle fotocellule (spazio tra le fotocellule 40mm) in box di plexiglas (480x480x400 mm) muniti di fotocellule collegate ad un computer (Motil TSE, Bad Homburg, Germania).

*Procedura sperimentale* – Il giorno del test i ratti sono stati divisi in 2 gruppi composti da 3 sottogruppi di 7/8 animali raggruppati in modo tale che avessero un peso corporeo simile. Le sessioni di attività locomotoria sono state condotte nella prima metà della fase di buio del ciclo luce/buio.

I ratti erano tutti *naive* al box per garantire un'alta baseline di motilità così da magnificare possibili effetti soppressivi legati al trattamento. Le sessioni sono state fatte durare 60 min. e l'attribuzione ai box è stata random. Alla fine di ogni sessione i box venivano puliti. Il disulfiram, sospeso come descritto precedentemente, è stato somministrato, a seconda del gruppo sperimentale, 2h o 48h prima dell'inizio del test alle dosi di 0, 50 e 100 mg/kg. La variabile misurata è stata il numero totale di conte nei 60 min. intese come interruzioni delle fotocellule.

I dati dell'effetto del disulfiram ricavati da ciascun gruppo sono stati analizzati da separate ANOVA ad una via.

## 4. RISULTATI

### 4.1. Effetto del nepicastat sui comportamenti alcol-correlati

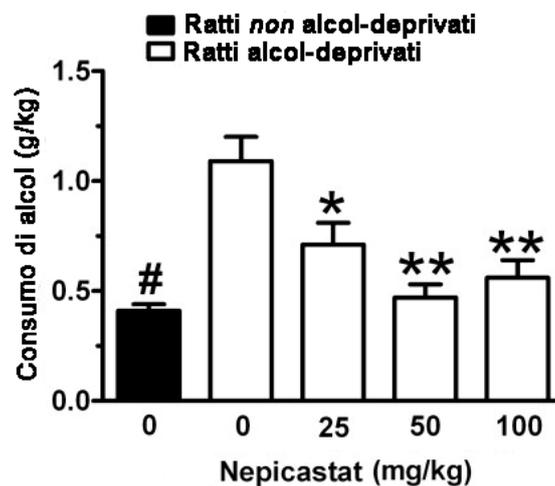
#### 4.1.1. *Esperimento 1 - Alcohol Deprivation Effect*

Il consumo di alcol nei ratti trattati col veicolo nel gruppo "ratti alcol-deprivati" è stato 2.5 volte più alto di quello registrato nei ratti trattati col veicolo del gruppo "ratti alcol non-deprivati" ( $p < 0.0005$ , test t di Student) (Fig. 1); questo è un indice di un effetto da alcohol deprivation effect.

L'ANOVA indica un effetto significativo del trattamento col nepicastat [ $F(3,32)=9.37$ ,  $p<0.0005$ ]. L'analisi *post hoc* indica che il trattamento con tutte le dosi di nepicastat abolisce completamente l'effetto da alcol deprivazione (Fig. 1).

Il consumo di acqua non differisce tra il gruppo trattato col veicolo nel gruppo "ratti non alcol-deprivati" rispetto al gruppo "ratti alcol-deprivati" e trattato col veicolo ( $p>0.05$ , test *t di Student*). Non c'è differenza anche internamente ai sottogruppi trattati col nepicastat nel gruppo "ratti non alcol-deprivati" [ $F(3,32)=0.05$ ,  $p>0.05$ ] (Tab. 1).

Similarmente il consumo di cibo non differisce tra il gruppo trattato col veicolo nel gruppo "ratti non alcol-deprivati" ed il gruppo trattato col veicolo del gruppo "ratti alcol-deprivati" ( $p>0.05$ , test di *Mann-Whitney*), come non vi è differenza nel consumo di cibo tra i subgruppi trattati col nepicastat nel gruppo "ratti alcol deprivati" ( $p>0.05$ , test di *Kruskal-Wallis*) (Tab. 1).



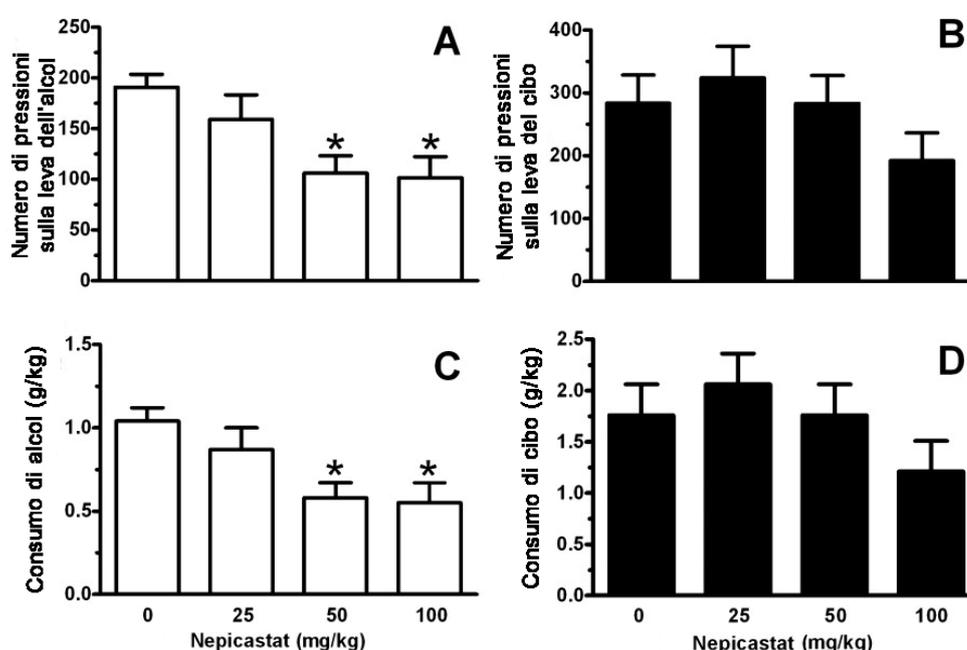
**Fig. 1.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore selettivo della dopamina- $\beta$ -idrossilasi sull' "alcohol deprivation effect" nei Ratti Sardinian Alcohol Preferring (sP). L'alcol (10% v/v) e l'acqua sono stati resi disponibili nella homecage 24h su 24h per quattro settimane consecutive in un regime di libera scelta. I "ratti alcol-deprivati" sono stati deprivati di alcol per 14 giorni consecutivi; i "ratti non alcol deprivati" hanno avuto accesso continuo all'alcol e all'acqua. Tre ore prima della reintroduzione dell'alcol (in concomitanza dell'inizio della fase di buio), i "ratti alcol-deprivati" sono stati trattati acutamente con nepicastat (0, 25, 50, and 100 mg/kg; intraperitonealmente); i "ratti non alcol-deprivati" sono stati trattati col veicolo del nepicastat. Il consumo di alcol è stato registrato 60 min. dopo l'inizio della fase di buio. Ciascuna barra è la media ( $\pm$ SEM) di  $n=9$  ratti. #  $p<0.0005$  in confronto con il gruppo dei ratti alcol-deprivati che hanno ricevuto 0 mg/kg di nepicastat (test *t di Student*); \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.001$  in confronto con il gruppo dei ratti alcol-deprivati che hanno ricevuto 0 mg/kg di nepicastat (test di *Dunnett*).

	Nepicastat (mg/kg)			
	0	25	50	100
<b>Ratti non alcol deprivati</b>				
Consumo di acqua (ml/kg)	1.35 ± 0.26	–	–	–
Consumo di cibo (g/kg)	4.90 ± 0.51	–	–	–
<b>Ratti alcol deprivati</b>				
Consumo di acqua (ml/kg)	0.90 ± 0.15	1.29 ± 0.48	1.74 ± 0.41	2.18 ± 0.69
Consumo di cibo (g/kg)	4.57 ± 0.61	4.93 ± 1.12	4.61 ± 0.51	4.53 ± 0.84

**Tab. 1.** L'alcol (10% v/v) e l'acqua sono stati resi disponibili nella homecage 24h su 24h per quattro settimane consecutive in un regime di libera scelta. I "ratti alcol-deprivati" sono stati deprivati di alcol per 14 giorni consecutivi; i "ratti non alcol deprivati" hanno avuto accesso continuato all'alcol e all'acqua. Il cibo è stato sempre disponibile. Tre ore prima della reintroduzione dell'alcol (in concomitanza dell'inizio della fase di buio), i "ratti alcol-deprivati" sono stati trattati acutamente con nepicastat (0, 25, 50, and 100 mg/kg; intraperitonealmente); i "ratti non alcol-deprivati" sono stati trattati col veicolo del nepicastat. L'acqua ed il cibo (come anche l'alcol) sono stati registrati per 60 min. dopo l'inizio della fase di buio. Ciascun valore è la media (±SEM) di n=9 ratti.

#### 4.1.2. Esperimento 2 – Operant, Alcohol Self-Administration

Il trattamento col nepicastat reduce significativamente il numero delle risposte sulla leva per l'alcol [F(3,33)=4.85,  $p < 0.01$ ] (Fig. 2A). L'analisi *post hoc* indica che il trattamento con le dosi 50 e 100 mg/kg riduce significativamente, e con efficacia simile (45% e 50% di riduzione), il numero delle risposte sulla leva. E' stata registrata anche una riduzione proporzionale nella quantità di alcol auto-somministrata [F(3,33)=4.95,  $p < 0.01$ ] (Fig. 2C). La risposta sulla leva dell'acqua è stata trascurabile (numero medio delle pressioni  $\leq 3$ ) e non è stata alterata dal trattamento col nepicastat [F(3,33)=0.45,  $p > 0.05$ ] (dati non mostrati).



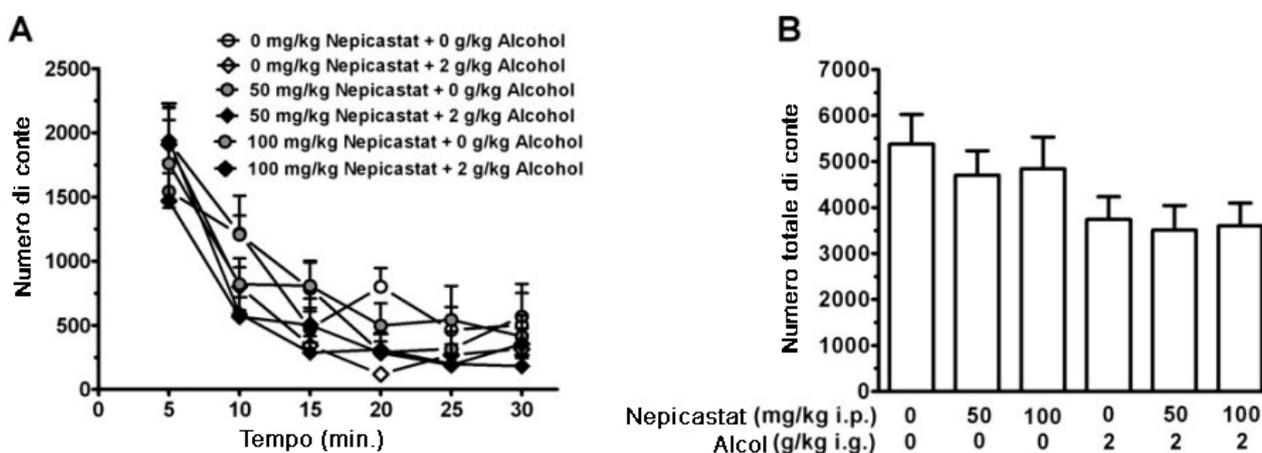
**Fig. 2.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore selettivo della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, nepicastat, sul numero delle pressioni sulla leva per l'alcol (A) e per i pellets di cibo (B), sul consumo di alcol autosomministrato (C) e dei pellets di cibo, nei Ratti Sardinian Alcohol Preferring (sP). I ratti sono stati inizialmente sottoposti ad un training per imparare a premere 4 volte una leva (FR4) per ottenere l'alcol (15% v/v, in acqua) o i pellets di cibo (45 mg di cibo standard) in 30 min. di sessione. Dopo aver raggiunto un comportamento operante stabile ai ratti è stato somministrato prima della sessione test il nepicastat. Tutte le dosi sono state testate seguendo uno schema a quadrato latino (Latin-square design). Ciascuna barra è la media ( $\pm$ SEM) di  $n=12$  ratti. \*  $p < 0.05$  in confronto col gruppo trattato con di 0 mg/kg nepicastat. (test di *Newman-Keuls*).

#### 4.1.3. Esperimento 3 - Operant, Food Self-Administration

Il trattamento con il nepicastat non ha prodotto effetti sul numero di pressioni sulla leva del cibo [F(3,33)=2.38,  $p > 0.05$ ] (Fig. 2B) né sul suo consumo totale [F(3,33)=2.45,  $p > 0.05$ ] (Fig. 2D).

#### 4.1.4. Esperimento 4 - Spontaneous Locomotor Activity

L'ANOVA non ha segnalato alcun effetto significativo del trattamento con la combinazione di alcol e nepicastat sul numero delle conte espresso ogni 5 min. [ $F_{\text{trattamento}}(5,66)=2.12$ ,  $p>0.05$ ;  $F_{\text{tempo}}(5,330)=57.82$ ,  $p<0.0001$ ;  $F_{\text{interazione}}(5,330)=0.99$ ,  $p>0.05$ ] (Fig. 3A), né sul numero totale delle conte nei 30 min. ( $F(1,66)=1.86$ ,  $p>0.05$ ) (Fig. 3B).



**Fig. 3.** Effetto della combinazione tra il trattamento acuto con l'inibitore selettivo della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, nepicastat, e l'alcol sull'attività locomotoria spontanea nei Ratti Sardinian Alcohol Preferring (sP) registrata all'interno di box muniti di fotocellule. Il numero delle conte, rappresentativo dell'attività locomotoria ed inteso come il numero delle interruzioni delle fotocellule, è stato registrato per 30 min (B) e scomposto in sei frazioni non cumulative da 5 min. (A). Ciascun punto o barra è la media ( $\pm$ SEM) di  $n=12$  ratti.

## 4.2. Effetto del nepicastat sui comportamenti cioccolato-correlati

### 4.2.1. Esperimento 5 – Operant, Chocolate Self-Administration

Il trattamento col nepicastat ha prodotto una riduzione dose-dipendente del numero delle pressioni sulla leva per la soluzione di cioccolato [ $F(3,33)=14.85$ ,  $p<0.0001$ ] (Fig. 4A).

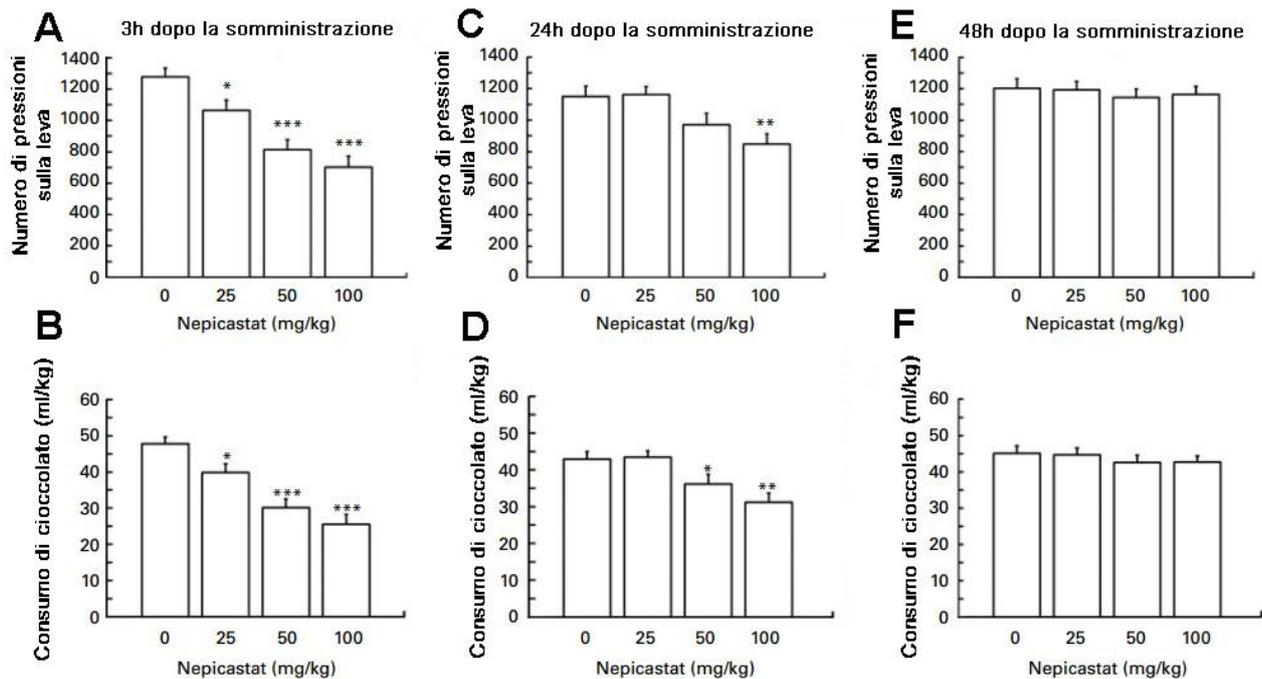
In particolare il numero di pressioni sulla leva nei ratti trattati con 25, 50, e 100 mg/kg di nepicastat sono state rispettivamente 17%, 36% e 45% più basse di quelle registrate nei ratti di controllo trattati col veicolo.

I test *post hoc* hanno mostrato che il numero delle pressioni sulla leva nei tre gruppi di ratti trattati con nepicastat è stato significativamente più basso di quello registrato nei ratti di controllo trattati col veicolo. La riduzione del numero delle pressioni sulla leva indotto dal trattamento col nepicastat era anche associato ad una proporzionale riduzione della soluzione di cioccolato auto-somministrata [ $F(3,33)=16.53$ ,  $p<0.0001$ ] (Fig. 4B).

Il nepicastat ha prodotto una riduzione sia delle pressioni [ $F(3,33)=5.64$ ,  $p<0.005$ ] (Fig. 4C) che del consumo [ $F(3,33)=6.98$ ,  $p<0.001$ ] (Fig. 4D) anche a 24h dalla somministrazione.

Nel primo caso il *post hoc* ha rilevato che solo la dose 100 mg/kg ha ridotto significativamente il numero delle pressioni sulla leva (approssimativamente del 25% rispetto ai ratti di controllo); nel secondo caso il *post hoc* ha rilevato un effetto significativo per le dosi 50 e 100 mg/kg di nepicastat.

A 48h dalla somministrazione invece non vi è nessuna differenza tra i gruppi sperimentali sia per quanto riguarda le pressioni sulla leva [ $F(3,33)=0.23$ ,  $p>0.05$ ] (Fig. 4E) che per quantità di soluzione auto-somministrata [ $F(3,33)=0.45$ ,  $p>0.05$ ] (Fig. 4F).



**Fig. 4.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore selettivo della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, nepicastat, sul numero delle pressioni sulla leva (A, C ed E) e sul consumo (B, D ed F) di una soluzione di cioccolato 5% p/v (Nesquik® (Nestlé, Italia) in ratti Wistar. I ratti sono stati inizialmente sottoposti ad un training per imparare a premere 10 volte una leva (FR10) per ottenere la soluzione di cioccolato in 30 min. di sessione. Dopo aver raggiunto un comportamento operante stabile ai ratti è stato somministrato prima della sessione test il nepicastat. Tutte le dosi sono state testate seguendo uno schema a quadrato latino (Latin-square design). Ciascuna barra è la media ( $\pm$ SEM) di  $n=12$  ratti. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.0005$  in confronto col gruppo trattato con 0 mg/kg di nepicastat. (test di *Newman-Keuls*).

#### 4.2.2. Esperimento 6 – Operant, Food Self-Administration

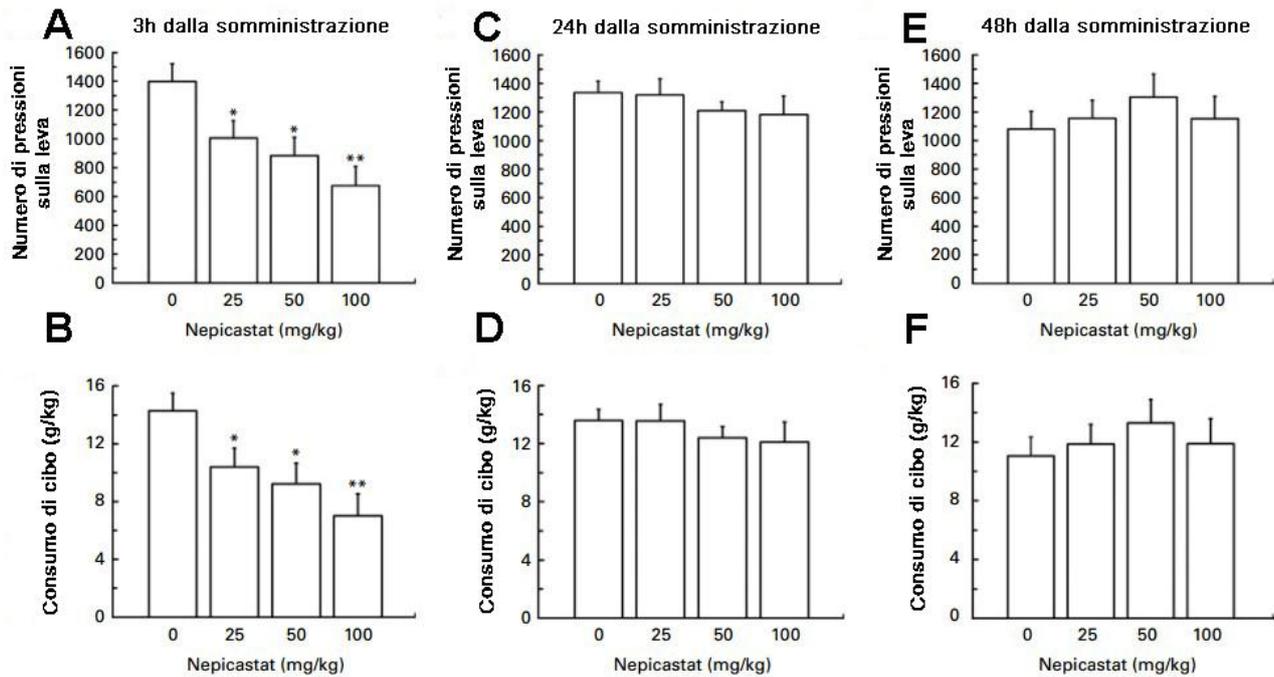
Il trattamento col nepicastat ha prodotto una riduzione dose-dipendente del numero delle pressioni sulla leva per i pellets di cibo [ $F(3,33)=5.94$ ,  $p<0.005$ ] (Fig. 5A).

In particolare il numero di pressioni sulla leva nei ratti trattati con 25, 50, e 100 mg/kg di nepicastat sono state rispettivamente 28%, 37% and 52% più basse di quelle registrate nei ratti di controllo trattati col veicolo.

I test *post hoc* hanno mostrato che il numero delle pressioni sulla leva tra gruppi di ratti trattati col nepicastat è stato significativamente più basso di quello registrato nei ratti di controllo trattati col veicolo. La riduzione del numero delle pressioni sulla leva indotto dalla

trattamento col nepicastat era anche associato ad una proporzionale riduzione di pellets auto-somministrato [ $F(3,33)=5.98$ ,  $p<0.005$ ] (Fig. 5B).

Il nepicastat non è stato efficace nel ridurre il numero delle pressioni ed il consumo di pellets di cibo nelle sessioni effettuate a 24h [pressioni sulla leva:  $F(3,33)=0.70$ ,  $p>0.05$ ; pellets auto-somministrati:  $F(3,33)=0.55$ ,  $p>0.05$ ; (Fig. 5C e 5D)] e 48h [pressioni sulla leva:  $F(3,33)=0.60$ ,  $p>0.05$ ; pellets auto-somministrati:  $F(3,33)=0.47$ ,  $p>0.05$ ; (Fig. 5E e 5F)] dalla somministrazione del nepicastat.



**Fig. 5.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore selettivo della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, nepicastat, sul numero delle pressioni sulla leva (A, C ed E) e sul consumo (B, D ed F) di pellets di cibo in ratti Wistar. I ratti sono stati inizialmente sottoposti ad un training per imparare a premere 10 volte una leva (FR10) per ottenere i pellets di cibo (45 mg di cibo standard) in 30 min. di sessione. Dopo aver raggiunto un comportamento operante stabile ai ratti è stato somministrato prima della sessione test il nepicastat. Tutte le dosi sono state testate seguendo uno schema a quadrato latino (Latin-square design). Ciascuna barra è la media ( $\pm$ SEM) di  $n=12$  ratti. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.0005$  in confronto col gruppo trattato con 0 mg/kg di nepicastat. (test di *Newman-Keuls*).

#### 4.2.3. Esperimento 7 – Progressive ratio

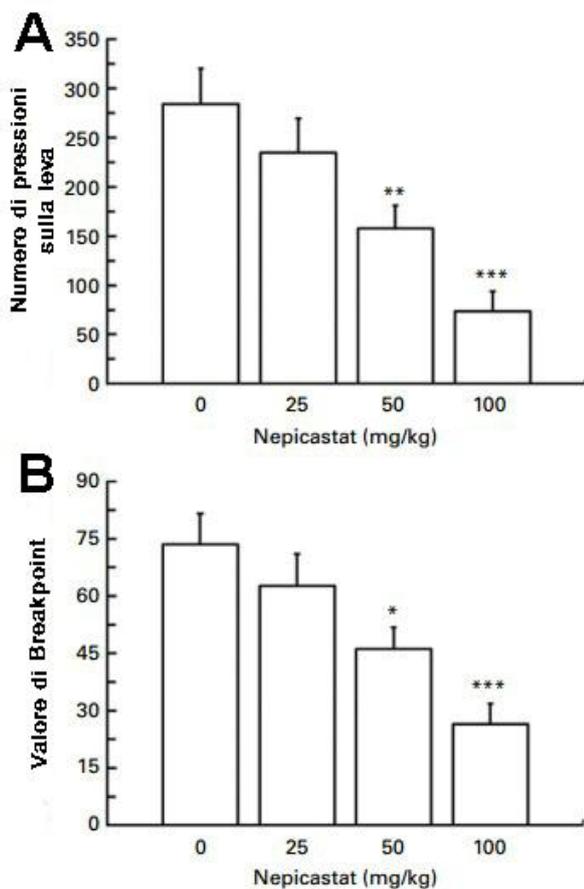
Il trattamento col nepicastat ha prodotto una riduzione dose-dipendente delle pressioni sulla leva per la soluzione di cioccolato [ $F(3,24)=11.07$ ,  $p<0.0001$ ] (Fig. 6A).

In particolare il numero delle pressioni sulla leva dei gruppi di ratti trattati con le dosi 25, 50 e 100 mg/kg di nepicastat è stato rispettivamente 17%, 45% e 75% più basso dei ratti di controllo trattati col veicolo.

Il test *post hoc* ha rivelato che il numero delle pressioni sulla leva nei ratti trattati con 50 e 100 mg/kg è stato significativamente più basso rispetto ai ratti di controllo trattati col veicolo.

Ancora, il trattamento col nepicastat ha ridotto in maniera dose dipendente il valore di breakpoint per la soluzione di cioccolato [ $F(3,24)=10.60$ ,  $p<0.0005$ ] (Fig. 6B).

Il valore di breakpoint è stato nei ratti di controllo di circa 75, mentre nei ratti trattati con 25, 50 e 100 mg/kg di nepicastat il valore di breakpoint è risultato essere rispettivamente 15%, 37% e 65% più basso rispetto ai ratti di controllo trattati con il veicolo. Il test *post hoc* ha rivelato che il breakpoint nei gruppi di ratti trattati con 50 e 100 mg/kg di nepicastat è stato significativamente più basso rispetto a quello registrato per i ratti di controllo.



**Fig. 6.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore selettivo della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, nepicastat, sul numero delle pressioni sulla leva (A) e sul breakpoint (B) per una soluzione di cioccolato 5% p/v (Nesquik®, Nestlè, Italia) in ratti Wistar. I ratti sono stati inizialmente sottoposti ad un training per imparare a premere 10 volte una leva (FR10) per ottenere la soluzione di cioccolato in 30 min. Dopo aver raggiunto un comportamento operante stabile i ratti sono stati sottoposti ad una sessione da 60 min. di progressive ratio dopo trattamento con nepicastat. Tutte le dosi sono state testate seguendo uno schema a quadrato latino (Latin-square design). Ciascuna barra è la media ( $\pm$ SEM) di  $n=12$  ratti. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.0005$  in confronto col gruppo trattato con 0 mg/kg di nepicastat. (test di *Newman-Keuls*).

#### 4.2.4. Esperimento 8 – Extinction responding e Reinstatement

L'andamento del numero delle pressioni sulla leva durante la fase di extinction responding è stato simile in tutti e quattro i gruppi successivamente trattati col veicolo o con le tre dosi di nepicastat (Fig. 7A).

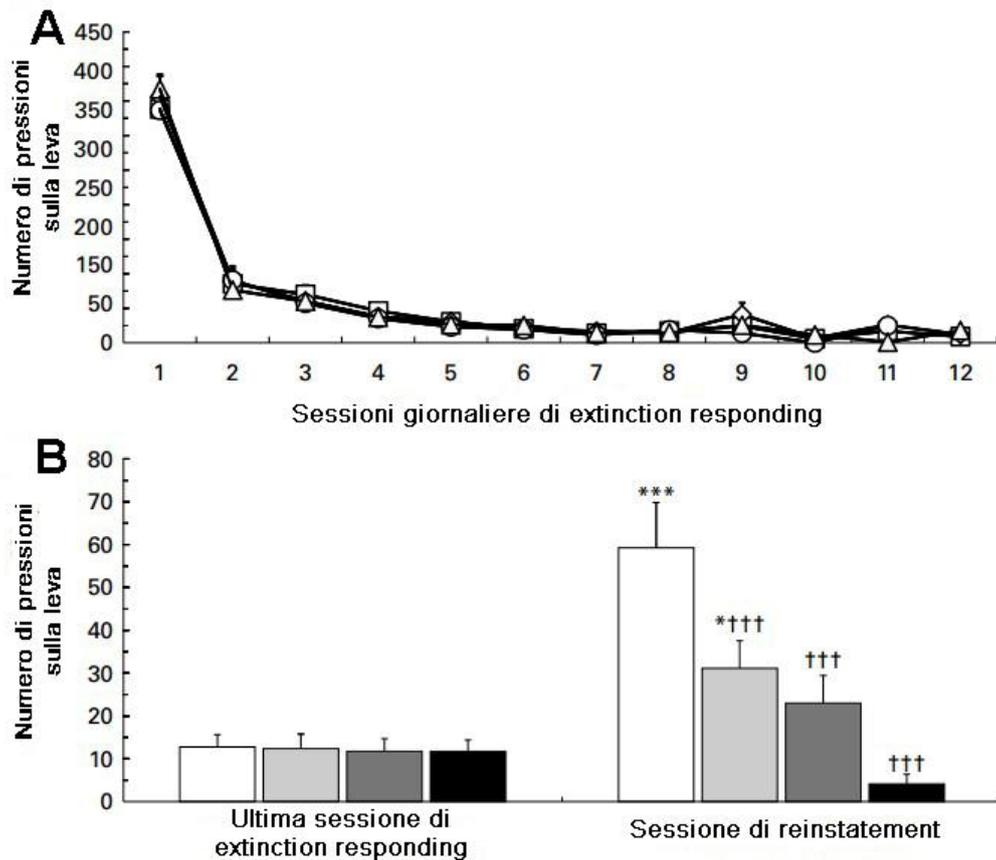
Il numero delle sessioni utili a raggiungere il criterio di estinzione è stato infatti molto simile per i quattro gruppi [7.8 (SEM 0.8), 8.3 (SEM 0.7), 7.6 (SEM 0.7) and 7.9 (SEM 0.8)] nei ratti successivamente trattati rispettivamente con 0, 25, 50 e 100 mg/kg di nepicastat [ $F(3, 28)=0.14$ ,  $p>0.05$ ] (Fig. 7A).

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo della presentazione del complesso di stimoli associate alla disponibilità della soluzione di cioccolato. [ $F(1,28)=28.9$ ,  $p<0.0001$ ] e del trattamento con nepicastat [ $F(3,28)=7.05$ ,  $p<0.005$ ], inoltre un'interazione significativa tra i due fattori [ $F(3,28)=12.30$ ,  $p<0.0001$ ].

Il numero delle pressioni sulla leva durante l'ultima sessione della fase di extinction responding è stata praticamente identica nei quattro gruppi successivamente trattati con 0, 25, 50 and 100 mg/kg di nepicastat (Fig. 7B).

La presentazione del complesso di stimoli precedentemente associato alla disponibilità della soluzione di cioccolato, ha determinato nei ratti di controllo un robusto reinstatement. Il numero di pressioni sulla leva è stato in media 59.3 (SEM 10.6) ed è stato 4.6 volte più alto di quello registrato nell'ultima sessione di extinction (Fig. 7B).

La somministrazione di nepicastat ha prodotto una soppressione dose dipendente delle pressioni sulla leva (Fig. 7B); in particolare la dose 100 mg/kg di nepicastat ha prodotto un completo blocco delle pressioni sulla leva come si nota dal numero di pressioni raggiunte durante la sessione [4.1 (SEM 2.3)] che è stato largamente più basso di quello registrato durante l'ultima sessione della fase di estinzione. Nel gruppo sperimentale trattato con la dose 100 mg/kg due ratti hanno totalmente evitato la leva.



**Fig. 7.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore selettivo della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, nepicastat, sul numero delle pressioni sulla leva associata alla disponibilità per una soluzione di cioccolato in ratti Wistar. I ratti sono stati inizialmente sottoposti ad un training per imparare a premere 10 volte una leva (FR10) per ottenere la soluzione di cioccolato 5% p/v (Nesquik®, Nestlé, Italia) in 30 min. Successivamente i ratti sono stati esposti ad un periodo di extinction responding (A) alla fine del quale sono stati sottoposti ad una sessione di reinstatement di 60 min dopo il trattamento con il nepicastat. La sessione di reinstatement è stata aperta dall'esposizione dei ratti ad un complesso di stimoli precedentemente associati alla disponibilità della soluzione di cioccolato.

Ciascuno punto (A) è la media di un campione di ratti compreso numericamente tra 1 ed 8, cioè è dipeso dal numero di sessioni che ciascun ratto ha impiegato a raggiungere il criterio di estinzione. Ciascuna barra (B) è la media ( $\pm$ SEM) di n=8 ratti. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0005$  in confronto col rispettivo gruppo dell'ultima sessione di extinction responding (test di Newman-Keuls). †††  $p < 0.0005$  in confronto col gruppo trattato con 0 mg/kg di nepicastat (test di Newman-Keuls).

#### 4.2.5. Esperimento 9 – Spontaneous Locomotor Activity

Il trattamento col nepicastat non ha avuto alcun effetto sull'attività locomotoria spontanea sia a 3h [ $F(3,31)=1.57$ ,  $p>0.05$ ] che a 24h dalla somministrazione [ $F(3,30)=0.48$ ,  $p>0.05$ ] (Tab. 2).

	Nepicastat (mg/kg)							
	0		25		50		100	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Sessione 2 (24h dopo la somministrazione del nepicastat)	10 583	697	11 145	1106	9158	605	9029	838
Sessione 1 (3h dopo la somministrazione del nepicastat)	13 376	617	14 149	908	13 754	1609	12 294	1121

**Tab. 2.** Effetto del trattamento con nepicastat sull'attività locomotoria spontanea in ratti Wistar registrata all'interno di box muniti di fotocellule. Il numero delle conte, rappresentativo dell'attività locomotoria ed inteso come il numero delle interruzioni delle fotocellule, è stato registrato per 30 min. Ciascun valore è la media ( $\pm$ SEM) di n=8-9 ratti.

### 4.3. Effetto del disulfiram sui comportamenti cioccolato-correlati

#### 4.3.1. Esperimento 10 – Operant, Chocolate Self-Administration

In riferimento al numero delle pressioni sulla leva per la soluzione di cioccolato (Fig. 8A), l'ANOVA ha rilevato sia un effetto significativo del trattamento con disulfiram [ $F(3,28)=8.27$ ,  $p<0.005$ ] che del tempo [ $F(5,140)=33.47$ ,  $p<0.0001$ ], ed inoltre un'interazione significativa tra i due fattori [ $F(15,140)=9.42$ ,  $p<0.0001$ ].

Quando la sessione è stata effettuata a 2h dal trattamento il numero delle pressioni sulla leva è risultato soppresso nei ratti trattati con 50 e 100 mg/kg di disulfiram (percentuali di riduzione pari rispettivamente a 57 e 84).

Quando la sessione è stata effettuata a 24h dal trattamento non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra i quattro gruppi.

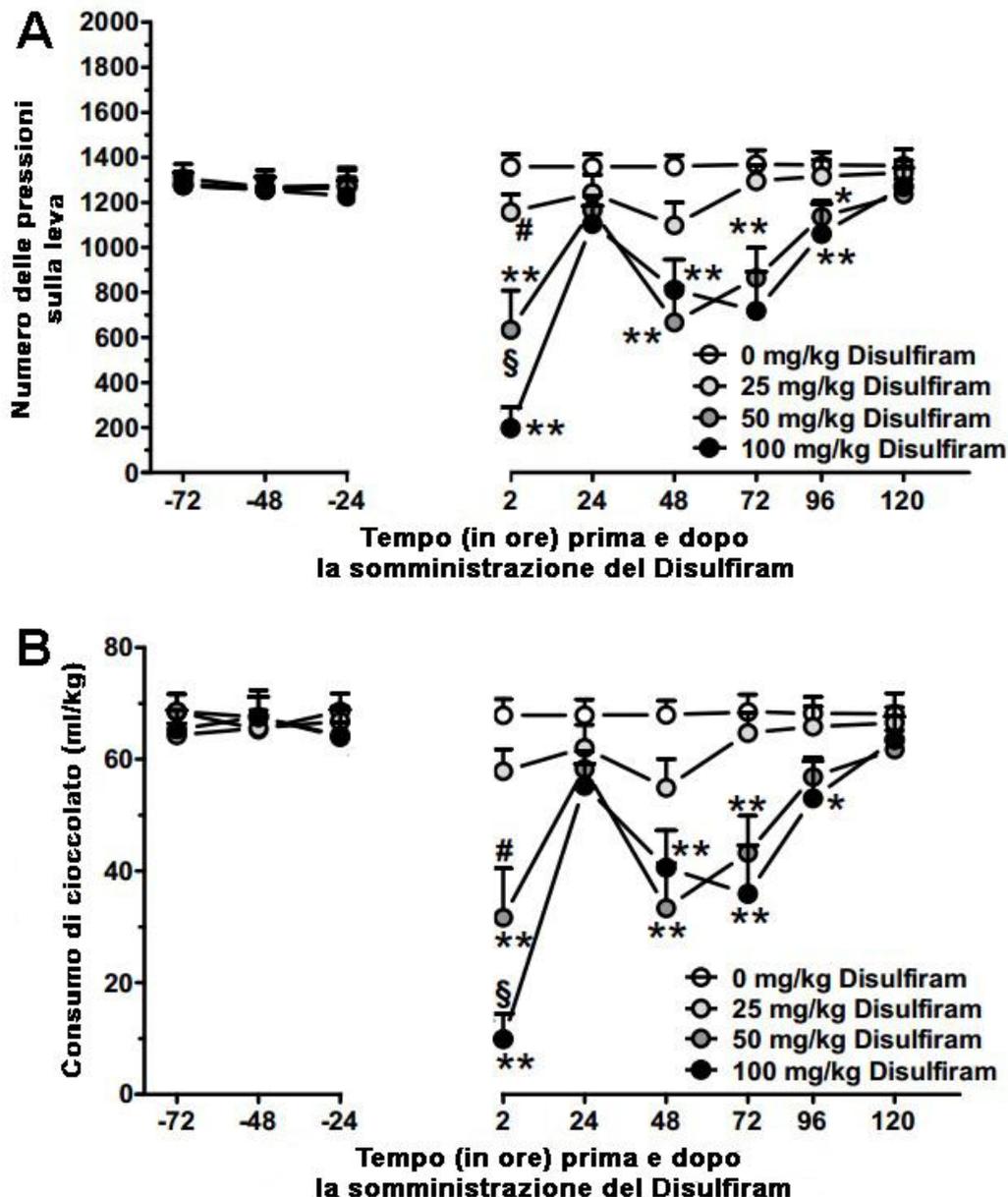
Nelle sessioni successive l'ANOVA ha rilevato diverse differenze significative dei ratti trattati con disulfiram rispetto ai ratti di controllo:

- la dose 50 mg/kg di disulfiram ha prodotto una riduzione significativa nelle sessioni effettuate a 48h e 72h dalla somministrazione;
- la dose 100 mg/kg di disulfiram ha prodotto una riduzione significativa nelle sessioni effettuate a 48h, 72h e 96h dalla somministrazione.

A 120h dalla somministrazione invece l'ANOVA non ha messo in evidenza alcuna differenza tra i gruppi che sono quindi risultati virtualmente identici.

In riferimento alla quantità di soluzione di cioccolato auto-somministrata (Fig. 8B), l'ANOVA ha rilevato un effetto significativo sia del trattamento con disulfiram [F(3,28)=8.28,  $p<0.0005$ ] che del tempo [F(5,140)=33.40,  $p<0.0001$ ], ed inoltre un'interazione significativa tra i due fattori [F(15,140)=9.43,  $p<0.0001$ ].

Il pattern della riduzione sulla quantità di soluzione di cioccolato auto-somministrata è stato virtualmente identico a quello registrato per il numero di pressioni sulla leva.



**Fig. 8.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, disulfiram, sul numero delle pressioni sulla leva (A) e sul consumo (B) di una soluzione di cioccolato 5% p/v (Nesquik® (Nestlè, Italia) in ratti Wistar. I ratti sono stati inizialmente sottoposti ad un training per imparare a premere 10 volte una leva (FR10) per ottenere la soluzione di cioccolato in 20 min. di sessione. Dopo aver raggiunto un comportamento operante stabile ai ratti è stato somministrato prima della sessione test il disulfiram. Ciascun punto è la media ( $\pm$ SEM) di n=8 ratti. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.0001$ , \*\*\*  $p<0.0005$  in confronto col gruppo trattato con 0 mg/kg di disulfiram. (test di Newman-Keuls).

#### 4.3.2. *Esperimento 11 – Operant, Food Self-Administration*

In riferimento al numero delle pressioni sulla leva per i pellets di cibo (Fig. 9A), l'ANOVA ha rilevato un effetto significativo sia del trattamento con disulfiram [ $F(3,28)=6.09$ ,  $p<0.0005$ ] che del tempo [ $F(5,140)=27.04$ ,  $p<0.0001$ ], ed inoltre un'interazione significativa tra i due fattori [ $F(15,140)=4.15$ ,  $p<0.0001$ ].

Quando la sessione è stata effettuata a 2h dal trattamento il numero delle pressioni sulla leva è risultato soppresso nei ratti trattati con 50 e 100 mg/kg di disulfiram e notevolmente ridotto nei ratti trattati con la dose di 25 mg/kg di disulfiram (percentuali di riduzione pari a 35, 73, e 87 nei ratti rispettivamente trattati con 25, 50, and 100 mg/kg di disulfiram).

Quando la sessione è stata effettuata a 24h dal trattamento non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra i quattro gruppi.

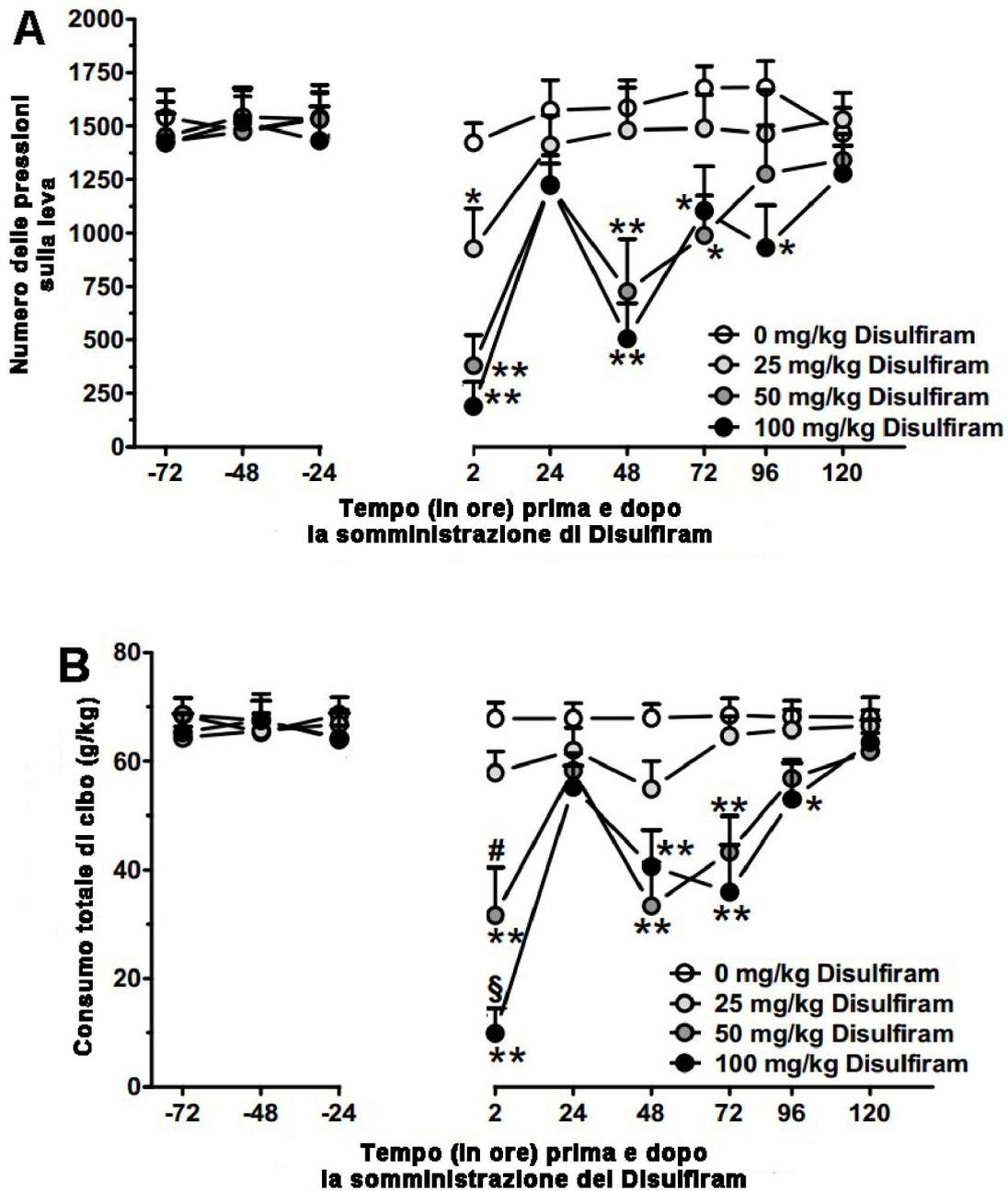
Nelle sessioni successive l'ANOVA ha rilevato diverse differenze significative dei ratti trattati con disulfiram rispetto ai ratti di controllo:

- la dose 50 mg/kg di disulfiram ha prodotto una riduzione significativa nelle sessioni effettuate a 48h e 72h dalla somministrazione;
- la dose 100 mg/kg di disulfiram ha prodotto una riduzione significativa nelle sessioni effettuate a 48h, 72h e 96h dalla somministrazione.

A 120h dalla somministrazione invece l'ANOVA non ha messo in evidenza alcuna differenza tra i gruppi i quali sono quindi risultati virtualmente identici.

In riferimento alla quantità di pellets auto-somministrata (Fig. 9B), l'ANOVA ha rilevato sia un effetto significativo del trattamento con disulfiram [ $F(3,28)=6.96$ ,  $p<0.005$ ] che del tempo [ $F(5,140)=27.14$ ,  $p<0.0001$ ], ed inoltre un'interazione significativa tra i due fattori [ $F(15,140)=4.11$ ,  $p<0.00013$ ].

Il pattern della riduzione sulla quantità di pellets auto-somministrata è stato virtualmente identico a quello registrato per il numero di pressioni sulla leva.



**Fig. 9.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, disulfiram, sul numero delle pressioni sulla leva (A) e sul consumo (B) di pellets di cibo in ratti Wistar. I ratti sono stati inizialmente sottoposti ad un training per imparare a premere 10 volte una leva (FR10) per ottenere i pellets di cibo (45 mg di cibo standard) in 30 min. di sessione. Dopo aver raggiunto un comportamento operante stabile ai ratti è stato somministrato prima della sessione test il disulfiram. Ciascun punto è la media ( $\pm$ SEM) di n=8 ratti. \* p<0.05, \*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.0005 in confronto col gruppo trattato con 0 mg/kg di disulfiram. (test di Newman-Keuls).

#### 4.3.3. Esperimento 12 – Progressive ratio

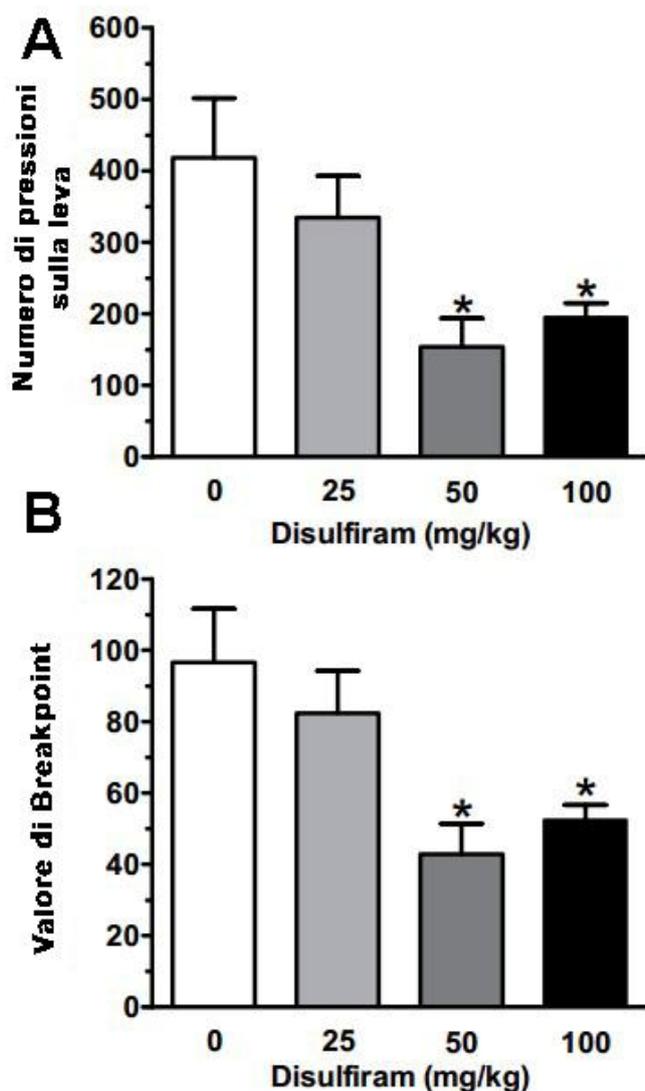
Il trattamento col nepicastat somministrato 48h prima l'inizio della sessione ha prodotto una riduzione dose-dipendente delle pressioni sulla leva per la soluzione di cioccolato [F(3,28)=5.04, p<0.01] (Fig. 10A).

In particolare il numero delle pressioni sulla leva dei gruppi di ratti trattati con le dosi 25, 50 e 100 mg/kg di disulfiram è stato rispettivamente 20%, 63% e 53% più basso dei ratti di controllo trattati col veicolo.

Il test *post hoc* ha rivelato che il numero delle pressioni sulla leva nei ratti trattati con 50 e 100 mg/kg è stato significativamente più basso rispetto ai ratti di controllo trattati col veicolo.

Ancora, il trattamento col disulfiram ha ridotto il breakpoint per la soluzione di cioccolato [F(3,28)=5.32,  $p < 0.005$ ] (Fig. 10B).

Il valore di breakpoint è stato nei ratti di controllo di circa 97, mentre nei ratti trattati con 25, 50 e 100 mg/kg di nepicastat il valore di breakpoint è risultato essere rispettivamente 15%, 56% e 45% più basso rispetto ai ratti di controllo trattati con il veicolo. Il test *post hoc* ha rivelato che il breakpoint nei gruppi di ratti trattati con 50 e 100 mg/kg di nepicastat è stato significativamente più basso rispetto a quello registrato per i ratti di controllo.



**Fig. 10.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, disulfiram, sul numero delle pressioni sulla leva (A) e sul breakpoint (B) per una soluzione di cioccolato 5% p/v (Nesquik®, Nestlè, Italia) in ratti Wistar. I ratti sono stati inizialmente sottoposti ad un training per imparare a premere 10 volte una leva (FR10) per ottenere la soluzione di cioccolato in 20 min. Dopo aver raggiunto un comportamento operante stabile i ratti sono stati sottoposti ad una sessione da 60 min. di progressive ratio dopo trattamento con disulfiram. Ciascuna barra è la media ( $\pm$ SEM) di  $n=8$  ratti. \*  $p < 0.05$  in confronto col gruppo trattato con 0 mg/kg di disulfiram. (test di Newman-Keuls).

#### 4.3.4. Esperimento 13 – Extinction responding e Reinstatement

L'andamento del numero delle pressioni sulla leva durante la fase di extinction responding è stato simile in tutti e quattro i gruppi successivamente trattati col veicolo o con le tre dosi di disulfiram (Fig. 11A).

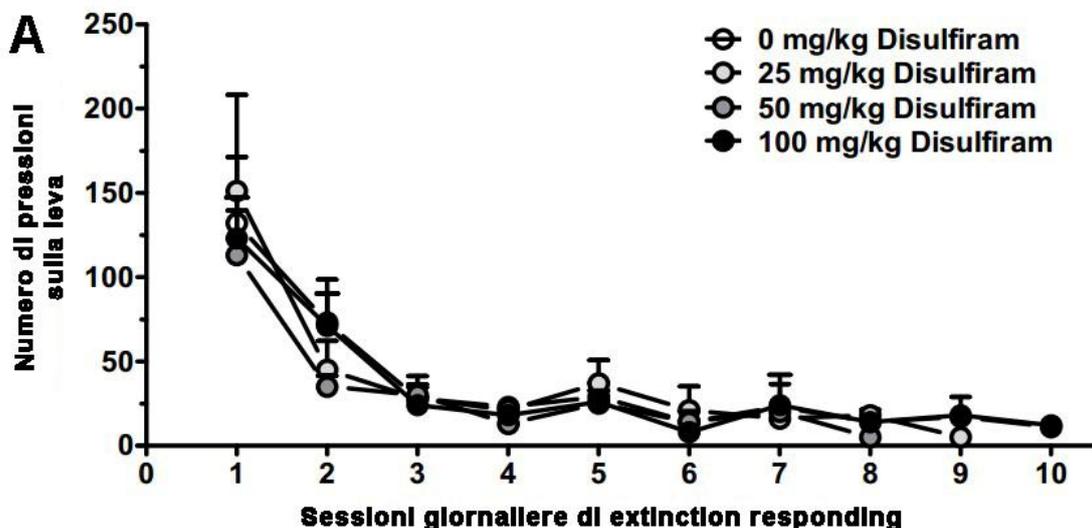
Il numero delle sessioni utili a raggiungere il criterio di estinzione è stato infatti molto simile per i quattro gruppi [6.1 (SEM 0.9), 5.9 (SEM 0.7), 5.1 (SEM 0.5) and 5.8 (SEM 0.8)] nei ratti successivamente trattati rispettivamente con 0, 25, 50 e 100 mg/kg di disulfiram [ $F(3,28)=0.33, p>0.05$ ] (Fig. 11A).

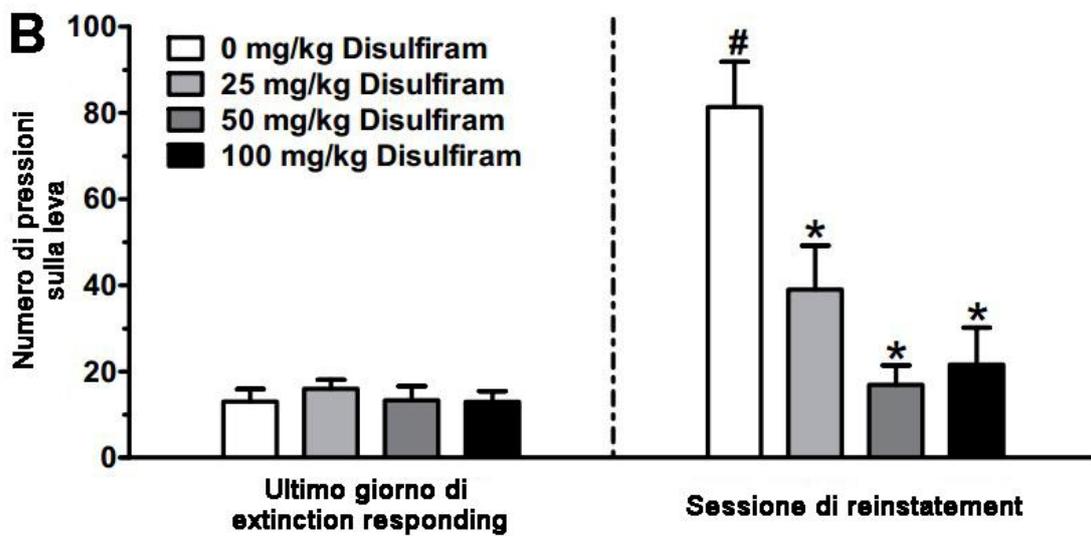
In relazione al numero di pressioni sulla leva, l'ANOVA ha rivelato sia un effetto significativo della presentazione del complesso di stimoli associati alla disponibilità della soluzione di cioccolato [ $F(1,28)=33.23, p<0.0001$ ] che del trattamento con nepicastat [ $F(3, 28)=9.76, p<0.005$ ], ed inoltre un'interazione significativa tra i due fattori [ $F(3,28)=10.71, p<0.0001$ ].

Il numero delle pressioni sulla leva durante l'ultima sessione della fase di extinction responding è stata praticamente identica nei quattro gruppi successivamente trattati con 0, 25, 50 and 100 mg/kg di disulfiram (Fig. 11B).

La presentazione del complesso di stimoli precedentemente associato alla disponibilità della soluzione di cioccolato ha determinato nei ratti di controllo un robusto reinstatement. Il numero di pressioni sulla leva è stato in media 81.4 (SEM 10.5) ed è stato 6 volte più alto di quello registrato nell'ultima sessione di extinction (Fig. 11B).

La somministrazione del disulfiram si è tradotta in una soppressione non dose dipendente, difatti; se confrontate con la dose di controllo, il numero delle pressioni sulla leva è stato rispettivamente 52%, 79%, e 73% più basso per le dosi 25, 50, e 100 mg/kg di disulfiram (Fig. 11B).



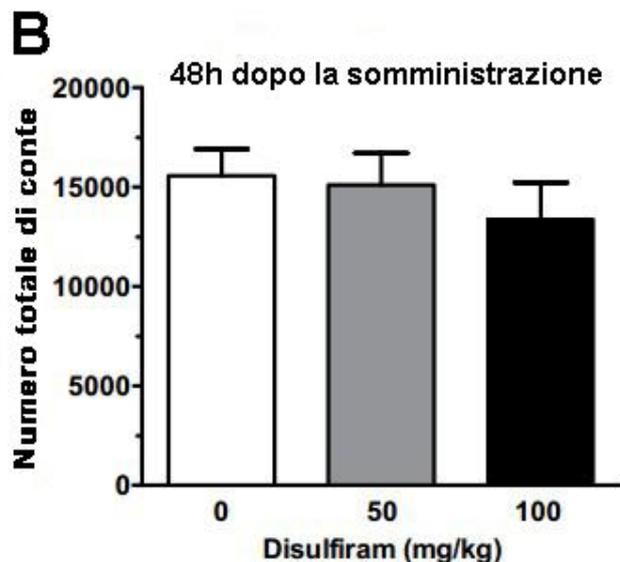
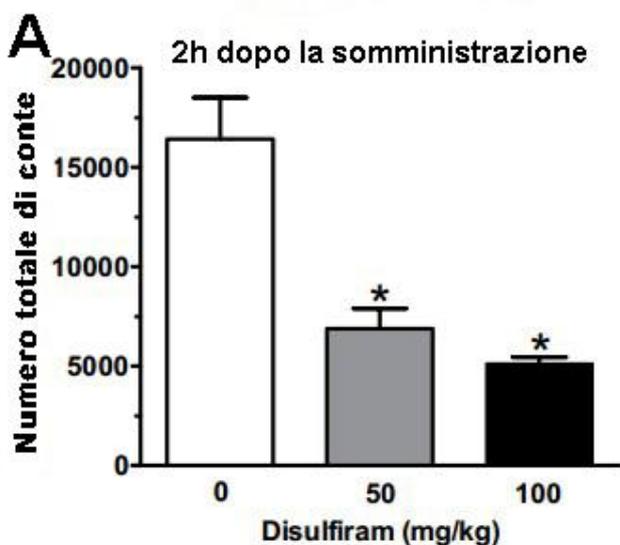


**Fig. 11.** Effetto della somministrazione acuta dell'inibitore della dopamina- $\beta$ -idrossilasi, disulfiram, sul numero delle pressioni sulla leva associata alla disponibilità per una soluzione di cioccolato in ratti Wistar. I ratti sono stati inizialmente sottoposti ad un training per imparare a premere 10 volte una leva (FR10) per ottenere la soluzione di cioccolato 5% p/v (Nesquik®, Nestlè, Italia) in 20 min. Successivamente i ratti sono stati esposti ad un periodo di extinction responding (A) il giorno dopo il quale ai ratti è stato somministrato il disulfiram. A 48h dalla somministrazione i ratti sono stati esposti ad una sessione di reinstatement di 60 min. La sessione di reinstatement è stata aperta dall'esposizione dei ratti ad un complesso di stimoli precedentemente associati alla disponibilità della soluzione di cioccolato.

Ciascuno punto (A) è la media di un campione di ratti compreso numericamente tra 1 ed 8 e ciò è dipeso dal numero di sessioni che ciascun ratto ha impiegato a raggiungere il criterio di estinzione. Ciascuna barra (B) è la media ( $\pm$ SEM) di n=8 ratti. \*  $p < 0.0005$  in confronto col rispettivo gruppo dell'ultima sessione di extinction responding (test di *Newman-Keuls*). #  $p < 0.0005$  in confronto col gruppo trattato con 0 mg/kg di disulfiram (test di *Newman-Keuls*).

#### 4.3.5. Esperimento 14 – Spontaneous Locomotor Activity

La somministrazione del disulfiram 2h prima del test ha prodotto una marcata riduzione del numero totale delle conte (inteso come numero delle interruzioni delle fotocellule) [F(2,19)=18.50,  $p < 0.0001$ ]. Le dosi 50 e 100 mg/kg hanno infatti rispettivamente ridotto del 58% e del 69% il numero delle conte totali (Fig. 12A). Invece, la somministrazione del disulfiram a 48h non ha avuto nessun effetto sull'attività locomotoria spontanea [F(2,21)=0.51,  $p > 0.05$ ] (Fig. 12B).



**Tab. 11.** Effetto del trattamento con disulfiram sull'attività locomotoria spontanea in ratti Wistar registrata all'interno di box muniti di fotocellule. Il disulfiram è stato somministrato, in due esperimenti indipendenti, 2h (A) e 48h (B) prima dell'esposizione al box. Il numero delle conte, rappresentativo dell'attività locomotoria ed inteso come il numero delle interruzioni delle fotocellule, è stato registrato per 60 min. Ciascun valore è la media ( $\pm$ SEM) di  $n=7-8$  ratti. \*  $p < 0.0005$  in confronto col gruppo trattato con 0 mg/kg di disulfiram (test di *Newman-Keuls*).

## **5. DISCUSSIONE**

Studi preclinici recenti hanno messo in evidenza come il trattamento con il nepicastat sia in grado di ridurre il reinstatement per la cocaina (Shroeder et al., 2010, 2013).

I risultati di questa tesi indicano che il nepicastat è anche in grado di ridurre diversi comportamenti alcol- e cioccolato-correlati nel ratto. In particolare il nepicastat ha ridotto le proprietà rinforzanti dell'alcol e soppresso il consumo di alcol in un modello di ricaduta in ratti sP; inoltre ha ridotto le proprietà rinforzanti e motivazionali del cioccolato e soppresso il reinstatement della ricerca del cioccolato (un modello di ricaduta) in ratti Wistar.

### **5.1. Effetto del nepicastat sui comportamenti alcol-correlati**

Il trattamento acuto con il nepicastat ha soppresso l'incremento di alcol assunto dai ratti quando l'alcol è stato volontariamente reintrodotta dopo settimane di astinenza (esperimento 1). Questi dati sono di notevole interesse in quanto l'ADE è stata proposta e validata come uno dei pochi modelli animali di ricaduta dell'uomo (Martin-Fardon e Weiss, 2013; Vengeliene et al., 2014). L'effetto sull'ADE è stato selettivo in quanto entrambe le dosi usate non hanno interferito sul normale consumo di alcol, e dell'acqua, nei gruppi di controllo non sottoposti alle due settimane di astinenza.

I risultati dell'esperimento 2 invece indicano che il nepicastat alle dosi 50 e 100 mg/kg ha ridotto sia il numero di pressioni sulla leva che la quantità di alcol auto-somministrato.

Questi dati suggeriscono la capacità del nepicastat di attenuare le proprietà rinforzanti dell'alcol. Questo effetto è relativamente selettivo sull'alcol infatti il trattamento con le medesime dosi di nepicastat ha prodotto solo una lieve tendenza alla riduzione nell'auto-somministrazione di cibo normale non palatabile (esperimento 3).

Questi dati tendono ad escludere che il nepicastat riduca il consumo di alcol per via di effetti sedativi o secondari sulla motilità. I risultati dell'esperimento 2 sono in accordo con quanto evidenziato da esperimenti precedenti nel trattamento con inibitori della DBH come FLA-57 e U-14,624, che hanno soppresso l'attività pressoria per l'alcol in ratti Sprague Dawley i quali si auto-somministravano l'alcol per via intragastrica (Davis et al., 1978, 1979). Tutti questi dati suggeriscono che il blocco della biosintesi di NA ha un suo ruolo sull'effetto soppressivo sulle proprietà di rinforzo dell'alcol.

I dati dell'esperimento 4 suggeriscono che il trattamento con le dosi 50 e 100 mg/kg non ha alterato la locomozione spontanea dei ratti sia da solo che in associazione con una dose moderata/alta di alcol pari 2 g/kg. Questo risultato acquisisce anche più importanza se consideriamo il fatto che topi knockout per il DBH sono più sensibili alla sedazione

indotta da alcol (Weinshenker et al., 2000), mentre la contemporanea somministrazione di alcol e nepicastat alle massime dosi raggiunte, 50 e 100 mg/kg, non ha alterato la locomozione.

In conclusione questi effetti sono stati: a) relativamente selettivi, b) dose-correlati, c) non soggetti ad interazioni di tipo sedativo tra alcool e nepicastat in quanto non è stata alterata l'attività locomotoria spontanea nei ratti sP.

## **5.2. Effetto del nepicastat sui comportamenti cioccolato-correlati**

I risultati dello studio presente mostrano che il nepicastat ha ridotto le proprietà di rinforzo e motivazionali della soluzione di cioccolato e totalmente soppresso il reinstatement.

In particolare il nepicastat ha ridotto in una maniera dose-dipendente le risposte sulla leva sotto FR (una misura delle proprietà di rinforzo) (esperimento 5), sotto PR (una misura delle proprietà motivazionali del cioccolato) (esperimento 7). L'effetto soppressivo del nepicastat è stato di lunga durata, difatti la dose massima è stata efficace anche 24h dopo la somministrazione e non legata ad effetti secondari di tipo sedativo, dal momento che nessuna dose del nepicastat ha causato alcuna alterazione a livello locomotorio (esperimento 9).

Tuttavia gli effetti soppressivi del nepicastat non sono risultati specifici per la componente edonica del cibo, in quanto il composto è stato ugualmente attivo nell'inibire le pressioni sulla leva guidate dall'appetito in ratti soggetti ad un regime di restrizione alimentare calibrato per generare una risposta della leva per il cibo standard uguale a quello prodotto nei ratti che si auto-somministravano cioccolato (esperimento 6). Questi risultati suggeriscono che il nepicastat può avere un effetto nel ridurre le proprietà rinforzanti del cibo, sia quando è sostenuto dalla palatabilità che dall'appetito; questi risultati suggeriscono che c'è un comune substrato neuronale che controlla entrambe le condizioni.

Gli effetti soppressivi del nepicastat nel reinstatement per il cioccolato (esperimento 8) hanno riprodotto l'effetto inibitorio riportato dal nepicastat e dal disulfiram nel reinstatement per la cocaina nei ratti (Schroeder et al., 2013), suggerendo che ci potrebbe essere un comune meccanismo neuronale a guidare la capacità di indurre ricaduta da parte di stimoli differenti (cocaina, cioccolato, cues e stress).

Nel reinstatement la fase di estinzione del comportamento di seeking behaviour del cioccolato è stata raggiunta in media dopo otto giorni di sessioni, durante le quali alle pressioni sulla leva non era associato alcun rinforzo. Il reinstatement della ricerca del

cioccolato è stato scatenato da una esposizione non contingente della soluzione di cioccolato combinata con stimoli ambientali (luce e tono sonoro) precedentemente associati con la disponibilità del rinforzo.

Questi stimoli ambientali sono gli stessi che spingono i cosiddetti “cioccolisti” a ricadere dopo un periodo di astinenza (Grilo et al., 1989; Van Gucht et al, 2008).

Con questo studio sono state inoltre confermate precedenti osservazioni (Maccioni et al., 2008; Zaru et al., 2012) con le quali sono state messe in evidenza le grandi proprietà motivazionali e di rinforzo della soluzione di cioccolato che è in grado di indurre una rapida acquisizione ed un mantenimento costante della self-administration.

L’operant behaviour generato è caratterizzato da:

- un alto numero di pressioni sulla leva in ciascuna sessione di self-administration;
- un grande volume di soluzione ingerita in un breve arco di tempo;
- alti valori di braekpoint.

La fase di mantenimento del comportamento a livelli così elevati è probabilmente guidata dagli stimoli orosensoriali che la soluzione di Nesquik® produce (dolcezza, sapore ed aroma) e non dall’appetito o dal suo apporto energetico; infatti gli animali sono nutriti ad libitum nella loro home cage e l’apporto energetico della soluzione consumata è talmente basso da considerarsi trascurabile rispetto alle calorie assunte durante la giornata e nelle ore precedenti le sessioni.

### **5.3. Effetto del disulfiram sui comportamenti cioccolato-correlati**

L’effetto evidenziato a 2h dal trattamento sia nella chocolate self-administration che nella food self-administration è in accordo con la farmacocinetica dell’inibizione della DBH (Deitrich e Erwin, 1971) e la conseguente deplezione di NA (Goldstein e Nakajima, 1967). Di conseguenza la concomitante riduzione dell’attività locomotoria spontanea (esperimento 14), del numero delle pressioni sulla leva per il cioccolato (esperimento 10) e per i pellets di cibo (esperimento 11) dovrebbe essere riconducibile proprio alla deplezione di NA.

Gli effetti soppressivi evidenziati nelle sessioni effettuate dopo le 2h non sembrerebbero invece compatibili con la farmacocinetica nell’inibizione della DBH né, tantomeno, della ALDH che non è implicata nei meccanismi di taking e seeking delle sostanze d’abuso e dei rewards naturali.

Un possibile meccanismo d’azione, alternativo all’inibizione della DBH, potrebbe essere ricercato nelle reazioni di metabolizzazione del disulfiram che portano alla formazione

dell'S-metil-sulfossido e dell'S-metil-solfone che, per via delle loro proprietà elettrofile, sono in grado di carbamoilare, ed inibire, diversi enzimi (Hu et al., 1997).

Nagendra e coll. (Nagendra et al., 1997) hanno infatti scoperto che il disulfiram, proprio tramite carbamoilazione, inibisce parzialmente i recettori ionotropici e metabotropici del glutammato nel sistema nervoso centrale; tali recettori giocano un ruolo cruciale nel rilascio della DA nell'NAcb e quindi nei meccanismi di ricompensa (Olive, 2009). Questo meccanismo potrebbe essere alla base degli effetti soppressivi del disulfiram riscontrati dopo le 2h dalla somministrazione.

In conclusione, questi dati mostrano che il disulfiram condivide col nepicastat la capacità di inibire le proprietà incentivo-motivazionali di un cibo palatabile come il cioccolato (nonché di inibirne il reinstatement). A differenza del nepicastat però il disulfiram ha un effetto inibitorio più marcato sul consumo di un cibo non palatabile la cui assunzione è legata alla sensazione di appetito.

Partendo da questi risultati preclinici è stato condotto presso il Policlinico Universitario di Cagliari un trial clinico preliminare per saggiare il disulfiram (Antabuse®) su pazienti affetti da binge eating disorder (BED). I risultati mostrano una riduzione della frequenza degli episodi di binge eating; sfortunatamente, gli effetti collaterali riscontrati nella maggioranza dei pazienti potrebbero limitare l'utilità clinica del disulfiram. Un possibile "effetto placebo" è stato inoltre escluso grazie alla prolungata osservazione dei pazienti che assumevano il placebo (Farci et al., 2015).

## **6. POSSIBILI EFFETTI NEUROFISIOLOGICI DELL'INIBIZIONE DELLA DBH**

Recenti studi di microdialisi (Devoto et al., 2012, 2013, 2014) suggeriscono un meccanismo d'azione per gli effetti soppressivi del nepicastat sul consumo di alcol, cocaina e cioccolato. Questi studi hanno evidenziato come nepicastat e disulfiram siano in grado di ridurre non solo il rilascio di NA in differenti aree del cervello, come atteso in seguito ad un'inibizione della DBH, ma hanno causato anche un marcato incremento del rilascio della DA nella PFC. Per spiegare questo effetto è stato ipotizzato che i due inibitori della DBH, in seguito ad una deplezione di NA a livello degli autorecettori  $\alpha_2$ , potrebbero produrre un mancato controllo della NA stessa sul rilascio della DA dai terminali NAergici e DAergici della PFC. Un aumento dell'attività DAergica in questa zona, ed in particolare in sede post-sinaptica su neuroni glutammatergici, potrebbe essere alla base di un controllo inibitorio mediato dalla DA a livello del NAcb. È stato ipotizzato infatti che la DA riduca il

tono glutammanergico eccitatorio delle efferenze che dalla PFC proiettano al NAc, struttura che gioca un ruolo fondamentale nel reward e negli episodi di ricaduta per la ricerca della droga e del cibo (McFarland et al., 2003; Peters et al., 2006; LaLumiere et al., 2008).

## **7. CONCLUSIONI**

Questi risultati ci consentono di estendere nel ratto l'efficacia del nepicastat a diversi comportamenti indotti dall'alcol e da uno stimolo naturale come il cioccolato.

In conclusione possiamo affermare che:

- la DBH è un target promettente non solo per la cura della dipendenza da cocaina (George et al., 2000; Petrakis et al., 2000; Carroll et al., 2004; Kosten et al., 2013, ma anche per la dipendenza da alcol (Johansson 1992; Colombo et al., 2014) e per i disturbi del comportamento alimentare (Zaru et al., 2013; Farci et al., 2015);
- questi dati danno un'ulteriore conferma che i circuiti neuronali per il taking ed il seeking di droghe d'abuso e cibo sono sovrapponibili (Volkow et al., 2008), confermando l'utilità del modello della self-administration di cioccolato nello studio delle basi neurofisiologiche dei disturbi del comportamento alimentare e nello screening di nuove molecole.

## 8. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

Agabio R, Carai MA, Lobina C, Pani M, Reali R, Vacca G, Gessa GL, Colombo G (2000) Development of short-lasting alcohol deprivation effect in sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol* 21(1):59-62.

Anden Ne, Carlsson A, Dahlstroema A, Fuxe K, Hillarp Na, Larsson K (1964) Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci* 3:523-30.

Barth KS, Malcolm RJ (2010) Disulfiram: an old therapeutic with new applications. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9(1):5-12.

Bassareo V, De Luca MA, Di Chiara G (2002) Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 1;22(11):4709-19.

Bassareo V, Di Chiara G (1997) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7(1):69-76.

Berridge KC, Venier IL, Robinson TE (1989) Taste reactivity analysis of 6-hydroxydopamine-induced aphagia: implications for arousal and anhedonia hypotheses of dopamine function. *Behav Neurosci* 103(1):36-45.

Berridge KC (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology* 191(3):391-431.

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

Blum K, Oscar-Berman M, Giordano J, Downs B, Simpatico T, Han D, Femino J (2012) Neurogenetic impairments of brain reward circuitry links to reward deficiency syndrome (RDS): potential nutrigenomic induced dopaminergic activation. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2012 17;3(4). pii: 1000e115.

Bruinsma K, Taren DL (1999) Chocolate: food or drug? *J Am Diet Assoc* 99(10):1249-56.

Canon C.M, Palmiter R.D (2003) Reward without dopamine. *J. Neurosci.* 23, 10827-10831.

Carlsson A (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11(2, Part 2):490-3.

Carlsson A, Waldeck B (1958) A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol Scand* 15;44(3-4):293-8.

Carroll KM, Nich C, Ball SA, McCance E, Frankforter TL, Rounsaville BJ (2000) One-year follow-up of disulfiram and psychotherapy for cocaine-alcohol users: sustained effects of treatment. *Addiction* 95(9):1335-49.

Carroll KM, Fenton LR, Ball SA, Nich C, Frankforter TL, Shi J, Rounsaville BJ (2004) Efficacy of disulfiram and cognitive behavior therapy in cocaine-dependent outpatients: a randomized placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 61(3):264-72.

Colombo G, Maccioni P, Vargiolu D, Loi B, Lobina C, Zaru A, Carai MA, Gessa GL (2014) The dopamine  $\beta$ -hydroxylase inhibitor, nopicostat, reduces different alcohol-related behaviors in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 38(9):2345-53. doi: 10.1111/acer.12520.

Davis WM, Smith SG, Werner TE (1978) Noradrenergic role in the self-administration of ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 9:369–374.

Davis WM, Werner TE, Smith SG (1979) Reinforcement with intragastric infusions of ethanol: blocking effect of FLA 57. *Pharmacol Biochem Behav* 11:545–548.

de Wit H, Stewart J (1981) Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology* 75(2):134-43.

Deitrich RA, Erwin VG (1971) Mechanism of the inhibition of aldehyde dehydrogenase in vivo by disulfiram and diethyldithiocarbamate. *Mol Pharmacol* 7, 301-307.

Devoto P, Flore G, Saba P, Cadeddu R, Gessa GL (2012) Disulfiram stimulates dopamine release from noradrenergic terminals and potentiates cocaine-induced dopamine release in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 219, 1153 –1164.

Devoto P, Flore G, Saba P, Bini V, Gessa GL (2013) The dopamine beta-hydroxylase inhibitor nepicastat increases dopamine release and potentiates psychostimulant-induced dopamine release in the prefrontal cortex. *Addict Biol* [Epub ahead of print].

Devoto P, Fattore L, Antinori S, Saba P, Frau R, Fratta W, Gessa GL (2014) Elevated dopamine in the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking via D1 receptor overstimulation. *Addict Biol* 19. doi: 10.1111/adb.12178. [Epub ahead of print].

Di Chiara G (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 2;137(1-2):75-114.

Di Chiara G (2005) Dopamine, Motivation and Reward in *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol. 21: Dopamine, Elsevier, Amsterdam.

Di Chiara G, Tanda G, Bassareo V, Pontieri F, Acquas E, Fenu S, Cadoni C, Carboni E (1999) Drug addiction as a disorder of associative learning. Role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. *Ann N Y Acad Sci* 29;877:461-85.

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

Erb S, Shaham Y, Stewart J (1996) Stress reinstates cocaine-seeking behavior after prolonged extinction and a drug-free period. *Psychopharmacology* 128(4):408-12.

Falck B, Torp A (1962) New evidence for the localization of noradrenalin in the adrenergic nerve terminals. *Med Exp Int J Exp Med* 6:169-72.

Farci AMG, Piras S, Murgia M, Chessa A, Restivo A, Gessa GL, Agabio R (2015) Disulfiram for binge eating disorder: an open trial. *Eat. Behav* 16, 84-87.

Fuchs RA, Tran-Nguyen LT, Specio SE, Groff RS, Neisewander JL (1998) Predictive validity of the extinction/reinstatement model of drug craving. *Psychopharmacology* 135(2):151-60.

George TP, Chawarski MC, Pakes J, Carroll KM, Kosten TR, Schottenfeld RS (2000) Disulfiram versus placebo for cocaine dependence in buprenorphine-maintained subjects: a preliminary trial. *Biol Psychiatry* 47(12):1080-6.

Mark A, Geyer MA (2002) The role of preclinical models in development of psychotropic drugs. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Edited by Kenneth L. Davis, Dennis Charney, Joseph T. Coyle, and Charles Nemeroff. American College of Neuropsychopharmacology.

Goldstein M, Nakajima K (1967) The effect of disulfiram on catecholamine levels in the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 157(1):96-102.

Grilo CM, Shiffman S, Wing RR (1989) Relapse crises and coping among dieters. *J Consult Clin Psychol* 57, 488 – 495.

Hameedi FA, Rosen MI, McCance-Katz EF, McMahon TJ, Price LH, Jatlow PI, Woods SW, Kosten TR (1995) Behavioral, physiological, and pharmacological interaction of cocaine and disulfiram in humans. *Biol Psychiatry* 37(8):560-3.

Hernandez L, Hoebel BG(1988) Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the accumbens. *Physiol Behav* 44(4-5):599-606.

Higgins ST, Budney AJ, Bickel WK, Hughes JR, Foerg F (1993) Disulfiram therapy in patients abusing cocaine and alcohol. *Am J Psychiatry* 150(4):675-6.

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

Hu P, Jin L & Baillie TA (1997) Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde

dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. *J Pharmacol Exp Ther* 281, 611-617.

Johansson, B. 1992. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr. Scan* 369(Suppl):15–26.

Kenny PJ (2011) Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron* 24;69(4):664-79. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.016.

Le Moal M, Koob GF (2006) Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol.* (6-7):377-93.

Kosten, TR, TP George, and TA Kosten (2002) The potential of dopamine agonists in drug addiction. *Expert Opin. Investig. Drugs* 11:491–499.

Kosten, TR., G. Wu, W Huang, MJ Harding, SC Hamon, J Lappalainen, Nielsen DA (2013). Pharmacogenetic randomized trial for cocaine abuse: disulfiram and dopaminethylhydroxylase. *Biol. Psychiatry* 73:219–224

Krampe H, Ehrenreich H (2010) Supervised disulfiram as adjunct to psychotherapy in alcoholism treatment. *Curr Pharm Des.* 16(19):2076-90.

LaLumiere RT & Kalivas PW (2008) Glutamate release in the nucleus accumbens core is necessary for heroin seeking. *J Neurosci* 28, 3170 – 3177

Lê AD, Funk D, Harding S, Juzysch W, Fletcher PJ, Shaham Y (2006) Effects of dexfenfluramine and 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists on stress-induced reinstatement of alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology* 186, 82-92.

Le Foll B, Gallo A, Le Strat Y, Lu L, Gorwood P (2009) Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. *Behav Pharmacol* 20(1):1-17. doi: 10.1097/FBP.0b013e3283242f05.

Maccioni P, Pes D, Carai MA, Gessa GL, Colombo G (2008) Suppression by the cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant, of the reinforcing and motivational properties of a chocolateflavoured beverage in rats. *Behav Pharmacol* 19, 197 –209.

Maccioni P, Colombo G, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Gessa GL, Carai MA (2010) Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on operant self-administration of a chocolate-flavoured beverage in rats. *Br J Nutr* 104, 624 –628.

Maccioni P, Zaru A, Loi B, Lobina C, Carai MA, Gessa GL, Capra A, Mugnaini C, Pasquini S, Corelli F, Hyytiä P, Lumeng L, Colombo G (2012) Comparison of the effect of the GABAB receptor agonist, baclofen, and the positive allosteric modulator of the GABAB receptor, GS39783, on alcohol self-administration in 3 different lines of alcohol-preferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 36(10):1748-66. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01782.x.

Madden GJ, Smethells JR, Ewan EE, Hursh SR (2007) Tests of behavioral-economic assessments of relative reinforcer efficacy: economic substitutes. *J Exp Anal Behav* 87, 219 – 240.

Martin-Fardon R, Weiss F (2013) Modeling relapse in animals. *Curr Top Behav Neurosci* 13:403–432.

McCance-Katz EF, Kosten TR, Jatlow P (1998) Disulfiram effects on acute cocaine administration. *Drug Alcohol Depend* 1;52(1):27-39.

McFarland K, Lapish CC & Kalivas PW (2003) Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 23, 3531– 3537.

William T, McKinney Jr, (1988) *Models of Mental Disorders: A New Comparative Psychiatry* Softcover reprint of the original 1st ed. 1988 Springer Edition. ISBN-10: 1468454323.

Meil WM, See RE (1996) Conditioned cued recovery of responding following prolonged withdrawal from self-administered cocaine in rats: an animal model of relapse. *Behav Pharmacol* 7(8):754-763.

Meule A (2011) How prevalent is "food addiction"? *Front Psychiatry* 2:61

Nagendra SN, Faiman MD, Davis K, Wu JY, Newby X, Schloss JV (1997) Carbamoylation of brain glutamate receptors by a disulfiram metabolite. *J Biol Chem* 272, 24247-24251.

O'Connor EC, Chapman K, Butler P, Mead AN (2011) The predictive validity of the rat self-administration model for abuse liability. *Neurosci Biobehav Rev* 35(3):912-38. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.10.012.

Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47(6):419-27.

Oster SM, Toalston JE, Kuc KA, Pommer TJ, Murphy JM, Lumeng L, Bell RL, McBride WJ, Rodd ZA (2006) Effects of multiple alcohol deprivations on operant ethanol self-administration by high-alcohol-drinking replicate rat lines. *Alcohol* 38, 155 – 164

Pani PP, Trogu E, Vacca R, Amato L, Vecchi S, Davoli M (2010) Disulfiram for the treatment of cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jan 20; (1):CD007024. doi: 10.1002/14651858.CD007024.

Panlilio LV, Goldberg SR (2007) Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction* 102(12):1863-70.

Peters J, Kalivas PW (2006) The group II metabotropic glutamate receptor agonist, LY379268, inhibits both cocaine and food-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology* 186, 143 – 149

Rada P, Avena NM, Hoebel BG (2005) Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience* 134(3):737-44.

Richardson NR & Roberts DC (1996) Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 66, 1– 11.

Robbins TW, Everitt BJ. A role for mesencephalic dopamine in activation: commentary on Berridge (2006). *Psychopharmacology* 191(3):433-7.

Rodd AZ, Bell RL, Kuc KA, Murphy JM, Lumeng L, Li T-K., McBride WJ (2003) Effect of repeated alcohol deprivations on operant ethanol self-administration by alcohol-preferring (P) rats. *Neuropsychopharmacology* 28, 1614-1621.

Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM (2005) Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol* 2005 Feb;5(1):34-41.

Schroeder JP, Cooper DA, Schank JR, Lyle MA, Gaval-Cruz M, Ogbonmwan YE, Pozdeyev N, Freeman KG, Iuvone PM, Edwards GL, Holmes PV, Weinshenker D. (2010) Disulfiram attenuates drug-primed reinstatement of cocaine seeking via inhibition of dopamine b-hydroxylase. *Neuropsychopharmacology* 35, 2440– 2449.

Schroeder JP, Epps SA, Grice TW, Weinshenker D (2013) The selective dopamine b-hydroxylase inhibitor nepicastat attenuates multiple aspects of cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* 38(6):1032-8. doi: 10.1038/npp.2012.267.

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

Sesack SR, Bunney BS (1989) Pharmacological characterization of the receptor mediating electrophysiological responses to dopamine in the rat medial prefrontal cortex: a microiontophoretic study. *J Pharmacol Exp Ther* 248(3):1323-33.

Shaham Y, Rajabi H, Stewart J (1996) Relapse to heroinseeking in rats under opioid maintenance: the effects of stress, heroin priming, and withdrawal. *J Neurosci* 16, 1957 – 1963

Shalev U, Highfield D, Yap J, Shaham Y (2000) Stress and relapse to drug seeking in rats: studies on the generality of the effect. *Psychopharmacology* 150(3):337-46.

Skinner MD, Lahmek P, Pham H, Aubin HJ (2014) Disulfiram efficacy in the treatment of alcohol dependence: a meta-analysis. *PLoS One* 10;9(2):e87366. doi: 10.1371/journal.pone.0087366.

Spanagel R, Weiss F (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci.* 1999 Nov;22(11):521-7.

Stice E, Rohde P, Shaw H, Marti CN (2011) Efficacy trial of a selective prevention program targeting both eating disorder symptoms and unhealthy weight gain among female college students. *J Consult Clin Psychol* 80(1):164-70. doi: 10.1037/a0026484.

Stice E, Marti CN, Durant S (2012) Risk factors for onset of eating disorders: evidence of multiple risk pathways from an 8-year prospective study. *Behav Res Ther.* 2011 Oct;49(10):622-7. doi: 10.1016/j.brat.2011.06.009

Ungerstedt U (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1971;367:1-48.

Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 18;24(3):485-93.

Vacca G, Serra S, Brunetti G, Carai MA, Samson HH, Gessa GL, Colombo G (2002) Operant self-administration of ethanol in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002 Nov;26(11):1678-85.

Van Gucht D, Vansteenwegen D, Beckers T, Van den Bergh O (2008) Return of experimentally induced chocolate craving after extinction in a different context: divergence between craving for and expecting to eat chocolate. *Behav Res Ther* 46, 375 – 391

Vengeliene V, Bilbao A, Spanagel R (2014) The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. *Alcohol* 48:313–320.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, Dewey SL, Wolf AP (1993) Decreased dopamine D<sub>2</sub> receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* 14(2):169-77.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Hitzemann R, Ding YS, Pappas N, Shea C, Piscani K (1996) Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 20(9):1594-8.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Sedler M, Logan J, Franceschi D, Gatley J, Hitzemann R, Gifford A, Wong C, Pappas N (2001) Low level of brain dopamine D<sub>2</sub> receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *Am J Psychiatry* 2001 Dec;158(12):2015-21.

Volkow ND, Wise RA (2005) How can drug addiction help us understand obesity? *Nat Neurosci* 8:555–560.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Telang F (2008) Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 3191 –3200.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Telang F, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C, Swanson JM (2009) Cognitive control of drug craving inhibits brain reward regions in cocaine abusers. *Neuroimage* 1;49(3):2536-43. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.10.088.

Volkow ND, Wang GJ, Baler RD (2011) Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity.

Wang GJ, Volkow ND, Fowler JS, Logan J, Abumrad NN, Hitzemann RJ, Pappas NS, Pascani K (1997) Dopamine D<sub>2</sub> receptor availability in opiate-dependent subjects before and after naloxone-precipitated withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 16(2):174-82.

Wang GJ, Volkow ND, Thanos PK, Fowler JS (2004) Similarity between obesity and drug addiction as assessed by neurofunctional imaging: a concept review. *J Addict Dis.* 2004;23(3):39-53.

Weinshenker D, Rust NC, Miller NS, Palmiter RD (2000) Ethanol-associated behaviors of mice lacking norepinephrine. *J Neurosci* 20:3157–3164.

Weiss F, Maldonado-Vlaar CS, Parsons LH, Kerr TM, Smith DL, Ben-Shahar O (2000) Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 11;97(8):4321-6.

Wise RA (1982) Common neural basis for stimulation reward, drug reward and food reward. In: Hoebel BG, Novin D (Eds.), *The Neural Basis of Feeding and Reward*. Haer Institute for Electrophysiological Research, Brunswick, ME, pp. 445-454.

Wise RA (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron.* 10;36(2):229-40.

Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 483-494.

Wise RA (2006) Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 361, 1149-1158.

Wise RA, Spindler J, deWit H, Gerberg GJ (1978) Neuroleptic-induced “anhedonia” in rats: pimozone blocks reward quality of food. *Science* 201,262 -264.

Zaru A, Maccioni P, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Gessa GL, Carai MA, Colombo G (2012) Reducing effect of a combination of *Phaseolus vulgaris* and *Cynara scolymus* extracts on operant self-administration of a chocolate-flavoured beverage in rats. *Phytother Res* 27(6):944-7. doi: 10.1002/ptr.4814.

Zaru A, Maccioni P, Colombo G, Gessa GL (2013) The dopamine  $\beta$ -hydroxylase inhibitor, nepicastat, suppresses chocolate self-administration and reinstatement of chocolate seeking in rats. *Br J Nutr* 110(8):1524-33. doi: 10.1017/S0007114513000743.