



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Biomedicina e Neuroscienze

Coordinatore – Ch.mo Prof. Giovanni Zummo

Indirizzo Neuroscienze e Disturbi del Comportamento

Referente – Ch.mo Prof. Carla Cannizzaro

Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14

Nuovi derivati della Dopamina nell'Addiction da sostanze d'abuso: studi preclinici su modelli sperimentali murini

IL DOTTORE

Flavia Maria Sutera

IL COORDINATORE

Ch.mo Prof. Giovanni Zummo

IL TUTOR

Ch.mo Prof. Carla Cannizzaro
(SSD BIO/14)

CO-TUTOR

Preg. mo Dr. Viviana De Caro
(SSD CHIM/09)

CICLO XXV

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

Indice

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Recettori per la Dopamina	6
1.2 Sistema Mesolimbico Dopaminergico	8
1.3 Dopamina e Motivational Learning	9
1.4 Dopamina e Memoria	11
1.5 Etanolo e Reward	14
1.6 Agonisti Dopaminergici e Auto-somministrazione Orale di Etanolo nel Ratto	16
1.7 DA-Phen: Nuovo Coniugato Aminoacidico Della DA	17
2. SCOPO DELLA TESI	21
3. MATERIALI E METODI	25
3.1 Materiali e metodi per la Sintesi e la caratterizzazione del 2-amino-N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl]-3-phenyl-propionamide (DA-Phen)	25
3.2 Valutazione della reattività comportamentale indotta da Da-Phen	27
3.2.1 Animali	27
3.2.2. Open Field	27
3.2.3 Elevated Plus Maze	28
3.2.4 Forced Swimming Test	29
3.2.5 Morris Water Maze	31
3.2.5.1 Training Period - Place Learning	32
3.2.5.2 Reversal Period - New Place Learning	32
3.2.5.3 Probe - Cognitive Flexibility	33
3.2.6 Condizionamento Operante - Skinner Box	34
3.3 Design Sperimentale per la valutazione della reattività comportamentale indotta dalla somministrazione di DA-Phen	34
3.3.1 Open Field e Elevated Plus Maze	34
3.3.2 Forced Swimming Test e Morris Water Maze	35
3.3.3 Analisi Statistica	35
3.3.3.1 Open Field e Elevated Plus Maze	35
3.3.3.2 Forced Swimming Test	35
3.3.3.3 Morris Water Maze	36
3.3.4 Trattamento	36

<i>3.4 Design Sperimentale per la valutazione della modulazione del consumo di alcool dopo trattamento con DA-Phen</i>	36
3.4.1 Protocollo Sperimentale - Condizionamento Operante	36
3.4.1.1 Timeline del Disegno Sperimentale	37
3.4.2 Valutazione degli effetti astinenziali – Open Field ed Elevated Plus Maze	41
3.4.2.1 Prima sessione di Deprivation	41
3.4.2.2 Terza sessione di Deprivation	41
3.4.3 Analisi statistica	41
3.4.4 Trattamento	41
<i>3.5 Analisi degli organi target/non target dei ratti</i>	42
3.5.1 Sacrificio dei ratti	42
3.5.2 Preparazione degli omogenati	42
3.5.3 Campionamento degli organi da analizzare	43
3.5.3.1 Campioni provenienti dai ratti del primo Design Sperimentale	43
3.5.3.2 Campioni provenienti dai ratti del secondo Design Sperimentale	43
3.5.4 Determinazione quali-quantitativa di DA-Phen in cervello, plasma, fegato, reni e milza.	44
3.5.5 Determinazione quantitativa di Acetaldeide in cervello e fegato	44
<i>3.6 Predizione del Metabolismo in vivo di DA-Phen</i>	45
3.6.1 Algoritmo per analisi SMARTCyp standard	45
3.6.2 Algoritmo impiegato per il modello CYP2D6	46
3.6.3 Algoritmo impiegato per il modello CYP2C9	47
<i>3.7 Modello di omologia</i>	48
3.7.1 Stima qualitativa del Modello	48
3.7.2 Preparazione del modello proteico	48
3.7.3 Site Mapping	49
3.7.4 Docking Molecolare	50
<i>4 . RISULTATI</i>	52
<i>4.1 Valutazione della reattività comportamentale indotta dalla somministrazione di DA-Phen</i>	52
4.1.1 Open Field	52
4.1.2 Elevated Plus Maze	56
4.1.3 Forced Swimming Test	58
4.1.4 Morris Water Maze	61

4.2 Valutazione della modulazione del consumo di alcool dopo trattamento con DA-Phen	65
4.2.1 Comportamento di auto-somministrazione operante	65
4.2.1.1 Effetti del DA-Phen sul consumo giornaliero di EtOH - 3° ciclo di Relapse	68
4.2.1.2 Sessione Di Extinction	69
4.2.2 Risultati Open Field Test	70
4.2.3 Risultati Elevated Plus Maze Test	71
4.2.4 Variazione ponderale	73
4.3 Analisi degli organi target/non target dei ratti	74
4.3.1 Valutazione dell'uptake di DA-Phen nei principali organi target/non target quali cervello, plasma, fegato, reni, milza in seguito all'applicazione del Primo Design Sperimentale	74
4.3.2 Valutazione dell'uptake di DA-Phen nei principali organi target/non target quali cervello, plasma, fegato, reni, milza in seguito all'applicazione del Secondo Design Sperimentale	75
4.4 Risultati dell'analisi SMARTCyp per la predizione del metabolismo in vivo di DA-Phen	76
4.5 In silico Modeling (in collaborazione con Dr. Marco Tutone e Prof. Anna Maria Almerico)	78
4.5.1 Preparazione del modello proteico	78
4.5.2 Site Mapping	78
4.5.3 Molecular Docking	79
5. DISCUSSIONE	81
5.1 Valutazione della reattività comportamentale indotta dalla somministrazione di DA-Phen	81
5.1.1 Open Field	81
5.1.2 Elevated Plus Maze	83
5.1.3 Forced Swimming Test	86
5.1.4 Morris Water Maze	90
5.2 Valutazione della modulazione del consumo di alcool dopo trattamento con DA-Phen	93
5.2.1 Consumo Di Cibo Ed Etanolo	94
5.2.2 Pattern Di Bevuta E Astinenza	96
5.2.3 Effetti della somministrazione di DA-Phen durante il terzo ciclo di Deprivation-Relapse	98

<i>5.3 Analisi dell'uptake del DA-Phen in organi target-non target</i>	102
<i>5.4 Predizione del metabolismo di DA-Phen in vivo</i>	105
<i>5.5 Uptake di DA-Phen e correlazione con i livelli di uptake di ACD</i>	105
<i>5.6 Site Mapping e Docking Molecolare (in collaborazione con Dr. M. Tutone, Prof. A.M. Almerico)</i>	107
5.6.1 Site Mapping e Docking Molecolare	107
6. CONCLUSIONI	109
7. BIBLIOGRAFIA	112

1. Introduzione

La dopamina (DA) è un neurotrasmettitore cruciale nella regolazione dei processi cognitivi e delle attività psichiche e motorie, mediante l'azione che svolge nelle aree limbiche ed extrapiramidali del Sistema Nervoso Centrale (SNC) (Ikemoto e Bonci, 2014; Di Chiara e Bassareo, 2007) (Fig.1).

La DA regola una serie di comportamenti, attraverso la modulazione di vari circuiti, profondamente legati all'apprendimento e all'acquisizione delle informazioni provenienti dall'ambiente con cui l'individuo interagisce (Wise, 1996; Sheynikhovich et al, 2013). La trasmissione dopaminergica è fondamentale nel creare uno stato di motivazione mirato al rinforzo (*motivation to seek reward*) (Berridge and Robinson, 1998; Salamone et al., 2007) e per la memorizzazione dello stimolo associato al *reward*, ossia alla gratificazione ed al senso di benessere che derivano da un'attivazione del circuito dopaminergico mesolimbocorticale (Williams and Goldman-Rakic, 1995; Dalley et al, 2002, 2008). Le sostanze che influenzano negativamente la trasmissione dopaminergica alterano l'apprendimento legato al rinforzo in senso peggiorativo; al contrario, le sostanze stupefacenti e i farmaci che aumentano il tono della la trasmissione dopaminergica, lo favoriscono (Wise, 2004; Kroner et al, 2005).

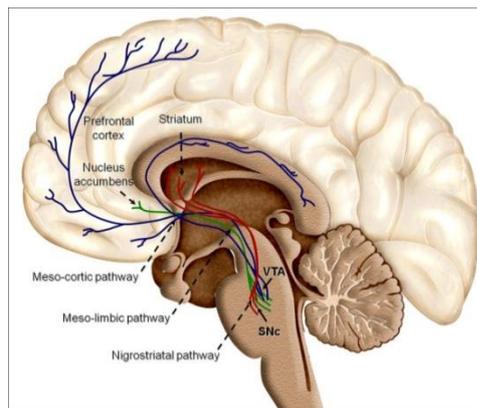


Fig. 1 Mappatura delle principali aree del cervello su cui agisce il neurotrasmettitore DA e raffigurazione dei pathways dopaminergici mesocorticale, mesolimbico e nigrostriatale (VTA: Ventral Tegmental Area; SNC: Substantia Nigra *pars compacta*).

1.1 Recettori per la Dopamina

I recettori dopaminergici vengono distinti nei sottotipi recettoriali D1-like e D2-like.

La famiglia D1 include anche il sottotipo D5: essi attivano l'adenilato ciclasi (AC) e la fosfolipasi C (PLC). I recettori D1 sono ampiamente diffusi nel sistema nervoso centrale, i D5 sono localizzati prevalentemente nell'ippocampo e nel talamo.

La famiglia dei recettori D2 include anche i sottotipi D3 e D4, essi agiscono inibendo l'attività della AC.

I D2 sono abbondantemente espressi in tutte le aree di innervazione dopaminergica, i D3 sono prevalentemente collocati nelle aree limbiche, quali tubercolo olfattorio, ippocampo e Substantia Nigra (SN) pars compacta; i recettori D4 si trovano invece nell'ippocampo, nella corteccia e nell'ipotalamo (Paoletti, Nicosia, Clementi, Fumagalli; 2004). (Tab. 1)

Famiglia	Funzione	Localizzazione
D1-like D1 D5	Attivano la adenilato ciclasi e, attraverso essa attivano la fosfolipasi, provocando la mobilitazione di calcio Mediano la risposta di vasodilatazione dei vasi sanguigni periferici, a livello renale, mesenterico, coronarico e cerebrale	Sono solo postsinaptici D ₁ si trovano nello striato, nel talamo, nell'ipotalamo, nel sistema limbico; D ₅ nell'ippocampo e nell'ipotalamo
D2-like D2 D3 D4	Provocano inibizione della adenilato ciclasi Provocano la riduzione del cAMP che determina l'apertura di canali del K ⁺ e chiusura di quelli del Ca ⁺⁺	Sono sia pre- che postsinaptici D ₂ si trovano nello striato, nella <i>substantia nigra</i> e nell'ipofisi, D ₃ si trovano nel bulbo olfattorio, nello striato laterale e nell'ipotalamo, D ₄ si trovano nella corteccia frontale, nel bulbo e nel mesencefalo.

Tab. 1. Principali famiglie recettoriali dopaminergiche e relative funzioni e localizzazioni

L'intero sistema dopaminergico può essere così schematizzato (Tab.2):

SISTEMA	ORIGINE	DESTINAZIONE	FUNZIONE
DOPAMINERGICO NIGRO-STRIATALE	Pars compacta della substantia nigra (area A9)	Gangli della base (neostriato)	Controllo extrapiramidale della motilità
DOPAMINERGICO MESOLIMBICO	VTA (area A10) e parte mediale della SN	Nucleus accumbens, tubercolo olfattorio e nucleo interstiziale della stria terminalis, corteccia limbica (giro del cingolo e corteccia entorinale), amigdala, ippocampo	Modulazione dell'umore, della gratificazione, del desiderio, della memoria e dell'aggressività
DOPAMINERGICO MESOLIMBO-CORTICALE	VTA (area A10)	Setto (in particolare nucleo del setto laterale), ippocampo, amigdala, corteccia entorinale, corteccia prefrontale, corteccia peririnale e corteccia piriforme	Modulazione delle attività cognitive, dell'attenzione e della volontà
DOPAMINERGICO MESOTALAMICO	VTA (area A10)	Ponte, diencefalo, telencefalo, abenula mediale e laterale (quest'ultima è un'importante tappa del sistema extrapiramidale; infatti il pallido ventrale e dorsale inviano afferenze all'abenula laterale che, a sua volta, proietta alla formazione reticolare e alla SN)	Controllo extrapiramidale della motilità
DOPAMINERGICO TUBERO-INFUNDIBOLARE	Corpi cellulari dopaminergici dei nuclei arcuato e periarquato dell'ipotalamo detti: A11, A12, A13, A14	Ipofisi posteriore (neuroipofisi)	Inibizione della secrezione di α -MSH (ormone melanocitostimolante), β -endorfina (ipofisi intermedia), ossitocina e vasopressina (ipofisi posteriore). La DA rilasciata nel circolo portale ipofisario, attraverso i capillari dell'eminenza mediana, raggiunge l'ipofisi anteriore inibendo la secrezione di prolattina, per stimolazione dei recettori D2
DOPAMINERGICO TUBERO-IPOFISARIO	Parte anteriore dell'area A12	Ipofisi intermedia e posteriore, strato esterno dell'eminenza mediana	Inibizione della secrezione di α -MSH (ormone melanocitostimolante), β -endorfina (ipofisi intermedia), ossitocina e vasopressina (ipofisi posteriore). La DA rilasciata nel circolo portale ipofisario, attraverso i capillari dell'eminenza mediana, raggiunge l'ipofisi anteriore inibendo la secrezione di prolattina, per stimolazione dei recettori D2

Tabella 2. Principali vie dopaminergiche (Goodman and Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics)

1.2 Sistema Mesolimbico Dopaminergico

Il circuito della gratificazione comprende un gruppo di neuroni DAergici il cui corpo ha origine nell'area tegmentale ventrale (VTA). Questi neuroni possiedono processi assionali che proiettano in una serie di regioni cerebrali compreso il Nucleus Accumbens (NAc), corteccia prefrontale, amigdala, tubercolo olfattorio e ippocampo (Tzschentke, 2001).

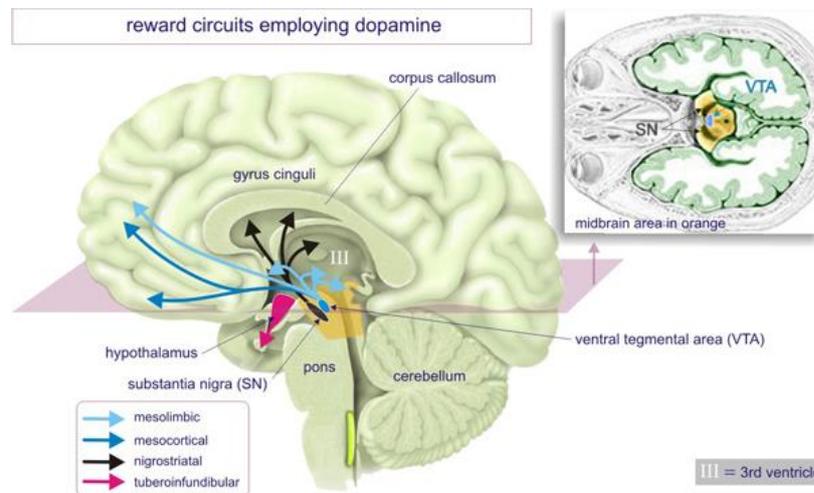


Fig 2. Circuito dopaminergico della gratificazione

Di particolare rilevanza sono le proiezioni DAergiche che dall'VTA terminano al NAc, poiché molteplici studi hanno dimostrato come diversi stimoli gratificanti naturali, quali cibo, acqua e sesso, e una serie di sostanze d'abuso (compreso l'etanolo) determinino un incremento della DA extracellulare in questa regione (Carboni et al, 1989; Di Chiara e Imperato, 1988; Koob e Le Moal, 2001; Yoshimoto et al, 1992; Niehaus et al, 2009), e che amigdala, ippocampo e corteccia prefrontale siano implicati in una serie di aspetti di rinforzo indotti da etanolo e cocaina (Vorel et al, 2001; Hodge et al, 1996; Melendez et al, 2003; Edwards et al, 2007). Negli ultimi anni è stato chiarito che il NAc non è una struttura cerebrale omogenea, ma costituita da diverse sub-regioni, shell e core, che sono state individuate sulla base delle differenze nei marcatori istochimici, e che si differenziano sia nelle funzioni comportamentali che nelle connessioni

anatomiche (Hitchcott et al, 2007; Hnasko et al, 2010; Zahm e Brog, 1992; Zahm, 1999). Recenti lavori hanno suggerito come l'attività DAergica nel core e nello shell sia diversa nei confronti degli stimoli gratificanti naturali e delle droghe, così come differenti sono le conseguenti associazioni che essa può evocare (Berlanga et al, 2003). I ruoli precisi di shell e core sono stati a lungo dibattuti riguardo le dipendenze. Lo shell potrebbe mediare stati edonici (piacevoli) ed intervenire nell'iniziazione o induzione del *drug-seeking behaviour* (Ito et al, 2000, 2004), mentre il core potrebbe essere importante per l'acquisizione o il mantenimento del *drug-seeking* (Koob e Volkow, 2010).

1.3 Dopamina e Motivational Learning

I neuroni DAergici presenti nella corteccia e in altre aree corticali mesencefaliche, prevalentemente localizzati nella SN *pars compacta* e nell' VTA (Bjorklund e Dunnett, 2007), rilasciano la DA in due modi: tonicamente e fasicamente (Grace, 1991; Grace et al, 2007) (Fig.3).

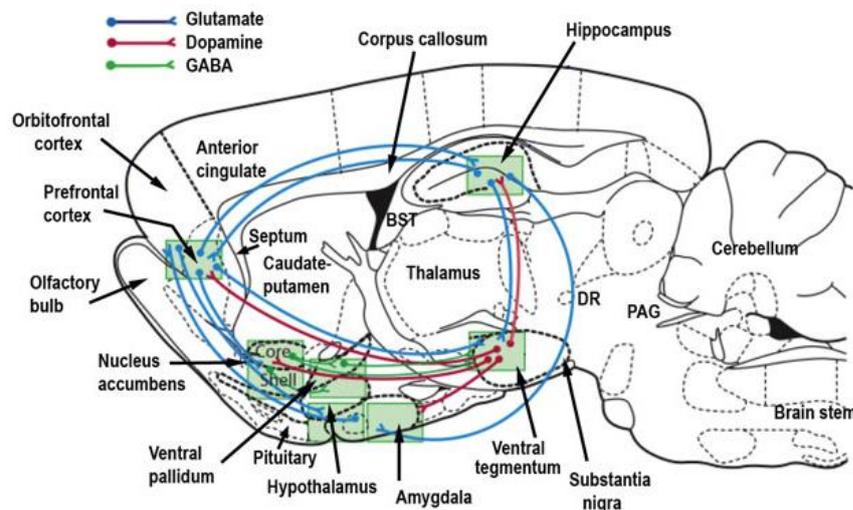


Fig.3 Circuiti dopaminergici legati all'apprendimento e alla memoria, alla motivazione ed all'emozionalità. Sezione sagittale di cervello di ratto riportante i nuclei chiave del sistema limbico. Vengono mostrati i principali circuiti del sistema mesolimbico dopaminergico, che si dipartono dal tegmento ventrale (in rosso), i pathways glutamatergici (in blu) che proiettano alla corteccia prefrontale, all'ippocampo ed ai gangli della base, ed i neuroni GABAergici inibitori (in verde). Abbreviazioni: PAG: Grigio periacqueduttale; DR= nucleo dorsale del rafe; BST= nucleo del letto della stria terminale (Berridge; 2004)

Nella fase tonica, i neuroni mantengono uno *steady state*, cioè un livello basale di DA per le strutture neurali a valle, che è vitale per assicurare il normale funzionamento dei circuiti neuronali (Schultz, 2007). Nella modalità fasica, i neuroni dopaminergici aumentano o diminuiscono nettamente il loro *firing* neuronale per 100-500 millisecondi, causando grandi variazioni della concentrazione di DA nelle strutture a valle per alcuni secondi (Schultz, 1998; Schultz, 2007). Queste risposte fasiche sono indotte da vari tipi di stimoli sensoriali, correlati e non correlati alla ricompensa (Schultz, 1998; 2000), e sono responsabili del ruolo cruciale della DA nel controllo motivazionale, nonché della capacità, da parte di questo neurotrasmettitore, di essere un segnale di rinforzo (Schultz et al, 1997; Wise, 2005) capace di promuovere il *reward seeking* (Berridge e Robinson, 1998).

Alcuni ricercatori sostengono che i neuroni DAergici fasici codifichino principalmente per *reward-related events*, ossia eventi correlati alla gratificazione (Schultz, 2007); mentre altri suggeriscono che i neuroni DAergici trasmettano anche segnali addizionali, non correlati alla ricompensa, coinvolti in altri processi quali: salienza, eventi avversativi, novità, sorpresa (Redgrave et al, 1999; Horvitz, 2000; Di Chiara, 2002; Joseph et al, 2003; Pezze e Feldon, 2004; Lisman e Grace, 2005; Redgrave e Gurney, 2006).

Per queste ragioni i neuroni dopaminergici vengono distinti in:

- neuroni che codificano per un effetto motivazionale, inibito da eventi avversativi e favorito da eventi ricompensativi: questi neuroni supportano le strutture cerebrali coinvolte nel raggiungimento degli obiettivi, nella valutazione dei risultati e nel valore dell'apprendimento (Grace, 1991; Neve et al, 2004);
- neuroni che codificano per la salienza motivazionale, stimolata sia da eventi avversativi, che da eventi ricompensativi: si tratta di neuroni che supportano le strutture cerebrali preposte all'orientamento, ai processi cognitivi e al *drive motivazionale* (Schultz et al, 1997). Inoltre entrambi i tipi di neuroni trasmettono un segnale di allerta, scatenato da stimoli sensoriali di notevole importanza (Grace, 1991; Neve et al, 2004; Pezze e Feldon, 2004)

La scarsa attivazione dei recettori DAaergici dà luogo al potenziamento delle sinapsi cortico-striatali del circuito inibitorio (Shen et al, 2008) e all'apprendimento legato ai risultati negativi (Voon et al, 2010), mentre il blocco dei recettori striatali D2 sopprime selettivamente i movimenti non associati al *reward* (Nakamura e Hikosaka, 2006; Rosenkranz e Grace 2001; 2002).

La DA, inoltre, influenza il comportamento *reward-related* agendo anche sulla corteccia prefrontale (Seamans et al, 2004; Hitchcott et al, 2007; Rotaru et al, 2007), la corteccia entorinale (Liu et al, 2004), l'ippocampo (Packard e White, 1991; Grecksch e Matties, 1981) e l'amigdala (Phillips et al, 2010). Gli effetti della DA sono diversi in queste regioni, per via della diversità nella densità di innervazione dopaminergica, nei trasportatori del neurotrasmettitore, negli enzimi metabolici, negli autorecettori, e per la diversità di altri recettori accoppiati ai pathways intracellulari (Neve et al, 2004; Bentivoglio e Morelli, 2005; Frank e Fossella, 2010). In aggiunta, nella VTA, i neuroni dopaminergici possono avere diverse proprietà intracellulari sulla base dei siti targets (Lammel et al, 2008; Margolis et al, 2008), e alcuni hanno l'abilità di trasmettere glutammato oltre che DA (Descarries et al, 2008; Chuhma et al, 2009; Hnasko et al, 2010; Tecuapetla et al, 2010; Stuber et al, 2010).

1.4 Dopamina e Memoria

La corteccia cerebrale è il principale sito di conservazione della memoria; questa è correlata alla plasticità sinaptica: maggiore è l'apprendimento, maggiore è la plasticità (Yang e Seamans, 1996; Yao et al, 2004; Bieszczad e Weinberger, 2010). Il circuito dopaminergico proencefalico è stato studiato per via del suo coinvolgimento nel *Parkinson's Disease* (date le discinesie motorie dovute ad un'alterazione del pathway nigrostriatale che ha origine nella SN) e nella motivazione, come anche nell'*addiction* (che fanno capo alla neuromodulazione dei sistemi mesolimbico e mesocorticale, che originano nella VTA). Evidenze sperimentali dimostrano che SN e VTA sono entrambe coinvolte nel *reward* e nell'*addiction* (Koob e Volkow, 2010). La stimolazione elettrica dei due nuclei stimola il *reward*, al contrario il blocco degli inputs glutammatergici e colinergici

alla SN e alla VTA attenua gli effetti della somministrazione abituale di cocaina; inoltre la DA dei terminali nigrostriatali e mesolimbici definisce le proprietà del rinforzo, attraverso il potenziamento della memoria (Wise, 2009).

I ratti imparano a lavorare per stimolazione di molteplici circuiti, presumibilmente collegati in serie, definiti “*reward-related*”. L’univoca auto-stimolazione coinvolge l’attivazione di una serie di nuclei lungo il fascio mediale del proencefalo (MFB) (Wise, 2009; Chao et al, 2002). L’uso di antagonisti della DA attenua gli effetti di *reward* legati alla stimolazione del MFB, a dosi che non causano significativa alterazione motoria (Wise e Rompre, 1989; Wise, 1996; 2004).

Sebbene il sistema mesolimbocorticale sia quello maggiormente associato al *reward*, le fibre dopaminergiche dalla SN e dalla VTA entrano e proiettano lungo il MFB, e centri del *reward* sono stati ritrovati sia nella SN, che nella VTA (Routtenberg e Malsbury, 1969; Crow, 1972).

I recettori D1 della VTA sono localizzati sulle terminazioni GABAergiche e glutamatergiche, e poichè il controllo presinaptico del rilascio di glutammato, grazie all’uso di agonisti D1, è più sensibile del controllo presinaptico del rilascio di GABA (Kalivas e Duffy, 1995), con la somministrazione di antagonisti D1 sembra aumentare il drive eccitatorio dei neuroni dopaminergici. L’input glutamatergico alla VTA attiva i neuroni DAergici, come evidenziato dal rilascio di DA dai dendriti (You et al, 2007), ed è correlato al *firing* cellulare e al rilascio di DA nel NAc (Legault e Wise, 2001). Il blocco dei recettori glutamatergici della VTA, così come il blocco dei recettori D1, aumenta l’auto-somministrazione di cocaina, ma attenua il rinforzo condizionato e lo stimolo, presumibilmente bloccando il contributo glutamatergico (You et al, 2007). Nel caso in cui venga somministrato un antagonista della DA nella SN, vengono attenuati l’eccitazione dopaminergica e il *reward*, in modo simile a quanto visto per la VTA (Quinlan et al, 2004).

Evidenze sperimentali dimostrano che proiezioni colinergiche dai nuclei laterodorsali e peduncolopontini tegmentali, rappresentano una seconda fonte di inputs eccitatori per i neuroni dopaminergici della VTA (Sesack e Pickel, 1992; Sesack e Grace, 2010) e il rilascio di Acetilcolina nella VTA e nella SN è elevato

durante la somministrazione i.v. di cocaina. Questo aumento è correlato all'attivazione dopaminergica, ed attenuato dall'uso di antagonisti colinergici (You et al, 2008). Come con gli antagonisti dopaminergici, quelli colinergici, microiniettati, aumentano il rilascio locale di DA e la risposta alla cocaina. Questi antagonisti riducono perciò l'input DA eccitatorio alla SN e alla VTA (You et al, 2008).

La DA, dato il suo determinante ruolo nei processi che regolano la memoria, risulta cruciale nel modulare la Long Term Potentiation (LTP) e la Long Term Depression (LTD) (Sheynikhovich et al, 2013; Niehaus et al, 2009; Otani et al, 2003, Tang et al, 1997). La LTP ippocampale è bloccata dall'uso di antagonisti dopaminergici D1 (Frey et al, 1990; Li et al, 2003) e potenziata da agonisti D1 (Otmakhova e Lisman, 1998).

Mediante studi *in vitro* condotti su slices ippocampali di neuroni CA1 murini, Chen e collaboratori hanno dimostrato che sia i recettori di tipo D1-like che D2-like sono coinvolti nella modulazione della LTD ippocampale. In particolare, per le dosi testate, la LTD risulterebbe potenziata da un'attivazione dei recettori D1-like, mentre un'attivazione dei recettori D2-like bloccherebbe i processi legati alla LTD (Chen et al, 1996). La LTD striatale è inibita sia dai D1, che dai D2 antagonisti; la LTP in questa regione è anch'essa dipendente dalla DA. La LTP e la LTD sono DA dipendenti anche nell'amigdala (Bissiere et al, 2003), nella corteccia frontale (Otani et al, 2003) e persino nella VTA (Thomas et al, 2000; Bonci e Malenka, 1999) e nella SN (Overton et al, 1999). Con sorpresa, altri studi hanno evidenziato che la DA gioca un ruolo determinante solo nella LTD (Thomas et al, 2000; Pennartz et al, 1993). Alla luce di ciò si può affermare che il neurotrasmettitore non agisce allo stesso modo sui circuiti nigrostriatali e mesolimbici; infatti essi mostrano un diverso contributo sulle strategie di apprendimento spaziale, emotivo e abitudinale (Otani et al, 2003; Sesack e Grace, 2010). Sheynikhovich ha realizzato uno studio che dà una visione unificata del ruolo funzionale della DA nella corteccia prefrontale, basandosi sulla teoria di Bienenstock-Cooper-Munro della plasticità corticale. Mediante l'ausilio del modello multi-compartimentale Hodgkin-Huxley dei neuroni piramidali prefrontali, Sheynikhovich ha dimostrato che la plasticità sinaptica a lungo

termine, è governata in modo dose-dipendente dalla DA, interessando sia recettori D1-like che D2-like. La DA controllerebbe la soglia sinaptica di alterazione della LTD in LTP nei neuroni piramidali, ed il quadro teorico proposto attraverso questo modello multi-compartimentale spiegherebbe una vasta gamma di risultati sperimentali, quali quelli già precedentemente citati, e fornirebbe inoltre un collegamento tra gli studi *in vitro* e *in vivo* sulla modulazione dopaminergica della plasticità sinaptica (Sheynikhovich et al, 2013).

1.5 Etanolo e Reward

Diversi studi dimostrano come tutte le sostanze additive attivino i neuroni dopaminergici il cui nucleo risiede nella VTA (Koob e Volkow, 2010; Arias-Carrion et al, 2010).

I meccanismi con cui le sostanze stupefacenti, fatta eccezione per l'etanolo, attivano il sistema mesolimbico dopaminergico coinvolgono recettori che si trovano sui neuroni dopaminergici della VTA, che proietta al NAc, o sui terminali dei neuroni dopaminergici del NAc. L'etanolo, tuttavia, agisce con un meccanismo indiretto che coinvolge l'inibizione della funzione GABAergica, che può risultare critica per il mantenimento del consumo di etanolo (Koob, 2014). Di fatti a livello del NAc vi è un'abbondanza di interneuroni GABA denominati "Medium Spiny Neurons" (MSN) (O'Donnell e Grace, 1995; Gruber e O'Donnell 2009), che innervano il pallidum ventrale, la VTA e l'ipotalamo laterale, e che sembrano giocare un ruolo importante nell'integrazione di diversi segnali afferenti che innervano il NAc. I MSN accumbali sono densamente innervati da afferenze dopaminergiche provenienti dall'VTA (Brog et al, 1993), e si pensa che ricevano afferenze glutammatergiche provenienti dalla corteccia e da aree ippocampali (Sesack e Pickel, 1992). Pertanto l'attivazione dei recettori GABA-A sui neuroni spinosi del guscio mediale determina l'inibizione di questi neuroni di proiezione, con conseguente disinibizione delle loro strutture bersaglio, compreso il NAc. L'etanolo, agendo sui neuroni GABAergici, disattiva l'inibizione di questi sul rilascio di DA nel NAc con conseguente effetto gratificante (Tabakoff e Hoffman, 2013) (Fig.4).

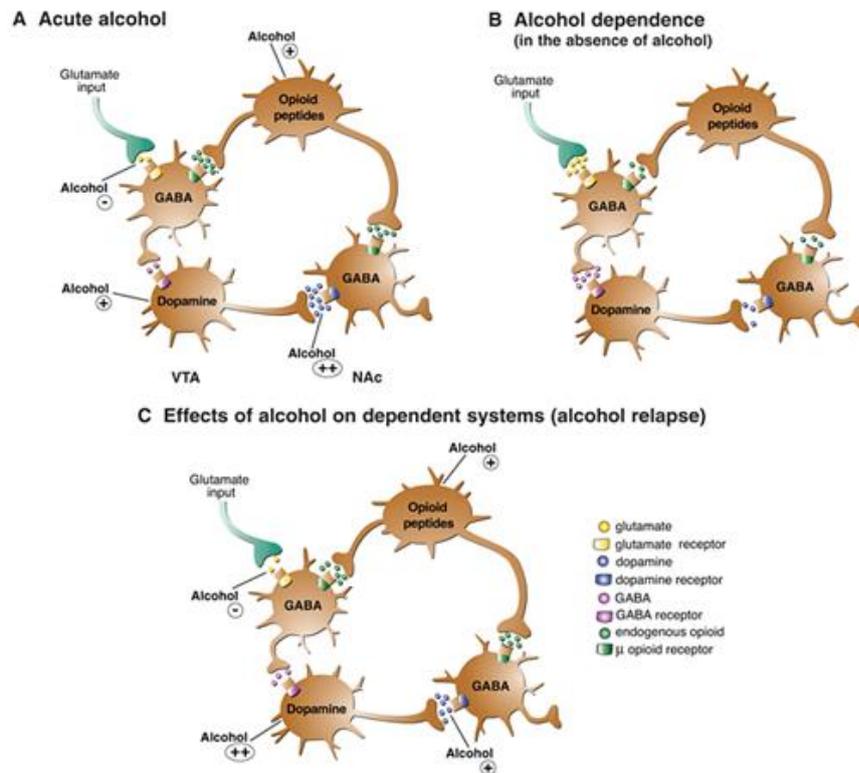


Figure 4. Effetti dell'alcool sul Sistema Mesolimbico dopaminergico: Rappresentazione grafica del meccanismo d'azione dell'etanolo e relativa disattivazione dell'inibizione dei neuroni GABAergici sul rilascio di DA a livello del NAc. L'attività dei neuroni DAergici nella VTA è controllata dai neuroni GABAergici. Quando i neuroni GABAergici vengono attivati, il loro segnale diminuisce il firing dei neuroni DAergici. Gli oppioidi endogeni, tuttavia, possono agire sui recettori μ oppioidi presenti sui neuroni GABAergici, inibire quindi la trasmissione GABAergica e di conseguenza provocare un aumento dei livelli di DA. A) L'esposizione acuta all'alcool induce il rilascio di β -endorfine, che provocano l'attivazione dei recettori μ presenti sui neuroni GABAergici della VTA. Tale attivazione, in combinazione con l'inibizione della trasmissione glutamatergica indotta dall'alcool sui neuroni GABA, porta a una generale diminuzione dell'attività GABAergica nella VTA, con un conseguente aumento del firing dei neuroni DAergici e del rilascio di DA nel NAc. Inoltre l'alcool stimola direttamente i neuroni DAergici. B) Nei periodi di Astinenza (withdrawal) dall'alcool, in seguito ad un'esposizione cronica che induce dipendenza, gli input glutamatergici ai neuroni GABAergici aumentano, e ciò comporta un decremento del rilascio di DA. Inoltre, l'attività dei neuroni DAergici della VTA risulta ridotta. C) Durante le fasi di ricaduta, I neuroni DAergici sono molto più sensibili agli effetti diretti dell'alcool; tuttavia, l'alcool inibisce nuovamente il rilascio di endorfine da parte dei neuroni glutamatergici, provocando il rebound rispetto al decremento del rilascio di DA verificatosi durante la fase di withdrawal nel soggetto con dipendenza conclamata. (modificato da Clapp et al, 2013)

1.6 Agonisti Dopaminergici e Auto-somministrazione Orale di Etanolo nel Ratto

Il disturbo dell'*addiction*, generato dalla propensione compulsiva all'assunzione delle sostanze d'abuso ed al meccanismo bio-psicologico di craving che deriva (Di Chiara et al, 2004), è riconducibile alla marcata alterazione della trasmissione dopaminergica che, di fatto, è la diretta e specifica conseguenza dell'azione delle sostanze sul sistema dopaminergico mesolimbico e mesocorticale (Di Chiara, 2002; Di Chiara e Imperato, 1988; Koob e Le Moal, 2008).

I modelli animali di auto-somministrazione di sostanze d'abuso hanno assunto un importante ruolo nell'investigazione dei meccanismi coinvolti negli effetti di rinforzo indotti da tale sostanze (Koob, 2014; Altman et al,1996; Cacace et al, 2012; Briscoe e Gauvin, 1999; Spanagel e Holter, 1999; 2000). Poiché i meccanismi che sottolineano gli effetti farmacologici dell'etanolo sono complessi (Tabakoff e Hoffman, 2013), potrebbe sembrare molto difficile definire una terapia sostitutiva nel trattamento delle sostanze d'abuso. Tuttavia, considerando l'importanza della trasmissione DAergica nel mediare gli effetti riguardanti le sostanze d'abuso (Koob e Le Moal, 1997; Koob e Nestler 1997; Weiss et al, 1996; Melis et al, 2005), gli agonisti della DA potrebbero avere un'efficacia nel trattamento dell'alcolismo.

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che il sistema dopaminergico mesolimbico si trovi in uno stato "ipofunzionale" nel cervello dei soggetti dipendenti (Melis et al, 2005). L'ipotesi ipodopaminergica sostiene infatti che vi sia una riduzione della funzione della DA in soggetti tossicodipendenti, che determina un diminuito interesse per gli stimoli non correlati alla droga e una maggiore sensibilità alla droga scelta (Melis et al, 2005): a partire da tale ipotesi è quindi logico proporre il ripristino della funzione DAergica come razionale terapeuticamente vantaggioso (Diana, 2011).

La strategia farmacologica è supportata da diversi studi sulla somministrazione di agonisti dopaminergici che agiscono sui recettori *D1-like* e *D2-like*: SKF 38393, SKF 82958, Quinpirolo, 7-OH-DPAT in modelli di auto-somministrazione di etanolo: tali studi hanno evidenziato come sia possibile ottenere una riduzione

dell'assunzione di etanolo negli animali trattati (Linseman,1990; Dyr et al,1993; George et al,1995; Cohen et al,1998).

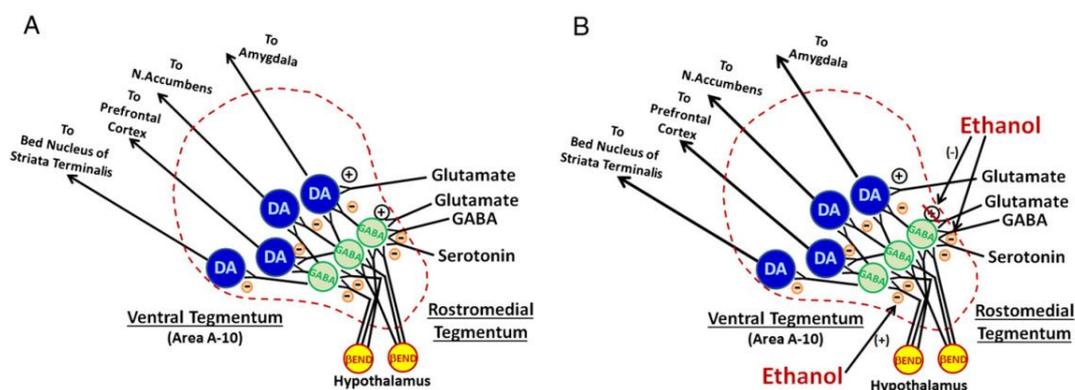


Fig.5 Neuron dopaminergici come segnalatori di reward. (A) Le proiezioni dopaminergiche dall'area tegmentale ventrale (VTA) al NAc, ovvero il percorso mesolimbico, rappresentano una componente centrale della via della "ricompensa". I neuroni dopaminergici inviano proiezioni dalla VTA al NAc, amigdala, corteccia prefrontale e altre aree limbiche. I Peptidi oppiacei (β -endorfine, β -END) rilasciati dalla inibizione dell' attivit  degli interneuroni GABAergici dal VTA a livello di ipotalamo, nei corpi cellulari dei che risiedono nella tegmento rostromediale, aumentando l'attivit  dopaminergica dei neuroni del VTA. (B) L'Etanolo aumenta il rilascio di peptidi oppiacei ipotalamici, inibendo gli interneuroni GABAergici, e portando al rilascio di dopamina attraverso questo meccanismo di disinibizione. Allo stesso tempo, l'etanolo pu  inibire la funzione del recettore NMDA, diminuendo l'input eccitatorio degli interneuroni GABAergici della VTA.(Tabakoff e Hoffman, 2013)

1.7 DA-Phen: Nuovo Coniugato Aminoacidico Della DA

Come precedentemente descritto,   attualmente accettato dalla comunit  scientifica che una riduzione della trasmissione dopaminergica tonica nelle aree striatali a livello dei recettori D2   implicata nei disturbi motivazionali (anedonia) in soggetti dipendenti in astinenza, oltrech  nella vulnerabilit  individuale all'*addiction* (Melis et al, 2005) e quindi predisponente alla ricaduta. La riduzione della trasmissione dopaminergica   indicativa di un aumento dell'impatto gratificante delle sostanze d'abuso nei soggetti non tossicodipendenti, condizione che li rende maggiormente vulnerabili all'*addiction* (Koob e Volkow, 2010), cos  come, in individui in astinenza, questa condizione li rende maggiormente esposti alla ricaduta (Volkow e Li, 2005). Le modificazioni DA-correlate a livello dei

circuiti dello striato ventrale e/o della corteccia prefrontale produrrebbero un disturbo del controllo degli impulsi, esponendo il soggetto a un maggior rischio di sviluppare *addiction* (Volkow e Li, 2005).

Vista la necessità di trovare agenti farmacologici che permettano la risoluzione del quadro clinico e psichico tipico del disturbo dell'*addiction*, che siano in grado di oltrepassare la BBB (barriera emato encefalica) e di localizzarsi a livello centrale (Ballabh et al, 2004; Scherrmann, 2002) modulando di fatto l'attività della neurotrasmissione dopaminergica, è cresciuto sempre più l'interesse verso *prodrugs* o *co-drugs*, capaci di modificare la biodisponibilità della DA (Rautio et al, 2008; Di Stefano et al, 2011).

La somministrazione diretta di DA infatti non permette l'uptake cerebrale del neurotrasmettitore in quanto incapace di oltrepassare la Barriera Ematoencefalica (BBB), a causa dell'assenza di uno specifico carrier di trasporto.

Il DA-Phen, o 2-amino-N-[2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl]-3-phenyl-propionamide – sintetizzato presso il laboratorio di Tecnologia Farmaceutica del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli studi di Palermo – Giannola et al, 2008) possiede invece proprietà chimico-fisiche adeguate all'attraversamento della BBB (porzione strutturale aromatica di carattere lipofilo, coefficiente di Distribuzione apparente $\text{Log } D_{\text{pH } 7.4} = 0,76$; Peso Molecolare P.M. = 300.35 Da), e ciò è stato comprovato da studi in vitro mediante l'ausilio di sistemi PAMPA e Caco2, con i quali è stata valutata la possibile implicazione di meccanismi di trasporto *carrier* mediato e meccanismi di efflusso.

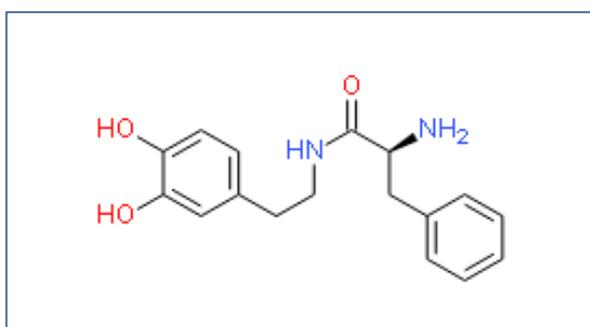


Fig.6 Struttura del 2-amino-N-[2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl]-3-phenyl-propionamide (DA-Phen), (Giannola et al, 2008)

Comparando i valori di permeabilità, ottenuti utilizzando rispettivamente il modello PAMPA-BBB e la linea cellulare Caco-2, è stato possibile dedurre che l'attraversamento della BBB da parte del DA-Phen avvenga mediante una combinazione di due diversi meccanismi: diffusione passiva e trasporto carrier-mediato. Inoltre, i risultati degli esperimenti di efflusso hanno dimostrato che la molecola non è classificabile come substrato per i sistemi di efflusso mediati dalla P-glicoproteina.

Studi di tossicità condotti sulla linea cellulare Caco-2 hanno evidenziato, infine, che il DA-Phen non comporti alterazioni della vitalità cellulare alle concentrazioni testate (Giannola et al, 2008; Scaturro et al, 2012).

Il DA-Phen quindi, rispetto al farmaco padre (DA), potrebbe assicurare *in vivo* un migliore organotropismo verso il SNC rispetto alla DA, liberare la DA attraverso reazioni chimiche e/o enzimatiche (Rautio et al, 2008), e risultare potenzialmente efficace nel trattamento dell'addiction e di patologie che richiedano una rimodulazione della neurotrasmissione dopaminergica, quale la dipendenza da alcool. Uno degli aspetti cruciali dell'esposizione cronica all'alcool infatti, imputabile ad un meccanismo neurotrasmettitoriale adattativo, è l'ipofunzione della trasmissione mesolimbica dopaminergica (Melis et al, 2005). Alla base della volontaria assunzione di alcool, protratta nel tempo, c'è il tentativo di compensare la sua diminuita azione di "efficacia", dovuta l'instaurarsi della tolleranza, sul rilascio di DA. Significative sono le alterazioni della trasmissione DAergica anche a livello mesostriatale, riscontrate in ratti che assumono cronicamente EtOH: fra queste, un decremento della sintesi, unitamente ad un incremento della clearance di DA, al livello delle sinapsi. Inoltre il deficit di DA che si osserva in soggetti con storia di alcool dipendenza (Diana et al, 2003) perdura molto al di là della sindrome astinenziale acuta: la persistenza di tale alterazione renderebbe ragione della vulnerabilità alle recidive. E' chiaro dunque che gli effetti di rinforzo positivo dovuti all'assunzione di EtOH abbiano come fondamento una profonda alterazione centrale del sistema DAergico.

Il ruolo dei farmaci dopaminomimetici, fra i quali si potrebbe ascrivere il meccanismo d'azione di DA-Phen nell'attivazione comportamentale, risulterebbe quindi di cruciale importanza non solo nelle risposte finalizzate all'ottenimento di una ricompensa ma anche in altri comportamenti finalizzati (Canon e Palmiter, 2003; Salamone et al, 2007), nonché nella dissuefazione e nella riduzione del *drug-seeking behaviour* rispetto all'assunzione di sostanze d'abuso, quali l'alcool.

2. Scopo della Tesi

La necessità di trovare agenti farmacologici in grado di oltrepassare la BBB e di garantire un *uptake* a livello centrale (Ballabh et al, 2004; Scherrmann, 2002), ha fatto sì che nell'ultimo decennio crescesse sempre più l'interesse verso *prodrugs* o *co-drugs*, capaci di migliorare la biodisponibilità della DA (Carafa et al, 2009).

L'elevata idrofilia della DA rende quest'ultima incapace di attraversare la mucosa gastrointestinale, nonché la BBB, per assenza di uno specifico carrier di trasporto nella porzione luminale della membrana delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali (CEC); ed infine, la metabolizzazione che la DA subisce ad opera delle monoamino ossidasi (MAO) periferiche, rendono impossibile il suo diretto utilizzo ai fini terapeutici.

Al fine di superare i limiti sopra descritti, è stato recentemente sintetizzato un derivato del neurotrasmettitore DA presso i laboratori di ricerca della sezione di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo (sotto la direzione dei Prof. L.I. Giannola, Dr. V. De Caro), con caratteristiche chimico-fisiche idonee al trasporto del neurotrasmettitore all'interno del SNC, e potenzialmente efficace nel trattamento di malattie neurodegenerative che richiedano un implemento e/o una modulazione dei livelli centrali di DA.

L'obiettivo del lavoro di ricerca ivi esposto è stato quindi quello di valutare l'attività del derivato dopaminico oggetto di studio, 2-amino-N-[2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl]-3-phenyl-propionamide (DA-Phen), e testarne l'eventuale capacità di modulare la trasmissione dopaminergica, mediante l'analisi degli effetti comportamentali in ratti maschi adulti del ceppo Wistar. Questa prima parte dell'analisi comportamentale del disegno sperimentale proposto comprende differenti tests comportamentali:

- OPEN FIELD (FD), usato per misurare l'attività locomotoria, l'ansia e alterazioni varie nel comportamento emozionale (Fernandez-Teruel et al, 1997, Lacroix et al,1998);
- ELEVATED PLUS MAZE (EPM), test finalizzato al monitoraggio della componente ansiosa simultaneamente alla spontanea attività motoria del ratto (Walf e Frye, 2007; Cruz et al 1994; Pellow et al, 1985);
- FORCED SWIMMING TEST (FST) utilizzato per valutare agenti antidepressivi (Detke et al, 1996) e sostanze psicostimolanti (Porsolt et al, 1977, 1978).
- MORRIS WATER MAZE (MWM), utilizzato per la valutazione dell'apprendimento spaziale e la memoria. Il test permette una prima analisi degli effetti del composto sulle facoltà mnemoniche e cognitive influenzate dai circuiti dopaminergici, in seguito a somministrazioni ripetute del coniugato oggetto di studio.

Il Morris Water Maze, articolato in tre sessioni, consente in particolare di valutare il *place learning* (Vorhees e Williams, 2006) durante la fase di *training*. La sessione di *reversal* può consentire di evidenziare la *behavioral flexibility*, e quindi la capacità di riadattamento dell'animale rispetto all'apprendimento iniziale; infine il *probe trial* permette di stimare la *cognitive flexibility* e la *reference memory* degli animali trattati rispetto ai gruppi controllo.

Il secondo obiettivo del lavoro di ricerca ivi esposto è quello di valutare l'attività del DA-Phen sul comportamento di bevuta operante per EtOH nel ratto.

Il disegno sperimentale prevede la somministrazione sistemica del nuovo coniugato in esame (DA-Phen) alla dose di 0.03mmol/Kg, concentrazione presumibilmente in grado di influenzare rispettivamente il terminale pre- e post-sinaptico, e pertanto in grado di ridurre il livello di dipendenza dall'etanolo. A tal fine, il disegno sperimentale, che mira alla valutazione sia del comportamento operante di bevuta che degli effetti sulla reattività comportamentale durante le fasi di *withdrawal*, propone l'utilizzo di tre differenti test comportamentali:

- **COMPORTAMENTO DI AUTO-SOMMINISTRAZIONE OPERANTE:** che induce, mediante un paradigma di auto-somministrazione, la dipendenza dalla sostanza di abuso e quindi consente di predirne gli effetti motivazionali, e simulare l'alta incidenza di ricadute in seguito a fasi di astinenza (Vengeliene et al, 2007) dovute al consumo di sostanze d'abuso;
 - **OPEN FIELD (OF)** impiegato, in questa fase della sperimentazione, per valutare le alterazioni comportamentali durante le fasi astinenziali acute (Holter et al, 1998; 2000) ;
 - **ELEVATED PLUS MAZE (EPM)** utilizzato per la valutazione degli effetti astinenziali in cronico. (Holter et al, 1998; 2000)

La ricerca si propone inoltre lo sviluppo di uno studio di Docking Molecolare, per verificare, mediante un modello *in silico*, una possibile interazione fra la molecola DA-Phen ed i siti recettoriali di tipo D1-*type* e D2-*type* (in collaborazione con la Prof. AM. Almerico e il Dr. M. Tutone del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo), al fine di confermare le ipotesi di interazione recettoriale con i recettori dopaminergici, sulla base delle evidenze comportamentali previamente osservate.

Infine, allo scopo di valutare la correlazione fra la risposta comportamentale e l'uptake cerebrale del DA-Phen verranno espianati, dai ratti soggetti alla sperimentazione, gli organi di maggior interesse per effettuare una determinazione quali-quantitativa del composto in esame. La ricerca comprenderà la scelta tra le più opportune tecniche per l'espianto ed il trattamento degli organi, la scelta dei metodi separazione ed identificazione del DA-Phen dalla matrice biologica e la messa a punto dei metodi di analisi, in termini di sensibilità e accuratezza. Tale studio sarà svolto in collaborazione con la Dr. V. De Caro e il Prof. L.I. Giannola della Sezione di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche del Dipartimento STEBICEF.

Potrà infine essere effettuata una predizione in silico dei siti del DA-Phen che in vivo potrebbero subire lisi, al fine di individuare i potenziali metaboliti del composto in esame.

3. Materiali e Metodi

3.1 Materiali e metodi per la Sintesi e la caratterizzazione del 2-amino-N-[2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl]-3-phenyl-propionamide (DA-Phen)

I prodotti 3,4-dimetossifenilettilamina, acido trifluoroacetico (TFA), sono stati acquistati presso la ditta Sigma-Aldrich-Chemie; i prodotti N-Boc-L-fenilalanina, dicicloesilcarbodiimmide (DCC) la 4-dimetil-amino-piridina (DMAP) e tribromuro di boro (BBr₃) presso la ditta Acros Organics (USA).

La purezza delle sostanze utilizzate è stata previamente controllata mediante cromatografia su lastra di gel di silice da 0.25 mm (Merck), con indicatore di fluorescenza F254, ed utilizzando il sistema eluente etile acetato/diclorometano/cicloesano nel rapporto 5.5/ 4/ 0.5.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer mod. 1720, operante in trasformata di Fourier. Le frequenze sono state misurate come media di 20 scansioni.

Le analisi HPLC sono state effettuate con un apparecchio Shimadzu LC-10AD VP, dotato di un sistema a due pompe LC-10AD VP, un detector UV a diodi SPD-M20A, un loop da 20 µL e un sistema di integrazione computerizzato (EZ start 7.3 software). La separazione cromatografia è stata realizzata su una colonna Phenomenex Gemini – NX C18 110A (150x4.6 mm, 5 µm), utilizzando come fase mobile una miscela di acido trifluoroacetico (0,01%) e metanolo (99.5:0.05 – 0.01-5.00min; 98.5:1.5 – 9.00-11.00min; 0.00:100 – 18.00-25.00min; 99.5:0.05 – 38.00-40.00min). Il flusso della fase mobile è stato settato ad 1 mL/min. In queste condizioni il tempo di ritenzione del 2-amino-N-[2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl]-3-phenyl-propionamide risulta pari a 18.8 minuti. Per integrare l'area dei picchi è stata utilizzata l'opportuna curva di calibrazione; ottenuta in un range di concentrazione compreso tra 0.001 e 0.01 µg/mL di DA-Phen solubilizzato in soluzione acquosa acida di TFA allo 0.01% ($y=134,67+87815x$ per $\lambda_{max} = 283.0$ nm; $R=0.999$).

Le analisi ESI-MS sono state effettuate, per infusione diretta (10 µL/min), con uno spettrometro di massa Autospec Tof Ultima, MicroMass Magnetic Sector

Orthogonal Tof (spray voltage 4000 V; cone voltage 20 V; temperatura del capillare 40°C; gas di collisione: argon $1 \cdot 10^{-6}$ atm).

Gli spettri ^{13}C ed ^1H N.M.R. sono stati registrati con uno spettrometro Bruker AC 250, operante in trasformata di Fourier a 250.13 MHz per gli spettri del protone e a 62,89 MHz per gli spettri del carbonio, in soluzione di CD_3OD o in soluzione di CDCl_3 . I valori di ^1H ed ^{13}C chemical shift sono stati misurati relativamente ai segnali del CD_3OD , centrati rispettivamente a 3.31 e 49.00 ppm a campi più bassi del TMS, o relativamente ai segnali del CDCl_3 , centrati rispettivamente a 7.25 e 77.00 ppm a campi più bassi del TMS.

I punti di fusione sono stati determinati, in capillare, con un'apparecchiatura Büchi 530 e non sono stati corretti.

L'elaborazione dei dati sperimentali è stata eseguita utilizzando i software Kaleidagraph e Curve Expert 1.34 for Windows.

Tutti i solventi adoperati sono di purezza analitica.

Il coniugato è stato sintetizzato seguendo la procedura descritta da Giannola e collaboratori (Giannola et al, 2008).

Il solido, ottenuto con una resa del 90%, mostra le seguenti caratteristiche:

- UV (metanolo): $\lambda_{\text{max}} = 283.0$ nm;
- IR (acetone): 3521 (-OH fenolici), 3230-3100 (-NH amidico + NH_2), 1670 (C=O amidico), 1510 (-NH amidico) cm^{-1} ;
- MS: m/z 300.9 (M^+), 137, 120, 103, 91;
- I dati relativi agli spettri ^{13}C ed ^1H -NMR sono conformi alla struttura molecolare.

I dati ottenuti rispettano la caratterizzazione riportata in letteratura (Giannola et al, 2008).

3.2 Valutazione della reattività comportamentale indotta dalla somministrazione di DA-Phen

3.2.1 Animali

Per la ricerca sono stati utilizzati ratti maschi adulti del ceppo Wistar, aventi un peso corporeo compreso tra 200-250 g (Harlan, Udine, Italia). Gli animali sono stati stabulati in gabbie metalliche, ciascuna contenente tre ratti, e mantenuti in condizioni ambientali controllate (temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; umidità relativa del $55 \pm 10\%$) e con un ciclo circadiano di 12 ore luce /buio (8:00 – 20:00). Ogni animale è stato sottoposto ad un regime dietetico controllato, ed ha ricevuto giornalmente 25g di cibo in pellet ed, ove non diversamente specificato, acqua *ad libitum*. I consumi di cibo ed acqua sono stati monitorati ogni 24 ore. Tutte le procedure sono state portate avanti in accordo con la politica della sperimentazione animale prevista da Palermo University Animal Care and Use Committee, basata sul recepimento della Direttiva dell'Unione Europea 2010/63/EU per la sperimentazione animale.

3.2.2. Open Field

L'Open Field (OF) è un test che viene normalmente effettuato per valutare l'attività spontanea dei roditori. Ciascun ratto è stato sottoposto all'OF, ubicato all'interno di una camera insonorizzata, priva di riferimenti visivi e in condizioni di media luminosità (100 lux).

L' apparato è costituito da un'arena in plexiglass (40cm x40cm x20cm), divisa in 2 aree: una più esterna (che costeggia le pareti) e quella più interna, che include il centro dell'arena. Ogni trial ha avuto una durata pari a 300 secondi.

All'inizio di ogni trial, il ratto è stato posizionato nella parte centrale dell'arena, e il suo comportamento è stato monitorato mediante un sistema computerizzato costituito da una telecamera connessa ad opportuno software di rilevazione e registrazione dati (ANY MAZE Video Tracking System, Ugo Basile).

Tra un trial ed il successivo la piattaforma è stata pulita con etanolo al 90%, onde evitare che ciascun ratto percepisse che altri animali siano stati precedentemente sottoposti al medesimo maze, alterandone così la risposta comportamentale.

Durante l'esposizione di ciascun ratto al test, sono stati misurati i seguenti parametri:

- Distanza totale percorsa (TDT, [m]);
- Distanza percorsa della zona esterna (perimetrale) dell'arena (EDT, [m]);
- Distanza percorsa nella zona interna (centrale) dell'arena (IDT, [m]);
- Tempo speso nella zona esterna [s];
- Tempo speso nella zona centrale [s];

3.2.3 Elevated Plus Maze

Al fine di valutare l'*anxiety-like effect* nell'animale, ciascun ratto è stato sottoposto all'Elevated Plus Maze (EPM), ubicato all'interno di una camera insonorizzata, priva di riferimenti visivi e in condizioni di media luminosità (100 lux).

Lo strumento è costituito da una piattaforma centrale, di forma quadrata (10cm x lato), dalla quale si dipartono 4 bracci disposti a croce (ciascuno dei bracci misura 50cm x 10 cm). Una delle coppie di bracci diametralmente opposti costituisce i bracci aperti; l'altra coppia, che presenta pareti alte 40cm, costituisce i bracci chiusi. Tutte le superfici dell'EPM sono di colore nero. L'apparato è posto ad un'altezza di 70 cm dal pavimento.

All'inizio di ogni trial, ogni ratto è stato posizionato nella piattaforma centrale col muso rivolto verso uno dei 2 bracci aperti e il suo comportamento è stato monitorato mediante un sistema computerizzato costituito da una telecamera connessa ad opportuno software di rilevazione e registrazione dati (ANY MAZE Video Tracking System, Ugo Basile).

Durante l'esposizione di ciascun ratto al test, sono stati misurati i seguenti parametri:

- n° di ingressi nel braccio aperto;
- n° di ingressi nel braccio chiuso;
- tempo speso lungo il braccio aperto (misurato in secondi, [s]);
- tempo speso lungo il braccio chiuso (misurato in secondi, [s]);
- n° di head dippings, ossia movimenti esploratori che l'animale compie sporgendo la testa verso l'area esterna al braccio aperto (Walf e Frye, 2007).

Un ingresso è considerato tale quando l'animale transita con tutte e quattro le zampe all'interno di un singolo braccio. I risultati sono stati espressi come percentuale del numero di ingressi nei bracci aperti del maze rispetto al numero di ingressi totali (1), e come percentuale di tempo speso lungo i bracci aperti rispetto al tempo totale del trial (2), in base alle formule che seguono:

(1) % n° ingressi nei bracci aperti = (n° ingressi nei bracci aperti / n° ingressi totali)*100

(2) % tempo speso nei bracci aperti = (tempo speso nei bracci aperti/ durata totale del trial)*100

Ogni trial ha avuto una durata pari a 300 secondi. Tra un trial ed il successivo la piattaforma è stata pulita con etanolo al 90%, onde evitare che ciascun ratto percepisca che al medesimo maze sono stati sottoposti precedentemente altri animali, alterandone così la risposta comportamentale.

3.2.4 Forced Swimming Test

L'apparato è costituito da un cilindro di plexiglass (25cm x 25cm x 50cm), riempito con acqua avente una $T = 21 \pm 1$ °C. Il volume di acqua impiegato è tale da non permettere al ratto di toccare il fondo del recipiente con le zampe posteriori o con la coda. L'acqua viene cambiata tra un trial ed il successivo, e il recipiente lavato con un liquido detergente non profumato. Una volta terminata la sessione, il ratto viene rimosso dal recipiente in cui è stato eseguito il FST, asciugato con della carta e tenuto per un'ora in una stanza riscaldata prima di essere nuovamente stabulato.

Seguendo la procedura classica, modificata da Detke (Porsolt et al, 1977,1978; Detke, 2005) vengono eseguite due sessioni, a distanza di 24 ore l'una dall'altra. La prima, definita "**Pretest**", ha una durata di 15 minuti e la seconda, definita "**Test**", ha una durata pari a 5 minuti.

La fase di **Pretest** è suddivisa in due trials: durante il primo trial, della durata di 5 minuti, vengono annotati e registrati i parametri comportamentali salienti del ratto, mentre durante il secondo trial, della durata di 10 minuti, il ratto viene lasciato all'interno del recipiente in modo che si adatti al "despair behaviour". I due trials vengono eseguiti in successione immediata, senza che il ratto venga prelevato dal recipiente.

La fase di **Test**, eseguita 24 ore dopo il Pretest, è costituita da un unico trial, in cui vengono annotati e registrati i parametri per il lasso di tempo previsto.

Gli operatori annotano e cronometrano la durata e/o la frequenza dei seguenti parametri (Detke et al, 1996):

- *Immobility*: tempo, misurato in secondi [s], in cui il ratto assume un comportamento passivo, mantenendo la testa al di sopra della superficie libera dell'acqua e compiendo solo i movimenti necessari per galleggiare;
- *Swimming*: tempo, misurato in secondi [s], che il ratto impiega compiendo un nuoto attivo mediante vigorosi movimenti delle zampe anteriori e posteriori;
- *Climbing*: movimento attivo e repentino delle zampe anteriori, con cui il ratto assume una posizione verticale e cerca di salire lungo le pareti del cilindro. Se ne misura la frequenza (n° di volte in cui viene osservato il parametro);
- *Diving*: movimento con cui il ratto si immerge completamente al di sotto della superficie libera dell'acqua. Se ne misura la frequenza (n° di volte in cui viene osservato il parametro);
- *Head shakes*: movimento con cui il ratto esegue un repentino movimento orizzontale della testa per scrollarsi l'acqua. Se ne misura la frequenza (n° di volte in cui viene osservato il parametro).

3.2.5 Morris Water Maze

Il Morris Water Maze consiste di una vasca circolare (160 cm di diametro e 70 cm di altezza), riempita fino ad un'altezza di 50 cm con acqua alla temperatura di $21 \pm 1^\circ\text{C}$, tale da non provocare affaticamento o ipotermia (Lindner et al, 1991).

Le pareti della vasca sono in PVC, di colore blu scuro, non riflettenti. L'intero maze poggia direttamente sul pavimento ed è collegato a una valvola di scarico, per facilitarne la pulizia. La vasca è ubicata in una camera insonorizzata, mediamente illuminata (100 lx), in cui sono presenti diversi riferimenti visivi (*cues*), la cui posizione è rimasta inalterata per l'intera durata della sperimentazione (Maurer et al, 2000; Cannizzaro et al, 2005).

La vasca è stata arbitrariamente suddivisa in quattro quadranti nominati come: quadrante Nord-Est (NE), Sud-Est (SE), Nord-Ovest (NW) e Sud-Ovest (SW), utili per identificare il punto di partenza dell'animale e la localizzazione della piattaforma.

La piattaforma è stata costruita utilizzando del Plexiglas trasparente (10 cm x 10 cm) ed è stata posta al centro di uno dei quattro quadranti e sommersa a 1,5 cm sotto la superficie dell'acqua in modo da essere invisibile all'animale. Le dimensioni della piattaforma rispetto alle dimensioni della vasca riflettono la difficoltà ed il *despair* che il ratto può avere nel raggiungere la piattaforma stessa durante la ricerca di tale zona: questa difficoltà è infatti funzione del rapporto tra l'area di ricerca e le dimensioni della piattaforma (Vorhees e Williams, 2006).

La posizione della piattaforma è stata la medesima durante la sessione di *Training* (quadrante NE), mentre è stata invertita durante la sessione di *Reversal* (SW). Durante la sessione *Probe* la piattaforma è stata rimossa dalla vasca. Tutti i movimenti di ciascun animale all'interno del *maze* sono stati registrati utilizzando un software di gestione dei dati (ANY MAZE Video Tracking System, Ugo Basile).

La procedura utilizzata prevede una modifica del protocollo sperimentale utilizzato da Santin (Santin et al, 2000). L'esperimento consta di tre sessioni: ***Training period*** (*Place Learning*, acquisizione spaziale), ***Reversal Period*** (*New Place Learning*, nuova acquisizione spaziale), ***Probe*** (*Cognitive Flexibility*). La

posizione della piattaforma è stata la medesima durante la sessione di **Training** (quadrante NE), mentre è stata spostata di 180° durante la sessione di **Reversal** (quadrante SW); durante la fase **Probe** la piattaforma è stata rimossa.

3.2.5.1 Training Period - Place Learning

Questa fase ha previsto l'esecuzione di 4 trials giornalieri (per tre giorni consecutivi), della durata di 90 secondi ciascuno. I ratti sono stati adagiati sulla superficie libera dell'acqua, all'interno della vasca, con il muso rivolto verso la parete del recipiente. Per ciascun trial, l'animale è stato posto nella vasca da un differente *starting point* (ogni *starting point* corrisponde ad un diverso quadrante). Durante la sessione di *Place Learning* la piattaforma è stata posizionata al centro del quadrante NE.

Se un ratto sottoposto al *maze* raggiunge la piattaforma prima dello scadere dei 90 secondi previsti, la registrazione del trial mediante tracking system viene interrotta dall'operatore, e il ratto viene lasciato riposare sulla piattaforma per 10 secondi (*reinforce time*).

Se il ratto non riesce a localizzare la piattaforma durante i 90 secondi, viene accompagnato delicatamente da un operatore sulla piattaforma e lasciato riposare per 10 secondi. Al termine di ogni trial, l'animale è stato rimosso dalla vasca e posto ad asciugare per 30 secondi prima di iniziare il trial successivo.

Durante l'esposizione di ciascun ratto al test, vengono misurati i seguenti parametri:

- Distanza totale percorsa (indice dell'efficacia nel percorso effettuato dall'animale. TDT, [m]);
- Distanza percorsa in ciascun quadrante (NE, SE, SW, NW, [m]);
- Tempo di Latenza (tempo impiegato per raggiungere la piattaforma indice della capacità di apprendimento dell'animale, *Escape Latency*, [s]);
- Tempo speso in ciascun quadrante (NE, SE, SW, NW, [s]).

3.2.5.2 Reversal Period - New Place Learning

I criteri d'esecuzione di questa sessione sono analoghi a quelli descritti per la sessione di *Training*, fatta eccezione per la posizione della piattaforma, che in

questa fase viene ubicata nel quadrante SW (spostamento pari a 180° rispetto alla posizione originaria), e la durata della sessione, pari ad un solo giorno.

Durante l'esposizione di ciascun ratto al test, vengono misurati i seguenti parametri:

- Distanza totale percorsa (indice dell'efficacia nel percorso effettuato dall'animale TDT, [m]);
- Distanza percorsa in ciascun quadrante (NE, SE, SW, NW, [m]);
- Tempo di Latenza (tempo impiegato per raggiungere la piattaforma indice della capacità di apprendimento dell'animale, *Escape Latency*, [s]);
- Tempo speso in ciascun quadrante (NE, SE, SW, NW, [s]).

3.2.5.3 *Probe - Cognitive Flexibility*

Durante la sessione di *Probe*, la cui durata è stata pari ad un solo giorno, la piattaforma è stata rimossa dalla vasca. Analogamente a quanto descritto in precedenza, questa fase ha previsto l'esecuzione di 4 trials, della durata di 90 secondi ciascuno. Per ciascun trial, l'animale è stato posto nella vasca da un differente *starting point* (ogni *starting point* corrisponde ad un diverso quadrante).

Al termine di ogni trial, l'animale è stato rimosso dalla vasca e posto ad asciugare per 30 secondi prima di iniziare il trial successivo. Durante l'esposizione di ciascun ratto al test, vengono misurati i seguenti parametri:

- Distanza totale percorsa (indice dell'efficacia nel percorso effettuato dall'animale. TDT, [m]);
- Distanza percorsa in ciascun quadrante (NE, SE, SW, NW, [m]);
- Tempo speso in ciascun quadrante (NE, SE, SW, NW, [s]).

Al fine di valutare la flessibilità cognitiva, dai suddetti parametri sono stati calcolati la percentuale di tempo speso (1) e la percentuale della distanza percorsa nel quadrante bersaglio (*Target Quadrant*, QT) (2) della sessione *Training* e della sessione *Reversal* (Brown et al, 2000):

$$(1) \quad \% \text{ tempo speso QT} = (\text{tempo speso nel QT} / \text{tempo totale}) * 100$$

$$(2) \quad \% \text{ distanza percorsa nel QT} = (\text{distanza percorsa nel QT} / \text{TDT}) * 100$$

3.2.6 Condizionamento operante – Skinner Box

L'apparato per il condizionamento operante è costituito da una camera (30x28x37 cm) insonorizzata dai rumori esterni, munita di una ventola per il riciclo dell'aria, illuminata in modo uniforme e tenue (100Lux), con un sistema a solenoide per l'erogazione del liquido in un apposito spazio, e una leva metallica di risposta. La singola pressione sulla leva consente l'erogazione di 0.08mL di liquido e il numero di volte in cui la leva viene pressata è registrato da un contatore connesso all'apparato.

3.3 Design sperimentale per la valutazione della reattività comportamentale indotta dalla somministrazione di DA-Phen

3.3.1 Open Field e Elevated Plus Maze

Il disegno sperimentale prevede quattro sessioni di OF (prima, seconda, terza e quarta sessione di OF), e quattro sessioni di EPM (prima, seconda, terza e quarta sessione di EPM). Ogni sessione viene eseguita a distanza di dieci giorni dalla successiva.

- prima sessione: eseguita sui ratti *naïve*, al fine di valutare il comportamento *basale* dei ratti da sottoporre al trattamento;

- seconda sessione: ai tre gruppi, definiti rispettivamente A, B, C, è stata somministrata una dose di DA-Phen pari a 0.1 mmol/Kg. I gruppi sperimentali vengono esposti al test comportamentale dopo i seguenti time course points:

Gruppo A: 30 minuti; Gruppo B: 120 minuti; Gruppo C: 360 minuti.

- terza sessione: ai tre gruppi, definiti rispettivamente A, B, C, è stata somministrata una dose di DA-Phen pari a 0.03 mmol/Kg. I gruppi sperimentali vengono esposti al test comportamentale dopo i seguenti time course points:

Gruppo A: 30 minuti; Gruppo B: 120 minuti; Gruppo C: 360 minuti.

- quarta sessione: ai tre gruppi, è stata somministrata una dose di DA-Phen pari a 0.01 mmol/Kg. I gruppi sperimentali A, B, C vengono esposti al test comportamentale dopo i seguenti time course points:

Gruppo A: 30 minuti; Gruppo B: 120 minuti; Gruppo C: 360 minuti.

Il gruppo controllo (CTR, N = 3) viene trattato con volume equivalente di soluzione salina sterile, in proporzione al peso di ciascun animale.

Ciascuna delle sessioni descritte viene eseguita a distanza di 10 giorni dalla precedente, onde evitare che i ratti acquisiscano familiarità con il labirinto scelto, ed in modo da consentire il washout farmacocinetico dell'attivo somministrato.

3.3.2 Forced Swimming test e Morris Water Maze

Al termine delle quattro sessioni di OF e delle quattro sessioni di EPM precedentemente descritte, vengono eseguiti un FST ed un MWM. In questa fase del protocollo sperimentale, i ratti dei gruppi A, B, C vengono riassociati in un unico gruppo, definito DA-Phen. I ratti del gruppo DA-Phen ricevono 0,03mmol/Kg di attivo, il gruppo controllo (CTR, N = 9) riceve un volume equivalente di soluzione salina sterile. Entrambe le sessioni di *Pretest e Test* del FST vengono eseguite due ore dopo la somministrazione dell'attivo o del veicolo, così come le sessioni di Training, Reversal e Probe del MWM.

3.3.3 Analisi statistica

3.3.3.1 Open Field ed Elevated Plus Maze

Per l'elaborazione statistica dei dati relativi agli effetti del DA-Phen, alle dosi di 0.1; 0.03; 0.01 mmol/Kg, ed ai tempi di valutazione comportamentale pari a 30 minuti, 2 ore e 6 ore dalla somministrazione dell'attivo, è stata utilizzata l'Analisi della Varianza a due vie. Tutti i valori sono espressi come Media \pm S.D.

Il test *post hoc* Tukey è stato usato per l'analisi della varianza (ANOVA) quando gli effetti dovuti al trattamento ed al tempo di osservazione comportamentale sono stati considerati separatamente. Il livello di significatività è stato posto per un valore di $p < 0.05$.

3.3.3.2 Forced Swimming Test

Tutti i valori sono espressi come Media \pm S.D. E' stata utilizzata un'analisi mediante Student t-test per la valutazione degli effetti del DA-Phen, seguita da

analisi Mann-Whitney, ove necessario. Il livello di significatività è stato posto uguale a $p < 0.05$.

3.3.3.3 Morris Water Maze

Tutti i valori sono espressi come Media \pm S.D. L'analisi della varianza a due vie è stata utilizzata per la valutazione degli effetti del DA-Phen.

Il test post hoc Tukey è stato usato per l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie quando gli effetti dovuti al trattamento ed al tempo di osservazione comportamentale sono stati considerati separatamente. Il livello di significatività è stato posto uguale a $p < 0.05$.

Per l'elaborazione dei dati è stato usato il software Sigmaplot V11.0 (Systat Software, CA, USA).

3.3.4 Trattamento

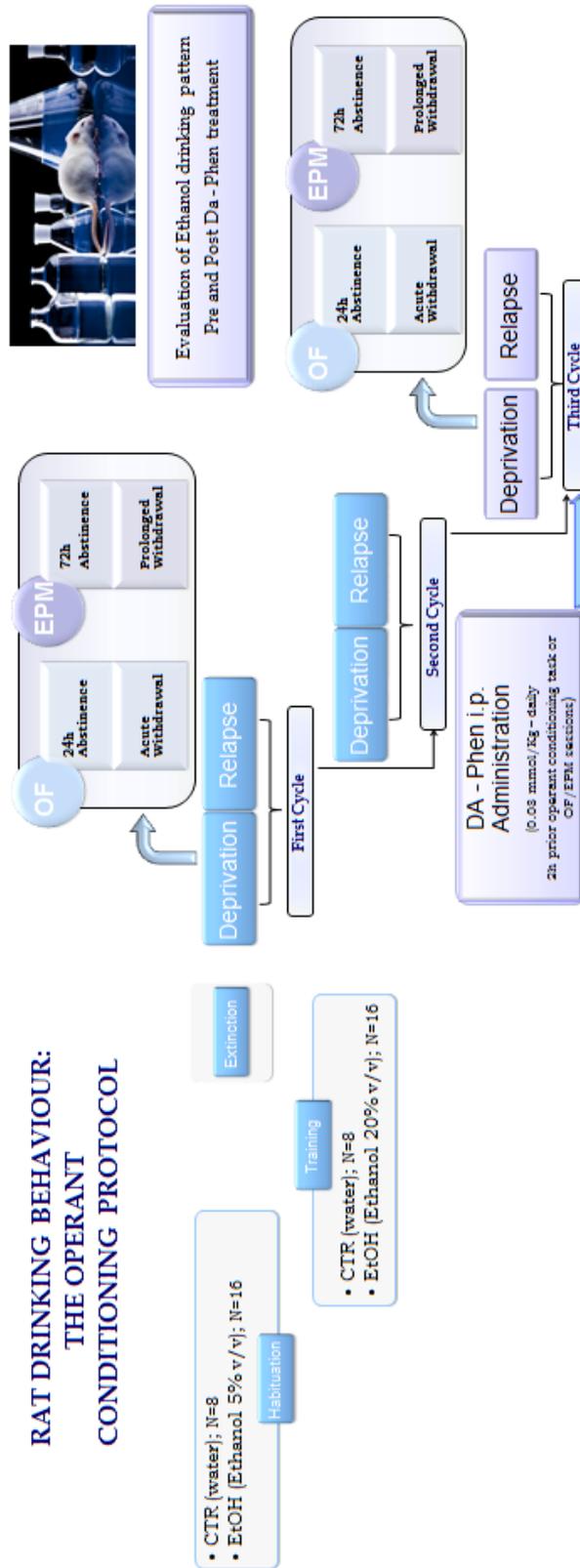
Il derivato dopaminico DA-Phen è stato solubilizzato in soluzione salina sterile e somministrato per via i.p. alle dosi di trattamento e per i gruppi specificati. Il gruppo controllo (CTR) ha ricevuto un volume equivalente di soluzione salina sterile (fisiologica 0.9%, veicolo).

3.4 Design sperimentale per la valutazione della modulazione del consumo di alcool dopo trattamento con Da-Phen

3.4.1 Protocollo Sperimentale – Condizionamento Operante

Gli animali (N=24) sono stati sottoposti ad un paradigma di condizionamento operante. Ogni sessione giornaliera ha avuto una durata pari a 15 minuti/ratto. Al termine di ciascuna sessione giornaliera, tranne che ove diversamente specificato, gli animali hanno avuto accesso all'acqua esclusivamente per 1 ora al giorno.. Nelle fasi di Housing e Deprivation gli animali hanno ricevuto acqua *ad libitum*. I livelli di intake di acqua sono stati giornalmente misurati.

3.4.1.1 Timeline del Disegno Sperimentale



Schema 1: Timeline del secondo Design Sperimentale

➤ Housing (7gg) ed Habituation (7gg)

Prima dell'inizio dell'esperimento è stata effettuata una settimana di stabulazione (Housing).

Gli animali sono stati divisi in 2 gruppi:

- Gruppo controllo, CTR: N= 8, trattato con acqua;
- Gruppo etanolo, EtOH: N=16, trattato con soluzione idroalcolica di etanolo.

Gli animali sono stati privati dell'acqua nelle 24 ore precedenti al primo giorno di Habituation. Durante la fase di Habituation gli animali sono stati introdotti per la prima volta nella camera di condizionamento operante. La sessione di Habituation è stata finalizzata all'apprendimento: i ratti infatti hanno appreso che l'azionamento della leva corrisponde alla fuoriuscita della soluzione, che costituisce la ricompensa (Reward). Il gruppo EtOH ha avuto a disposizione una soluzione idroalcolica di etanolo avente titolo pari al 5% v/v.

➤ Training (20gg)

Gli animali sono stati nuovamente introdotti nella camera operante, per un periodo di 20 giorni (Plescia et al, 2013), al fine di instaurare un comportamento di auto-somministrazione per la sostanza erogata. I ratti del gruppo EtOH hanno assunto una soluzione idroalcolica avente concentrazione pari al 20% v/v.

➤ Extinction (1g)

Gli animali, introdotti nella camera operante, non hanno ricevuto alcuna sostanza all'azionamento della leva. In tal modo è stato possibile evidenziare il comportamento *drug-seeking*. La sessione operante ha avuto la durata di 15 min, al termine dei quali ciascun animale è stato riposto nella rispettiva gabbia con libero accesso ad acqua e cibo.

➤ 1° Deprivation (5gg)

A seguito del *training*, gli animali sono stati privati di EtOH . In tale lasso di tempo sono stati lasciati indisturbati nelle loro gabbie con acqua e cibo *ad libitum*, in modo da indurre una condizione di astinenza forzata. Per la valutazione degli effetti astinenziali in acuto ed in cronico indotti dal consumo volontario di EtOH, i ratti dei gruppi sperimentali descritti sono stati sottoposti ad una sessione di Open Field a 24 ore, ed a una sessione di Elevated Plus Maze a 72 ore dall'induzione forzata di astinenza.

➤ 1° Relapse (5gg)

Gli animali sono nuovamente introdotti nella camera operante, per 5 giorni, per testare la loro vulnerabilità a recidivare un comportamento di auto-somministrazione per EtOH 20% v/v.

➤ Secondo ciclo di Deprivation e Relapse

E stato in seguito effettuato un secondo ciclo:

- 2°Deprivation (5 gg)
- 2°Relapse (5 gg)

In modo da indurre il reinforcement rispetto alla sostanza di abuso mediata dagli effetti motivazionali dell'etanolo (Cacace et al, 2012). I gruppi sperimentali descritti (CTR, N=8; EtOH, N=16) sono rimasti invariati.

➤ Terzo ciclo di Deprivation e Relapse

Alla fine del secondo ciclo è stata effettuata la divisione del gruppo EtOH (N=18), così come di seguito descritto:

- DA-Phen D+EtOH (N=6) a cui è stato somministrato DA-Phen solo durante la terza deprivation;
- EtOH (N=12) a cui è stato somministrato il veicolo.

Il gruppo CTR è rimasto invariato:

- CTR, N=8.

➤ 3° Deprivation (5gg)

Durante la terza fase di astinenza, è stato somministrato DA-Phen esclusivamente al gruppo DA-Phen D (N=6), e veicolo al gruppo EtOH. Le somministrazioni sono state effettuate una volta al giorno per 5 giorni, sempre al medesimo orario. Per la valutazione degli effetti astinenziali in acuto ed in cronico indotti dal consumo volontario di EtOH, i ratti dei gruppi sperimentali descritti sono stati sottoposti ad una sessione di Open Field a 24 ore, ed a una sessione di Elevated Plus Maze a 72 ore dall'induzione forzata di astinenza.

➤ 3° Relapse (5gg)

Per il 3° Relapse è stata effettuata un'ulteriore divisione dei gruppi sperimentali:

- CTR, N=3;
- CTR + Da-Phen, N=3; al quale è stato somministrato il DA-Phen durante il 3°relapse, due ore prima della sessione operante
- DA-Phen D+EtOH , N=6,
- DA-Phen R+EtOH, N=6, al quale è stato somministrato il DA-Phen durante il 3°relapse, due ore prima della sessione operante.
- EtOH, N=6, al quale è stato somministrato il veicolo nelle stesse condizioni del gruppo DA-Phen R+EtOH.

Nella terza ed ultima fase di Relapse DA-Phen è stato somministrato ai gruppi DA-Phen R+EtOH e CTR+DA-Phen, 2 ore prima della sessione sperimentale. Tutti i gruppi (EtOH, DA-Phen D+EtOH, DA-Phen R+EtOH, CTR, CTR + DA-Phen) sono stati nuovamente introdotti nella camera di condizionamento operante, allo scopo di valutare la capacità del farmaco di ridurre le recidive. E' stato deciso di effettuare la suddivisione interna al gruppo CTR, mediante i due sottogruppi CTR e CTR+DA-Phen, al fine di valutare una possibile alterazione della risposta al comportamento operante imputabile esclusivamente al trattamento con DA-Phen.

3.4.2 Valutazione degli effetti astinenziali – Open Field ed Elevated Plus Maze

3.4.2.1 Prima sessione di Deprivation

Per la valutazione degli effetti astinenziali in acuto indotti dal consumo volontario di EtOH, è stata eseguita una sessione di OF a 24 ore dall'inizio dell'astinenza forzata. Per la valutazione degli effetti astinenziali in cronico, è stata eseguita una sessione di EPM a 72 ore dall'inizio dell'astinenza forzata.

3.4.2.2 Terza sessione di Deprivation

Al fine di valutare l'azione del DA-Phen sugli effetti astinenziali in acuto indotti da EtOH, è stata eseguita una sessione di OF a 24 ore dall'inizio dell'astinenza forzata. Per la valutazione dell'azione del DA-Phen sugli effetti astinenziali in cronico, è stata eseguita una sessione di EPM a 72 ore dall'inizio dell'astinenza forzata.

3.4.3 Analisi statistica

Per l'elaborazione statistica dei dati relativi ai consumi di EtOH ed acqua, e per la valutazione della variazione di peso dei ratti, è stata utilizzata l'Analisi della Varianza multipla, seguita da analisi Post Hoc Tukey o Holm-Sidak. Ove appropriato, l'analisi statistica è stata effettuata mediante l'applicazione dello Student t-test (seguito da test di Mann-Whitney, ove appropriato). Tutti i valori sono espressi come Media \pm SD, il livello di significatività è stato posto per un valore di $p < 0.05$.

Per l'elaborazione dei dati è stato usato il software Sigmaplot V11.0 (Systat Software, CA, USA).

3.4.4 Trattamento

Il derivato dopaminico L-Fenilalanina- β -(3,4-diidrossifenil)etil-amide (DA-Phen) è stato solubilizzato in soluzione salina sterile e somministrato per via i.p. ad una dose di trattamento pari a 0,03mmol/Kg. Il gruppo controllo ha ricevuto un

volume equivalente di soluzione salina sterile (fisiologica 0.9%, veicolo). L'Etanolo 96° (Sigma Aldrich, Milan, Italy) è stato impiegato per realizzare soluzioni acquose idroalcoliche aventi titolo pari al 5% v/v (EtOH 5%) ed al 20% v/v (EtOH 20%). Le soluzioni sono state preparate solubilizzando i volumi specificati in acqua per uso alimentare umano.

3.5 Analisi degli organi target/non target dei ratti

3.5.1 Sacrificio dei ratti

Procedura 1: Due ore dopo la somministrazione di DA-Phen o di salina, i ratti sono stati anestetizzati profondamente per iniezione i.p. di Ketamina addizionata a Xylazina (40mg/Kg + 5mg/Kg – onset dell'anestesia pari a 5 minuti). E' stata quindi eseguita una perfusione transcardiaca con PBS avente T=4°C (Phosphate buffer saline: 137mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄; pH 7.4). La procedura è stata adottata per escludere che il farmaco presente a livello del cervello fosse imputabile alla sua relativa presenza a livello del circolo del Willis.

Procedura 2: Due ore dopo la somministrazione di DA-Phen o di salina, i ratti sono stati sacrificati mediante decapitazione in stato "awake". La procedura è stata adottata per verificare l'assenza di interferenze da parte di un eventuale anestetico con il farmaco oggetto di studio.

Procedura 3: Due ore dopo la somministrazione di DA-Phen o di salina, i ratti sono stati anestetizzati profondamente per iniezione i.p. di Ketamina addizionata a Xylazina (40mg/Kg + 5mg/Kg – onset dell'anestesia pari a 5 minuti). E' stata quindi eseguito il sacrificio mediante decapitazione.

In seguito al sacrificio si è proceduto all'espianto degli organi di interesse. Ogni organo è stato opportunamente lavato, con soluzione fisiologica allo 0.9% di NaCl alla temperatura di 4°C, tamponato ed in seguito pesato e sezionato.

3.5.2 Preparazione degli omogenati

In seguito al sacrificio, gli organi di interesse sono stati opportunamente espantati e trattati con Nuclei Buffer per la realizzazione degli omogenati in

rapporto 4:1 con il peso, espresso in grammi, degli organi espianati (Schiera et al, 2013); composizione: 50mM Na₂HPO₄; 50mM NaH₂PO₄; 50mM KCl; 0.15mM di spermina; 0.5mM spermidina; 2mM EDTA; 0.5mM EGTA; 0.32M saccarosio (tutti i componenti sono stati acquistati presso la ditta Sigma Aldrich).

L'omogeneizzazione è stata effettuata utilizzando un sistema di omogeneizzazione automatico, alla velocità di 15000 rpm per 5 min (BioGen PRO200 Homogenizer, probe 10mm x 115mm, tubi da centrifuga da 15mL). Immediatamente dopo, gli omogenati sono stati centrifugati a 1000 g per 10 minuti alla temperatura di 4°C (Sorvall Legend X1 Centrifuge, ThermoScientific), ed i rispettivi surnatanti sono stati prelevati.

3.5.3 Campionamento degli organi da analizzare

3.5.3.1. Campioni provenienti dai ratti del Primo Design Sperimentale

I ratti provenienti dal *Primo Design Sperimentale* sono stati utilizzati per la Valutazione dell'uptake di DA-Phen nei principali organi target/non target quali cervello, plasma, fegato, reni, milza. Gli animali del gruppo DA-Phen sono stati suddivisi in due gruppi prima di essere sottoposti al sacrificio. Il primo gruppo, costituito da N=5 ratti, è stato sottoposto al sacrificio seguendo la procedura 1. Il secondo gruppo, costituito da N=4 ratti, è stato sottoposto al sacrificio seguendo la procedura 2. Tutti i campioni sono stati conservati ad una temperatura di -80°C sino al momento dell'analisi.

3.5.3.2. Campioni provenienti dai ratti del Secondo Design Sperimentale

I ratti provenienti dal *Secondo Design Sperimentale* sono stati utilizzati per la Valutazione dell'uptake di DA-Phen nei principali organi target/non target quali cervello, plasma, fegato, reni, milza, e per la valutazione della quantità di ACD presente nel cervello e nel fegato. Tutti gli animali sono stati sacrificati entro le due ore successive al termine del paradigma, seguendo la procedura 3. I campioni di organi sono stati suddivisi in due aliquote, una da destinare alla determinazione quali-quantitativa del DA-Phen, e l'altra per la determinazione quali-quantitativa

dell'ACD presente nei tessuti considerati. Tutti i campioni sono stati conservati ad una temperatura di -80°C sino al momento dell'analisi.

3.5.4 Determinazione quali-quantitativa di DA-Phen in cervello, plasma, fegato, reni e milza.

Per la determinazione quali-quantitativa del DA-Phen, tutti i campioni sono stati liofilizzati (Labconco, P= 0.002mbar, T= -52°C). In seguito ogni singolo liofilizzato è stato opportunamente raccolto, pesato e conservato in essiccatore a pressione ridotta. Una aliquota di 10 mg di omogenato è stata sospesa in 1 mL di H₂O, agitata meccanicamente (MixMate, mixing frequency=700rpm; mixing orbit 1.5mm) per 15 min ed in seguito centrifugata a 14.000 rpm per 10 min (Eppendorf centrifuge 5415 C). Il surnatante è stato quindi analizzato mediante analisi HPLC, (Shimadzu LC10-AD/VP HPLC system, UV-SPD-M20A Diode array detector, colonna Phenomenex Gemini – NX C18 110A (150 x 4.6 mm, 5 µm), $\lambda = 280\text{nm}$; $\lambda_{2,3,4,5} = 220, 257, 399, 500\text{nm}$) utilizzando un metodo in gradiente TFA 0.01%:MeOH (99.5:0.05 – 0.01-5.00min; 98.5:1.5 – 9.00-11.00min; 0.00:100 – 18.00-25.00min; 99.5:0.05 – 38.00-40.00min) mantenendo un flusso di 1mL/min. Ogni omogenato è stato letto in triplicato. Il contenuto di DA-Phen è stato determinato come $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ di organo, mediante opportuna curva di calibrazione, già precedentemente riportata.

3.5.5 Determinazione quantitativa di Acetaldeide in cervello e fegato

La determinazione quantitativa dell'ACD nei campioni di cervello e fegato è stata effettuata mediante analisi HPLC operando preventivamente la derivatizzazione dell'ACD con 2,4-dinitro-fenil-idrazina (DNPH) (Mao et al, 2010).

I campioni, precedentemente conservati a -80°C, sono stati portati a temperatura ambiente (25 °C), e ad una aliquota di surnatante, di volume pari a 200 µL, sono stati aggiunti 200 µL di una soluzione di DNPH in acetonitrile 0.1mM. I campioni sono stati incubati a 60°C per 15 minuti, centrifugati a 3000

rpm per 10 min ed in seguito direttamente iniettati (20 μ L) in colonna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4.8x100 mm, 3.5 micron). L'analisi HPLC è stata effettuata utilizzando il sistema Shimadzu precedentemente descritto, utilizzando un metodo isocratico in miscela MeOH-H₂O (60:40) mantenendo un flusso di 1mL/min.

Il derivato ACD-DNP è stato valutato ad $\lambda = 360$ nm. Il tempo di ritenzione (Rt) è risultato pari a 6.8 min. Una soluzione madre di ACD-DNP è stata diluita con acetonitrile per ottenere otto soluzioni standard in un range di concentrazione tra 0.025 e 0.75 mg·mL⁻¹ per la costruzione della curva di taratura ($y = -9043,9551 + 2251434,2 x$; R = 0.9996). Il contenuto di ACD è stato determinato come $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ di organo.

L'accuratezza del metodo di analisi è stata valutata in termini di resa del recupero di ACD.

A 1000 μ L di omogenato di cervello di ratto non trattato sono stati aggiunti 50, 80, 100 o 120 nL di una soluzione standard di ACD. I campioni così ottenuti sono stati incubati per 2 h a 37°C. Successivamente i campioni sono stati sottoposti al trattamento con un eccesso di DPNH per 15 min a 60 °C e di seguito analizzati. I valori di ACD-DNP riscontrati sono stati espressi come percentuale di ACD recuperata rispetto alla quantità standard di ACD precedentemente aggiunta (Guan et al, 2012).

La quantità di ACD-DNP riscontrata nei campioni ha indicato che il recupero medio di ACD è del 94% rispetto all'ACD presente nelle soluzioni standard.

3.6 Predizione del Metabolismo in vivo di DA-Phen

La predizione del potenziale metabolismo *in vivo* di DA-Phen è stata condotta mediante software SMARTCYP (The SMARTCyp cytochrome P450 metabolism prediction server, Rydberg et al 2010, a, b, c; Rydberg et al, 2012; 2013).

3.6.1 Algoritmo per analisi SMARTCyp standard

L'algoritmo dell'analisi SMARTCyp ivi impiegato è dato dalla seguente equazione:

$$\text{Score, } S = E - 8 * A - 0.04 * \text{SASA}$$

In cui:

E indica l'energia di attivazione della reazione che determina l'omolisi o l'eterolisi di legame a livello di un particolare atomo della struttura molecolare esaminata, rispetto al sito catalitico di una CYP. Tale energia è determinata come funzione dei matching dei diversi frammenti generati e dalle rispettive energie di attivazione, ed espressa come kJ/mol;

A (accessibilità) è la misura relative della distanza topologica, per un atomo, dal centro della molecola, ed il suo valore oscilla sempre fra 0.5 (atomo al centro) ed 1 (atomo terminale);

SASA (Area Superficiale Accessibile al solvente, **Solvent Accessible Surface Area**) descrive il livello di accessibilità locale per un atomo, e viene computata utilizzando l'algoritmo di tipo 2DSASA, in grado di predire tale valore in base alla topologia molecolare.

3.6.2 Algoritmo impiegato per il modello CYP2D6

L'algoritmo dell'analisi SMARTCyp per il modello CYP2D6 ivi impiegato è dato dalla seguente equazione:

$$\text{Score, } S = E + N + \text{dist_correction} + \text{Span2End_correction} - 0.04 * \text{SASA}$$

In cui:

Correzione N+dist (N+dist_correction)

N+dist è il numero di legami che si instaurano fra un atomo e un amina protonate.

La correzione è computata come segue:

$N+dist < 8: N+dist_correction = 6.7 * (8 - N+dist)$

$N+dist \geq 8: N+dist_correction = 0$

Correzione Span2End (Span2End_correction)

Span2End è un parametro il cui valore indica il numero di legami tra un atomo e le porzioniterminali di una struttura molecolare. La correzione è computata come segue:

$Span2End < 4: Span2End_correction = 6.7 * Span2End$

$Span2End \geq 4: Span2End_correction = 6.7 * 4 + 0.01 * Span2End$

3.6.3 Algoritmo impiegato per il modello CYP2C9

L'algoritmo dell'analisi SMARTCyp per il modello CYP2C9 ivi impiegato è dato dalla seguente equazione:

$$\text{Score, } S = E + \text{COO-dist_correction} + \text{Span2End_correction} + 0.04 * \text{SASA}$$

In cui:

Correzione COO-dist (COO-dist_correction)

COO-dist è il parametro il cui valore indica il numero di legami che un atomo instaura con un legame carbonilico (o eventualmente un bioisostero) La correzione è computata come segue:

$COO-dist < 8: COO-dist_correction = 5.9 * (8 - COO-dist)$

$COO-dist \geq 8: COO-dist_correction = 0$

Correzione del parametro Span2End

Span2End è un parametro il cui valore indica il numero di legami tra un atomo e le porzioni terminali di una struttura molecolare. La correzione è computata come segue:

Span2End < 4: Span2End_correction = 5.9 * Span2End

Span2End >= 4: Span2End_correction = 5.9 * 4 + 0.01*Span2End

3.7 Modello di omologia

In funzione della indisponibilità di una struttura cristallizzata del recettore dopaminergico D1-type, si è reso necessario sviluppare un modello di omologia della struttura proteica, al fine di poter condurre delle simulazioni di interazione recettoriale *in silico*. La sequenza del recettore dopaminergico D1 umano è stata acquisita dal server Swiss-Prot Database (UniProt Consortium, 2010); ed in seguito processata mediante il server I-Tasser (Zhang , 2009; Roy, 2010)

3.7.1 Stima qualitativa del Modello

Sono stati quindi sviluppati 5 modelli, e ciascuno di essi è stato validato mediante due parametri: il C-score, che rappresenta un punteggio di confidenza in grado di stimare la bontà della predittività del modello scelto (variabile entro il range: -5; 2); ed il TM-score, che è stato recentemente proposto per stimare la similarità strutturale fra due modelli, allo scopo di risolvere i problemi della Root Mean Deviation Square (RMDS), sensibile ad errori locali fra due strutture in esame. Il TM-score con punteggio superiore a 0.5 indica un modello con corretta topologia.

Il modello migliore ha valori di C-Score = 0.59 e di TM-Score = 0.79.

3.7.2 Preparazione del modello proteico

La struttura tridimensionale proteica predetta è stata sottoposta ad ulteriori accurate analisi di valutazione. E' stato calcolato il Q-mean score (Benkert 2008; 2009; 2011), il quale permette di stimare il "grado di natività" delle proprietà strutturali osservabili in un modello- Il Q-mean score descrive inoltre il grado di

somiglianza di un dato modello, quando questo viene impiegato in analisi qualitative di comparazione con molecole sperimentali. Il Q-mean score rappresenta una funzione di scoring complessa, in grado di derivatizzare contemporaneamente le stime di errori globali (per esempio errori relativi all'intera struttura) e locali (per esempio relativi agli errori residui), sulla base di un solo singolo modello. In seguito, per la stima della robustezza del modello proposto, è stato impiegato il software RAMPAGE (Lovell et al, 2003) per effettuare l'analisi del Ramachandran plot.

Il modello è stato successivamente verificato in base al Protein Preparation Wizard implementato nel software MAESTRO (Maestro v 9.0.211), il quale ottimizza i networks dei legami a idrogeno e gli orientamenti flip, unitamente agli stati tautomerici, effettuando una ottimizzazione geometrica con una RMSD massima di 0.3 Å, sfruttando il campo di forza di tipo OPLS2005. Mediante Desmond (Desmond Molecular Dynamics System, version 2.2), il modello è stato virtualmente immerso in un bilayer lipidico, e l'orientamento della struttura all'interno della membrana è stata ricavata mediante il database OPM (Orientation of Proteins in Membranes) (Lomize et al, 2006). Il sistema è stato quindi solvatato all'interno di una matrice cubica, costituita da molecole d'acqua (SPC water model). Infine, è stato impiegato SiteMap (Sitemap 2.3), al fine di ipotizzare i siti di legame probabili, e allo scopo di predire ove una data proteina generasse un elevato gradi di binding.

3.7.3 Site Mapping

Il software SiteMap opera in modo del tutto analogo all'algoritmo GRID di Goodford (Goodford, 1985), attraverso tre stages. Nel primo step, è stata realizzata una griglia, e tutti i punti caratteristici sono stati raggruppati in sets, in accordo ai diversi criteri che definiscono i rispettivi siti di interesse. Nel secondo step, i siti sono stati mappati su una griglia differente, in modo da produrre i files di visualizzazione delle mappature. Successivamente, sono state performato tutte le interazioni di tipo Van der Waals e, più genericamente, tutte le interazioni di tipo elettrostatico distanza-dipendenti da una sonda generica, che è stata posta nei

punti caratteristici della griglia impiegata per generare il campo elettrico e le forze di Van der Waals. La sonda simula una molecola d'acqua, ed è rappresentata da una sfera di van der Waals del raggio pari a 1.6 Å, ed energia pari a 0.13 kcal/mol, con un momento dipolare pari a 2.4 Debye. Per generare la griglia di campo elettrostatico, la sonda è stata orientata in modo che il suo punto di dipolo massimo giacesse lungo il campo elettrico, con un offset di 0.15 Å dalla sfera di van der Waals verso il centro di legame O–H ottimale.

3.7.4 Docking Molecolare

Il software Glide (Glide, version 5.7) è stato impiegato per valutare il docking molecolare della molecola di Da-Phen col modello recettoriale D1-like. Il programma sfrutta delle serie gerarchiche di filtri allo scopo di cercare le possibili allocazioni del ligando nelle regioni sito-attive del recettore, mentre l'organizzazione spaziale e le proprietà del recettore vengono rappresentate da una griglia, suddivisa in diversi campi di settaggio, che provvedono progressivamente al miglioramento del punteggio di scoring delle diverse conformazioni assumibili dal medesimo ligando. Viene pertanto realizzata una ricerca conformazionale estensiva usando uno schermo euristico che rapidamente provvede all'esclusione delle conformazioni non idonee (per esempio conformazioni che presentano legami H interni eccessivamente lunghi o sovrapposizioni steriche fra diversi frammenti molecolari).

L'intera serie di conformazioni generate viene quindi classificata gerarchicamente, ridefinita ed ulteriormente minimizzata nella griglia del sito attivo, prima di essere definitivamente computata usando la funzione GlideScore, definita come:

$$\text{GScore} = 0.065 \times \text{vdW} + 0.130 \times \text{Coul} + \text{Lipo} + \text{Hbond} + \text{Metal} + \text{BuryP} + \text{RotB} + \text{Site}$$

In cui vdW è il termine termodinamico di van der Walls, Coul è l'energia di Coulomb, Lipo è il termine di contatto che compensa le interazioni idrofobiche favorevoli, H-bond è il termine riferito ai ponti a idrogeno, Metal si riferisce ai legami covalenti con ioni metallici (ove applicabile), BuryP è un termine detrattivo che si applica in presenza di gruppi polari schermati in funzione della

conformazione spaziale considerata; RotB è un altro termine detrattivo, riferibile al congelamento dei legami rotazionali; mentre Site è il termine utilizzato per esprimere la presenza di interazioni polari favorevoli con sito attivo. I nostri esperimenti sono stati condotti usando i parametri di default ed il seguente protocollo: inizialmente, il livello di Precisione Standard di accuratezza (SP) è stato impiegato per generare e stimare 10 conformazioni per ogni ligando. La conformazione top-scored (con il miglior punteggio) è stata ulteriormente analizzata eseguendo un secondo docking mediante l'algoritmo Extra-Precision (XP).

Infine, le conformazioni migliori sono state ridefinite con l'opzione "Refine" (quest'operazione permette di ottimizzare la struttura del ligando nella tasca del recettore) ed il livello di accuratezza XP. La modalità XP combina protocolli di campionamento statisticamente potenti con l'uso di una funzione di scoring designata per definire le conformazioni del ligando che si presume siano energeticamente sfavorite. Il presupposto principale di tale protocollo è che solo i campioni attivi avranno la possibilità di assumere configurazioni spaziali in grado di evitare termini detrattivi, e ricevere invece punteggi favorevoli dovuti ad un appropriato contatto idrofobico tra proteina e ligando.

Il metodo di campionamento XP è basato su una strategia di ridefinizione ed incoraggio: i frammenti ancorati del ligando, che hanno generato il docking (tipicamente i frammenti ciclici), vengono scelti da un set di conformazioni SP e la molecola viene nuovamente sviluppata, legame per legame, a partire dai frammenti ancorati. In seguito, una minimizzazione completa e lo scoring XP vengono performati su un vasto insieme di conformazioni mediante il metodo della crescita. Le funzioni di scoring XP integrano quindi le funzioni basilari di GlideScore con termini addizionali: per simulare il grado di solvatazione viene esplicitata una funzione specifica, parametrizzata rispetto ad una molecola d'acqua su diversi complessi proteina-ligando già noti. Similarmente, parametri addizionali compensatori sono stati calcolati per tutte le tasche idrofobiche occupate dai gruppi apolari del ligando.

4 . Risultati

Le dosi di DA-Phen scelte per il presente studio comportamentale sono equimolari a quelle che vengono comunemente testate per valutare l'attività farmacologica di composti ad attività dopamino-agonista.

Le dosi somministrate hanno tenuto in considerazione la potenziale scissione enzimatica di DA-Phen in vivo, in grado di liberare DA ed L-Fenil-Alanina nel plasma (LD50 della DA = 0.5 mmol/kg) (Di Stefano et al, 2006; Giannola et al, 2008). Per le dosi somministrate, non si è verificato nessun caso di mortalità.

4.1 Valutazione della reattività comportamentale indotta dalla somministrazione di DA-Phen

4.1.1 Open Field

La prima sessione di OF, mirata alla valutazione del comportamento basale, ha mostrato una omogeneità nella risposta dei ratti trattati. I ratti sono stati quindi suddivisi in gruppi in modo randomizzato, come precedentemente descritto.

Tutti i grafici di seguito riportati mostrano la comparazione fra i ratti trattati con DA-Phen, alle diverse dosi proposte ed ai differenti time points, rispetto al gruppo CTR.

Open Field – Distanza Totale Percorsa

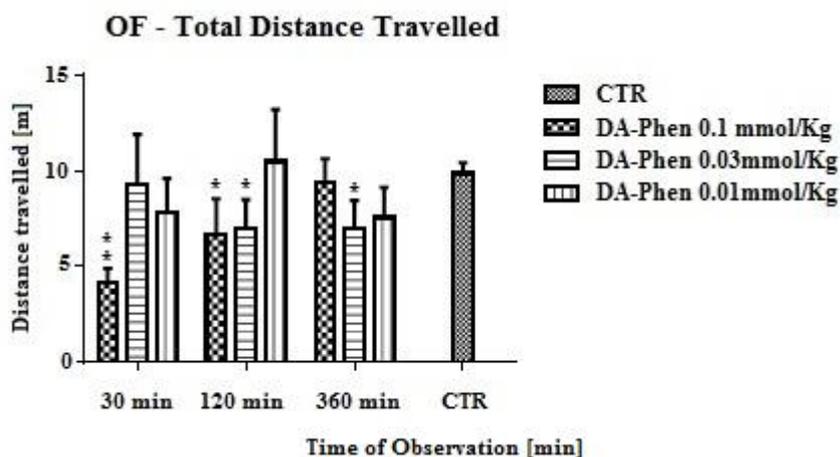


Fig. 7 – OF - Distanza Totale Percorsa - ANOVA a 2 vie, Post Hoc Holm Sidak per comparazioni multiple, *p<0.05, **p<0.001 .

I risultati derivanti dall'analisi statistica mostrano una significatività nell'interazione fra la Dose di Trattamento ed il Tempo di osservazione [F (6,24) =4.069; p=0.0059].

Rispetto al gruppo CTR, la somministrazione di DA-Phen comporta un generico decremento dell'attività locomotoria per ogni dose somministrata [F (3,24) =6.012; p=0.003], mentre non ha rivelato una significatività rispetto al tempo di somministrazione [F (2,24) = 0.75; p=0.4816]. Mediante la comparazione multipla di Holm Sidak è stato evidenziato che è presente una significatività nel trattamento rispetto al gruppo CTR per DA-Phen 0.1 mmol/Kg a 30 min (Mean Diff = -3.12; p=0.0012) e 120 min (Mean Diff = -6.95; p=0.0168) e per DA-Phen 0.03 mmol/Kg a 120 min (Mean Diff = -7.34; p=0.0192) e 360 min (Mean Diff = -7.28; p=0.0197).

Open Field – Tempo trascorso nella Zona interna

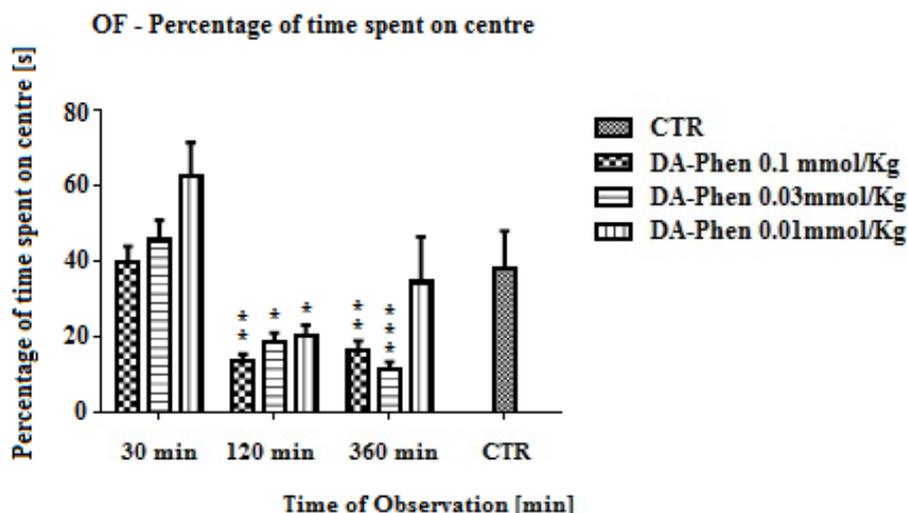


Fig. 8– OF: Percentuale di Tempo trascorso nella Zona Interna (s) - ANOVA a 2 vie, Post Hoc Holm Sidak per comparazioni multiple, *p<0.05, **p<0.001, *p<0.0001**

Come precedentemente discusso in merito ai valori di distanza percorsa, analizzando i valori di tempo trascorso nella medesima zona del maze si ottiene una significatività statistica nell'interazione fra le dosi di trattamento ed i differenti tempi di osservazione [F (6,24)=6.128; p=0.0005]. Lo stesso tipo di significatività si riscontra analizzando singolarmente il fattore Dose di trattamento [F(3,24)=12.78; p=0.0001] ed il fattore tempo di somministrazione [F (2,24)=41.60; p=0.0001]. L'analisi Post Hoc di tipo Holm Sidak ha rivelato, in particolare, rispetto al gruppo CTR, una significatività per DA-Phen 0.1 mmol/Kg a 120 min (Mean Diff = -14.98; p=0.0004) e 360 min (Mean Diff = -13.54; p=0.0003), per DA-Phen 0.03 mmol/Kg a 120 min (Mean Diff = -13.08; p=0.0013) e 360 min (Mean Diff = -15.12; p<0.0001), ed infine per DA-Phen 0.01 mmol/Kg a 120 min (Mean Diff = -12.70; p=0.0022).

Open Field - Numero di Line crossings

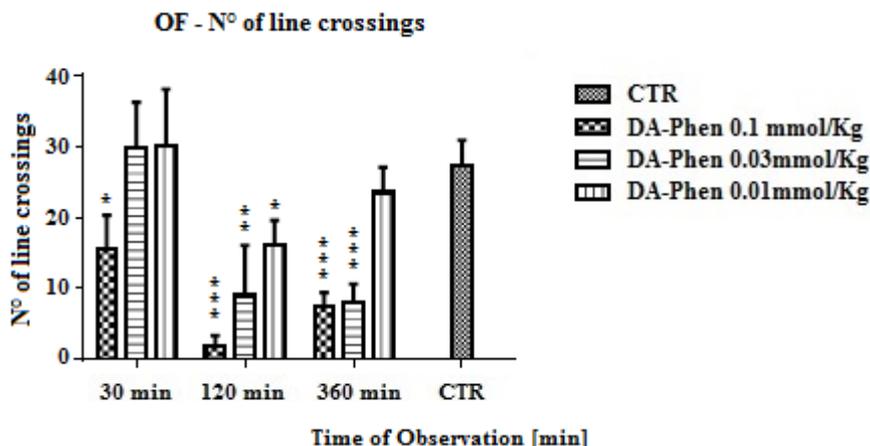


Fig. 9 – OF: N° di Line Crossings - ANOVA a 2 vie, Post Hoc Holm Sidak per comparazioni multiple, *p<0.05, **p<0.001, *p<0.0001**

L'elaborazione dei dati relativi al numero di line crossings mostra una significatività fra le dosi di trattamento ed i differenti tempi di osservazione [F (6,24)=4.161; p=0.0053]. E' stata riscontrata una significatività analizzando singolarmente il fattore Dose di trattamento [F (3,24)=29.99; p=0.0001] ed il fattore tempo di somministrazione [F (2,24)=22.56; p=0.0001]. L'analisi Post Hoc di tipo Holm Sidak ha rivelato rispetto al gruppo CTR una significatività per DA-Phen 0.1 mmol/Kg a 30 min (Mean Diff = -14.71; p=0.0035), 120 min (Mean Diff = -23.94; p<0.0001), e 360 min (Mean Diff = -18.94; p<0.0001); per DA-Phen 0.03 mmol/Kg a 120 min (Mean Diff = -19.37; p=0.0003), e 360 min (Mean Diff = -11.77; p<0.0001) e per DA-Phen 0.01 mmol/Kg a 120 min (Mean Diff = -14.24; p=0.0019).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata nell'analisi del parametro velocità media: Dose di trattamento (F (3,24)=0.5862; p=0.6299); Tempo di osservazione [F (2,24)=0.01293; p=0.9872], Interazione [F (6,24)=0.2371; p=0.9599].

4.1.2 Elevated Plus Maze

Tutti i grafici di seguito riportati mostrano la comparazione fra i ratti trattati con DA-Phen, alle diverse dosi proposte ed ai differenti time points, rispetto al gruppo CTR.

Elevated Plus Maze – Percentuale di tempo speso nel braccio aperto

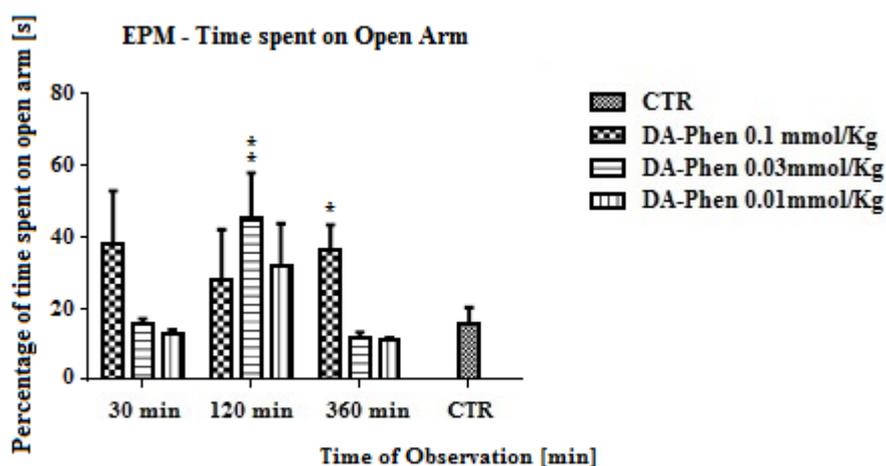


Fig. 10– EPM: Percentuale di tempo speso nel braccio aperto ANOVA a 2 vie, Post Hoc Holm Sidak per comparazioni multiple, *p<0.05, **p<0.001, *p<0.0001.**

L'analisi del tempo speso nel braccio aperto ha evidenziato una significatività fra le dosi di trattamento ed i differenti tempi di osservazione [F (6,24)=3.655; p=0.0102]. E' stata riscontrata una significatività nell'analisi del fattore Dose di trattamento [F (3,24)=6.263; p=0.0027] ed il fattore tempo di somministrazione [F (2,24)=4.659; p=0.0195]. L'analisi Post Hoc di tipo Holm Sidak ha mostrato una significatività per DA-Phen 0.1mmol/Kg a 360 min (Mean Diff = 18.38; p=0.0015) e per DA-Phen 0.03 mmol/Kg a 120 min rispetto al gruppo CTR (Mean Diff = 25.38; p=0.0003).

Elevated Plus Maze – Numero di ingressi nel braccio aperto

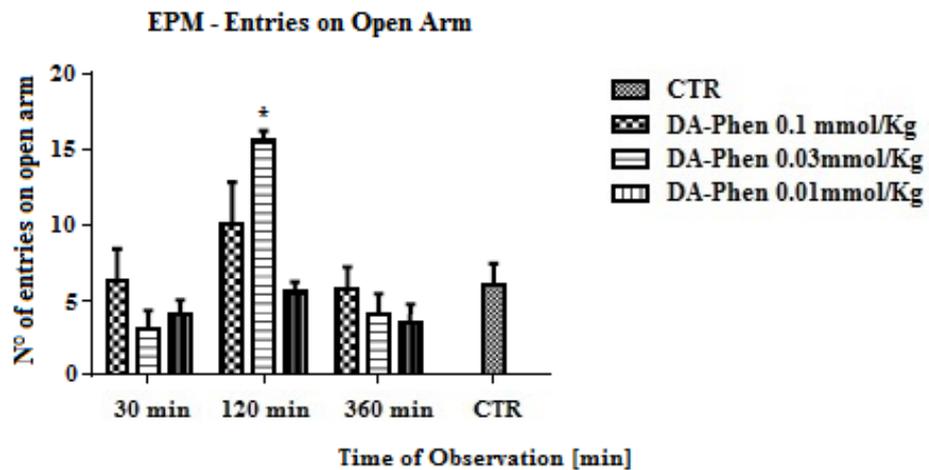


Fig. 11 – EPM: N° di ingressi nel braccio aperto ANOVA a 2 vie, Post Hoc Holm Sidak per comparazioni multiple, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.0001$.**

L'analisi del numero di ingressi nel braccio aperto ha evidenziato una significatività nell'interazione fra le dosi di trattamento ed i differenti tempi di osservazione [$F(6,24) = 14.36$; $p = 0.0001$]. E' stata riscontrata una significatività nell'analisi del fattore Dose di trattamento [$F(3,24) = 9.775$; $p = 0.0002$] ed il fattore tempo di somministrazione [$F(2,24) = 39.70$; $p = 0.0001$]. L'analisi Post Hoc di tipo Holm Sidak ha mostrato una significatività per DA-Phen 0.03 mmol/Kg a 120 min rispetto al gruppo CTR (Mean Diff = 6.83; $p = 0.0036$).

Elevated Plus Maze – Numero di Head Dippings

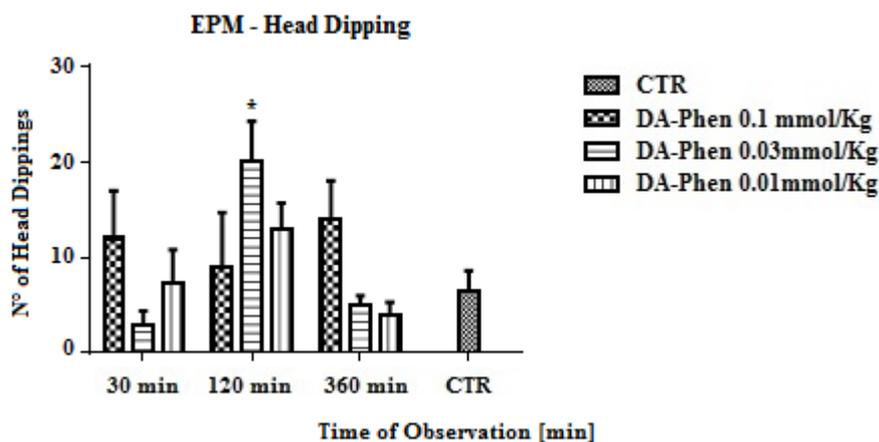


Fig. 12 – EPM: N° di Head Dippings - ANOVA a 2 vie, Post Hoc Holm Sidak per comparazioni multiple, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.0001$**

L'analisi del numero di ingressi nel braccio aperto ha evidenziato una significatività nell'interazione fra le dosi di trattamento ed i differenti tempi di osservazione [F (6,24)=5.608; $p=0.0009$]. E' stata riscontrata una significatività nell'analisi del fattore Dose di trattamento [F (3,24)=2.916; $p=0.0548$] ed il fattore tempo di somministrazione [F (2,24)=6.396; $p=0.0059$]. L'analisi Post Hoc di tipo Holm Sidak ha mostrato una significatività per DA-Phen 0.03 mmol/Kg a 120 min rispetto al gruppo CTR (Mean Diff = 5.167; $p=0.0255$).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata nell'analisi del parametro velocità media: Dose di trattamento [F (3,24)=0.3225; $p=0.8090$]; Tempo di osservazione [F (2,24)=0.5961; $p=0.5589$], Interazione [F (6,24)=1.065; $p=0.4102$].

4.1.3 Forced Swimming Test

I risultati relativi ai 4 parametri valutati durante le sessioni di FST, Immobilità, n° di Headshakes, n° di Climbings, n° di Divings, sono di seguito riportati (Fig. 13, 14, 15, 16) e consentono di confrontare le differenze riscontrate fra i ratti trattati con DA-Phen 0.03 mmol/kg, $t=2h$ con il gruppo controllo. L'analisi dei

dati relativi al FST ha mostrato una significatività nell'effetto indotto dalla somministrazione di DA-Phen sul tempo di immobilità, che è risultato inferiore per il gruppo DA-Phen rispetto al gruppo CTR [$t=19.16$ $df=11.46$; $p < 0.0001$]. Lo stesso tipo di trend è stato osservato per i valori di immobilità di entrambi i gruppi nella fase di Test [$t=10.96$ $df=15.02$; $p < 0.0001$] (Fig. 13).

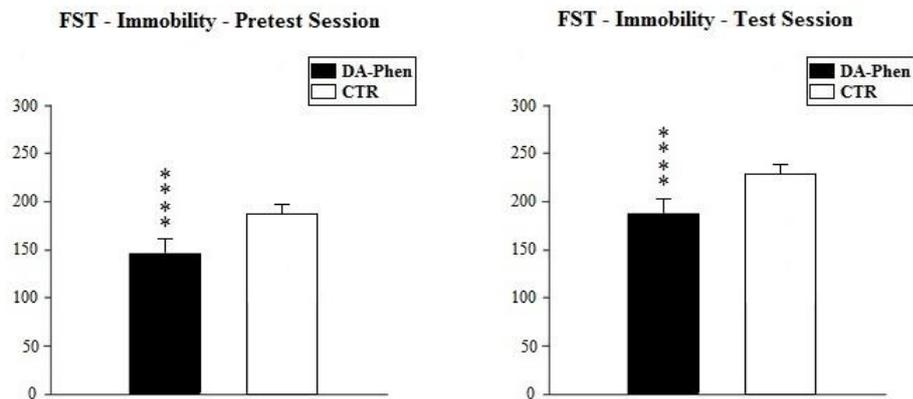


Fig. 13. Tempo di Immobilità (Immobility Time) ■ Gruppo DA-Phen , 0.03mmol/Kg; □ Gruppo CTR; t-test di Student (di tipo unpaired, two tailed) con correzione di Welch, * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ – sessione Pretest : DA-Phen 133.8 ± 2.9 ; CTR 195.4 ± 1.4 ; sessione Test : DA-Phen 188.6 ± 2.8 ; CTR 226.7 ± 2.1 .

Inoltre, il trattamento con DA-Phen ha fatto registrare, nel gruppo trattato, un significativo aumento della frequenza degli HeadShakes [$t=12.51$ $df=13.88$; $p < 0.0001$] e dei Divings [$t=6.586$ $df=13.11$; $p < 0.0001$] rispetto al gruppo CTR, nella sessione di Pretest. Nella sessione di Test, il gruppo DA-Phen ha fatto registrare un decremento nel valore di entrambi i parametri HeadSkakes [$t=2.572$ $df=11.53$; $p = ns$] e Diving [$t=3.430$ $df=11.89$; $p = ns$] (Fig. 14 e 15).

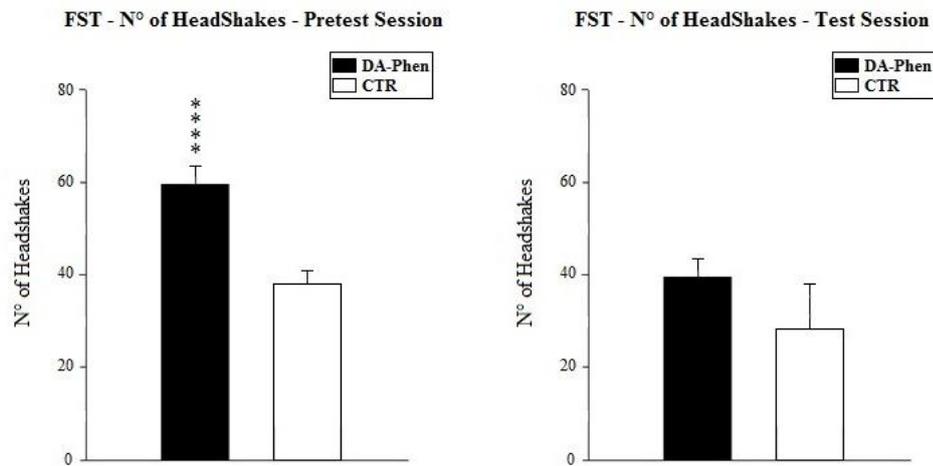


Fig. 14. Frequenza degli HeadShakes: ■ Gruppo DA-Phen, 0.03mmol/Kg; □ Gruppo CTR; Student t-test (di tipo unpaired, two tailed) con correzione di Welch, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. Sessione di Pretest: DA-Phen 59.3 ± 0.8 ; CTR 39.3 ± 1.3 ; Sessione di Test: DA-Phen 38.2 ± 3.0 ; CTR 33.56 ± 1.4 .

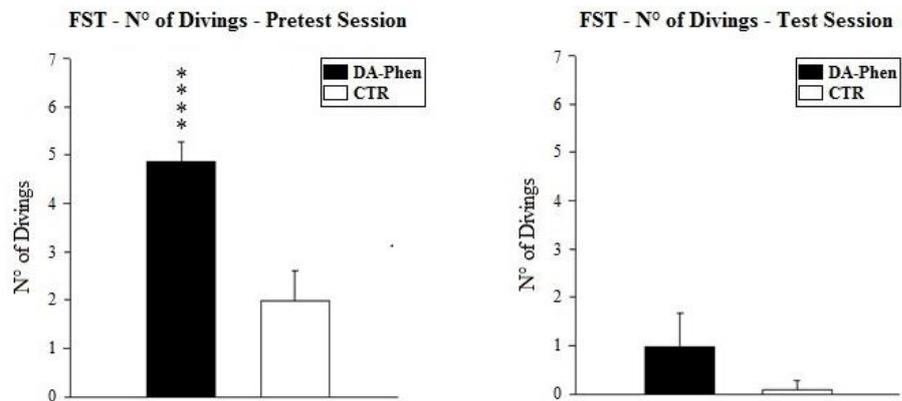


Fig. 15. Frequenza dei Divings: ■ Gruppo DA-Phen, 0.03mmol/Kg; □ Gruppo CTR; Student t-test (di tipo unpaired, two tailed) con correzione di Welch, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. Sessione di Pretest : DA-Phen 5.2 ± 0.4 ; CTR 1.9 ± 0.3 ; Sessione di Test: DA-Phen 1.3 ± 0.3 ; CTR 0.2 ± 0.1 .

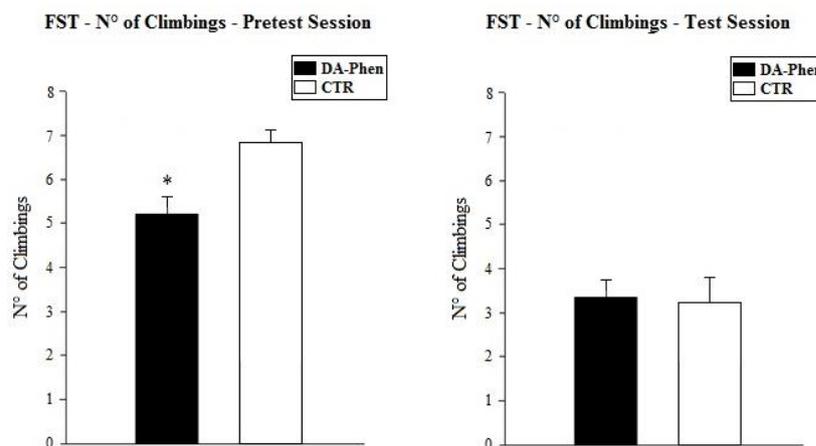


Fig.16. Frequenza dei Climbings: ■ DA-Phen , 0.03mmol/Kg; □ CTR; Student t-test (di tipo unpaired, two tailed) con correzione di Welch, * $p < 0.05$. Sessione di Pretest: DA-Phen 5.0 ± 0.5 ; CTR 7.2 ± 0.4 ; Sessione di Test: DA-Phen 3.3 ± 0.4 ; CTR 3.2 ± 0.4 .

È inoltre stato possibile evidenziare un numero maggiore di Climbing per il gruppo DA-Phen rispetto che per il gruppo CTR nella fase di Pretest [$t=3.255$ $df=14.59$; $p= 0.0055$]; mentre nessuna significatività è emersa nell'analisi dei Climbings nella successiva sessione di Test [$t=0.1943$ $df=15.64$; $p = ns$] (Fig. 16).

4.1.4 Morris Water Maze

Sessione di Training. Gli effetti della somministrazione di DA-Phen sulla modulazione dell'apprendimento e della memoria spaziale sono mostrati nelle Figure 17 ed 18. Il valore medio di tempo di latenza per il raggiungimento della piattaforma è stato significativamente minore per il gruppo DA-Phen, rispetto al gruppo CTR (Fig. 17). Nonostante il gruppo CTR abbia mostrato una progressiva tendenza alla diminuzione dei valori di tempo di latenza, dal primo al terzo giorno di Training, non ha mai raggiunto i valori minimi medi registrati per il gruppo DA-Phen [trials, $F(11, 192) = 29.22$, $p < 0.0001$; treatment $F(1, 192) = 28.4$, $p < 0.0001$].

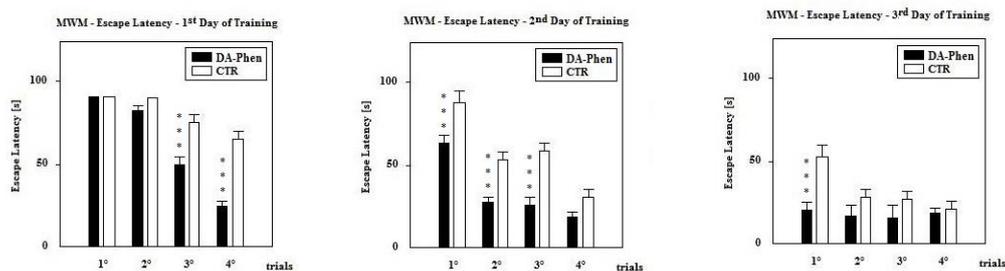


Fig. 17. Sessione di Training del MWM – Riduzione progressiva del tempo di Latenza nel raggiungimento della piattaforma: ■ DA-Phen, 0.03mmol/Kg; □ CTR group; *p<0.05, ***p<0.001. Two Way ANOVA a due vie, Post Hoc Tukey per comparazioni multiple.

Lo stesso trend è stato osservato nell'analisi della distanza totale percorsa per il raggiungimento della piattaforma [trials, $F(11, 192) = 39.57$, $p < 0.0001$; treatment $F(1, 192) = 59.16$; $p < 0.0001$] (Fig. 8). L'analisi ha permesso di evidenziare anche una significativa interazione fra trial e trattamento [$F(11, 192) = 3.810$, $p < 0.0001$]. non sono invece state riscontrate differenze significative fra i gruppi per quanto concerne i valori di velocità media di nuoto [$F(5, 210) = 11.79$, $p < 0.05$].

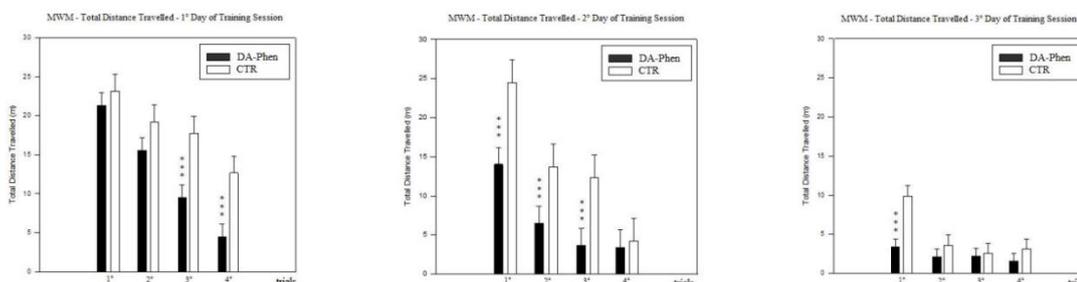


Fig. 18. Sessione di Training del MWM – Riduzione progressiva della distanza totale percorsa per il raggiungimento della piattaforma (m): ■ DA-Phen, 0.03mmol/Kg; □ CTR; *p<0.05, ***p<0.001 – ANOVA a due vie, Post Hoc Tukey per comparazioni multiple.

Sessione di Reversal. Come mostrato in Fig.19, il gruppo DA-Phen ha mostrato un valore di tempo di latenza maggiore del gruppo CTR, esclusivamente durante il primo trial. Dal secondo al quarto trial invece il gruppo DA-Phen ha mostrato una significativa riduzione del tempo di latenza impiegato per il raggiungimento

della piattaforma [trials $F(3,48) = 2.924$, $p < 0.05$; trattamento $F(1,16) = 6.368$, $p < 0.05$]. E' stata altresì verificata un'interazione fra trial e trattamento [$F(3,48) = 4.460$, $p < 0.05$]. Come osservato durante la sessione di Training, anche durante la sessione di Reversal non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nella velocità media di nuoto fra i gruppi considerati [$t=0.6275$ $df=65.97$, $p=0.5325$, two tailed, correzione di Welch].

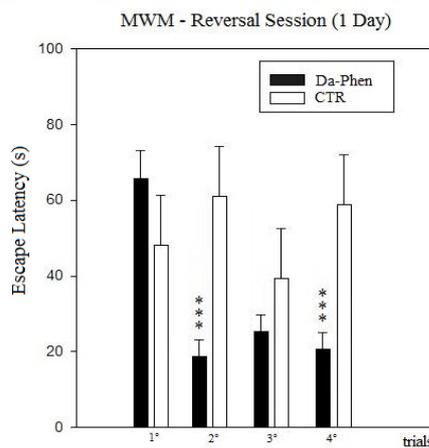


Fig. 19. Sessione di Reversal del MWM – Riduzione progressiva del tempo di latenza necessario per raggiungere la piattaforma (s): ■ DA-Phen, 0.03 mmol/Kg; □ CTR; ANOVA a due vie, Post Hoc Tukey per comparazioni multiple, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. 1° trial: DA-Phen 65.3 ± 6.3 ; CTR 47.4 ± 9.8 ; 2° trial: DA-Phen 18.8 ± 4.2 ; CTR 60.2 ± 9.3 ; 3° trial: DA-Phen 26.6 ± 4.7 ; CTR 38.4 ± 8.6 ; 4° trial: DA-Phen 22.2 ± 3.9 ; CTR 59.1 ± 9.2 .

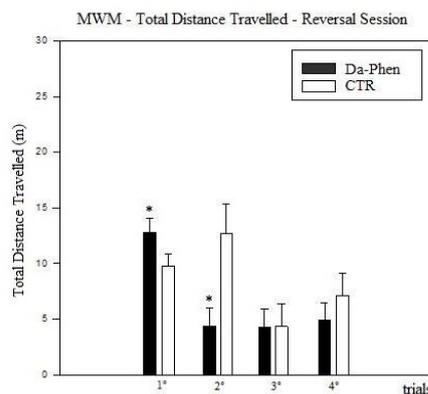


Fig. 20. Sessione di Reversal del MWM – Distanza totale percorsa, dallo starting point sino alla piattaforma (m): ■ DA-Phen, 0.03 mmol/Kg; □ CTR; ANOVA a due vie, Post Hoc Tukey per comparazione multipla, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. 1° trial: DA-Phen 12.3 ± 1.5 ; CTR 9.4 ± 1.9 ; 2° trial: DA-Phen 4.3 ± 1.5 ; CTR 12.3 ± 2.5 ; 3° trial: DA-Phen 4.2 ± 1.5 ; CTR 4.2 ± 1.9 ; 4° trial: DA-Phen 4.7 ± 1.6 ; CTR 6.9 ± 2.0 .

Sessione di Probe. Il principale parametro analizzato durante la sessione di Probe è stato la percentuale di tempo speso nel quadrante target delle sessioni di Training e di Reversal. In seguito al completamento del periodo di Training, della durata di tre giorni, e della fase di Reversal, di un giorno, il gruppo CTR ha fatto registrare una percentuale di tempo spesa nel quadrante target della sessione di Training significativamente maggiore che rispetto al gruppo DA-Phen [$t=8.317$ $df=54.42$, $p<0.0001$]. tale risultato è completamente invertito quando si analizza la percentuale di tempo speso nel quadrante target della sessione di Reversal [$t=14.89$ $df=68.21$, $p<0.0001$]. Un risultato del tutto speculare è stato ottenuto quando è stata esaminata la percentuale di distanza percorsa nel quadrante target della sessione di Training [$t=2.263$ $df=53.90$, $p<0.05$], e della sessione di Reversal [$t=6.432$ $df=61.75$, $p<0.0001$]. (Fig. 21)

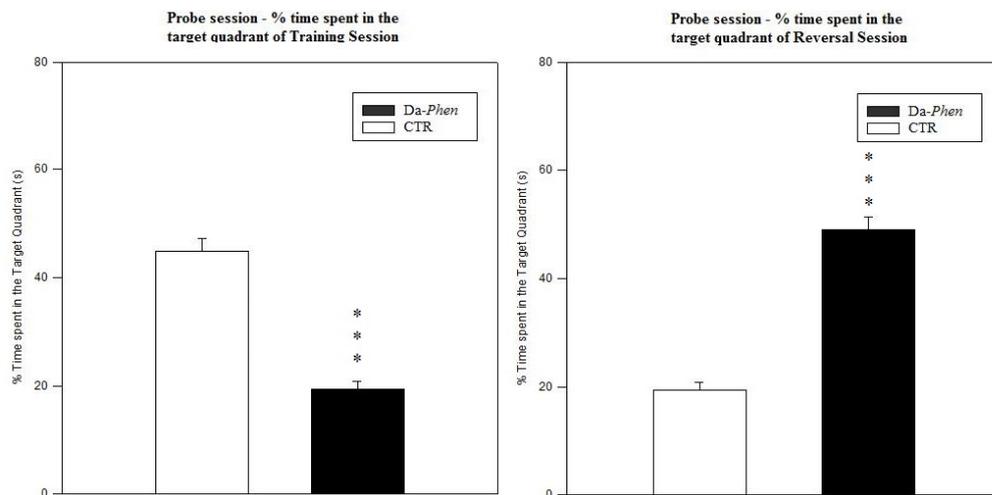


Fig. 21. Sessione di Probe del MWM – Percentuale di tempo speso nel quadrante target della sessione di Training (a) e della sessione di Reversal (b): ■ DA-Phen , 0.03 mmol/Kg; □ CTR ; Student t-test (di tipo unpaired, two tailed), * $p<0.05$, *** $p<0.001$. (a): DA-Phen 21.7 ± 2.1 ; CTR 41.6 ± 1.2 ; (b): DA-Phen 48.6 ± 1.2 ; CTR 21.6 ± 1.4 .

4.2 Valutazione della modulazione del consumo di alcool dopo trattamento con Da-Phen

4.2.1 Comportamento di auto-somministrazione operante

L'analisi ANOVA (tempo come variabile indipendente, sessione come fattore) ha rivelato un incremento del consumo di etanolo nel gruppo EtOH fra le sessioni di Training, Primo Relapse, Secondo Relapse [$F(2, 29) = 9.566, p < 0.05$]. L'analisi post hoc Holm Sidak ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nell'intake di Etanolo fra il Primo Relapse ed il Training ($t = 2.502; p = 0.019$), e tra il Secondo Relapse ed il Training ($t = 4.016; p < 0.001$). (Fig. 22)

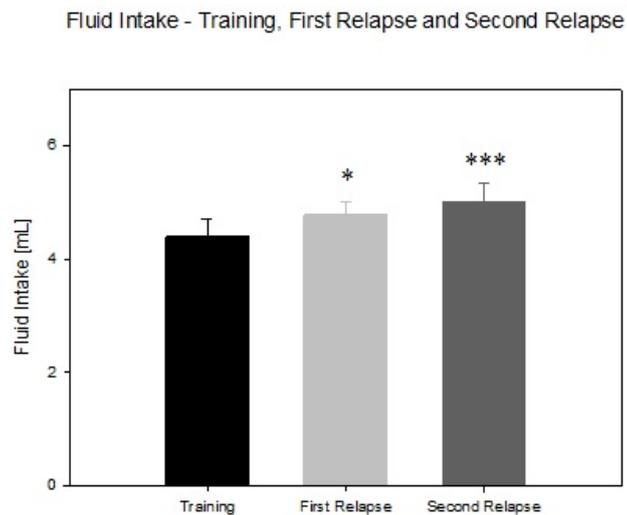


Fig. 22 Consumo totale di Etanolo nelle sessioni di Training, Primo Relapse, Secondo Relapse – ANOVA ad una via, post hoc Holm Sidak per comparazioni Multiple, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Nel terzo Relapse, il gruppo EtOH ha incrementato il consumo di Etanolo rispetto alla sessione di Training. L'analisi ANOVA (consumo di EtOH come variabile indipendente, trattamento con DA-Phen come fattore), impiegata per analizzare gli effetti indotti da DA-phen sull'intake di Etanolo, ha rivelato una differenza significativa indotta dall'agonista dopaminergico sul consumo di alcol. Infatti, per entrambi i gruppi trattati con il derivato della dopamina, il consumo di etanolo è notevolmente diminuito [$F(2,14) = 96.842, p < 0.001$]. L'analisi post hoc

Holm Sidak ha mostrato differenze significative sia sui ratti trattati con il DA-Phen durante la terza Deprivation rispetto al gruppo EtOH ($t=10.924$; $p=0.019$), che nei ratti trattati con DA-Phen durante il terzo Relapse ed il gruppo EtOH ($t=12.929$; $p<0.001$). (Fig.23)

Nessuna differenza statisticamente significativa nel consumo di etanolo è stata riscontrata fra i ratti trattati con DA-Phen durante la terza Deprivation (Da-Phen D+EtOH) ed i ratti trattati con DA-Phen nel terzo Relapse (Da-Phen R+EtOH) ($t=2.005$; $p=0.068$). (Fig.23)

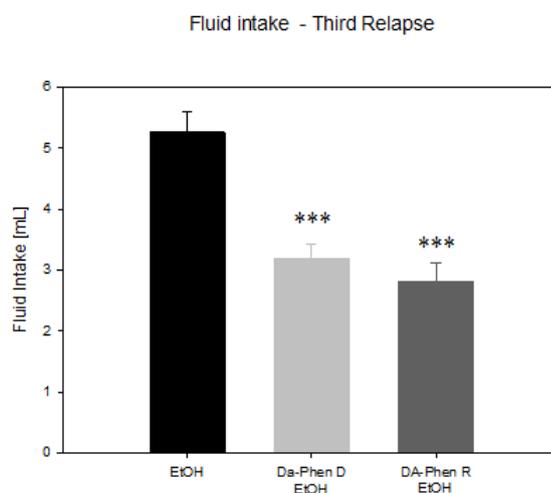


Fig. 23 Consumo totale di Etanolo durante il Terzo Relapse – ANOVA a una via, post hoc Holm Sidak per comparazioni multiple, * $p<0.05$; *** $p<0.001$. EtOH – ratti esposti ad etanolo; Da-Phen D+EtOH – ratti esposti ad etanolo, trattati con DA-Phen solo durante la terza Deprivation; DA-phen R+EtOH – ratti esposti ad etanolo, trattati con solo DA-Phen durante il terzo Relapse

I ratti trattati con EtOH 20% v/v hanno mostrato un trend crescente dei consumi fra le sessioni di Training, Primo Relapse, Secondo Relapse ($df=2$, $f=9.57$, $p<0.05$). Il post hoc Holm Sidak ha rivelato una differenza statisticamente significativa fra la media dei consumi della sessione di Training vs media della sessione di Primo Relapse ($DoM=0.61$; $t=4.016$, $p<0.001$) e della sessione di Training vs Secondo Relapse ($DoM=0.38$; $t=2.502$, $p=0.019$).

L'analisi del terzo Relapse ha mostrato una diminuzione dell'assunzione di EtOH sia per i ratti trattati con DA-Phen durante la Terza Deprivation (Da-Phen D, $N=6$) che quelli trattati con DA-Phen durante il Terzo Relapse (DA-Phen R, $N=6$), rispetto ai consumi di EtOH nei ratti non soggetti alla somministrazione del farmaco ($N=4$) – ($df=2$; $f=96.824$, $p<0.001$ – EtOH vs DA-Phen D - $DoM=2.1$;

$t=12.929$, $p<0.001$; EtOH vs DA-Phen R - DoM=2.5; $t=10.924$, $p<0.001$). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata fra i consumi dei gruppi trattati con DA-Phen durante il terzo Relapse (DA-Phen D vs DA-Phen R - DoM=0.38; $t=2.005$, $p=0.068$).

Dall'analisi dei consumi giornalieri di soluzione durante le singole sessioni di operante, è stato riscontrato un consumo medio (inerente le sessioni di Training ed i primi due cicli di Relapse) pari a 14.4 ± 1.2 mL per il gruppo CTR, e di 4.4 ± 1.0 mL per i ratti trattati con EtOH 20% v/v.

Il posthoc Holm Sidak, eseguito per tutti i giorni di Training e Relapses considerati, rivela una significatività tra i consumi del gruppo CTR e dei ratti trattati con EtOH per ogni singolo giorno ($df=34$; $f=13.16$; $p<0.001$).

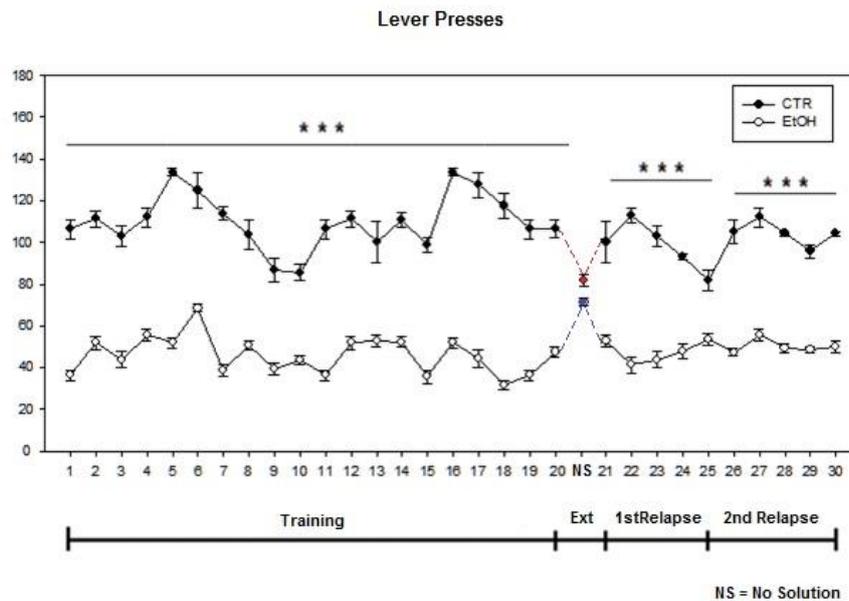


Fig 24. Numero di battute effettuate giornalmente durante le sessioni di Training e di primo e secondo Relapse – ANOVA a due vie, post hoc di Holm Sidak per comparazioni multiple, $*p < 0.05$. ● CTR (acqua); ○ EtOH.

4.2.1.1 Effetti del Da-Phen sul consumo giornaliero di EtOH - 3° ciclo di Relapse

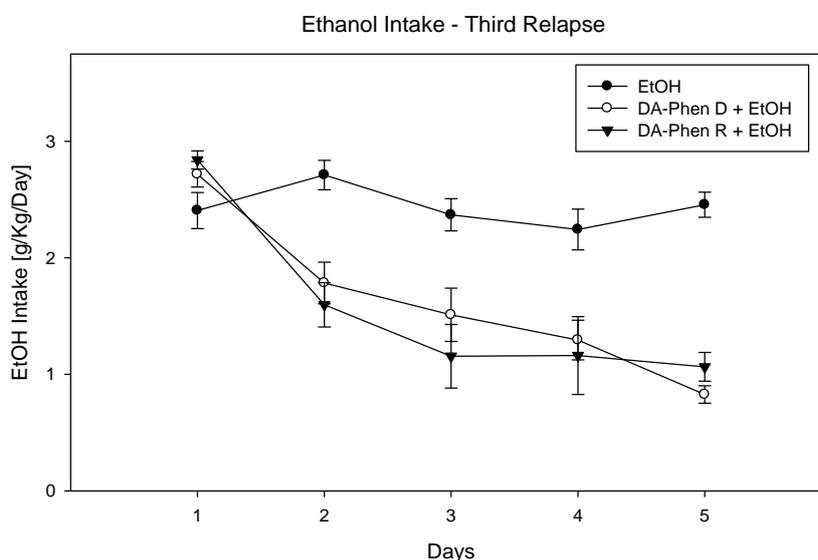


Fig. 25 Andamento del consumo di EtOH nella terza sessione di Relapse-somministrazione DA-Phen-ANOVA a due vie, post hoc HolmSidak per comparazioni multiple,* $p < 0.05$ ●EtOH; ○ DA-PhenD+EtOH; ▼ DA-PhenR+EtOH

Dall'analisi dell'assunzione giornaliera di Etanolo (espressa in g/Kg/giorno) durante il 3° ciclo di Relapse, si evince una diminuzione di circa il 50% nel consumo di EtOH durante il terzo ciclo di Relapse (giorni $F(4,70)=11.176$; $p < 0.001$; trattamento $F(1,70) = 82.018$; $p < 0.001$; interazione $F(4,70)=9.65$; $p < 0.001$). Il post hoc Holm Sidak per comparazioni multiple ha confermato il mantenimento di una complessiva riduzione dell'intake di EtOH a partire dal secondo giorno (terzo Relapse: 1° giorno $t=1.219$; $p=0.227$; 2° giorno $t=4.782$; $p < 0.001$; 3° giorno $t=4.856$; $p < 0.001$; 4° giorno $t=4.757$; $p < 0.001$; 5° giorno $t=7.075$; $p < 0.001$). (Fig.25)

Nessuna differenza significativa è stata riscontrata fra i consumi dei gruppi trattati con DA-Phen durante il terzo ciclo Deprivation/Relapse (Da-Phen D+EtOH; DA-Phen R+EtOH). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nei consumi di acqua fra i gruppi CTR e CTR+Da-Phen.

4.2.1.2 Sessione Di Extinction

Analizzando il numero delle battute sino all'estinzione del comportamento (primi 5 minuti), è stata osservata una sostanziale differenza fra il gruppo EtOH rispetto al gruppo CTR. Raffrontando i dati relativi all'ultimo giorno di Training con i dati della giornata di Extinction, il gruppo EtOH ha fatto registrare un incremento del numero di battute pari al 22% ($t=-2.382$, $df=30$, $p=0.024$). Per il gruppo CTR invece è stato registrato un decremento del numero di battute pari al 23%. ($t=2.016$, $df=14$, $p=0.06$). (Fig.26)

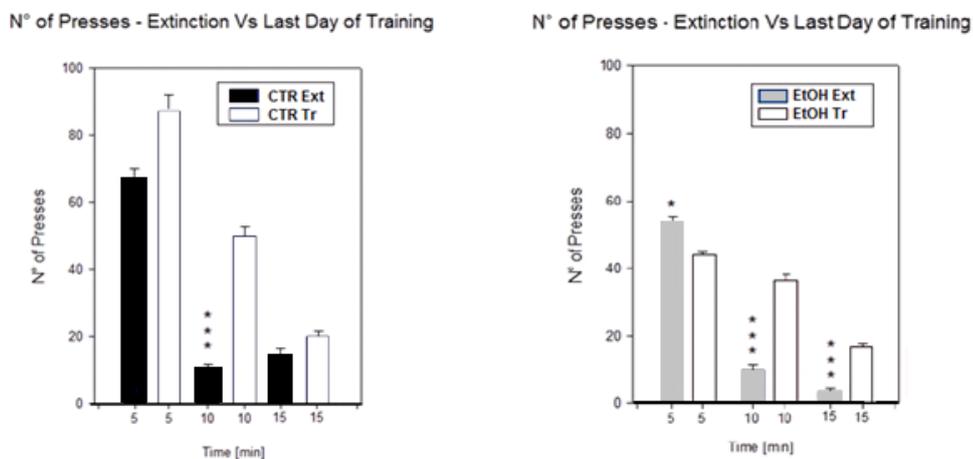


Fig. 26. Numero di lever presses (battute) durante la sessione di Extinction- A. Differenze fra il numero di lever presses nella sessione di Extinction ■ (CTR Ext) e nell'ultimo giorno di Training □ (CTR Tr) per il gruppo CTR – B. Differenze fra il numero di lever presses nella sessione di Extinction ■ (EtOH Ext) e nell'ultimo giorno di Training □ (EtOH Tr) per il gruppo EtOH. Student t-test, * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

Risultati Student t-test (Grafico A.) CTR – Extinction vs Last Day of Training:

CTR Ext vs CTR Tr a 5 min: $df=14$, $t=2.016$, $p=0.06$

CTR Ext vs CTR Tr a 10 min – correzione di Mann-Whitney: $p<0.001$

CTR Ext vs CTR Tr a 15 min – correzione di Mann-Whitney: $p=0.119$

Risultati Student t-test (Grafico B.) - EtOH – Extinction vs Last Training:

EtOH Ext vs EtOH Tr a 5 min: $df=30$, $t=-2.382$, $p=0.024$

EtOH Ext vs EtOH Tr a 10 min – correzione di Mann-Whitney: $p<0.001$

EtOH Ext vs EtOH Tr a 15 min – correzione di Mann-Whitney: $p<0.001$

4.2.2 Risultati Open Field Test

Terzo giorno di Training: il valore di Distanza totale percorsa (TDT) per il gruppo EtOH (n=16) è risultato maggiore di quello registrato per il gruppo CTR (n=8), tuttavia la differenza non è risultata statisticamente significativa ($t=-1.555$; $df=22$; $p=0.134$).

La percentuale di tempo speso al centro dell'arena è stata maggiore per il gruppo EtOH ($t = -2.211$; $df=22$; $p = 0.038$). Nessuna significatività fra i gruppi è stata riscontrata per il numero di passaggi al centro ($t = -1.048$; $df=22$; $p=0.306$).

24 ore di astinenza forzata, prima Deprivation: l'analisi della TDT ha rivelato un significativo incremento in valore nel gruppo EtOH (n=16) rispetto a quanto riscontrato nel gruppo CTR (n=8) ($t=-3.927$; $df=22$; $p<0.001$).

La percentuale di tempo speso al centro è risultata maggiore per il gruppo CTR (Mann Whitney U statistic=25, $p=0.018$). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nell'analisi del numero di passaggi ($t = -1.048$; $df=22$; $p=0.306$). (Fig.27).

24 ore di astinenza forzata, terza Deprivation: L'analisi ANOVA ha evidenziato una differenza statisticamente significativa fra i gruppi [$F(2,23)=12.066$; $p<0.001$].

Il gruppo EtOH ha fatto registrare un valore maggiore per la TDT, mentre il gruppo DA-Phen D+EtOH ha fatto registrare un valore molto simile a quello del gruppo CTR. Il post hoc Tukey ha rivelato una differenza statisticamente significativa tra il gruppo EtOH ed il gruppo CTR ($q=6.892$; $p<0.001$) e tra il gruppo EtOH ed i soggetti trattati con DA-Phen (Da-Phen D+EtOH) ($q=4.205$; $p=0.019$).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata fra il gruppo CTR ed il gruppo DA-Phen D+EtOH ($q=2.687$; $p=0.164$). L'analisi del tempo speso al centro non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa [$F(2,23)=1.231$; $p=0.312$]; così come l'analisi dei passaggi al centro dell'arena [$F(2,23)=0.044$; $p=0.957$]. (Fig. 28)

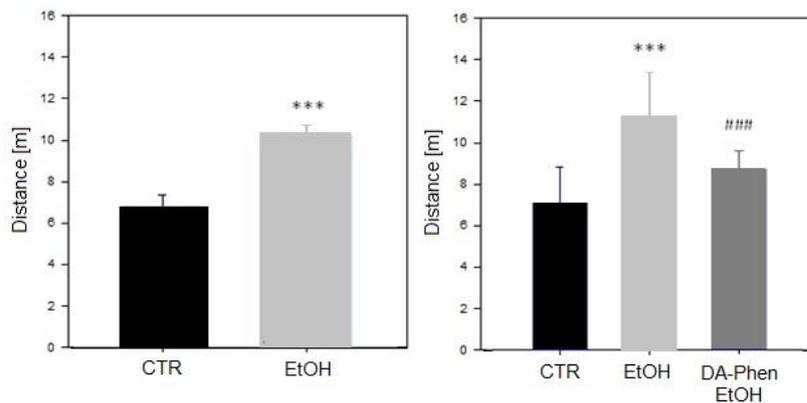


Fig. 27– Distanza. A. Open Field eseguito dopo 24h di astinenza forzata (Prima Deprivation); B. Open Field eseguito dopo 24 ore di astinenza forzata (Terza Deprivation). CTR; EtOH (ratti che hanno assunto EtOH 20%v/v); DA-Phen+EtOH (ratti che hanno assunto EtOH 20%v/v, trattati con DA-Phen). *p<0.05, *p<0.001; ###p<0.001 (# significatività del gruppo DA-Phen+EtOH rispetto al gruppo EtOH).**

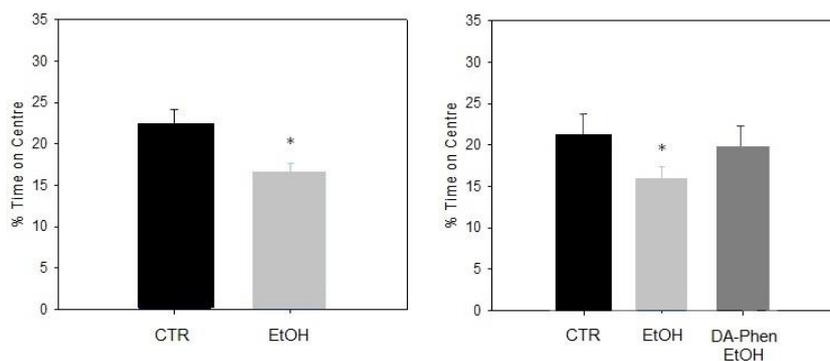


Fig. 28 – Percentuale di tempo speso al centro. A. Open Field eseguito dopo 24h di astinenza forzata (Prima Deprivation); B. Open Field eseguito dopo 24 ore di astinenza forzata (Terza Deprivation). CTR; EtOH (ratti che hanno assunto EtOH 20%v/v); DA-Phen+EtOH (ratti che hanno assunto EtOH 20%v/v, trattati con DA-Phen). *p<0.05.

4.2.3 Risultati Elevated Plus Maze Test

72 ore di astinenza forzata, prima Deprivation: Il gruppo EtOH ha fatto registrare un valore di Head Dippings significativamente più alto del gruppo CTR ($t=-2.542$; $df=22$; $p=0.019$). (Fig.29). Lo stesso trend è stato osservato analizzando la percentuale di tempo speso nel braccio aperto ($t = -2.686$; $df=22$; $p= 0.013$). (Fig. 30) Non è stata osservata alcuna significatività nel numero di passaggi al centro ($t=0.581$; $df=22$; $p=0.567$) (Fig.31), nella velocità media ($t=-1.270$; $df=22$; $p=0.217$), e nella distanza percorsa ($t=-1.863$; $df=22$; $p=0.076$).

72 ore di astinenza forzata, terza Deprivation: Come nella prima Deprivation, Il gruppo EtOH ha fatto registrar un valore maggiore di Head Dippings nel gruppo EtOH rispetto al gruppo CTR, ed anche rispetto al gruppo Da-Phen+EtOH [F(2,23)=32.765; p=0.001]. (Fig. 29)

Il post hoc Tukey ha mostrato una differenza statisticamente significativa fra il gruppo EtOH ed il gruppo CTR (t= 5.521; p<0.001) e tra il gruppo EtOH ed il gruppo DA-Phen+EtOH (t=7.888; p<0.001). Una significatività è stata registrata anche fra i gruppi CTR e DA-Phen+EtOH (t=2.366; p=0.028). Inoltre, il gruppo EtOH ha fatto registrare un valore più alto di percentuale di tempo speso nel braccio aperto [F(2,23)=3.584; p=0.046]. (Fig. 30)

Il post Hoc Tukey ha evidenziato una significatività fra i gruppi EtOH e DA-Phen+EtOH (t=2.604; p=0.017), ma non fra i gruppi EtOH e CTR (t=0.763; p=0.454), e tra i gruppi DA-Phen+EtOH e CTR (t=1.841; p=0.080).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per il numero di line crossings [F(2,23)=4.259; p=0.119] (Fig. 31), per la velocità media [F(2,23)=0.728; p=0.495] e la distanza percorsa [F(2,23)=1.879; p=0.178].

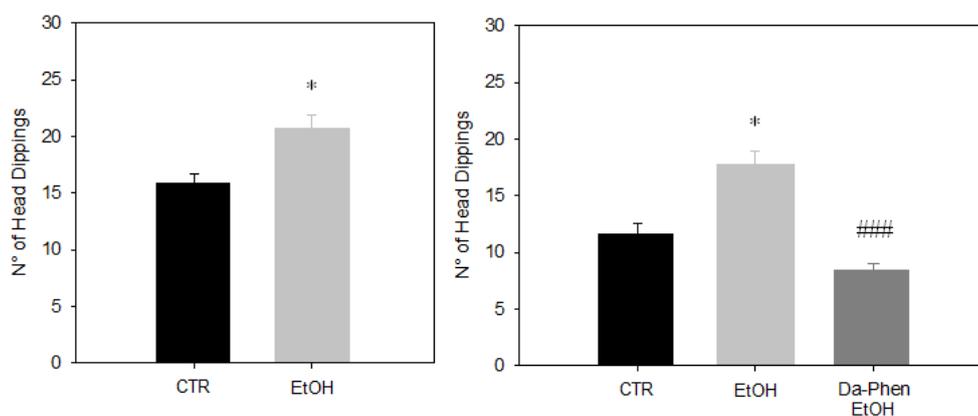


Fig. 29 – N° di Head Dippings. A. Elevated Plus Maze eseguito a 72 ore di Astinenza forzata (Prima Deprivation); B. Elevated Plus Maze eseguito a 24 ore di Astinenza forzata (Terza Deprivation). CTR; EtOH (ratti esposti ad Etanolo 20%v/v); DA-Phen EtOH (Etanolo 20%v/v e trattati con DA-Phen), *p<0.05 (Significatività di EtOH rispetto CTR), ###p<0.001 (significatività di DA-Phen EtOH rispetto a EtOH).

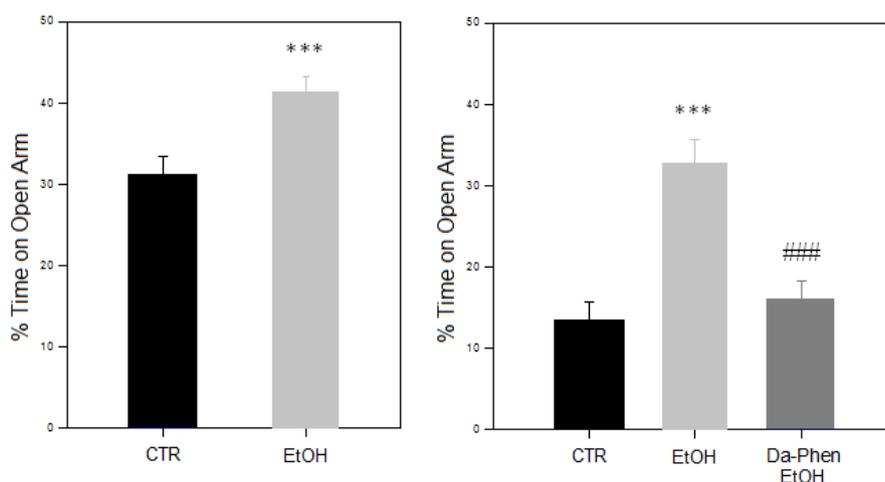


Fig. 30 – Percentuale di tempo speso nel braccio aperto. A. Elevated Plus Maze eseguito a 72 ore di Astinenza forzata (Prima Deprivation); B. Elevated Plus Maze eseguito a 24 ore di Astinenza forzata (Terza Deprivation). CTR; EtOH (ratti esposti ad Etanolo 20%v/v); DA-Phen EtOH (Etanolo 20%v/v e trattati con DA-Phen), * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ (Significatività di EtOH rispetto CTR); # $p < 0.05$, ### $p < 0.05$ (significatività di DA-Phen EtOH rispetto a EtOH).**

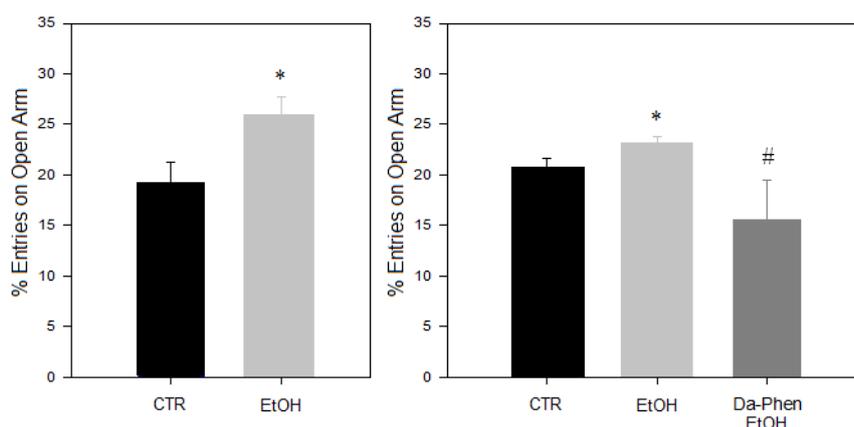


Fig.31 – Percentuale di ingressi nel braccio aperto. A. Elevated Plus Maze eseguito a 72 ore di Astinenza forzata (Prima Deprivation); B. Elevated Plus Maze eseguito a 24 ore di Astinenza forzata (Terza Deprivation). CTR; EtOH (ratti esposti ad Etanolo 20%v/v); DA-Phen EtOH (Etanolo 20%v/v e trattati con DA-Phen), * $p < 0.05$ (Significatività di EtOH rispetto CTR), # $p < 0.05$ (significatività di DA-Phen EtOH rispetto a EtOH).

4.2.4 Variazione ponderale

Dall'analisi complessiva dei dati relativi agli incrementi di peso dei ratti, si evince che i ratti che hanno assunto EtOH hanno avuto un *rate* di incremento ponderale inferiore rispetto ai ratti del gruppo CTR, in particolare durante le sessioni di Training e di Relapse. Un significativo incremento del *rate* è stato

osservato durante le sessioni di Deprivation nei ratti che hanno assunto EtOH. Il trattamento con DA-Phen non ha inficiato sul *rate* di incremento ponderale dei ratti trattati. (Fig. 32)

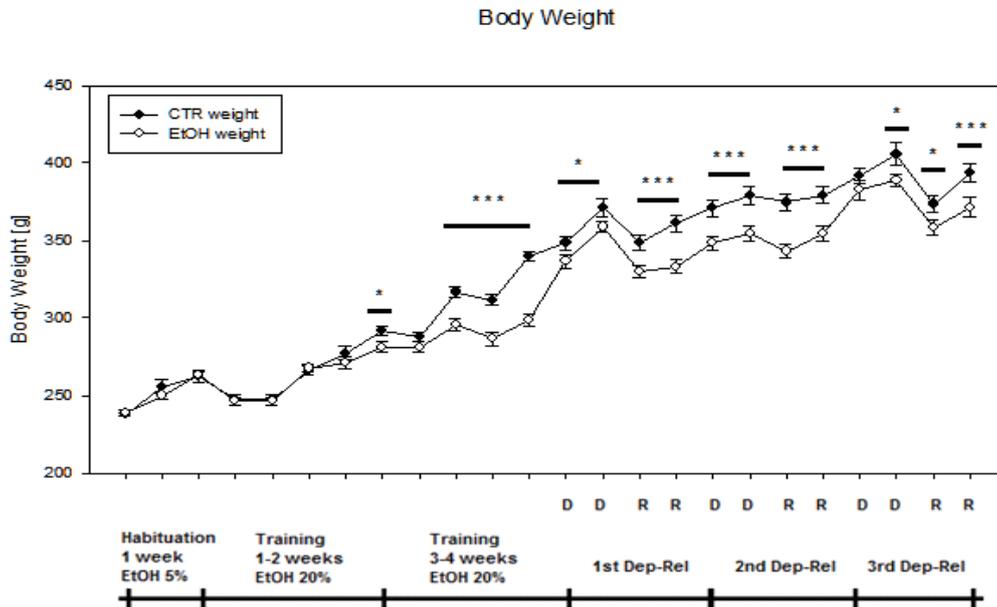


Fig.32 Variazione del peso corporeo, ANOVA a due vie, post hoc Holm Sidak, * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$. ● CTR (acqua); ○ EtOH (EtOH 20%v/v).

4.3 Analisi degli organi target/non target dei ratti

4.3.1 Valutazione dell'uptake di DA-Phen nei principali organi target/non target quali cervello, plasma, fegato, reni, milza, in seguito all'applicazione del Primo Design Sperimentale

La tabella 3, di seguito riportata, mostra i risultati inerenti l'analisi in triplicato di campioni di omogenato provenienti da ratti maschi Wistar sottoposti alla batteria comportamentale del primo design sperimentale.

I risultati sono stati espressi come Media \pm SD per campioni relativi al gruppo analizzato e indicato. Il valore di Media \pm SD per il gruppo DA-Phen, è dato da N=9, visto che la quantità di DA-Phen riscontrata nei campioni appartenenti al gruppo di ratti sacrificati secondo la procedura 1 è del tutto equiparabile a quella dei ratti sacrificati mediante perfusione con soluzione fisiologica 0.9%NaCl

(procedura 2). Per la determinazione quantitativa di DA-Phen nel plasma dei ratti trattati, il numero dei campioni analizzati è N=5.

Gruppi	Cerebro (µg/g)	Fegato (µg/g)	Plasma (µg/g)	Rene (µg/g)	Milza (µg/g)
CTR	/	/	/	/	/
DA-Phen	0.094±0.014	0.112±0.006	0.238±0.023	0.746±0.052	0.412±0.043

Tabella 3. Determinazione quantitativa del DA-Phen nei vari organi di ratti maschi Wistar sottoposti al primo Design sperimentale. La quantità di DA-Phen è stata espressa come µg per grammo di tessuto analizzato.

4.3.2 Valutazione dell'uptake di DA-Phen nei principali organi target/non target cervello, plasma, fegato, reni, milza, in seguito all'applicazione del Secondo Design Sperimentale.

Le tabelle 4 e 5, di seguito riportate, mostrano i risultati inerenti l'analisi in triplicato di campioni di omogenato provenienti da ratti maschi Wistar sottoposti al protocollo di condizionamento operante precedentemente descritto (Secondo Design Sperimentale). I risultati sono stati espressi come Media ± SD per campioni relativi al gruppo analizzato e indicato.

Gruppi	Cerebro (µg/g)	Fegato (µg/g)	Plasma (µg/g)	Rene (µg/g)	Milza (µg/g)
CTR	/	/	/	/	/
CTR+ DA-Phen	0.101±0.008	0.138±0.006	0.223±0.065	0.806±0.088	0.432±0.035
EtOH	/	/	/	/	/
EtOH+ DA-Phen D	0.116±0.009	0.042±0.002	0.066±0.005	0.063±0.005	0.465±0.040
EtOH+ DA-Phen R	0.568±0.005	0.134±0.010	0.014±0.001	0.170±0.079	0.079±0.005

Tabella 4. Determinazione quantitativa del DA-Phen in organi di ratti maschi Wistar sottoposti al Secondo Design Sperimentale. La quantità di DA-Phen è stata espressa come µg per grammo di tessuto analizzato.

Dall'analisi si evince che il DA-Phen presenta un minimo up-take aspecifico in tessuti normali dell'organismo, quali fegato, milza, rene. Una frazione libera viene riscontrata anche nel plasma.

E' stata inoltre effettuata una determinazione quantitativa dell'ACD in campioni di cervello e fegato mediante analisi HPLC, operando una derivatizzazione dell'ACD con 2,4-dinitro-fenil-idrazina (DNPH) (Mao et al, 2010). L'ACD è stata identificata come picco del derivato ACD-DNP e quantificata per mezzo di una opportuna curva di calibrazione effettuata utilizzando soluzioni standard di ACD-DNP. In Tabella 5 sono riportati i valori di ACD riscontrati nei campioni sia di cervello che di fegato dei ratti maschi Wistar sottoposti al Secondo Design Sperimentale.

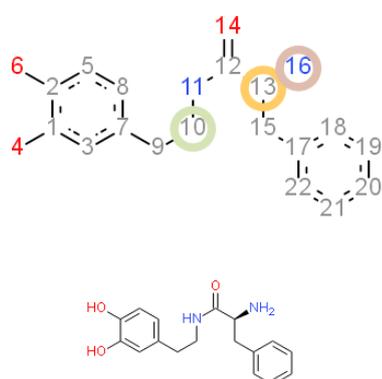
Gruppi sperimentali	Cerebro	Fegato
CTR	23.50±3.70	2.20±0.60
CTR+DA-Phen	20.64±1.90	1.90±0.50
EtOH	30.28±2.80	3.20±0.60
EtOH+DA-Phen D	25.24±1.30	2.25±0.40
EtOH+DA-phen R	24.74±2.30	2.60±0.50

Tabella 5. Determinazione quantitativa di ACD in organi di ratti maschi Wistar sottoposti al Secondo Design Sperimentale. La quantità di ACD è stata espressa come µg per grammo di tessuto analizzato.

4.4 Risultati dell'analisi SMARTCyp per la predizione del metabolismo in vivo di DA-Phen

In seguito ad elaborazione mediante software SMARTCYP, mediante l'ausilio degli algoritmi precedentemente descritti, (The SMARTCyp cytochrome P450 metabolism prediction server) risulta che il DA-Phen può subire tre principali tipi di lisi molecolare per ogni tipo di analisi effettuata. In particolare, applicando l'algoritmo Standard, DA-Phen ha un'alta probabilità di subire scissione enzimatica a livello del C10, del C13 e dell'eteroatomo N (posizione 16). Applicando l'algoritmo CYP2C, il DA-Phen registra uno scoring di scissione per le posizioni C10, C13 e C 20. Infine, mediante l'ultima tipologia di algoritmo, DA-Phen evidenzia uno scoring di scissione per le posizioni C5, C8 e C20.

Risultati relativi all'applicazione dell'algoritmo di tipo Standard (Tab.6)

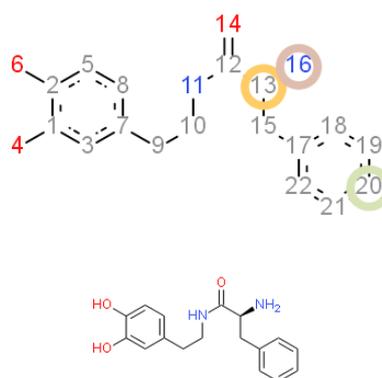


Standard CYP2C CYP2D6

1: Molecule from ChemDoodle Web Components

Rank	Atom	Score	Energy	Accessibility	2DSASA
1	C.13	35.61	41.1	0.64	8.72
2	N.16	46.68	54.1	0.71	42.52
3	C.10	58.33	63.9	0.57	24.91
4	C.15	59.9	66.4	0.71	19.7
5	C.9	60.28	66.4	0.64	24.41
6	C.8	66.72	74.1	0.79	27.46
7	C.5	69.17	77.2	0.86	29.43
8	C.3	69.9	77.2	0.79	25.31
9	C.20	76.85	86.3	1	36.24
10	C.19	77.5	86.3	0.93	34.32
11	C.18	78.27	86.3	0.86	29.38
12	N.11	85.16	89.6	0.5	10.99
13	C.2	991.31999	0.93	6.54	
14	C.1	991.89999	0.86	6.22	
15	C.17	992.55999	0.79	3.99	
16	C.7	993.13999	0.71	3.99	
17	C.12	994.23999	0.57	4.87	

Risultati relativi all'applicazione dell'algoritmo di tipo CYP2C (Tab.7)

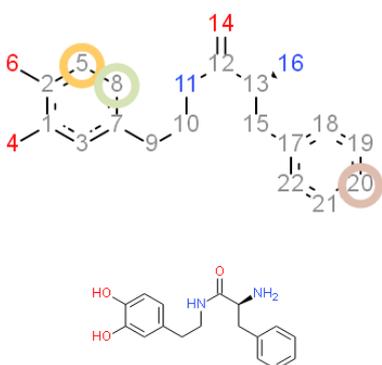


Standard CYP2C CYP2D6

1: Molecule from ChemDoodle Web Components

Rank	Atom	Score	Energy	S2End	COODist	2DSASA
1	C.13	64.4	41.1	5	-	8.72
2	N.16	76.04	54.1	4	-	42.52
3	C.20	84.85	86.3	0	-	36.24
4	C.10	86.56	63.9	6	-	24.91
5	C.5	87.82	77.2	2	-	29.43
6	C.9	89.07	66.4	5	-	24.41
7	C.15	89.25	66.4	4	-	19.7
8	C.8	90.7	74.1	3	-	27.46
9	C.19	90.83	86.3	1	-	34.32
10	C.3	93.89	77.2	3	-	25.31
11	C.18	96.92	86.3	2	-	29.38
12	N.11	112.83	89.6	7	-	10.99
13	C.2	1,004.64999	1	-	6.54	
14	C.1	1,010.55999	2	-	6.22	
15	C.17	1,016.54999	3	-	3.99	
16	C.12	1,022.47999	6	-	4.87	
17	C.7	1,022.48999	4	-	3.99	

Risultati relativi all'applicazione dell'algoritmo di tipo CYP2D6 (Tab.8)



Standard CYP2C CYP2D6

1: Molecule from ChemDoodle Web Components

Rank	Atom	Score	Energy	S2End	N+Dist	2DSASA
1	C.5	89.42	77.2	2	8	29.43
2	C.20	98.25	86.3	0	6	36.24
3	C.8	99.8	74.1	3	7	27.46
4	C.3	102.99	77.2	3	7	25.31
5	C.19	111.73	86.3	1	5	34.32
6	C.9	112.37	66.4	5	5	24.41
7	C.13	114.5	41.1	5	1	8.72
8	C.10	116.56	63.9	6	4	24.91
9	C.18	125.32	86.3	2	4	29.38
10	C.15	132.65	66.4	4	2	19.7
11	N.16	132.84	54.1	4	0	42.52
12	N.11	149.53	89.6	7	3	10.99
13	C.2	1,005.44999	1	9	6.54	
14	C.1	1,012.15999	2	8	6.22	
15	C.7	1,039.08999	4	6	3.99	
16	C.17	1,052.44999	3	3	3.99	
17	C.12	1,065.87999	6	2	4.87	

4.5 In silico Modeling (in collaborazione con Dr. Marco Tutone e Prof. Anna Maria Almerico)

4.5.1 Preparazione del modello proteico

L'esame del Ramachandran plot mediante il software RAMPAGE (Benkert et al, 2008, 2009, 2011), ha fornito una significativa evidenza della robustezza del modello proposto (il 93.35% dei residui ricade nelle regioni favorite, il 4.3% dei residui in regioni consentite e solo il 2.5% dei residui in regioni non consentite o sfavorite).

4.5.2 Site Mapping

Dall'analisi mediante Site Mapping è risultato che il DA-Phen ha ottenuto un punteggio SiteScore maggiore di 1 per tre potenziali siti di binding, indicando una promettente interazione per 3 tipologie di siti recettoriali *D1-like/D2-like*.

Il "numero dei punti del sito" che costituiscono l'area di riferimento, offre una stima delle dimensioni del sito considerato. I parametri di Exposure ed Enclosure (rispettivamente indicativi del grado di esposizione e di ripiegamento del sito) forniscono diverse informazioni sul grado di esposizione del sito al solvente biologico. La proprietà di contatto misura quanto sia forte l'interazione media fra i punti caratteristici del sito con il recettore circostante, sfruttando le sole forze di interazione di tipo van der Waals. I parametri di idrofilia e idrofobia, insieme alla stima dei siti in grado di acquisire o cedere elettroni (donor-acceptor scores) forniscono ulteriori informazioni sul grado di interazione (Tab.9).

	SiteScore	Size	DScore	Volume	Exposure	Enclosure	Contact	Phobic	Philic	Balance	Don/Acc
Site 1	1.026	458	1.051	1139.446	0.555	0.722	0.933	0.987	0.988	0.999	1.057
Site 2	1.010	128	0.939	347.116	0.613	0.714	0.995	0.265	1.316	0.202	1.139
Site 3	1.009	98	0.875	208.887	0.497	0.722	0.997	0.107	1.500	0.071	0.937
Site 4	0.771	36	0.735	91.924	0.621	0.730	1.049	1.630	0.819	1.989	5.843
Site 5	0.706	51	0.684	118.335	0.736	0.555	0.681	0.344	0.983	0.350	0.266

Tabella 9. Valori di SiteScore, DScore, Exposure/Enclosure, Idrofobia ed Idrofilia ottenuti per i cinque siti di potenziale Binding di DA-Phen.

In questo studio sono stati identificati 5 potenziali siti di binding, ma solo uno di questi mostra un Dscore maggiore di 1. I valori di Exposure/enclosure mostrano un grado di interazione nella media, con una piccola prevalenza di siti donatori di elettroni, ed una distribuzione bilanciata delle regioni idrofiliche ed idrofobiche. (Fig.33)

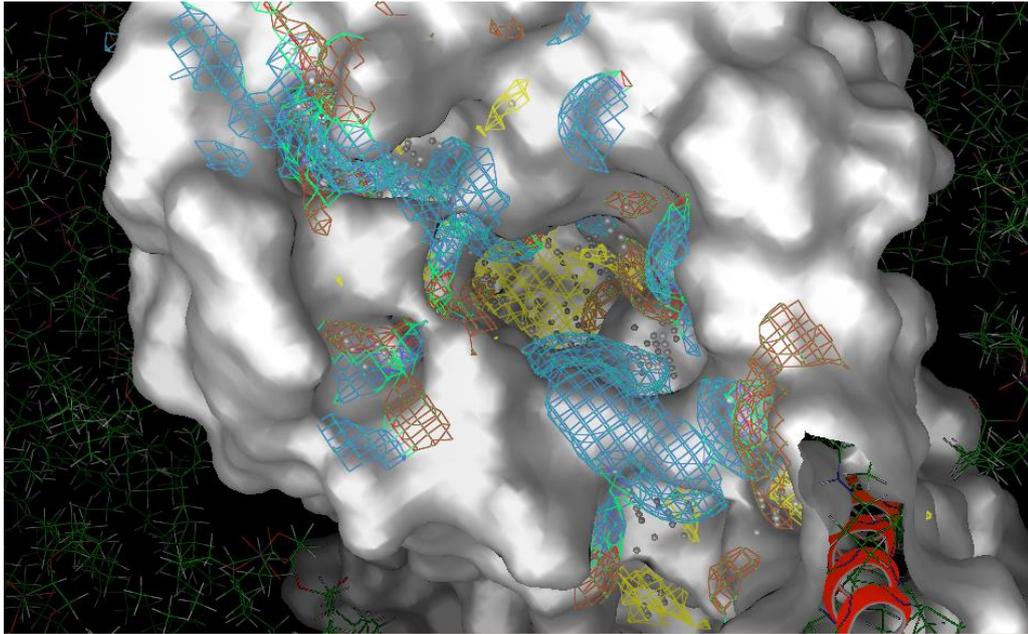


Fig.33. Sito di Binding Identificato. L'immagine si riferisce al lato extracellulare della membrana - In giallo sono evidenziate le regioni idrofobiche, in verde le regioni idrofile, in azzurro-ciano le regioni H-donor, in rosso le regioni H-Acceptor. La matrice solida in grigio indica il recettore D1 immerso nel bilayer lipidico.

4.5.3 Molecular Docking

L'analisi di docking ha rivelato l'interazione del DA-Phen con la tasca recettoriale profonda del sito di binding identificato. Le interazioni che si sviluppano tra la piccola molecola ed i residui della tasca sono molto diversificate. Innanzitutto, il DA-Phen genera 4 legami H: due attraverso i gruppi ossidrilici del catecolo col residuo Asp295, il terzo attraverso il gruppo aminico NH₂ ed il gruppo carbonilico del residuo Val81, ed il quarto attraverso l'Ossigeno carbonilico dell'è-amino gruppo di Lys62. Quest'ultimo residuo è coinvolto nell'interazione idrofobica con il fenile. La moiety fenilica interagisce, allo stesso tempo, con Phe269 e Trp266. Inoltre l'anello catecolico stabilisce un legame con

Phe294, che fornisce un'ulteriore stabilizzazione della molecola di DA-Phen. Altri residui coinvolti nell'interazione con la tasca recettoriale riflettono le proprietà del sito in funzione della mappatura recettoriale, con una piccola prevalenza di residui idrofobici. (Figure 34, 35, 36)

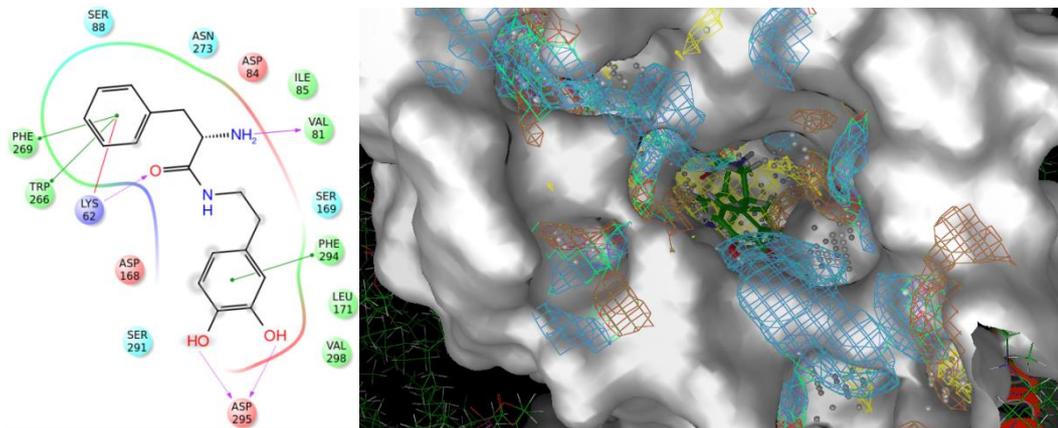


Figure 34, 35. Docking del DA-Phen all'interno del binding site del recettore D1, In giallo sono evidenziate le regioni idrofobiche, in verde le regioni idrofile, in azzurro-ciano le regioni H-donor, in rosso le regioni H-Acceptor. La matrice solida in grigio indica il recettore D1 immerso nel bilayer lipidico.

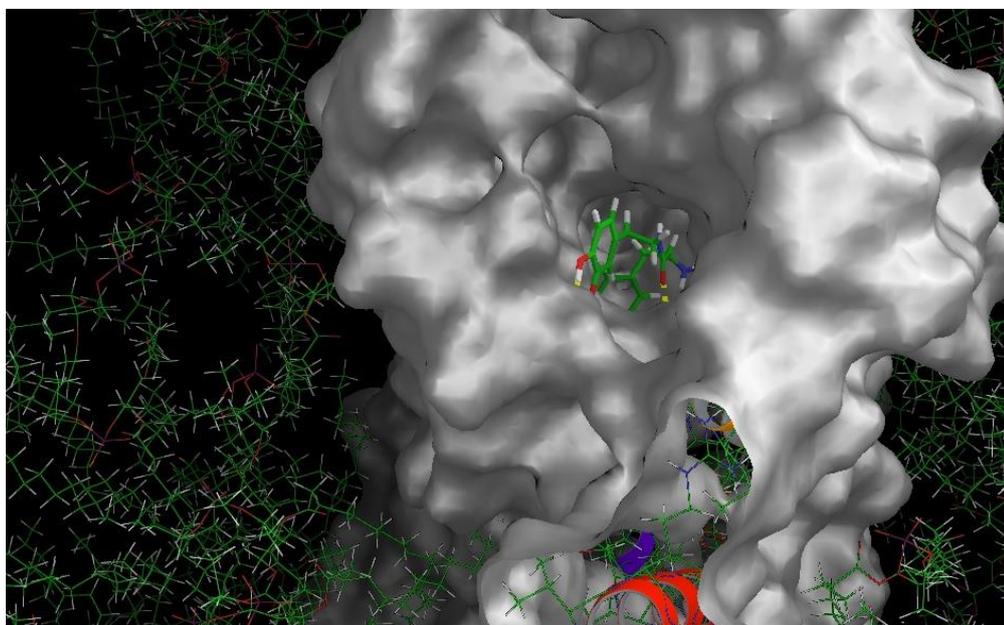


Fig. 36. Docking del DA-Phen all'interno del binding site del recettore D1.

5. Discussione

5.1 Valutazione della reattività comportamentale indotta dalla somministrazione di DA-Phen

5.1.1 Open Field

E' noto che i recettori D1-like giocano un ruolo essenziale negli effetti motori provocati da farmaci stimolanti (Xu et al.,1994). Studi neuro-anatomici hanno dimostrato che i recettori dopaminergici D1 sono localizzati a livello post-sinaptico nello striato ed altri nuclei della base (Bathia and Marsden, 1994). Nei roditori, i circuiti dopaminergici mesostriatale e mesolimbico partecipano al controllo del movimento spontaneo mediato dai recettori dopaminergici (Le Moal, 1995). In particolare, la via discendente che dal Nac, attraverso il pallido ventrale, raggiunge la regione motoria mesencefalica, costituisce un importante collegamento fra le regioni limbiche e motorie (Messier et al, 1991 A, B).

Dall'analisi della Distanza Totale Percorsa (Total Distance Travelled, TDT), si evince che i ratti trattati con DA-Phen, rispetto al gruppo CTR presentano una generica diminuzione dell' *explorative drive*, tranne che per DA-Phen 0.1 mmol/Kg a 6 ore, 0.03mmol/Kg a 30 min e 0.01mmol/Kg a 2 ore, in cui si osserva un comportamento sovrapponibile a quello del gruppo CTR. Diversi studi mirati alla valutazione della reattività comportamentale nel ratto, in seguito alla somministrazione di antagonisti dopaminergici, quali SCH23390 (antagonista selettivo D1), Raclopride ed Eticlopride (antagonisti selettivi D2), mostrano un lieve decremento dell'attività locomotoria ed esplorativa rispetto ai valori basali. Sostanze dopaminomimetiche, quali Quinpirolo (agonista di tipo D2) (Schindler e Carmona, 2002) e Terguride (agonista parziale D2) (Mc Dougall et al, 2005) mostrano ugualmente un decremento dei valori di TDT rispetto ai livelli basali, mentre in alcuni casi si osserva un lieve incremento della TDT in seguito a

somministrazione i.p. di SFK82958 (agonista selettivo D1) (Schindler e Carmona, 2002).

I dati relativi alla percentuale di tempo speso nella zona interna mostrano, rispetto al gruppo CTR, una generica diminuzione dell'attività esplorativa per tutte le dosi ad un tempo di osservazione pari a due ore. A trenta minuti dalla somministrazione non si nota alcuna variazione significativa rispetto al gruppo CTR, mentre a sei ore permane un effetto depressorio per le dosi di 0.03 e 0.1 mmol/Kg. Alla dose di 0.01mmol/Kg si osserva un'attività che si attesta ad un valore sovrapponibile a quello del gruppo CTR.

Anche il numero di line crossing segue un trend ed una significatività sovrapponibile rispetto a quanto visto per l'analisi della percentuale di tempo speso al centro, mentre non risulta significativamente differente la velocità media dei ratti trattati sottoposti al maze rispetto ai ratti del gruppo CTR.

In uno studio condotto da Heijtz e collaboratori viene dimostrato come, in animali da esperimento *naïve*, mai sottoposti ad alcun tipo di maze, né tantomeno ad alcun trattamento, la somministrazione di agonisti dopaminergici produca una inibizione parziale dell'attività locomotoria (Heijtz et al, 2002).

Questo perché in seguito alla somministrazione ripetuta di dopamino-agonisti, si viene a creare una "*low baseline condition*", in quanto gli animali trattati tendono ad "abituarsi" alle condizioni imposte dal test previsto. È stato ampiamente dimostrato che sia l'uomo che gli animali da esperimento, quando vengono somministrati farmaci in grado di innescare delle modifiche dell'attività locomotoria, sono fortemente dipendenti dall'attività basale individuale (Robbins e Roberts, 2007).

L'aumento dell'attività locomotoria in seguito a somministrazione di D1 agonisti, come riportato in letteratura per SFK82958 (Schindler e Carmona, 2002), è da associare quindi ad una presentazione ripetuta del maze verso i ratti trattati. Salmi e Ahlenius hanno altresì dimostrato che il composto A 68930 ((1R,3S)-1-aminometil-5,6-diidrossi-3-fenilisocroman HCl), un agonista selettivo D1, produce un effetto sedativo sulla locomozione spontanea in ratti maschi sottoposti all'Open Field Test, diversamente da quanto si otterrebbe in seguito ad una presentazione ripetuta del medesimo maze. Tutte le osservazioni fin qui

proposte, globalmente, permettono di concludere che gli effetti inibitori degli agonisti dei recettori *D1-like* sono spesso rilevabili solo nel caso in cui i ratti testati abbiano una *high baseline activity* (alta attività basale, dovuta alla prima presentazione del maze) e non una *low baseline activity* (Salmi e Ahlenius, 2000).

È stato comprovato il binding di SKF-81297 per i recettori dopaminergici dell'area mediale della corteccia prefrontale, così come per i recettori dopaminergici dello striato ventrale (Heijtz et al, 2002): ciò giustifica ulteriormente la depressione dell'attività locomotoria e/o dell'*explorative drive* dovuta ad un'azione agonista nei confronti dei recettori dopaminergici.

In ratti adulti, gli autorecettori *D2-like* sono stimolati dagli agonisti parziali (Meller et al, 1987; Burris et al, 2002), mentre i recettori *D2-like* postsinaptici sono tipicamente antagonizzati dagli agonisti parziali (Burris et al, 2002).

Se gli agonisti parziali *D2-like* si presume abbiano il ruolo di antagonisti sui recettori postsinaptici *D2-like* normo-sensibili, non ci sorprende che DA-Phen, in virtù di un potenziale agonismo D1/D2, deprima l'attività esplorativa rispetto al gruppo CTR a determinati tempi di osservazione e per specifiche dosi.

Così come evidenziato per SKF-81297 e Terguride, DA-Phen potrebbe agire rispettivamente come agonista D1 e come agonista parziale D2 (con azione antagonistica) sui recettori postsinaptici durante gli stati di alto tono dopaminergico, mentre potrebbe agire da agonista degli stessi recettori quando il tono dopaminergico risulta basso o quando il livello del neurotrasmettitore DA rientri nel range basale (Sanders et al, 2005).

Il trend dei risultati ottenuti, nel complesso, potrebbe indicare un possibile agonismo parziale D2, oltre che un agonismo D1 : d'altronde, l'effetto di contrapposizione D1/D2 è assente nel Nac (Stoof e Verheijden, 1986), che è l'area in cui si esplicano gli effetti locomotori delle sostanze testate.

5.1.2 Elevated Plus Maze

Handley e Mithani originariamente svilupparono questo test come possibile modello animale di ansia non condizionato e basato sul conflitto *approach/avoidance* (Handley e Mithani, 1984) che si genera nel ratto quando

viene inserito nel maze. Negli animali l'ansia induce un'inibizione comportamentale che si evidenzia in una minore motilità accompagnata da uno stato di continua attenzione, ma soprattutto in una marcata inattività esploratoria e quindi un disinteresse verso tutto ciò che non rassicura l'animale nella nuova situazione nella quale si viene a trovare. E' proprio sulla base di questi parametri che sono stati messi a punto dei tests che stimolano e valutano il grado di ansietà dell'animale. Per questo l'EPM è molto utilizzato sia per studiare i siti (Gonzalez e File, 1997) e i meccanismi (Pellow et al, 1985; Pellow e File, 1986; Cortese e Phan, 2005) coinvolti nella genesi dell'ansia, che per studiare l'effetto ansiolitico di composti benzodiazepinici o simili. È stato dimostrato che molecole ansiogeniche riducono il tempo speso nel braccio aperto mentre molecole ad attività ansiolitica aumentano il tempo speso nel braccio aperto e riducono invece quello speso nel braccio chiuso (Lapin, 1995).

Generalmente, il rapporto tra entrate nel braccio aperto ed entrate totali, viene utilizzato per stabilire l'effetto del composto sui livelli di ansia, mentre il numero di entrate totali riflette la generale attività locomotoria (Pellow et al, 1985). Il comportamento *anxiety-like* è strettamente correlato all'attività dell'amigdala. Essa presenta recettori dopaminergici che svolgono un ruolo cruciale nelle reazioni agli stimoli ambientali, legate a stati ansiogeni (Sullivan et al, 2009).

In letteratura è riportato che la somministrazione intracerebro-ventricolare di differenti dosi di SCH23390 (Antagonista dei recettori D1) o della Sulpiride (Antagonista dei recettori D2) non causa alcuna variazione significativa della percentuale di tempo speso nel braccio aperto, o della percentuale di ingressi nel braccio aperto, e neppure dell'attività locomotoria in ratti maschi sottoposti ad EPM (de la Mora et al, 2010; 2012). Uno studio condotto da Rezayof e collaboratori mostra che la somministrazione sistemica di SCH23390 non ha considerevoli effetti sulla reattività comportamentale legata all'ansia (Rezayof et al, 2009; Rodgers et al, 1994). La somministrazione sistemica di Sulpiride invece è in grado di incrementare lo stato di ansia (Simon et al, 1992). Esistono evidenze sperimentali dalle quali si evince che la microiniezione bilaterale nell'amigdala di alte dosi di SCH23390 (3µg/ratto) causa una diminuzione dell'ansia generata da stati di potenziato allarme (Lamont e Kokkonidis, 1998); e che la

somministrazione per microiniezioni intra-amigdaloidee dell'antagonista a basse dosi (30 and 120 ng/ratto) esplica un effetto ansiolitico nel white/black box test (de la Mora et al, 2005).

La DA, a livello del nucleo basolaterale amigdaloideo (BLA), dovrebbe innescare risposte in grado di facilitare l'attenzione verso uno stimolo saliente, ed in grado di evitare una potenziale minaccia evocata da un preciso stimolo, il quale potrebbe essere, senza dubbio, il braccio aperto dell'EPM. E' intuitivo supporre che, in presenza di uno stato di presunta diminuzione della trasmissione dopaminergica nel BLA, l'*avoidance* verso il braccio aperto del maze sia significativamente ridotta (Sullivan et al, 2009). Tale supposizione è coerente con l'osservazione sperimentale che l'iniezione intra-amigdaloidea di antagonisti D1 generi un effetto ansiolitico (Sullivan et al, 2009).

I risultati ottenuti nel presente lavoro possono essere spiegati ponendo in analogia l'effetto bifasico sull'attività locomotoria degli agonisti D1 (SKF-81297), con gli stati d'ansia-correlati, in virtù della presenza di due distinte popolazioni recettoriali D1-like, che esercitano effetti opposti nella coordinazione del movimento e, di riflesso, sulle reazioni legate ad un *anxiety-like behaviour* nel ratto (Lamont e Kokkinidis, 1998; Lecca et al, 2007; Legault e Wise, 2001; Li et al, 2003)

Globalmente, la percentuale di ingressi nel braccio aperto e la percentuale di tempo speso nel braccio aperto mostrano un andamento "a campana", sia per DA-Phen 0.03mmol/Kg che per DA-Phen 0.01mmol/kg, ad indicare che a queste dosi, l'effetto massimo di DA-Phen si esplica mediamente dopo un tempo pari a due ore dalla somministrazione. Alla dose di 0.1 mmol/Kg e per i parametri considerati, DA-Phen è in grado di indurre una marcata diminuzione dell'*anxiety like behaviour* per tutti i tempi di osservazione e per tutti i parametri considerati.

I risultati complessivamente sembrerebbero in accordo con l'ipotesi di agonismo dopaminergico del DA-Phen, poiché i valori ottenuti, assimilabili a quelli registrati durante il basale, possono essere spiegati dal fatto che gli agonisti dopaminergici non hanno un'attività diretta come antidepressivi o ansiolitici (Pellow e File, 1986), mentre la diminuzione che avviene in taluni casi, potrebbe essere il risultato di una potenziale "influenza" del coniugato ivi testato sulla

trasmissione serotonergica, visto che è stata dimostrata una stretta correlazione tra i circuiti dopaminergici e quelli serotonergici a livello ippocampale (Robinson et al, 2008; Robinson e Berridge, 1993; Rodgers et al, 1994).

Gli head dippings costituiscono un parametro comportamentale caratteristico di questo tipo di maze, e dal quale si evince l'attività esploratoria del ratto (Hoshino et al, 2004)

Il risultato maggiormente significativo è quello riscontrato per DA-Phen 0.03 mmol/Kg, t=2h, in cui i ratti hanno dato un valore medio di circa 20 Head Dippings per trial (il gruppo CTR ha fatto registrare un valore di Head Dippings pari al 50% circa del gruppo trattato). Considerevoli sono stati i risultati ottenuti anche per DA-Phen 0.1 mmol/Kg, t=30 min e t=360min; DA-Phen 0.01 mmol/Kg, t=120 min. Gli Head Dippings indicherebbero, a conferma dell'ipotesi inizialmente avanzata in merito ad un potenziale agonismo D1 associato a un parziale agonismo D2 di DA-Phen, il carattere dopaminomimetico del coniugato testato.

5.1.3 Forced Swimming Test

Il Forced Swimming Test (FST), originariamente proposto come “*behavioural despair test*” (Porsolt et al, 1977; 1978), è il modello animale più utilizzato per lo screening dei farmaci antidepressivi, e consiste nell’immergere i ratti (o topi) in un cilindro pieno d’acqua dal quale è impossibile scappare. Gli animali rispondono inizialmente con una attività vigorosa che consiste nel cercare di arrampicarsi alle pareti del cilindro, nel nuotare e nell’immergersi. Questi comportamenti possono essere interpretati come tentativi di fuga (Cryan et al, 2005). Successivamente, il livello di attività declina e gli animali compiono solamente i movimenti necessari per tenere la testa al di sopra del livello dell’acqua. Quando gli animali vengono testati 24 ore dopo, si osserva una riduzione del livello di attività. A livello comportamentale, il FST potrebbe essere interpretato come una condizione sperimentale dove gli animali devono fare un bilancio tra i rischi e i benefici raggiungibili con due strategie alternative: comportamento attivo, che può portare alla fuga ma che comporta il rischio di esaurimento delle forze; un comportamento di immobilità, che può prolungare la

sopravvivenza ma può portare, in mancanza di soccorso, ad annegamento (Cryan et al, 2005; Salamone et al, 2009). Così, il passaggio da una infruttuosa strategia di iperattività a un comportamento passivo potrebbe essere considerato come una risposta adattativa finalizzata ad aumentare le probabilità di sopravvivenza (Cryan et al. 2005).

La procedura classica (Porsolt et al, 1997;1978) prevede la somministrazione della molecola in esame nell'arco di tempo di 24 ore che intercorre tra l'esecuzione del *Pretest* e del *Test*. In questo studio è stata adottata una variazione rispetto al protocollo classico, che prevede la somministrazione della sostanza 2 ore prima di entrambe le sessioni. Questa scelta viene giustificata dal fatto che per lo screening di molecole antidepressive è importante ottenere dal *Pretest* un'attività basale fortemente influenzata dal primo contatto dell'animale con l'acqua, per valutare poi le differenze indotte dal farmaco durante la fase di *Test*. In questo studio, volendo valutare l'attività motoria dell'animale anche in funzione di un eventuale adattamento cognitivo, è stato necessario somministrare l'attivo prima dell'esecuzione di entrambe le sessioni, trascurando la componente ansiogena del *Pretest*.

Per l'esecuzione del FST è stato deciso, alla luce dei risultati ottenuti durante le sessioni di OF e di EPM, di testare DA-Phen alla dose di 0.03 mmol/kg, ad un tempo di osservazione pari a due ore, in quanto a questa dose di attivo ed a questo tempo di osservazione sono stati registrati i risultati maggiormente significativi dal punto di vista comportamentale nelle precedenti sessioni di EPM ed OF.

Il ruolo della DA e dei farmaci dopaminomimetici, fra i quali si potrebbe inscrivere il meccanismo d'azione di DA-Phen nell'attivazione comportamentale, potrebbe essere importante non solo nelle risposte finalizzate all'ottenimento di una ricompensa ma anche in altri comportamenti finalizzati (Canon e Palmiter, 2003; Salamone et al, 2005, 2007, 2009). Nel caso dell'applicazione del FST, il paradigma permette di studiare i meccanismi di aggiornamento di una risposta finalizzata, non mediante la ricompensa (o *reward*), ma con un diverso tipo di obiettivo, la fuga, e con un'emissione di risposte che richiedono un considerevole

sforzo. Il protocollo adottato in questo lavoro di tesi permette di valutare un aggiornamento dell'output motorio sia durante le sessioni che tra le sessioni (D'Aquila 2010).

Il processo di valutazione rivelato nel caso del FST, in cui i soggetti riducono il loro output comportamentale dopo aver percepito che i loro sforzi non hanno (e non possono) portare ad un esito positivo, valutando il loro tentativo di fuga come inefficace, permette di comprendere quanto gli animali riescano a preservare le proprie energie adottando uno stato di “imperturbabilità” (Cryan et al, 2005).

I risultati ottenuti dall'elaborazione dei dati mostrano sia nel Pretest che nel Test una diminuzione del tempo di immobilità per i ratti trattati con DA-Phen rispetto a quelli del gruppo controllo. Questi risultati corrispondono agli stessi osservati per sostanze antidepressive e psicostimolanti (Porsolt et al, 1978; Detke et al, 1997), che spengono dunque la componente ansiogena dovuta al primo contatto con l'acqua e aumentano contemporaneamente l'attività locomotoria, al pari di molecole che aumentano i livelli di DA nel SNC, come la cocaina (Loebens e Barros, 2003). Invece la somministrazione di antagonisti dopaminergici come l'aloiperidolo, diminuisce tutte le variabili connesse ai comportamenti attivi del FST (Gil e Armario, 1998).

Il numero di head shakes è più alto per gli animali trattati rispetto ai controlli, in quanto questo parametro rappresenta un chiaro segno di attivazione dopaminergica non correlabile alla strategia adattativa (Cryan et al, 2005). Il numero di climbing è notevolmente diminuito con la somministrazione del derivato dopaminico, a conferma della migliore strategia attuata dall'animale per preservare le energie. Il numero di diving è inferiore nei ratti trattati durante la fase di Test piuttosto che nella fase di Pretest, nonostante comunque il valore medio si mantenga comunque più alto rispetto ai ratti trattati con salina. Il *diving* è espressione di un'attività esplorativa esaltata, profondamente legata ad una situazione di “pericolo”, non legata ad una capacità risolutiva strategica, bensì ad una esasperazione comportamentale scatenata da un ambiente ostile (Cryan et al, 2005; Salamone et al, 2009): ciò dunque potrebbe confermare che l'azione del

DA-Phen si espliciti attraverso il riconoscimento, da parte dell'animale trattato, della migliore strategia adattativa, volta alla conservazione delle risorse fisiche disponibili. Quanto detto giustificerebbe il ridotto numero di diving nei ratti trattati nella fase di Test, che in qualche modo "riconoscerebbero" nel semplice swimming la migliore strategia adattativa

In un lavoro condotto da D'Aquila e Galistu (D'Aquila e Galistu, 2012) vengono riportati i risultati di un FST condotto per valutare gli effetti degli antagonisti dei recettori D1-like and D2-like della dopamina SCH23390 (Iorio et al, 1983) e raclopride (Köhler et al, 1985), rispettivamente, somministrati 30 minuti prima dell'esposizione al FST, e l'effetto degli stessi trattamenti in una seconda sessione a distanza di 24 ore. Il medesimo studio è stato condotto su un altro gruppo di ratti senza pre-esposizione alla condizione del nuoto forzato, e ciò ha permesso di concludere che il blocco dei recettori D1-like riduce l'attivazione della risposta, mentre il blocco dei recettori D2-like induce una persistenza della risposta di fuga, interpretabile come una compromissione del meccanismo che valuta l'efficacia della risposta.

E' stato dimostrato che il livello di attivazione delle risposte associate "all'adattamento" dipende dalla stimolazione dei recettori D1-like della DA, e il livello di tale attivazione viene aggiornato, o "reboosted", sulla base di un processo di valutazione mediato dalla stimolazione dei recettori D2-like della DA (D'Aquila, 2010).

DA-Phen, in base ai risultati ottenuti nel protocollo di FST ivi esposto, porterebbe, per agonismo D1/D2, all'attivazione delle risposte finalizzate al costo energetico congruo per quella particolare ricompensa in una data condizione fisiologica, psicologica e ambientale (D'Aquila, 2010). Questa ipotesi si inserisce all'interno del quadro teorico che guarda al ruolo della DA, e delle molecole dopaminomimetiche, in termini di analisi costo-beneficio e di allocazione dello sforzo alla risposta (Salamone et al, 2009).

5.1.4 Morris Water Maze

E' un test di apprendimento spaziale basato sulla presenza di riferimenti distali da raggiungere rispetto alla posizione iniziale, in un'arena aperta contenente una piattaforma di salvataggio. L'apprendimento spaziale viene valutato attraverso una serie di trials ripetuti, e la *reference memory* viene determinata dalla misurazione del tempo speso nel quadrante contenente la piattaforma, quando la piattaforma è assente. La ricerca del quadrante contenente la piattaforma è un indice di affidamento alle strategie spaziali e non; inoltre la presenza di riferimenti visivi è indice della presenza o meno di apprendimento spaziale. Con questo test è possibile indagare la relazione tra performance e sistemi neurotrasmettitoriali (McNamara and Skelton, 1993); infatti il MWM è collegato alla LTP (Long Term Potentiation) e, di conseguenza, alla funzionalità dei recettori dopaminergici, oltre che glutammatergici (Jeffery e Morris, 1993; Bannerman et al, 1995). Alla luce di quanto appena esposto, il MWM diventa una tecnica investigativa del circuito ippocampale, ma anche delle cortecce entorinale, peririnale, prefrontale, cingolata, del neostriato e del cervelletto, seppur in misura minore (D'Hooge e De Deyn, 2001).

Dall'analisi dei risultati ottenuti nelle fasi di *Training* e di *Reversal*, si può asserire che i ratti trattati con DA-Phen manifestino una “capacità di orientamento” maggiore rispetto ai controlli. Questo risultato potrebbe ascriversi al potenziamento della trasmissione dopaminergica indotta dal composto sulla *spatial memory*.

Infatti, gli animali trattati mostrano un potenziamento della memoria spaziale in quanto focalizzano la loro ricerca nel quadrante che per ultimo ha ospitato la piattaforma, facendo registrare una progressiva riduzione dei valori di latenza e di distanza percorsa, indici che usualmente subiscono una diminuzione particolarmente significativa in seguito alla somministrazione di dopaminomimetici (Conrad et al, 2008; Conrad, 2010).

E' noto che la DA influenzi la *spatial memory* e il *learning* in quanto capace di attuare una riconfigurazione dei circuiti neuronali (Surmeier , 2007; Surmeier et al, 2010; Goto et al, 2010; Molina-Luna et al, 2009); inoltre molti studi sperimentali hanno individuato l'ippocampo come struttura essenziale nella modulazione di entrambe queste facoltà (Jarrard, 1983; Morris et al, 1982; Olton e Papas, 1979; Sutherland et al, 2001), in quanto riceve le proiezioni dopaminergiche del circuito mesocorticale. I neuroni di questo sistema proiettano le loro fibre nervose al setto, soprattutto nel nucleo laterale, all'amigdala, all'ippocampo e alla corteccia prefrontale. Si ritiene che questo sistema sia quello maggiormente implicato nel controllo delle funzioni cerebrali superiori e delle emozioni (Moran-Gates et al, 2006).

Una delle ipotesi che spiegano come la DA supporti il *reinforcement learning* è quella secondo cui il neurotrasmettitore regoli la forza delle connessioni sinaptiche tra i neuroni. Infatti, se la cellula A attiva la cellula B, e quest'ultima causa un'azione comportamentale che ha come risultato finale il *reward*, quando la DA verrà nuovamente rilasciata, la connessione A→B verrà rinforzata (Montague et al, 1996; Schultz, 1998). Questo meccanismo consentirà ad un organismo di apprendere quale sarà la scelta ottimale per raggiungere il *reward*. Quindi si può dire che la DA ha una notevole influenza sulla plasticità sinaptica in molte zone del cervello (Surmeier et al, 2010; Marowsky et al, 2005; Lisman e Grace, 2005; Grace et al, 2007; Grace and Rosenkranz, 2002). Oltre agli effetti della DA sulla plasticità sinaptica a lungo termine, appena descritti, bisogna considerare la capacità di questo neurotrasmettitore nel modulare immediatamente le scariche neuronali e le connessioni sinaptiche tra i neuroni (Surmeier et al, 2007; Robbins e Arnsten, 2009), dando luogo al *reward*.

I dati registrati nella fase di Reversal mostrano come la somministrazione di DA-Phen favorisca l'apprendimento di nuovi percorsi finalizzati al raggiungimento della piattaforma, ubicata in una nuova posizione (Vorhees e Williams, 2006). Nel primo trial gli animali di entrambi i gruppi hanno fatto registrare alti valori di TDT e ciò può essere spiegato in funzione del fatto che ciascun ratto, in seguito alla fase di Training ed al relativo ricordo del quadrante

target sviluppato durante questa sessione, tende a raggiungere la posizione, che precedentemente conteneva la piattaforma.

Altro interessante parametro analizzato è l'*escape latency*, o tempo di latenza. Il tempo di latenza, sensibile a fattori motori e motivazionali (Abidin et al, 2004; Bodnoff et al, 1995; Sousa et al, 2000), è il parametro che fornisce una misura del "*cued learning*"; infatti attraverso la registrazione del tempo speso dal ratto per raggiungere la piattaforma se ne può valutare la capacità di nuoto finalizzata al raggiungimento di un obiettivo collocato in una precisa posizione dello spazio, e viene rivelata anche la *spatial memory* (Vorhees e Williams, 2006). Se il ratto manifesta delle difficoltà nel *cued learning*, sicuramente ci sarà un deficit nella memoria spaziale. Infatti il *cued learning* richiede abilità (abilità motoria, vista intatta), strategia (mirata al nuoto lontano dalle pareti al fine di raggiungere in tempi più rapidi la piattaforma) e motivazione (tendenza alla fuga dall'ambiente ostile, e quindi dall'acqua) (Vorhees e Williams, 2006).

Il *cued learning* è una delle procedure di base di controllo, ma non è la sola. Per esempio, Cain ha mostrato che alcune sostanze stupefacenti che interferiscono con la funzionalità sensori-motoria, alterano anche la capacità di riconoscere la piattaforma come un bersaglio (Saucier e Cain, 1995; Cain et al, 1996). Ratti che raggiungono la piattaforma senza arrampicarsi su essa, o che non stanno fermi su di essa, non hanno acquisito la giusta associazione tra piattaforma e fuga dall'acqua (Vorhees e Williams, 2006).

Il derivato dopaminico ha dato risultati conformi ad un'attivazione del sistema dopaminergico relazionata al *cued learning*: i ratti trattati registrano una *escape latency* minore dei controlli, e si mantengono in equilibrio sulla piattaforma. Ciò rafforza l'ipotesi che DA-Phen favorisca l'*enhancement* della *cognitive flexibility* e l'immagazzinamento di strategie utili al raggiungimento dell'obiettivo.

I dati riferiti alla percentuale di tempo speso nel quadrante target delle fasi di Training e Reversal, suggeriscono l'effetto del DA-Phen sulla memoria. La "memoria" viene distinta in *Reference Memory (RM)* e *Working Memory (WM)*. Il *probe trial* è utile per valutare la *Reference Memory* e va eseguito dopo 24 ore dall'ultimo trial, per assicurarsi che la *Reference Memory* sia indipendente dal ricordo dell'ultima sessione eseguita; inoltre esso non consente di distinguere tra

long term e *short term potentiation* (Vorhees e Williams, 2006). La *Reference Memory* è un tipo di apprendimento acquisito e incrementato, in cui l'informazione viene ripetuta in ogni trial del *training*. Stessa cosa non può dirsi per la *Working Memory*, poiché il suo sviluppo e potenziamento è basato sull'acquisizione di informazioni durante un singolo trial. La RM infatti è la memoria di riferimento basata sulla *long-term potentiation* e sul ripetersi dell'esperienza, che porta ad un immagazzinamento di informazioni e riferimenti; al contrario la WM è la memoria a breve termine, basata sull'attivazione di una *short-term potentiation*, che consente la momentanea acquisizione di informazioni necessarie all'esecuzione di quell'abilità e che viene rapidamente cancellata (Olton e Papas, 1979; Pawluski et al, 2006).

I risultati del presente studio dimostrano che i ratti trattati con DA-Phen verosimilmente potrebbero avere un *enhancement* della *Reference Memory*, rispetto ai controlli. L'attivo inoltre non altererebbe il consolidamento, il recupero e l'acquisizione della *Reference Memory*, in funzione di una probabile attivazione della LTP ippocampale.

Sperimentalmente è dimostrato che la LTP ippocampale è bloccata dall'uso di antagonisti dopaminergici D1 (Frey et al, 1990; Li et al, 2003) e potenziata da agonisti D1 (Otmakhova e Lisman, 1998).

La LTD, potenziata dai D1 agonisti e D2 antagonisti, è inoltre bloccata dai D1 antagonisti e D2 agonisti (Chen et al, 1996). Questo rafforza l'ipotesi che il DA-Phen possa agire da agonista dopaminergico D1, agonista parziale D2.

5.2 Valutazione della modulazione del consumo di alcool dopo trattamento con Da-Phen

Il sistema dopaminergico mesolimbico svolge un ruolo centrale nel rinforzo indotto dalle sostanze d'abuso. Tutte le principali sostanze d'abuso, tra cui l'etanolo, attivano il sistema dopaminergico mesolimbico già in seguito alla prima esposizione in acuto. Oltre all'importanza dell'aumento della DA in acuto, dovuto all'assunzione della sostanza, è da sottolineare l'aumento di DA osservato dopo la presentazione di stimoli, associati alla somministrazione cronica della droga, che è in grado di generare quindi un'alterazione delle funzioni cognitive in seguito ad

esposizione prolungata (Söderpalm e Ericson, 2013). Inoltre, sia i fattori genetici che ambientali giocano un ruolo importante per l'induzione al consumo di alcol e per la progressione di quest'ultimo verso l'alcolismo. Tuttavia, i meccanismi motivazionali che portano al consumo iniziale di alcool nell'animale sono differenti rispetto alla motivazione (o alla mancanza motivazionale) in un animale che ha già sperimentato il consumo di etanolo; ed ancora molto diversa la motivazione che induce all'assunzione cronica di etanolo un animale che ne abbia già sperimentato i segni di astinenza (Tabakoff e Hoffman, 2013).

Heyman descrive la dipendenza come un "comportamento operante volontario, che risulta da una temporanea cecità verso possibili alternative in una determinata situazione". Questa descrizione risponderebbe pertanto della condizione di apprendimento patologico legato "restringimento della capacità di discernere" (definito come "*narrowing of repertoire*"), costituente uno dei principali criteri diagnostici dell'alcolismo secondo il DSM V (Tabakoff e Hoffman, 2013).

Per comprendere meglio la neurobiologia e l'instaurarsi della dipendenza delle sostanze d'abuso, da sempre si è ricorso all'uso di modelli animali (Koob e Le Moal, 2008; Koob e Le Moal 2005; Koob e Le Moal 2001; Willuhn et al, 2010). Tra questi modelli, i paradigmi che riproducono al meglio una condizione patologica umana legata all'abuso di sostanze sono appunto quei modelli che contemplan l'auto-somministrazione di droghe: gli animali infatti sono in grado di assumere volontariamente la sostanza d'abuso, e le droghe che l'animale si auto-somministra corrispondono a quelle che hanno un alto potenziale di abuso nell'uomo (Willuhn et al, 2010).

5.2.1 Consumo Di Cibo Ed Etanolo

L'alcol, differentemente da altre droghe d'abuso, è inoltre in grado di indurre profonde modifiche del metabolismo, in quanto costituisce una vera e propria risorsa calorica, tanto da poter essere considerato un "cibo" (Yeomans, 2010; Yeomans et al., 2003). Il motivo per cui l'etanolo contribuisce ad un incremento calorico (mediante l'intake) ha un impatto significativo sulla ricerca che usa modelli animali "semplici" per investigare i meccanismi che ne causano

l'eccessivo consumo (Pohl et al., 2012). Pertanto, al fine di investigare correttamente circa la modulazione della dipendenza e dalla ricaduta indotte da etanolo, è necessario tenere in considerazione il trend della variazione di peso dei soggetti trattati quale importante variabile informativa, soprattutto quando si considerano gruppi con apporto calorico controllato (Guccione e Paolini, 2013).

I risultati del presente studio indicano che l'assunzione di etanolo ha indotto nei soggetti trattati con EtOH una significativa variazione nell'incremento del peso corporeo rispetto agli animali controllo, che hanno assunto acqua. In particolare, è stata osservata una differenza statistica a partire dalla seconda settimana di Training (consumo di EtOH pari al 20% v/v). In tale periodo del protocollo sperimentale i ratti trattati con etanolo hanno mostrato un incremento del peso corporeo più lento rispetto a quello osservato nei controlli. Tuttavia, durante la 1° Deprivation, l'analisi del peso corporeo ha rivelato che il valore medio del peso dei ratti trattati con EtOH ha raggiunto il peso dei controlli. In seguito, il trend di incremento di peso è divenuto di nuovo più lento per i soggetti che hanno assunto cronicamente con EtOH rispetto al gruppo CTR, evidenziando una significativa differenza tra i gruppi, specialmente durante le fasi di Relapse contro le fasi di Deprivation. Questi risultati suggeriscono che la variazione nella dieta giornaliera, a causa del differente consumo di EtOH nelle fasi di Relapse e di astinenza forzata (Deprivation) all'interno dello stesso gruppo (EtOH), ha indotto una differenza dell'incremento del peso corporeo dei soggetti sperimentali, in accordo con i risultati presenti in letteratura sul modello animale di auto somministrazione orale di EtOH (Holter et al, 1998; 2000). Il consumo di EtOH infatti, a causa dei suoi effetti farmacologici post-assunzione piuttosto che il suo valore calorico o il suo taste, e in funzione soprattutto della forte tolleranza metabolica e funzionale in cronico, promuove variazioni di peso gravi associate alle fasi di astinenza / ricaduta (Guccione et al., 2012). I risultati del presente studio sono inoltre in linea con quelli osservati in uno studio di Holter e collaboratori (Holter et al, 2000), in cui la ripresa dell'assunzione di alcol ha determinato una ridotta assunzione di cibo. Come osservato nello studio ivi sviluppato, confrontando il trend della variazione di peso nel primo periodo di Deprivation con i successivi, questo effetto è di solito più pronunciato nelle fasi di

astinenza forzata successive alla prima Deprivation, che si riflette in un più lento incremento di peso (Holter et al, 2000).

5.2.2 Pattern Di Bevuta E Astinenza

Nella fase di astinenza acuta da alcool, a seguito di esposizione cronica, in genere si ha un aumento marcato nell'assunzione di EtOH al momento della sua reintroduzione; questo fenomeno è noto come "effetto della privazione da alcool" (ADE), ed è una misura caratteristica della ricaduta nei modelli di dipendenza (Guccione et al, 2012; Vengeliene et al, 2007). Il comportamento indotto dalla sostanza a seguito di una fase di deprivazione da alcool è caratterizzata da una maggiore assunzione e preferenza di quest'ultimo, determinando un immediato aumento del consumo di soluzioni di alcol altamente concentrate, sia utilizzando il condizionamento operante che paradigmi di libero accesso (Holter et al, 2000; Vengeliene et al, 2007). E' ampiamente riconosciuto che l'ADE sia principalmente dovuto a due fattori: in primis, è finalizzato alla riduzione dei sintomi di astinenza ansiogeni (Pellow et al, 1985). Può inoltre essere il risultato dell'instaurarsi della tolleranza ad una sostanza (Funk, 2004). Si pensa che l'auto somministrazione di etanolo, in seguito ad un'astinenza, sia principalmente un mezzo in grado di alleviare l'ansia ad essa associata (Pellow et al, 1985), dato che si ritiene che il comportamento ansia-correlato all'astinenza da alcol nei ratti aumenti durante i periodi di Deprivation (Huot et al, 2001). In questo studio, gli animali trattati con EtOH presentano un comportamento tipico di ricaduta, con un progressivo aumento del consumo di etanolo dalle fasi di Training a quelle di Relapse.

Una precedente ricerca, indagando sugli ADE nei ratti *alcohol-preferring*, ha scoperto che la durata e l'entità di una precedente esposizione a etanolo influenzano l'espressione di un ADE (Sinclair e Senter, 1967). In diversi studi tuttavia, dopo diversi intervalli di ri-esposizione post-Deprivation, non è stata mai registrata una diminuzione del consumo di assunzione basale (Bell et al, 2008). I risultati ottenuti nella prima e la seconda fase di Relapse riflettono questo tipo di tendenza. Il gruppo EtOH presenta un aumento dell'assunzione di etanolo successivamente alla fase di astinenza forzata, soprattutto durante il primo giorno

di ri-esposizione. Successivamente, è stata notata una riduzione dell'intake nei due giorni a seguire, e di nuovo un picco nel consumo di etanolo negli ultimi giorni della sessione di relapse, con un trend " peaks and drops" (picchi e cadute) generalmente osservato nelle fasi di reinstatement dei protocolli di auto-somministrazione di alcol (Guccione et al,2012; Vengeliene et al, 2007).

È interessante notare che gli animali del gruppo EtOH hanno mostrato una preferenza per EtOH 5% al di sopra della soglia massima di consumo di acqua nel gruppo CTR durante la fase di Habituation. Durante il Training invece i ratti esposti ad alcol non hanno mostrato un consumo di volumi di etanolo al 20% maggiori dell'intake di acqua del gruppo CTR, sia nelle fasi di Training che di Relapse. Questo risultato però potrebbe essere giustificato dal disegno sperimentale, dato che l'intake complessivo di EtOH20%, rapportato al peso dei ratti trattati, risulta in linea con il consumo previsto di etanolo (espresso in g/kg/die) secondo letteratura (3g/kg/die - Holter et al, 2000; Walker e Koob, 2007).

Nella giornata di Extinction, i nostri risultati hanno dimostrato che i soggetti del gruppo EtOH, così come quelli del gruppo CTR, estinguono la ricerca della soluzione nei primi cinque minuti di condizionamento operante. Tuttavia, è importante notare che gli animali del gruppo EtOH hanno eseguito un numero di battute superiore del 22% rispetto al valore medio riscontrato nell'ultimo giorno del periodo di Training, mentre il gruppo CTR ha registrato un 23% di battute sotto il valore medio del periodo di Training. Questo risultato potrebbe sottolineare una compulsività nel gruppo EtOH generata dalla somministrazione della soluzione di Etanolo al 20% v/v.

A lungo termine, un consumo volontario di alcol di soli 3-4 g/kg/die nei ratti induce sintomi di astinenza quali ipereattività in risposta a stress lieve (Spanagel e Holter,1999), così come comportamenti ansia-correlati (Holter et al,1998), e iperlocomozione (Holter et al, 2000; Wee and Koob, 2010). Lo stato ipodopaminergico osservato negli animali in Deprivation da etanolo, o in alcolisti disintossicati, è caratterizzato da ipoattività dei neuroni dopaminergici e conseguente diminuzione del rilascio di DA nel NAc e nello striato, insieme a

down-regulation dei recettori post-sinaptici D2-like (D2R) nelle aree di proiezione della dopamina (Martinez et al, 2005; Volkow et al, 2007).

E' stato proposto che questo stato ipodopaminergico contribuisca alla componente emotiva/motivazionale della dipendenza da etanolo, anche se è stata implicata l'attivazione di altri sistemi neurotrasmettitoriali, come quelli che coinvolgono il fattore di rilascio della corticotropina o dinorfina endogena k-oppioide (Koob, 2009; Wee e Koob, 2010; Walker et al, 2011). A sostegno del ruolo dello stato ipodopaminergico nella dipendenza, gli animali in astinenza da etanolo hanno dimostrato di auto-somministrarsi etanolo fino a quando i livelli di dopamina nel NAc vengono ripristinati ai livelli basali di pre-astinenza (Weiss et al, 1996 ; Perra et al, 2011).

L'OF eseguito a 24h dall'inizio dell'astinenza, durante la prima Deprivation, ha rivelato che la percentuale di tempo trascorso al centro dell'arena, ha mostrato una differenza statistica tra i gruppi, risultante in un valore più basso nei ratti EtOH rispetto al valore riportato per i controlli, come solito segno di ansia causata da un nuovo ambiente (Cacace et al, 2012). Sorprendentemente, i risultati dell'analisi per EPM eseguito a 72 ore, hanno mostrato per il gruppo EtOH un numero maggiore Head Dippings e di entrate nel braccio aperto rispetto al gruppo CTR, riflettendo anche la più alta percentuale di tempo trascorso nel braccio aperto. Da un punto di vista generale, è stato osservato un incremento dei comportamenti esplorativi negli animali trattati con EtOH. Come suggerito da altri autori, l'iperlocomozione, l'iperattività e il comportamento esplorativo osservati durante la fase di astinenza protratta da alcol, rappresentano presumibilmente un comportamento di ricerca compulsivo della sostanza (Holter et al, 2000).

5.2.3 Effetti della somministrazione di DA-Phen durante il terzo ciclo di Deprivation-Relapse

La somministrazione del nuovo coniugato aminoacidico della dopamina ha indotto un'alterazione della reattività comportamentale e del comportamento

ansia-correlato durante le fasi astinenziali in acuto e protratta, nonché del consumo medio giornaliero di etanolo nel terzo Relapse.

In particolare, durante la terza sessione di Relapse, oltre ad osservare una mancanza di preferenza per l'etanolo, è stato registrato un aumento del consumo di acqua nella sessione post-operante all'interno del gruppo DA-Phen rispetto agli altri gruppi sperimentali, suggerendo che gli animali DA-Phen non mostrano un bisogno compulsivo di etanolo rispetto agli animali del gruppo EtOH.

I ratti del gruppo EtOH mantengono un elevato consumo di etanolo rispetto agli animali del gruppo DA-Phen, mostrando un picco iniziale nell'assunzione, seguito da una successiva riduzione ad un livello di pre-deprivation nel terzo relapse (Fig 15). L'assenza di una ricaduta significativa all'interno del gruppo DA-Phen suggerisce che questo nuovo coniugato aminoacidico abbia la capacità di ridurre il potenziale di gratificazione dell'etanolo (Berridge e Kringelbach, 2011) in ratti trattati cronicamente con tale sostanza d'abuso (Guccione et al, 2012).

E' noto che l'esposizione acuta ad etanolo stimoli la trasmissione dopaminergica mesolimbica (Foddai et al, 2004; Di Chiara et al, 2004; Weiss et al., 1996), principalmente attraverso l'attivazione diretta del firing dei neuroni DAergici della VTA (Volkow et al, 2007; Melis et al, 2005). Questo effetto media le azioni gratificanti e di rinforzo indotte dall'etanolo. Al contrario, notevoli diminuzioni nel rilascio di DA nel NAc sono stati osservate in animali deprivati per lungo termine da etanolo (Rossetti et al, 1992; Weiss et al, 1996) e anche in alcolisti disintossicati (Martinez et al, 2005; Melis et al, 2005; Volkow et al, 2007). In linea con queste osservazioni, una marcata riduzione nell'attività dei neuroni DAergici della VTA è stata riportata negli animali in astinenza da etanolo (Diana et al, 2003, 1996).

I risultati dell' OF eseguiti a 24 ore di astinenza durante la terza Deprivation hanno rivelato che i valori medi dei parametri considerati erano simili per i soggetti trattati con DA-Phen ed il gruppo CTR, mentre i soggetti EtOH hanno mostrato i comportamenti alterati tipici del modello di astinenza acuta precedentemente osservato nella prima Deprivation. La riduzione dei valori medi di tali parametri, e la loro similitudine con i valori ottenuti dall'analisi comportamentale del gruppo CTR , permette di ipotizzare che il DA-Phen sia in

grado di attenuare i comportamenti astinenziali in acuto in ratti Wistar resi fisicamente dipendenti dall'alcol. Una tendenza speculare è stata osservata analizzando i risultati per i principali parametri dell'EPM eseguito a 72h di astinenza, suggerendo che la principale azione di DA-Phen consista in una attenuazione complessiva dei comportamenti astinenziali anche nell'astinenza prolungata, in virtù di una potenziale modulazione attività dei neuroni dopaminergici della VTA.

È stato riscontrato che l'attività dei recettori D2 (D2R) è in relazione con il grado di auto-somministrazione di alcol (Thanos et al, 2001). Inoltre, l'attività D2R nel Nac, considerato uno dei punti più edonistici (Berridge e Kringelbach, 2011), è stata anche utilizzata per prevenire i segni somatici di astinenza da oppiacei in animali dipendenti (Harris,1994; Guccione et al, 2012). Sulla base di queste considerazioni, diversi studi in vivo hanno dimostrato che l'attività del firing neuronale DAergico nella VTA viene tonicamente inibita da questi recettori (Erhardt et al, 2002), confermando che il potenziamento dell'inibizione D2 e/o GABA B potrebbe contribuire alla ipoattività tonica dei neuroni dopaminergici, osservata in animali deprivati da etanolo. Precedenti studi hanno dimostrato che l'inibizione degli autorecettori D2-mediata dei neuroni dopaminergici della VTA è ridotta dopo esposizione ripetuta a psicostimolanti (Volkow et al, 2007; Melis et al, 2005). L'up-regulation dei recettori dopaminergici, in seguito ad auto-inibizione, potrebbe quindi avere un ruolo importante nella regolazione dell'output dopaminergico mesolimbico durante l'astinenza in vivo da etanolo (Koob, 2010; 2013).

Un possibile meccanismo di azione del DA-Phen, che ha ridotto i segni dell'astinenza in entrambe le fasi acute e croniche, potrebbe essere correlato ad una modulazione parziale dell'inibizione D2 agonista-indotta del firing dei neuroni DAergici della VTA, come riportato con altri agenti dopaminomimetici (Volkow et al, 2007; Melis et al, 2005). I ratti Alcol-dipendenti (nel presente contesto il termine "dipendente", quando riferito ad un soggetto sperimentale non umano, indica una condizione in cui il soggetto ha mostrato inequivocabilmente una prova di dipendenza, cioè, segni somatici di astinenza) mostrano una profonda riduzione della frequenza del firing spontaneo e del trend di impulsi

identificato nel Nac sporgente nell' area ventrale tegmentale (VTA) contenente neuroni DAergici (Diana et al, 2003) con una conseguente riduzione della concentrazione di DA nel Nac (Rossetti et al, 1992; Diana et al, 2003; Barak et al, 2011). Inoltre, la ridotta attività dopaminergica determina una maggior durata dei segni somatici dell'alcol-dipendenza (Diana et al, 1996, 2003), suggerendo quindi un ruolo della DA nelle conseguenze durature della dipendenza da alcol (Diana, 2011).

Studi preclinici atti a verificare l'effetto di agonisti e antagonisti dei recettori DAergici a livello centrale, hanno permesso di evidenziare alcuni effetti salienti circa la riduzione dell' auto-amministrazione di alcool in ratti cronicamente trattati con etanolo (Jupp e Lawrence, 2010).

Ligandi parziali e selettivi per i recettori D1 e D2 hanno dimostrato infatti la loro potenziale efficacia in studi clinici per il trattamento della dipendenza da psicostimolanti attraverso il loro uso come trattamento di mantenimento, inibendo l'azione DAergica tipica degli psicostimolanti o intervenendo sull' ipofunzione DAergica associata alla sospensione e all' uso cronico della sostanza (Jupp e Lawrence, 2010). In particolare, l'aripirazolo (Burriss et al, 2002) agisce come antagonista recettoriale in presenza di un tono DAergico elevato, e potenzia la trasmissione dopaminergica quando il tono di base è basso, rappresentando un possibile trattamento per i disturbi da abuso di alcool (Kenna et al, 2009). Studi di laboratorio umano hanno dimostrato che l'Aripirazolo riduce il consumo dell'alcool (Kranzler et al, 2008; Voronin et al, 2008; Diana, 2011). E' stato dimostrato che l'agonista del recettore D1 SKF82-958 è in grado di ridurre i sintomi di astinenza in morfina di ratti dipendenti (Chartoff et al, 2009), sostenendo ulteriormente l'uso di farmaci che potenziano il firing DAergico per l'astinenza da oppiacei.

Sulla base di test comportamentali quali Morris Water Maze e Forced Swimming Test, eseguiti su ratti naive trattati con DA-Phen, oltre che da studi di docking-molecolare (il quale ha evidenziato un possibile agonismo del farmaco con la popolazione recettoriale D1-like) e sulla base dei risultati ivi illustrati, il DA-Phen potrebbe agire in qualità di agonista D1 e agonista D2. Da questo punto di vista, il razionale teorico del suo impiego unitamente ai risultati ivi riportati (in

riferimento all' OF, ai dati dei test comportamentali EPM e al condizionamento operante nel terzo relapse) suggeriscono che gli effetti di DA-Phen sono in linea con i risultati della letteratura che utilizzano un approccio basato sulla modulazione della trasmissione DAergica a livello centrale. Inoltre, va sottolineato che la somministrazione ripetuta di DA-Phen non ha indotto la comparsa di effetti non specifici, in grado di alterare l'assunzione di cibo e il metabolismo. Un altro aspetto importante, a tal proposito, è legato al fatto che animali sottoposti al protocollo di condizionamento operante con sola acqua, trattati con Da-Phen durante il terzo Relapse, non hanno evidenziato alcuna modifica del pattern di bevuta, mantenendo dei valori del tutto assimilabili a quelli dei ratti CTR, escludendo quindi una potenziale alterazione del set-point ipotalamico del centro della sete.

5.3 Analisi dell'uptake del DA-Phen in organi target-non target

Il DA-Phen presenta un up-take aspecifico in tessuti quali fegato, milza, rene. Una frazione libera viene riscontrata anche nel plasma. In particolare, dopo 120 minuti circa dalla somministrazione i.p. di DA-Phen, si riscontra nel plasma circa lo 0.1% della dose iniettata. La quantità più alta di DA-Phen riscontrata negli organi analizzati si osserva nel cervello.

Considerando il peso medio degli organi trattati, da una sommatoria parziale risulta che la quantità di DA-Phen riscontrata è pari rispettivamente a 3.74 µg per i ratti trattati con solo DA-Phen (CTR+DA-Phen, sacrificati a due ore dall'ultima somministrazione dell'attivo), 1.74 µg per i ratti trattati con DA-Phen durante la Deprivation (EtOH+DA-Phen D, sacrificati a cinque giorni di distanza dall'ultima somministrazione dell'attivo), e 3.09 µg per i ratti trattati con DA-Phen durante il Relapse (EtOH+DA-Phen R, sacrificati a due ore di distanza dall'ultima somministrazione dell'attivo). Tenendo presente che a ciascun ratto, del peso medio di 300 g, è stata somministrata una dose di 0.03mmol/Kg due ore prima del sacrificio, corrispondenti a circa 9mg/Kg di DA-Phen, si ha che la dose riscontrata negli organi target/non target corrisponde a circa l'1% della dose somministrata per via i.p. La porzione dopaminica non sembra avere un effetto significativo sulla

farmacotossicità dell'attivo alla dose somministrata. Infatti, i ratti trattati non hanno mostrato la tipica sintomatologia da degradazione periferica da DA, nonostante sia stata somministrata una dose di DA-Phen equimolare a quella di L-Dopa, la quale necessita, come noto, della co-somministrazione di inibitori della decarbossilasi periferica. Ciò potrebbe essere dovuto alla mancata scissione del legame carbamidico del DA-Phen, in grado di dar luogo, in linea teorica, alla liberazione di quantità potenzialmente tossiche di DA a livello periferico. Verosimilmente, il DA-Phen potrebbe generare accumulo, alla dose di 0.03mmol/Kg, presso distretti non analizzati e di carattere maggiormente lipofilo rispetto ai tessuti analizzati, in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della molecola (Peso molecolare di 300.35 Da, LogP=0.76 – Giannola et al, 2008). Tale speculazione avrebbe ragion d'essere in considerazione della quantità di DA-Phen riscontrata negli animali trattati con l'attivo una settimana prima del sacrificio (gruppo EtOH-DA-Phen D, secondo design sperimentale). Il calcolo del Volume di Distribuzione (Vd) del DA-Phen confermerebbe quanto scritto. Stando al fatto che il Vd può essere calcolato come:

$$Vd = \frac{\text{Quantità totale di Da-Phen somministrato (D)}}{\text{Concentrazione plasmatica di DA-Phen (C}_p\text{)}}$$

ed assumendo che:

la dose di DA-Phen, pari a 0.03mmol/Kg (equivalenti a 9mg/Kg) sia immediatamente disponibile, come avverrebbe in una somministrazione di tipo i.v.;

il volume totale di plasma nel ratto sia pari a 64mL/Kg (per un ratto Wistar del peso di 300g, il volume plasmatico è pari a 19.2mL)

Con riferimento alla concentrazione plasmatica di DA-Phen osservata nei ratti appartenenti al primo design sperimentale, $C_p=0.2380\text{mg/g}$ (equivalenti a 4.95mg/L), si ricava un valore di V_d pari a:

$$Vd = D C_p = 2.0168\text{L/Kg}$$

Tale valore è in linea con farmaci aventi moderata/elevata lipofilia ed attività centrale, quali il diazepam (2.4L/Kg) (Poulin e Haddad, 2012) e la L-Dopa (1.7L/Kg) (Brooks, 2008).

La costante di eliminazione (K_{el}), correlabile al Mean Residence Time (MRT), per opportune semplificazioni, può essere calcolata nell'intervallo di tempo intercorso fra la somministrazione di DA-Phen ed il sacrificio dell'animale, mediante la seguente formula:

$$K_{el} = [\ln(C_0) - \ln(C_t)] / t$$

In cui C_0 rappresenta la Concentrazione plasmatica al tempo $t=0$ (assumendo che tutta la dose somministrata sia immediatamente disponibile), C_t rappresenta la concentrazione al tempo considerato (2 ore) e t rappresenta l'intervallo di tempo trascorso. Si ottiene quindi un valore di K_{el} pari a:

$$K_{el} = \ln(15.62) - \ln(4.95) / 2 = 0.57458$$

L'emivita plasmatica del DA-Phen, ottenuta dalla K_{el} per estrapolazione matematica, è quindi pari a:

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_{el} = 0.693 / 0.57458 = 1.2 \text{ h} = 80 \text{ min}$$

Il valore di emivita del DA-Phen è del tutto riconducibile al valore di emivita di farmaci aventi struttura molecolare simile, quali la L-Dopa somministrata in combinazione con carbidopa. ($t_{1/2} = 60-90 \text{ min.}$; Brooks, 2008)

Disponendo dei valori relativi alla costante di eliminazione K_{el} ed al Volume di Distribuzione V_d , è infine possibile calcolare la Clearance (CL) attesa per il derivato dopaminico oggetto di studio. Assumendo che la CL venga calcolata per un soggetto umano di sesso maschile e del peso di 70Kg, si ha che:

$$CL = V_d \cdot K_{el} = 2.0168 \text{ L/Kg} \cdot 0.57458 = 1.1588 \text{ L/h} \cdot \text{Kg} (81.1169 \text{ L/h})$$

La ridotta quantità di DA-Phen, riscontrata negli organi target/non target mediante analisi HPLC rispetto alla dose inizialmente somministrata, è probabilmente imputabile sia al washout d'organo del farmaco, sia all'attesa metabolizzazione dell'attivo a livello epatico.

5.4 Predizione del metabolismo di DA-Phen in vivo

In seguito ad elaborazione mediante software SMARTCyp, (The SMARTCyp cytochrome P450 metabolism prediction server) risulta infatti che il DA-Phen possiede sei potenziali siti di lisi della struttura molecolare, ma nessuno di essi riguarda il legame carbamidico fra DA ed L-Fenil-Alanina: ciò giustificherebbe ulteriormente le evidenze sperimentali che vedono il DA-Phen come agente dopaminergico in grado di esplicare la sua attività per effetto del binding dell'intera struttura molecolare sui recettori *D1/D2-like*, e non in qualità di *prodrug* della DA.

E' da sottolineare il fatto che i quantitativi di DA-Phen riscontrati negli animali appartenenti al secondo design sperimentale, ed in particolare nei ratti dei gruppi trattati previamente con Etanolo al 20% v/v per diverse settimane, siano indicativi di un diverso behaviour farmacinetico dell'attivo oggetto di studio, riconducibile all'alterata fisiologia dei ratti esaminati. Relativamente all'analisi HPLC condotta sui ratti del secondo design sperimentale, è interessante notare la correlazione fra quantitativi di DA-Phen e quantitativi di ACD osservati, nonché la risposta comportamentale verificata mediante gli opportuni tests.

5.5 Uptake di DA-Phen e correlazione con i livelli di uptake di ACD

Uno degli aspetti cruciali dell'esposizione cronica all'alcol, imputabile ad un meccanismo neurotrasmettitoriale adattativo, è l'ipofunzione della trasmissione mesolimbica dopaminergica (Melis et al, 2005). E' noto infatti che, alla base della volontaria assunzione di alcol, protratta nel tempo, c'è il tentativo di compensare la sua diminuita azione di "efficacia", dovuta l'instaurarsi della tolleranza, sul rilascio di DA (Mendelez et al, 2003). Significative sono le alterazioni della

trasmissione DAergica, anche a livello mesostriatale, riscontrate in ratti sottoposti a somministrazione cronica di etanolo con riferimento, in particolare, al decremento della sintesi e incremento della clearance di DA, al livello delle sinapsi. Inoltre, la persistenza del deficit di DA osservata in soggetti con storia di alcol dipendenza (Diana et al, 2003) giustificherebbe l'insorgenza delle recidive. E' chiaro dunque che gli effetti di rinforzo positivo dovuti all'assunzione di etanolo abbiano come fondamento una profonda alterazione centrale del sistema DAergico.

Attualmente, per gran parte del mondo scientifico ed accademico, è valida l'ipotesi che l'EtOH sia proprio un "profarmaco", in quanto un gran numero delle sue proprietà farmacologiche e comportamentali sembra essere mediato dall'ACD quale diretto prodotto del suo metabolismo epatico (Quertemont e Tambour, 2004). L'ACD, infatti, quando viene somministrata per via i.p. in ratti Wistar (Quertemont e De Witte, 2001), è in grado di indurre un'evidente place preference condizionata; inoltre, stimola, in modo dose-dipendente, l'attività elettrofisiologica dei neuroni dopaminergici dell'Area Ventrale Tegmentale (VTA), e tali effetti sono bloccati dal 4-metil pirazolo (4-MP), un potente inibitore dell'Aldeide deidrogenasi (ADLH) periferica (Foddai et al, 2004; Melis et al, 2007) nel ratto.

Nel presente studio, i ratti che hanno assunto volontariamente EtOH al 20% sino ad instaurare dipendenza e mostrarne sia i tipici segni astinenziali che recidivanti, una volta iniziato il trattamento con DA-Phen non solo hanno avuto una regressione di tali outcomes comportamentali, con behaviour sovrapponibile a quella del gruppo CTR, ma hanno fatto registrare un livello dei valori di uptake cerebrale di ACD assimilabile a quello del gruppo CTR. E' interessante notare anche il livello di uptake aspecifico di tipo epatico: anche in questo caso, si ottiene per il gruppo CTR e per i gruppi sperimentali di ratti alcolizzati trattati con DA-Phen un valore di ACD simile. Una probabile ipotesi sull'azione di DA-Phen in qualità di agente dissuefante rispetto all'*addiction* da EtOH potrebbe essere inerente, come visto mediante il primo design sperimentale, ad una rimodulazione della trasmissione dopaminergica in seguito alla somministrazione

del coniugato aminoacidico, che modifica il rinforzo positivo generato dalla sostanza d'abuso, mediante azione diretta sui recettori *D1/D2-like* centrali.

E' noto anche che l'ACD, a livello centrale, è in grado di generare Salsolinolo in presenza di DA, in una reazione nota come condensazione di Pictet-Spengler (Rommelspacher et al, 1995; Haber et al, 1996). Nel cervello dei mammiferi è possibile riscontrare il Salsolinolo racemico (R/S)-SAL. Nel cervello umano l'enantiomero selettivo (R)-SAL può essere sintetizzato a partire da DA e ACD mediante la (R)-SAL sintetasi (Naoi et al, 1998). La sintetasi di tipo (R/S)-SAL è normalmente presente nei fluidi biologici, quali urine, plasma, fluido cerebrospinale e nel cervello di soggetti alcolizzati e non in fase post-mortem (Sjöquist et al, 1982; Haber et al, 1996, 2000).

Agendo su entrambi i terminali presinaptici e postsinaptici, il Salsolinolo è in grado di potenziare il firing dei neuroni dopaminergici della VTA, incrementando il release della DA nelle regioni a valle della VTA stessa, come recentemente dimostrato in uno studio condotto da Xie (Xie et al, 2013). Alla luce di quanto scritto, un altro possibile meccanismo, non disgiunto dall'azione diretta del DA-Phen sulle popolazioni recettoriali dopaminergiche, soprattutto a livello della VTA, potrebbe essere l'azione sequestrante dell'ACD presente a livello centrale per condensazione del DA-Phen con la stessa ACD, mediante la funzione amminica libera del DA-Phen.

5.6 Site Mapping e Docking Molecolare (in collaborazione con Dr. M. Tutone, Prof. A.M. Almerico)

5.6.1 Site Mapping e Docking Molecolare

Il parametro più importante generato dall'analisi mediante SiteMap è il punteggio complessivo di Sitescore, basato sulla somma ponderale di differenti proprietà molecolari: un punteggio maggiore di 1 suggerisce un sito particolarmente promettente in termini di interazione (Fig. 33). E' possibile evidenziare anche altre proprietà relative al sito recettoriale considerato, quali il Dscore. Il Dscore sfrutta le stesse proprietà del Sitescore, ma impiegando diversi coefficienti. In particolare, il punteggio di idrofobicità non viene considerato nella

stima, e ciò determina la possibilità chiave per distinguere i target “difficili” e “undruggable” – che non permettono interazione alcuna con potenziali agonisti o antagonisti – con un Dscore<1; da quelli definiti “druggable”, capaci di instaurare interazioni ottimali con agonisti o antagonisti di riferimento, e aventi un Dscore>1. In tal senso, DA-Phen ha fatto registrare un valore di SiteScore maggiore di uno per tre dei cinque siti di potenziale interazione.

L’analisi di docking molecolare ha rivelato l’interazione del DA-Phen con la tasca recettoriale profonda del sito di binding identificato. Complessivamente, l’analisi condotta ha permesso di evidenziare un’ottimale interazione fra il DA-Phen ed il sito recettoriale di tipo *DI-like*, comprovando ulteriormente l’azione della molecola oggetto di studio sulla trasmissione dopaminergica.

6. Conclusioni

Il ruolo della DA e dei farmaci dopaminomimetici, fra i quali si potrebbe ascrivere il meccanismo d'azione di DA-Phen (L-Fenilalanina- β -(3,4-diidrossifenil) etil- amide – sintetizzato presso il laboratorio di Tecnologia Farmaceutica del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli studi di Palermo – Giannola et al, 2008) nell'attivazione comportamentale, risulta di cruciale importanza non solo nelle risposte finalizzate all'ottenimento di una ricompensa ma anche in altri comportamenti finalizzati (Canon e Palmiter, 2003; Salamone et al, 2007).

I maze avversativi Forced Swimming Test e Morris Water Maze, eseguiti su ratti *naïve* trattati con DA-Phen, hanno evidenziato le potenzialità del nostro addotto e la sua capacità di agire come molecola capace di facilitare i processi mnemonici e cognitivi, generando di fatto un enhancement della *behavioral flexibility*, nonché della strategia risolutiva messa in atto dall'animale per adattarsi agli ambienti avversativi. I risultati ivi riportati hanno permesso di ipotizzare che il DA-Phen agisca come molecola in grado di modulare la trasmissione dopaminergica, in modo del tutto speculare a quanto osservato per agonisti dopaminergici D1-like. E' sperimentalmente dimostrato che il processo di riconfigurazione neuronale, nonché di rimodulare la Long Term-Potentiation (LTP) ippocampale, è bloccata dall'uso di antagonisti dopaminergici D1 (Frey et al, 1990; Li et al, 2003) e potenziata da agonisti D1 (Otmakhova e Lisman, 1998). Questo rafforza l'ipotesi che il DA-Phen possa agire da agonista dopaminergico D1.

Tale ipotesi è stata confermata dagli studi di Docking Molecolare che ha infatti rivelato la possibile interazione del DA-Phen con la tasca recettoriale profonda del sito di binding D1-like. Le interazioni sviluppatasi tra la molecola ed i residui della tasca sono molto diversificate. Innanzitutto, il DA-Phen genera 4 ponti a idrogeno: due attraverso l'idrolisi del catecolo col residuo Asp295, il terzo attraverso il gruppo aminico NH₂ ed il gruppo carbonilico del residuo Val81, ed il quarto attraverso l'Ossigeno carbonilico dell' ϵ -amino gruppo di Lys62. Quest'ultimo residuo è coinvolto nell'interazione idrofobica con il fenile. Il moiety fenilico interagisce, allo stesso tempo, con Phe269 e Trp266. Inoltre

l'anello del catecolo stabilisce un legame con Phe294, che fornisce un'ulteriore stabilizzazione della molecola di DA-Phen. Altri residui coinvolti nell'interazione con la tasca recettoriale riflettono le proprietà del sito in funzione della mappatura recettoriale, con una piccola prevalenza di residui idrofobici.

Alla luce dei risultati esposti, durante il terzo anno di Dottorato sono stati valutati gli effetti del DA-Phen in un modello sperimentale murino di auto-somministrazione di alcool.

Uno degli aspetti cruciali dell'esposizione cronica all'alcool, infatti, imputabile ad un meccanismo neurotrasmettitoriale adattativo, è l'ipofunzione della trasmissione mesolimbica dopaminergica (Melis et al, 2005). Alla base della volontaria assunzione di alcool, protratta nel tempo, c'è il tentativo di compensare la sua diminuita azione di "efficacia", dovuta l'instaurarsi della tolleranza, sul rilascio di DA. Significative sono le alterazioni della trasmissione DAergica anche a livello mesostriatale, riscontrate in ratti che assumono cronicamente EtOH: fra queste, un decremento della sintesi, unitamente ad un incremento della clearance di DA, al livello delle sinapsi. Inoltre, il deficit di DA che si osserva in soggetti con storia di alcool dipendenza (Diana et al, 2003) perdura molto al di là della sindrome astinenziale acuta: la persistenza di tale alterazione renderebbe ragione della vulnerabilità alle recidive. E' chiaro dunque che gli effetti di rinforzo positivo dovuti all'assunzione di EtOH abbiano come fondamento una profonda alterazione centrale del sistema DAergico.

I risultati ottenuti suggeriscono, nel complesso, che DA-Phen possa essere in grado di ridurre il consumo di alcol nelle fasi di ricaduta mediante la modulazione del sistema mesolimbico, così come la riduzione dell'impulsività e i comportamenti di drug-seeking possano fare ipotizzare che l'attività sul recettore D1 post-sinaptico indotta dal farmaco ristabilisca l'omeostasi nel circuito meso-corticale.

E' noto anche che l'ACD a livello centrale sia in grado di generare Salsolinolo in presenza di DA, in una reazione nota come condensazione di Pictet-Spengler (Rommelspacher et al, 1995; Haber et al, 1996). Nel cervello dei mammiferi è possibile riscontrare il Salsolinolo racemico (R/S)-SAL. Nel cervello umano

l'enantiomero selettivo (R)-SAL può essere sintetizzato a partire da DA e ACD mediante la (R)-SAL sintetasi (Naoi et al, 1998). La sintetasi di tipo (R/S)-SAL è normalmente presente nei fluidi biologici, quali urine, plasma, fluido cerebrospinale e nel cervello di soggetti alcolizzati e non in fase post-mortem (Sjöquist et al, 1982; Haber et al,1996).

Agendo sia sui terminali presinaptici che postsinaptici, il Salsolinolo è in grado di potenziare il firing dei neuroni dopaminergici della VTA, incrementando il release della DA nelle regioni a valle della VTA stessa, come recentemente dimostrato in uno studio condotto da Xie (Xie et al, 2013). Il netto decremento dei livelli di uptake di ACD potrebbe far presumere un altro possibile meccanismo, non disgiunto dall'azione diretta del DA-Phen sulle popolazioni recettoriali dopaminergiche, soprattutto a livello della VTA. L'azione sequenziale dell'ACD presente a livello centrale potrebbe avvenire per condensazione del DA-Phen con la stessa ACD, mediante la funzione amminica libera del DA-Phen.

Una appropriata caratterizzazione del profilo farmacocinetico e farmacodinamico PK/PD del DA-Phen potrà in futuro essere realizzata mediante l'ausilio del corrispondente radioligando.

7. Bibliografia

Abidin I, Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, Aydin S, Ozturk O. (2004) The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int. J. Neurosci.* **114**:683–699.

Altman J, Everitt BJ, Glautier S, Markou A, Nutt D, Oretti R, Phillips GD, Robbins TW. (1996) The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. *Psychopharmacology* **125**:285-345.

Arias-Carrion O, Stamelou M, Murillo-Rodriguez E, Menendez-Gonzalez M, Poppel E. (2010) Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch. Med.* **6**:3-24.

Arnsten AFT. (2011) Catecholamine Influences on Dorsolateral Prefrontal Cortical Networks. *Biol. Psychiatry.* **69**:e89-e99.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. (2004) The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* **16**:1–13.

Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RGM. (1995) Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature.* **378**:182-186.

Barak S, Carnicella S, Yowell QV, Ron D. (2011). Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses alcohol-induced allostasis of the mesolimbic dopaminergic system: implications for alcohol reward and seeking. *J. Neurosci.* **31**:9885-9894.

Bathia KP, Marsden CD. (1994) The behavioural and motor consequences of focal lesions of the basal ganglia in man. *Brain.* **117**:859 – 876.

Bell RL, Rodd ZA, Schultz JA, Peper CL, Lumeng L, Murphy JM, McBride WJ. (2008) Effects of short deprivation and re-exposure intervals on the ethanol drinking behavior of selectively bred high alcohol-consuming rats. *Alcohol.* **42**:407–16.

Benkert P, Biasini M, Schwede T. (2011) Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics.* **27**:343-350.

Benkert P, Künzli M, Schwede T. (2009) QMEAN Server for Protein Model Quality Estimation. *Nucleic Acids Res.* **37**:W510-5144, doi: 10.1093/nar/gkp322.

Benkert P, Tosatto SCE, Schomburg D. (2008) QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins.* **71**:261-277.

Bentivoglio M, Morelli M. (2005) The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* **21**:1–107.

Berlanga ML, Olsen CM, Chen V, Ikegami A, Herring BE, Duvachelle, CL, Alcantara AA. (2003) Cholinergic interneurons of the nucleus accumbens and dorsal striatum are activated by the self-administration of cocaine. *Neuroscience.* **120**:1149– 1156.

- Berridge KC. (2004) Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol. Behav.* **81**: 179–209.
- Berridge KC, Robinson TE. (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience. *Brain Res. Rev.* **28**:309-369.
- Berridge KC, Kringelbach ML. (2011) Building a neuroscience of pleasure and well-being. *Theory Res. Pract.* **1**:1–26.
- Bieszczad KM, Weinberger NM. (2010) Learning strategy trumps motivational level in determining learning-induced auditory cortical plasticity. *Neurobiol. Learn. Mem.* **93**:229–239.
- Bissiere S, Humeau Y, Andreas Lüthi A. (2003) Dopamine gates LTP induction in lateral amygdala by suppressing feedforward inhibition. *Nat. Neurosci.* **6**:587–592.
- Bjorklund A, Dunnett SB. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* **30**:194–202.
- Bodnoff S, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ. (1995) Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J. Neurosci.* **15**:61–69.
- Bonci A, Malenka RC. (1999) Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* **19**:3723–3730.
- Briscoe RJ, Gauvin DV. (1999) Effects of ethanol hangover on the operant self-administration of cocaine in rats. *Alcohol.* **17**: 41–45.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm, DS. (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the accumbens part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J. Comp. Neurol.* **338**:255– 278.
- Brooks DJ. (2008) Optimizing levodopa therapy for Parkinson's disease with levodopa/carbidopa/entacapone: implications from a clinical and patient perspective. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **4**:39-47.
- Brown RW, Bardo MT, Mace DD, Phillips SB, Kraemer PJ. (2000) d-Amphetamine facilitation of Morris water task performance is blocked by eticlopride and correlated with increased dopamine synthesis in the prefrontal cortex. *Behav. Brain Res.* **114**:135–143.
- Burris KD, Molski TF, Xu C, Ryan E, Tottori K, Kikuchi T, Yocca FD, Molinoff PB. (2002) Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**:381–389.
- Cacace S, Plescia F, Barberi I, Cannizzaro C (2012) Acetaldehyde Oral Self-Administration: Evidence from the Operant-Conflict Paradigm. *Alcohol.Clin.Exp.Res.* **36**:1278-1287.
- Cain DP, Saucier D, Hall J, Hargreaves EL, Boon F. (1996) Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: Contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behav. Neurosci.* **110**:86-102.
- Cannizzaro E, Martire M, Gagliano M, Plescia F, La Barbera M, Mantia G, Mineo A, Cannizzaro E, Cannizzaro G. (2005) Reversal of prenatal diazepam-induced deficit in a spatial-object learning task by brief, periodic maternal separation in adult rats. *Behav. Brain Res.* **161**:320–330.
- Canon CM, Palmiter RD. (2003) Reward without dopamine. *J. Neurosci.* **23**:10827-10831.

- Carafa M, Marianecchi C, Di Marzio L, De Caro V, Giandalia G, Giannola LI, Santucci E (2010) Potential dopamine prodrug-loaded liposomes: preparation, characterization, and in vitro stability studies. *J. Liposome Res.* **20**:250-7
- Carboni E, Acquas E, Frau R, Di Chiara G. (1989) Differential inhibitory effects of a 5-HT3 antagonist on drug-induced stimulation of dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.* **164**:515–519.
- Chao SZ, Ariano MA, Peterson DA, Wolf ME (2002). D1 dopamine receptor stimulation increases GluR1 surface expression in nucleus accumbens neurons. *J. Neurochem.* **83**: 704–712.
- Chartoff EH, Barhight MF, Mague SD, Sawyer AM, Carlezon WA. (2009) Anatomically dissociable effects of dopamine D1 receptor agonists on reward and relief of withdrawal in morphine-dependent rats. *Psychopharmacology.* **204**:227–239.
- Chen Z, Ito K, Fujii S, Miura M, Furuse H, Sasaki H, Kaneko K, Kato H, Miyakawa H. (1996) Roles of dopamine receptors in long-term depression: enhancement via D1 receptors and inhibition via D2 receptors. *Recept. Channels.* **4**:1–8.
- Chuhma N, Choi WY, Mingote S, Rayport S. (2009) Dopamine neuron glutamate cotransmission: frequency dependent modulation in the mesoventromedial projection. *Neuroscience.* **164**:1068–1083.
- Clapp P, Bhavé SV, Hoffman PL (2013) How Adaptation of the Brain to Alcohol Leads to Dependence - <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh314/310-339.htm>
- Clarke CE, Deane KH. (2001) Ropinirole versus bromocriptine for levodopa-induced complications in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* :CD001517.
- Cohen C, Perrault G, Sanger DJ. (1998) Preferential involvement of D3 versus D2 dopamine receptors in the effects of dopamine receptor ligands on oral ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology* **140**:478.485.
- Conrad CD. (2010) A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Behav. Cognit. Neurosci. Rev.* **34**:742-755.
- Conrad KL, Tseng KY, Uejima JL, Reimers JM, Heng LJ, Shaham Y, Marinelli M, Wolf ME. (2008). Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature* **454**: 118–121.
- Cortese BM, Phan KL. (2005) The role of glutamate in anxiety and related disorders. *CNS Spectr.* **10**:820–830.
- Crow TJ. (1972) A map of the rat mesencephalon for electrical self-stimulation. *Brain Res.* **36**:265–273.
- Cruz APM, Frei F, Graeff FG. (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **49** :171–176.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. (2005) Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci. Biobehav.* **29**: 547-69.
- D'Aquila PS. (2010) Dopamine on D2-like receptors “reboosts” dopamine D1-like receptor mediated behavioural activation in rats licking for sucrose. *Neuropharmacol.* **58**: 1085-1096.

- D'Aquila PS, Galistu A. (2012) Possible role of dopamine D1-like and D2-like receptors in behavioural activation and evaluation of response efficacy in the forced swimming test. *Neuropharmacology* **62**: 1717-1729.
- D'Hooge R, De Deyn PP. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* **36**:60-90.
- Dalley JW, Mar AC, Economidou D, Robbins TW. (2008) Neurobehavioral mechanisms of impulsivity: fronto-striatal systems and functional neurochemistry. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **90**:250–260.
- Dalley JW, Theobald DE, Eagle DM, Passetti F, Robbins TW. (2002) Deficits in impulse control associated with tonically-elevated serotonergic function in rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology.* **26**:716-728.
- D'Aquila PS. (2010) Dopamine on D2-like receptors “reboosts” dopamine D1-like receptor mediated behavioural activation in rats licking for sucrose. *Neuropharmacology.* **58**: 1085-1096.
- Descarries L, Berube-Carriere N, Riad M, Bo GD, Mendez JA, Trudeau LE. (2008) Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res. Rev.* **58**:290–302.
- Desmond Molecular Dynamics System, version 2.2, DE. Shaw Research, New York, NY (2009). Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 2.2, Schrödinger, New York, NY, 2009.
- Detke MJ, Johnson J, Lucki I. (1997) Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* **5**:107–112
- Detke MJ, Lucki I. (1996) Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav. Brain Res.* **73**:43-46.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D. (2004) Dopamine and drug addiction the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology.* **47**:227-241.
- Di Chiara G, Bassareo V. (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin. Pharmacol.* **7**:69-76.
- Di Chiara G, Imperato A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:5274-8.
- Di Chiara G. (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav. Brain Res.* **137**:75–114.
- Di Matteo V, Di Giovanni G, Pierucci M, Esposito E. (2008) Serotonin control of central dopaminergic function: focus on in vivo microdialysis studies. *Prog. Brain Res.* **172**:7–44.
- Di Stefano A, Sozio P, Cerasa LS, Iannitelli A. (2011) L-Dopa prodrugs: an overview of trends for improving Parkinson's disease treatment. *Curr Pharm Des.* **17**(32):3482-93.
- Di Stefano A, Sozio P, Cocco A, Iannitelli A, Santucci E, Costa M, Pecci L, Nasuti C, Cantalamessa F, Pinnen F. (2006) L-Dopa and DA/(R)- α -lipoic acid conjugates as multifunctional codrugs with antioxidant properties. *J. Med. Chem.* **49**:1486-1493.

Diana M, Pistis M, Muntoni A, Gessa GL. (1996) Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: evidence of protracted abstinence. *Neuroscience* **71**:411-415.

Diana M. (2011) The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Front. Psychiatry*. **2**:64. doi:10.3389/fpsy.2011.00064.

Diana M, Brodie M, Muntoni A, Puddu MC, Pillolla G, Steffensen S, Spiga S, Little HJ. (2003) Enduring effects of chronic ethanol in the CNS: basis for alcoholism. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **27**(2):354-61.

Dyr W, McBride WJ, Lumeng T, LI TK, Murphy JM. (1993) Effects of D1 and D2 dopamine receptor agents on ethanol consumption in the high-alcohol drinking (HAD) line of rats. *Alcohol*. **10**:207-212.

Edwards S, Graham DL, Bachtell RK, Self DW (2007). Region-specific tolerance to cocaine-regulated cAMP-dependent protein phosphorylation following chronic self-administration. *Eur. J. Neurosci.* **25**: 2201–2213.

Erhardt S, Schwieler L, Engberg G (2002). Excitatory and inhibitory responses of dopamine neurons in the ventral tegmental area to nicotine. *Synapse*. **43**: 227–237.

Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, Gonzalez B, Tobena A. (1997) Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav. Gen.* **27**:513–26.

Foddai M, Dosia G, Spiga S, Diana M. (2004) Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology*. **29**:530–536

Frank MJ, Fossella JA. (2010) Neurogenetics and pharmacology of learning, motivation, and cognition. *Neuropsychopharmacology*. **36**:133-152.

Frey U, Schroeder H, Matthies H. (1990) Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.* **522**:69–75.

Funk D, Vohra S, Lê AD. (2004) Influence of stressors on the rewarding effects of alcohol in Wistar rats: studies with alcohol deprivation and place conditioning. *Psychopharmacology*. **176**:82–7.

George SR, Fan T, Ng GYK, Jung SY, O.Dowd BF, Naranjo CA. (1995) Low endogenous dopamine function in brain predisposes to high alcohol preference and consumption: reversal by increasing synaptic dopamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **273**:373-379.

Giannola LI, De Caro V, Giandalia G, Siragusa MG, Lamartina L. (2008) Synthesis and in vitro studies on a potential dopamine prodrug. *Pharmazie*. **63**:704-10.

Gil M, Armario A. (1998) Chronic immobilization stress appears to increase the role of dopamine in the control of active behaviour in the forced swimming test. *Behav. Brain Res.* **91**: 91-97.

Glide, version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.

Gonzalez LE, File SE. (1997) A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* **17**: 1505–1511.

Goodford PJ. (1985) A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. *J. Med. Chem.* **28**:849-857.

Goodman and Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics - 11th Ed., **20** (2006).

Goto Y, Yang CR, Otani S. (2010) Functional and dysfunctional synaptic plasticity in prefrontal cortex: roles in psychiatric disorders. *Biol. Psychiatry.* **67**:199–207.

Grace AA. (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience.* **41**:1–24.

Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ. (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci.* **30**:220–227.

Grace AA, Rosenkranz JA. (2002) Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. *Physiol. Behav.* **77**:489–493.

Grecksch G, Matties H. (1981) The role of dopaminergic mechanisms in the rat hippocampus for the consolidation in a brightness discrimination. *Psychopharmacology* **75**:165–168.

Gruber AJ, O'Donnell P. (2009) Bursting activation of prefrontal cortex drives sustained up states in nucleus accumbens spiny neurons in vivo. *Synapse.* **63**:173–180.

Guan X, Emanuel Rubin E, Anni H. (2012) An Optimized Method for the Measurement of Acetaldehyde by High-Performance Liquid Chromatography. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **36**:398–405.

Guccione L, Djouma E, Penman J, Paolini AG. (2013) Calorie restriction inhibits relapse behaviour and preference for alcohol within a two-bottle free choice paradigm in the alcohol preferring (iP) rat. *Physiol. Behav.* **110–111**:34–41.

Guccione L, Paolini AG, Penman J, Djouma E. (2012) The effects of calorie restriction on operant-responding for alcohol in the alcohol preferring (iP) rat. *Behav Brain Res.* **230**:281-7.

Haber SN, Fudge JL, McFarland NR. (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J. Neurosci.* **20**: 2369–2382.

Haber H, Winkler A, Putscher I, Henklein P, Baeger I, Georgi M, Melzig MF. (1996). Plasma and urine salsolinol in humans: effect of acute ethanol intake on the enantiomeric composition of salsolinol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**:87–92.

Handley SL, Mithani S. (1984) Effects of α -adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmeideberg's Arch. Pharmacol.* **327**:1–5.

Harris GC, Aston-Jones G. (1994) Involvement of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome. *Nature* **371**:155–7.

Heijtz RD, Beraki S, Scott L, Aperia A, Forssberg H. (2002) Sex differences in the motor inhibitory and stimulatory role of dopamine D1 receptors in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **445**:97– 104.

Hitchcott PK, Quinn JJ, Taylor JR. (2007) Bidirectional modulation of goal-directed actions by prefrontal cortical dopamine. *Cereb. Cortex.* **17**:2820–2827.

Hnasko TS, Chuhma N, Zhang H, Goh GY, Sulzer D, Palmiter RD, Rayport S, Edwards RH. (2010) Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo. *Neuron*. **65**:643–656.

Hodge CW, Chappelle AM., Samson HH. (1996). Dopamine receptors in the medial prefrontal cortex influence ethanol and sucrose-reinforced responding. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **20**:1631–1638.

Holter SM, Linthorst AC, Reul JM, Spanagel R. (2000) Withdrawal Symptoms in a Long-Term Model of Voluntary Alcohol Drinking in Wistar Rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **66**:143–151.

Hölter SM, Engelmann M, Kirschke C, Liebsch G, Landgraf R, Spanagel R. (1998) Long-term ethanol self-administration with repeated ethanol deprivation episodes changes ethanol drinking pattern and increases anxiety-related behaviour during ethanol deprivation in rats. *Behav. Pharmacol.* **9**:41–48.

Horvitz JC. (2000) Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience*. **96**:651–656.

Hoshino K, Uga DA, de Paula HMG. (2004) The compulsive-like aspect of the head dipping emission in rats with chronic electrolytic lesion in the area of the median raphe nucleus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**: 245-250.

Huot RL, Thirivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM. (2001) Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology*. **158**:366–73.

Iorio LC, Barnett A, Leitz FH, Houser VP, Korduba CA. (1983) SCH 23390, a potential benzazepine antipsychotic with unique interactions on dopaminergic systems. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**:462-468.

Ikemoto S, Bonci A. (2014) Neurocircuitry of drug reward. *NeuroPharm.* **76**:329-41.

Ito R, Dalley JW, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ. (2000). Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *J. Neurosci.* **20**:7489– 7495.

Ito R, Robbins TW, Everitt BJ. (2004). Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat. Neurosci.* **7**:389– 397.

Jarrard LE. (1983) Selective hippocampal lesions and behavior: effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav. Neurosci.* **97**:873–889.

Jeffery KJ, Morris RGM. (1993) Cumulative long-term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in the water maze. *Hippocampus*. **3**:133-140.

Joseph MH, Datla K, Young AM. (2003) The interpretation of the measurement of nucleus accumbens dopamine by in vivo dialysis: the kick, the craving or the cognition? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **27**:527–541.

Jupp B, Lawrence AJ. (2010) New horizons for therapeutics in drug and alcohol abuse. *Pharmacol. Ther.* **125**:138–168.

Kalivas PW, Duffy P. (1995) D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* **15**:5379–5388.

Kelly PH, Moore KE. (1976) Mesolimbic dopaminergic neurons in the rotational model of nigrostriatal function. *Nature.* **263**:695–696.

Kenna GA, Leggio L, Swift RM. (2009) A safety and tolerability laboratory study of the combination of aripiprazole and topiramate in volunteers who drink alcohol. *Hum. Psychopharmacol.* **24**:465-72.

Köhler C., Hall H., Ogren S.O., Gawell L. (1985) Specific in vitro and in vivo binding of 3H-raclopride. A potent substituted benzamide drug with high affinity for dopamine D-2 receptors in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* **34**: 2251-2259.

Koob GF. (2014) Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. *Handb. Clin. Neurol.* **125**:33-54.

Koob GF. (2009) Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. *Neuropharmacology* **56**: 18–31.

Koob GF, Le Moal M. (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* **278**: 52–58.

Koob GF, Le Moal M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**: 97–129.

Koob GF, Le Moal M (2005) Plasticity of reward neurocircuitry and the ‘dark side’ of drug addiction. *Nat. Neurosci.***8**:1442-1444.

Koob GF, Le Moal M. (2008) Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **363**:3113–23.

Koob GF, Volkow ND. (2010) Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology.* **35**: 217–238.

Koob GF. (2013) Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: alcohol addiction as a reward deficit disorder. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **13**:3-30.

Koob GF, Nestler EJ. (1997). The neurobiology of drug addiction. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **9**:482–497.

Kranzler HR, Covault J, Pierucci-Lagha A, Chan G, Douglas K, Arias AJ, Oncken C. (2008) Effects of aripiprazole on subjective and physiological responses to alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **32**:573–579.

Kroner S, Rosenkranz JA, Grace AA, Barrionuevo G. (2005) Dopamine modulates excitability of basolateral amygdala neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* **93**:1598–1610.

Lacroix L, Broersen LM, Weiner I, Feldon J. (1998) The effects of excitotoxic lesion of the medial prefrontal cortex on latent inhibition, prepulse inhibition, food hoarding, elevated plus maze, active avoidance and locomotor activity in the rat. *Neuroscience* **84**:431– 442.

Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B, Roeper J. (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron.* **57**:760–773.

Lamont EW, Kokkinidis L. (1998) Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. *Brain Res.* **795**:128–136

Lapin IP. (1995) Only controls: effect of handling, sham injection, and intraperitoneal injection of saline on behavior of mice in an elevated plus-maze. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **34**: 73–77.

Le Moal M. (1995) Mesocorticolimbic dopaminergic neurons: functional and regulatory roles, *Psychopharmacology* **71**:283– 294.

Lecca D, Cacciapaglia F, Valentini V, Acquas E, Di Chiara G. (2007) Differential neurochemical and behavioral adaptation to cocaine after response contingent and noncontingent exposure in the rat. *Psychopharmacology.* **191**:653-67.

Legault M, Wise RA. (2001) Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: dependence on impulse flow from the ventral subiculum and glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* **13**:819–828.

Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ. (2003) Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat. Neurosci.* **6**:526–531.

Lindner MD, Ribkoff VK. (1991) Relationship between performance in the Morris water task, visual activity and thermoregulatory function in aged F-344 rats. *Behav. Brain Res.* **45**:45-55.

Linseman MA (1990) Effects of dopaminergic agents on alcohol consumption by rats in a limited access paradigm. *Psychopharmacology* **100**:195-200.

Lisman JE, Grace AA. (2005) The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron.* **46**:703–713.

Liu Z, Richmond BJ, Murray EA, Saunders RC, Steenrod S, Stubblefield BK, Montague DM, Ginns EI. (2004) DNA targeting of rhinal cortex D2 receptor protein reversibly blocks learning of cues that predict reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **101**:12336–12341.

Loebens M, Barros HM. (2003) Diet influences cocaine withdrawal behaviors in the forced swimming test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **74**:259–267.

Lomize MA, Lomize AL, Pogozheva ID, Mosberg HI (2006) OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* **22**: 623-625.

Lopez-Munoz F, Alamo C, Garcia-Garcia P. (2011) The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs. *J. Anxiety Disord.* **25**:554–62.

Lovell SC, Davis IW, Adrendall WB, De Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC (2003) Structure validation by C alpha geometry: phi, psi and C beta deviation. *Proteins* **50**:437-450.

Maestro v 9.0.211, Schrodinger LLC, New York, NY.

Mao J, Xu Y, Deng YL, Lin FK, Xie BJ, Wang R. (2010) Determination of Acetaldehyde, Salsolinol and 6-Hydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline in Brains after Acute Ethanol Administration to Neonatal Rats. *Chin. J. Anal. Chem.* **38**:1789–1792.

Margolis EB, Mitchell JM, Ishikawa J, Hjelmstad GO, Fields HL. (2008) Midbrain dopamine neurons: projection target determines action potential duration and dopamine D(2) receptor inhibition. *J. Neurosci.* **28**:8908–8913.

Marowsky A, Yanagawa Y, Obata K, Vogt KE. (2005) A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron.* **48**:1025–1037.

Martinez D, Gil R, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Perez A, Kegeles L, Talbot P, Evans S, Krystal J, Laruelle M, Abi-Dargham A. (2005) Alcohol Dependence Is Associated with Blunted Dopamine Transmission in the Ventral Striatum. *Biol. Psychiatry.* **58**:779–786.

Maurer R, Derivaz V. (2000) Rats in a transparent Morris water maze use elemental and configural geometry of landmarks as well as distance to the pool wall. *Spatial Cogn. Comput.* **2**:135-156.

McDougall SA, Hernandez RM, Reichel CM, Farley CM. (2005) The partial D2-like dopamine receptor agonist terguride acts as a functional antagonist in states of high and low dopaminergic tone: evidence from preweanling rats - *Psychopharmacology* **178**: 431–439.

McNamara RK, Skelton RW. (1993) The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res. Rev.* **18**:33-49.

Melendez RI, Rodd-Henricks ZA, McBride WJ, Murphy JM.(2003). Alcohol stimulates the release of dopamine in the ventral pallidum but not in the globus pallidus: a dual-probe microdialysis study. *Neuropsychopharmacology* **28**: 939–946.

Melis M, Enrico P, Peana AT, Diana M. (2007) Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *Eur. J. Neurosci.* **26**:2824–2833.

Melis M, Spiga S, Diana M. (2005) The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int. Rev. Neurobiol.* **63**:101–154.

Meller E, Bohmaker K, Namba Y, Friedhoff AJ, Goldstein M. (1987) Relationship between receptor occupancy and response at striatal autoreceptors. *Mol. Pharmacol.* **31**:592–598.

Messier C, Mrabet O, Destrade C. (1991) Locomotor bias produced by intra-accumbens injection of dopamine agonists and antagonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **41**:177-182. A

Messier C, Mrabet O, Durkin TP, Destrade C. (1991) Bidirectional potentiation between D1 and D2 dopamine agonists: effects of unilateral intra-accumbens injections on locomotor activity in mice. *Life Sci.* **49**:43-48. B

Molina-Luna K, Pekanovic A, Rohrich S, Hertler B, Schubring-Giese M, Rioult-Pedotti MS, Luft AR. (2009) Dopamine in motor cortex is necessary for skill learning and synaptic plasticity. *PLoS ONE.* **4**:e7082.

Montague PR, Dayan P, Sejnowski TJ. (1996) A framework for mesencephalic dopamine systems based on predictive Hebbian learning. *J. Neurosci.* **16**:1936–1947.

de la Mora MP, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, Marcellino D, Fuxe K. (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Prog. Neurobiol.* **90**:198-216.

de la Mora MP, Gallegos-Cari A, Crespo-Ramirez M, Marcellino D, Hansson C, Fuxe K. (2012) Distribution of dopamine D2-like receptors in the rat amygdala and their role in the modulation of unconditioned fear and anxiety. *Neuroscience.* **201**:252–266.

de la Mora MP, Cárdenas-Cachón L, Vázquez-García M, Crespo-Ramírez M, Jacobsen K, Höistad M, Agnati L, Fuxe K. (2005) Anxiolytic effects of intra-amygdaloid injection of the D1 antagonist SCH23390 in the rat. *Neurosci Lett.* **377**:101-5.

Moran-Gates T, Gan L, Park YS, Zhang K, Baldessarini RJ, Tarazi FI. (2006) Repeated antipsychotic drug exposure in developing rats: dopamine receptor effects. *Synapse.* **59**:92-100.

Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* **297**:681–683.

Nakamura K, Hikosaka O. (2006) Role of dopamine in the primate caudate nucleus in reward modulation of saccades. *J. Neurosci.* **26**:5360–5369.

Naoi M, Maruyama W, Nakao N, Ibi T, Sahashi K, Benedetti MS. (1998) (R)salsolinol N-methyltransferase activity increases in parkinsonian lymphocytes. *Ann. Neurol.* **43**: 212–216.

Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. (2004) Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **24**:165–205.

Niehaus JL, Cruz-Bermudez ND, Kauer JA. (2009) Plasticity of addiction: a mesolimbic dopamine shortcircuit? *Am. J. Addict.* **18**:259–271.

O'Donnell P, Grace AA. (1995) Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J. Neurosci.* **15**:3622–3639.

Olton DS, Papas BC. (1979) Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* **17**:669–682.

Otani S, Daniel H, Roisin MP, Crepel F. (2003) Dopaminergic modulation of long-term synaptic plasticity in rat prefrontal neurons. *Cereb. Cortex.* **13**:1251–1256.

Otmakhova NA, Lisman JE. (1998) D1/D5 dopamine receptors inhibit depotentiation at CA1 synapses via cAMP-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **18**:1270–1279.

Overton PG, Richards CD, Berry MS, Clark D. (1999) Long-term potentiation at excitatory amino acid synapses on midbrain dopamine neurons. *Neuroreport.* **10**:221–226.

Packard MG, White NM. (1991) Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. *Behav. Neurosci.* **105**:295–306.

Paoletti R, Nicosia S, Clementi F, Fumagalli G. (2009) Trattato di farmacologia e terapia – *Farmacologia Generale e Molecolare*, Terza edizione, UTET.

Pawluski JL, Walker SK, Galea LA. (2006) Reproductive experience differentially affects spatial reference and working memory performance in the mother. *Horm. Behav.* **49**:143–149.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* **14**:149–67.

Pellow S, File SE. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **24**:525–9.

Pennartz CM, Ameerun RF, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH. (1993) Synaptic plasticity in an in vitro slice preparation of the rat nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* **5**:107–117.

Perra S, Clements MA, Bernier BE, Morikawa H. (2011) In Vivo Ethanol Experience Increases D2 Autoinhibition in the Ventral Tegmental Area. *Neuropsychopharmacology* **36**:993–1002.

Pezze MA, Feldon J. (2004) Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog. Neurobiol.* **74**:301–320.

Phillips GD, Salussolia E, Hitchcott PK. (2010) Role of the mesoamygdaloid dopamine projection in emotional learning. *Psychopharmacology.* **210**:303-316.

Plescia F, Brancato A, Marino RM, Cannizzaro C. (2013) Acetaldehyde as a drug of abuse:insight in to AM281administartion on Operant- Conflict Paradigm in rats. *Front.Behav.Neurosci.* **11**:7-64.

Pohl JB, Baldwin BA, Dinh BL, Rahman P, Smerek D, Prado III FJ, Sherazee N, Atkinson NS. (2012) Ethanol preference in Drosophila melanogaster is driven by its caloric value. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **36**:1903–12.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* **47**:379– 91.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. (1977) Depression: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* **266**:730– 2.

Poulin P, Haddad S. (2012) Advancing prediction of tissue distribution and volume of distribution of highly lipophilic compounds from a simplified tissue-composition-based model as a mechanistic animal alternative method. *J Pharm Sci.* **101**:2250-61.

Quertemont E, De Witte P. (2001) Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **68**:449–454.

Quertemont E, Tambour S. (2004) Is ethanol a pro-drug? Role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**:130-134.

Quinlan MG, Sharf R, Lee DY, Wise RA, Ranaldi R. (2004) Blockade of substantia nigra dopamine D1 receptors reduces intravenous cocaine reward in rats. *Psychopharmacology*. **175**:53–59.

Rautio J, Lainek K, Gynther M, Savolainen J. (2008) Prodrug Approaches for CNS Delivery. *AAPS J.* **10**:92-94.

Redgrave P, Gurney K. (2006) The short-latency dopamine signal: a role in discovering novel actions? *Nat. Rev. Neurosci.* **7**:967-975.

Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K. (1999) Is the short-latency dopamine response too short to signal reward error? *Trends Neurosci.* **12**:146–151.

Rezayof A, Hosseini SS, Zarrindast MR. (2009) Effects of morphine on rat behaviour in the elevated plus maze: the role of central amygdala dopamine receptors. *Behav. Brain Res.* **202**:171–8.

Robbins TW, Arnsten AF. (2009) The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Ann. Rev. Neurosci.* **32**:267–287.

Robbins TW, Roberts AC. (2007) Differential regulation of fronto-executive function by the monoamines and acetylcholine. *Cereb. Cortex.* **17**:i151–i160.

Robinson ESJ, Dalley JW, Theobald DEH, Glennon JC, Pezze MA, Murphy ER, Robbins TW. (2008) Opposing roles for 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in the nucleus accumbens on inhibitory response control in the 5-choice serial reaction time task. *Neuropsychopharmacology*. **33**: 2398–2406.

Robinson TE, Berridge KC. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.* **18**:247-291.

Rodgers RJ, Nikulina EM, Cole JC. (1994) Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze *Pharmacol. Biochem. Behav.* **49**:985–995.

Rommelspacher H, Sillstrom Baum S, Dufeu P, Schmidt LG. (1995). Determination of (R)- and (S)-salsolinol sulfate and dopamine sulfate levels in plasma of nonalcoholics and alcoholics. *Alcohol* **12**:309–315.

Rosenkranz JA, Grace AA. (2002) Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J. Neurosci.* **22**:324–337.

Rosenkranz JA, Grace AA. (2001) Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J. Neurosci.* **21**:4090–4103.

Rossetti ZL, Hmaidan Y, Gessa GL (1992). Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **221**: 227–234.

Rotaru DC, Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. (2007) Dopamine D1 receptor activation regulates sodium channel-dependent EPSP amplification in rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J. Physiol.* **581**:981–1000.

Routtenberg A, Malsbury C. (1969) Brainstem pathways of reward. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **68**:22–30.

Roy A, Kucukural A, Zhang Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**:725-738.

Rydberg P, Olsen L. (2012) Ligand-Based Site of Metabolism Prediction for Cytochrome P450 2D6. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**:69-73.

Rydberg P, Jørgensen MS, Jacobsen TA, Jacobsen AM, Madsen KG, Olsen L. (2013) Nitrogen Inversion Barriers Affect the N-Oxidation of Tertiary Alkylamines by Cytochromes P450. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**:993-997.

Rydberg P, Gloriam DE, Olsen L. (2010) The SMARTCyp cytochrome P450 metabolism prediction server. *Bioinformatics.* **26**:2988-2989.

Rydberg P, Rostkowski M, Gloriam DE, Olsen L. (2013) The Contribution of Atom Accessibility to Site of Metabolism Models for Cytochromes P450. *Mol. Pharmaceutics.* **10**:1216-1223.

Salamone JD, Correa M, Farrar A, Mingote SM. (2007) Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology.* **191**: 461-482.

Salamone JD, Correa M, Farrar AM, Nunes EJ, Pardo M. (2009) Dopamine, behavioral economics, and effort. *Front. Behav. Neurosci.* **3**:13.

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

Salmi P, Ahlenius S. (2000) Sedative effects of the dopamine D1 receptor agonist A 68930 on rat open-field behavior. *NeuroReport.* **11**:1269–1272.

Sanders A, McDougall R, Hernandez M, Reichel CM, Farley CM. (2005) The partial D2-like dopamine receptor agonist Terguride acts as a functional antagonist in states of high and low dopaminergic tone: evidence from preweaning rats. *Psychopharmacology.* **191**:461-462.

Santín LJ, Rubio A, Begega J, Arias L. (2000) Effects of alcohol consumption on spatial reference and working memory task. *Alcohol.* **20**:149-159.

Saucier D, Cain DP. (1995) Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature.* **378**:186-189.

Scaturro AL, Giandalia G, De Caro V, Sutera FM, Gentile C, Livrea MA, Cannizzaro C, Giannola LI. (2012) A new Dopamine aminoacid conjugate: synthesis and determination of physico-chemical properties useful to cross the BBB. Oral Proceeding-CRS Workshop, p.28. 8-10th November, Palermo, Italy.

Scherrmann JM. (2002) Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vasc. Pharmacol.* **38**:349–354.

Schiera G, Di Liegro CM, Saladino P, Pitti R; Savettieri G, Proia P, Di Liegro I. (2013) Oligodendrioma cells synthesize the differentiation-specific linker histone H1 and release it into the extracellular environment through shed vesicles. *Int. J. Oncol.* **43**:1771-1776.

Schindler CW, Carmona GN. (2002) Effects of dopamine agonists and antagonists on locomotor activity in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **72**: 857-86.

Schultz W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci* **30**: 259-288.

Schultz W, Dayan P, Montague PR. (1997) A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science.* **275**: 1593-1599.

Schultz W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J. Neurophysiol.* **80**:1-27.

Schultz, W. (2000). Multiple reward signals in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.***1**:199-207.

Seamans JK, Yang CR. (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol.***74**:1-58.

Sesack S.R., Grace A.A. (2010) Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology.* **35**:27-47.

Sesack SR, Pickel VM. (1992). Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* **320**:145-160.

Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ. (2008) Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science.* **321**:848-851.

Sheynikhovich D, Otani S, Arleo A. (2013) Dopaminergic Control of Long-Term Depression/Long-Term Potentiation Threshold in Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* **33**:13914-13926.

Simon P, Panissaud C, Costentin J. (1992) Sulpiride anxiogenic-like effect inhibition by a D1 dopamine receptor antagonist *Neuroreport* **3**:941-942.

Sinclair JD, Senter RJ. (1967) Increased preference for ethanol in rats following alcohol deprivation. *Psychon Sci.* **8**:11-12.

Sitemap 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.

Söderpalm B, Ericson M. (2013) Neurocircuitry involved in the development of alcohol addiction: the dopamine system and its access points. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **13**:127-61.

Sjöquist, B, Liljequist S, Engel J. (1982). Increased salsolinol levels in rat striatum and limbic forebrain following chronic ethanol treatment. *J. Neurochem.* **39**:259-262.

Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OFX, Paula-Barbosa MM. (2000) Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. **97**:253–266.

Spanagel R, Holter SM. (2000) Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. *J. Neural. Transm.* **107**:669–80.

Spanagel R, Hölter SM. (1999) Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: An animal model of alcoholism? *Alcohol*. **34**:231–243.

Stoof JC, Verheijden PDHM. (1986) D2 receptor stimulation inhibits cyclic AMP formation brought about by D1 receptor stimulation in rat neostriatum but not nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.* **129**: 205-206.

Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A. (2010) Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not dorsal striatum core release glutamate. *J. Neurosci.* **30**:8229– 8233.

Sullivan RM, Duchesne A, Hussain D, Waldron J, Laplante F. (2009) Effects of unilateral amygdala dopamine depletion on behaviour in the elevated plus maze: Role of sex, hemisphere and retesting. *Behav. Brain Res.* **205**:115–122.

Surmeier DJ. (2007) Dopamine and working memory mechanisms in the prefrontal cortex. *J. Physiol.* **581**:885.

Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.* **30**:228–235.

Surmeier DJ, Shen W, Day M, Gertler T, Chan S, Tian X, Plotkin JL. (2010) The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits. *Prog. Brain Res.* **183**:148–167.

Sutherland RJ, Weisend MP, Mumby D, Astur RS, Hanlon FM, Koerner A, Thomas MJ, Wu Y, Moses SN, Cole C, Hamilton DA, Hoesing JM. (2001) Retrograde amnesia after hippocampal damage: recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus*. **11**:27–42.

Tabakoff B, Hoffman PL. (2013) The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: An integrative history. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **113**:20–37.

Tang YP, Noda Y, Nabeshima T. (1997) Involvement of activation of dopaminergic neuronal system in learning and memory deficits associated with experimental mild traumatic brain injury. *Eur J Neurosci.* **9**: 1720-1727.

Tecuapetla F, Patel JC, Xenias H, English D, Tadros I, Shah F, Berlin J, Deisseroth K, Rice ME, Tepper JM, Koos T. (2010) Glutamatergic signaling by mesolimbic dopamine neurons in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* **30**:7105–7110.

Thanos PK, Volkow ND, Freimuth P, Umegaki H, Ikari H, Roth G, Ingram DK, Hitzemann R. (2001) Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol selfadministration. *J. Neurochem.* **78**:1094–103.

The UniProt Consortium (2010) Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource, *Nucleic Acids Res.* **39**:D214-D219.

Thomas MJ, Malenka RC, Bonci A. (2000) Modulation of long-term depression by dopamine in the mesolimbic system. *J. Neurosci.* **20**:5581–5586.

Tzschentke TM. (2001) Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog. Neurobiol.* **63**:241–320.

Vengeliene V, Heidbreder CA, Spanagel R. (2007) The effects of lamotrigine on alcohol seeking and relapse. *Neuropharmacology.* **53**:951-957.

Volkow N, Li TK. (2005) The neuroscience of addiction. *Nat. Neurosci.* **8**:1429-30.

Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C. (2007). Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *J. Neurosci.* **27**:12700–12706.

Voon V, Pessiglione M, Brezing C, Gallea C, Fernandez HH, Dolan RJ, Hallett M. (2010) Mechanisms underlying dopamine-mediated reward bias in compulsive behaviors. *Neuron.* **65**:135–142.

Vorel SR, Liu X, Hayes RJ, Spector JA, Gardner EL. (2001). Relapse to cocaine-seeking after hippocampal theta burst stimulation. *Science* **292**:1175– 1178.

Vorhees CV, Williams MT. (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* **1**:848-858.

Voronin K, Randall P, Myrick H, Anton R. (2008) Aripiprazole effects on alcohol consumption and subjective reports in a clinical laboratory paradigm-possible influence of self-control. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **32**:1954–1961.

Walf AA, Frye CA. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* **2**:322-328.

Walker BM, Koob GF. (2007) The g-aminobutyric acid-B receptor agonist baclofen attenuates responding for ethanol in ethanol-dependent rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **31**:11-18.

Walker BM, Zorrilla EP, Koob GF. (2011) Systemic k-opioid receptor antagonism by naltrexone reduces dependence-induced excessive alcohol self-administration in rats. *Addict. Biol.* **16**:116–119.

Wee S, Koob GF. (2010). The role of the dynorphin-kappa opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. *Psychopharmacology.* **210**: 121–135.

Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyttiä P, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF. (1996) Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J. Neurosci.* **16**:3474-3485.

Williams GV, Goldman-Rakic PS. (1995) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature*. **376**:572-575.

Willuhn I, Wanat MJ, Clark JJ, Phillips PE. (2010) Dopamine Signaling in the Nucleus Accumbens of Animals Self-Administering Drugs of Abuse. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **3**:29–71.

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

Wise RA. (2005) Forebrain substrates of reward and motivation. *J. Comp. Neurol.* **493**:115–121.

Wise RA. (1996) Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**: 319–40.

Wise RA, Rompre PP. (1989) Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.* **40**:191–225.

Wise RA. (2009) Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci.* **32**:517-524.

Xie G, Krnjevic K, Ye JH. (2013) Salsolinol modulation of dopamine neurons. *Front. Behav Neurosci.* **7**:52.doi:10.3389/fnbeh.2013.00052

Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S. (1994) Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioural responses. *Cell* **79**: 729– 742.

Yang CR, Seamans JK. (1996) Dopamine D1 receptor actions in layer V-VI rat prefrontal cortex neurons in vitro: Modulation of dendritic-somatic signal integration. *J. Neurosci.* **16**:1922–1935.

Yao WD, Gainetdinov RR, Arbuckle MI, Sotnikova TD, Cyr M, Beaulieu JM, Torres GE, Grant SG, Caron MG. (2004). Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity. *Neuron*. **41**: 625–638.

Yeomans MR. (2010) Alcohol, appetite and energy balance: is alcohol intake a risk factor for obesity? *Physiol. Behav.* **100**:82–9.

Yeomans MR, Caton S, Hetherington MM. (2003) Alcohol and food intake. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care.* **6**:639–44.

Yoshimoto K, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. (1992) Ethanol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **16**:781– 785.

You ZB, Wang B, Zitzman D, Wise RA. (2008) Acetylcholine release in the mesocorticolimbic dopamine system during cocaine-seeking: conditioned and unconditioned contributions to reward and motivation. *J. Neurosci.* **28**:9021–9029.

You ZB, Wang B, Zitzman D, Azari S, Wise RA. (2007) A role for conditioned ventral tegmental glutamate release in cocaine-seeking. *J. Neurosci.* **27**:10546–10555.

Zahm DS, Brog JS. (1992) On the significance of subterritories in the accumbens part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* **50**:751– 767.

Zahm DS. (1999) Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Ann. NY. Acad. Sci.* **877**:113– 128.

Zhang Y. (2009) I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8, *Proteins* **77**:100-113