



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN

Neuroscienze

Ciclo XXVII

L'isolamento sociale riduce marcatamente la risposta dei neuroni dopaminergici mesocorticali agli stimoli piacevoli.

Settore scientifico disciplinare di afferenza:

BIO-14

Presentata da:

Dottoressa Valeria Lallai

Coordinatore Dottorato:

Professor Walter Fratta

Tutor/Relatore:

Professoressa Laura Dazzi

Esame finale anno accademico 2013 – 2014

Sommario

Abbreviazioni	2
Breve Introduzione	4
Dopamina	5
<i>La corteccia prefrontale</i>	6
<i>Connessioni</i>	7
Gratificazione	10
<i>Gratificazione e Dopamina</i>	11
<i>Gratificazione e cibo</i>	15
<i>Cibo e Dopamina</i>	18
Impulsività	21
Stress	25
<i>Isolamento sociale</i>	28
Obiettivi	31
Materiali E Metodi	33
<i>Animali</i>	33
<i>Protocollo di isolamento sociale</i>	34
<i>Protocollo della restrizione alimentare</i>	34
<i>Trattamento ligandi recettore CB1</i>	35
<i>Trattamento con cioccolato e imipramina</i>	35
<i>Chirurgia</i>	36
<i>Procedura degli esperimenti</i>	37
<i>Istologia</i>	37
<i>Attività motoria</i>	37
<i>Test comportamentale</i>	39
<i>Analisi statistica</i>	39
Risultati	40
Discussione	57
Referenze	71

Abbreviazioni

<i>2-AG</i>	<i>2-Arachidonoilglicerolo</i>
<i>5-HT</i>	<i>5-Idrossitriptamina/Serotonina</i>
<i>6-OHDA</i>	<i>6-IdrossiDA</i>
<i>AMP</i>	<i>Adenosina Monofosfato</i>
<i>AMPA</i>	<i>α-Amino-3-Idrossi-5-Metil-4-Isoxazolone Propionato</i>
<i>COMT</i>	<i>Catecol-O-Metiltrasferasi</i>
<i>CRF/CRH</i>	<i>Ormone Di Rilascio Della Corticotropina</i>
<i>DA</i>	<i>Dopamina</i>
<i>DAT</i>	<i>Trasportatore Della Dopamina</i>
<i>FR</i>	<i>Food restriction</i>
<i>GABA</i>	<i>Acido γ-Amminobutirrico</i>
<i>GHB</i>	<i>Acido γ-Idrossibutirrico</i>
<i>HPA</i>	<i>Asse Ipotalamo Ipofisi Surrene</i>
<i>L-DOPA</i>	<i>Levodopa</i>
<i>MAO</i>	<i>MonoAmminoOssidasi</i>
<i>mPFC</i>	<i>Corteccia Prefrontale Mediale</i>
<i>mRNA</i>	<i>RNA Messaggero</i>
<i>NA</i>	<i>Noradrenalina</i>
<i>NAc</i>	<i>Nucleus Accumbens</i>
<i>NET</i>	<i>Trasportatore noradrenalina</i>
<i>NMDA</i>	<i>N-Metil-D-Aspartato</i>
<i>PFC</i>	<i>Corteccia Prefrontale</i>

<i>PN</i>	<i>Post Natal</i>
<i>SN</i>	<i>Substantia nigra</i>
<i>SNC</i>	<i>Sistema Nervoso Centrale</i>
<i>VTA</i>	<i>Area Ventro Tegmentale</i>
<i>Δ-9-THC</i>	<i>Δ-9-Tetraidrocannabinolo</i>

Breve Introduzione

Stimoli piacevoli e ricompense rappresentano fattori indispensabili alla condizione generale di benessere. Per questa ragione, il tema del piacere viene spesso considerato tra i fattori cruciali per la sopravvivenza e l'evoluzione delle specie. Il panorama della letteratura scientifica offre vari spunti che permettono di includere tra i bisogni primari, che si confermano tali anche per il carico emotivo che comportano, il cibo e le sue proprietà sensoriali (Berridge e Kringelbach 2008). La risposta fisiologica che ne consegue, a livello centrale, è di un importante coinvolgimento delle strutture dopaminergiche corticolimbiche in risposta alla presentazione del cibo. In accordo, le concentrazioni extracellulari di dopamina (DA) aumentano in risposta alla presentazione del cibo, sia in corteccia prefrontale mediale (mPFC) sia nel nucleus accumbens (NAc) (Bassareo e Di Chiara, 1997). Inoltre, il comportamento alimentare è correlato con un aumento dei livelli di endocannabinoidi in queste aree, che conferma il coinvolgimento del sistema endocannabinoide sulla stimolazione centrale della fame e la sua modulazione (Kirkham e Williams, 2001). Risposte fisiologiche ad altri stimoli esterni possono interagire con il sistema dopaminergico, visto il suo coinvolgimento negli stati emotivi. In accordo, il sistema dopaminergico mesocorticale è particolarmente sensibile all'esposizione a stimoli stressanti (Dazzi et al, 1995, 2004; Moghaddam e Jackson, 2004; Czéh et al, 2008).

Lo scopo del mio studio è stato quello di valutare se l'esposizione a uno stress cronico, quale l'isolamento sociale, potesse modificare la risposta del sistema dopaminergico mesocorticolimbico a uno stimolo piacevole quale il cibo e se le eventuali modificazioni potessero spiegare la maggiore sensibilità all'abuso che si osserva in individui sottoposti a stimoli stressanti.

Dopamina

La DA è una catecolamina endogena, caratterizzata dalla presenza nella sua struttura di un anello benzenico con due sostituenti ossidrilici, il catecolo, al quale poi è legato un gruppo etilaminico. La DA è il precursore della noradrenalina e dell'adrenalina. La sua sintesi inizia dalla tirosina grazie all'azione della tirosina idrossilasi, enzima limitante la sintesi, che forma L-DOPA; successivamente l'enzima DOPA-decarbossilasi converte l'L-DOPA in DA. Per azione del suo trasportatore, la DA è immagazzinata nelle vescicole in porzione presinaptica, dalla quale è rilasciata per esocitosi in seguito a depolarizzazione della membrana.

La DA esplica la sua azione grazie alla presenza di recettori dopaminergici legati a proteina G. Sono conosciuti cinque tipi di recettori, divisi in due gruppi sulla base delle proprietà strutturali e farmacologiche. I recettori D1 e D5, appartengono alla classe definita farmacologicamente *D1-like*, stimolano la formazione di AMP ciclico e l'idrolisi di fosfatidilinositolo; i recettori D2, D3 e D4, classe definita farmacologicamente *D2-like*, riducono la formazione di AMP ciclico e modulano correnti di K^+ e Ca^{2+} . I recettori dopaminergici sono distribuiti in diverse aree del cervello: i recettori D1 e D2 sono abbondantemente espressi nello striato, i recettori D4 e D5 si trovano per la maggior parte espressi al di fuori dello striato, mentre l'espressione del recettore D3 è maggiore nel NAc e nel tubercolo olfattorio. Per l'esaurimento della sua azione la DA viene trasportata all'interno della membrana e nelle vescicole da trasportatori specifici. In alternativa intervengono con processi di degradazione gli enzimi MAO o COMT.

Le vie dopaminergiche principali originano nel mesencefalo, dalla *substanza nigra*, e dalla VTA, e danno origine ai sistemi dopaminergici a fibre lunghe: nigro-striatale, meso-limbico, meso-corticale. Il sistema nigro-striatale ha origine dalla SN e proietta le terminazioni nervose nello striato (Fuxe et al, 1985). Questa via ha come ruolo principale quello di regolare il tono muscolare e partecipa ai meccanismi di coordinazione motoria. Più recentemente è stato suggerito possa rivestire un ruolo fondamentale nei comportamenti abitudinari, che acquisterebbero rilevanza fondamentale nei meccanismi che regolano l'abuso di sostanze (Tomasi e Volkow, 2013; Wise 2009; Belk ed Everitt 2008). I farmaci antipsicotici che hanno effetti extrapiramidali agiscono sui recettori dopaminergici localizzati nei neuroni della via nigro-striatale.

Dalla VTA e dalla *substantia nigra* origina il sistema meso-corticale, i neuroni che lo costituiscono proiettano le loro fibre nervose al setto, soprattutto nel nucleo laterale, all'amigdala, all'ippocampo, e alla PFC. Questa via dopaminergica riveste un ruolo chiave nella regolazione dei processi emozionali, è implicata nella regolazione del tono dell'umore e delle funzioni cognitive (Goldman-Rakic 1987; Sutton e Davidson 1997; Bubser e Schmidt 1990). La PFC risulta essere fondamentale per l'elaborazione di informazioni, interne ed esterne, che modulano i comportamenti complessi. I sintomi negativi della schizofrenia sono spesso riconducibili a *deficit* funzionali dei neuroni di questo sistema.

VTA e *substantia nigra* sono, inoltre, la sede di origine delle proiezioni neuronali che costituiscono il sistema mesolimbico. Le loro fibre vanno a innervare il NAc, il tubercolo olfattorio e il nucleo interstiziale della stria terminale (Fuxe et al, 1985). I neuroni dopaminergici mesolimbici, che giocano un ruolo importante nella genesi dell'eccitazione emotiva e nel comportamento di attivazione in risposta a stimoli che prevedono una ricompensa (Ikemoto e Panksepp 1999; Spanagel e Weiss 1999), vengono considerati fondamentali nei processi di incentivazione e di desiderio del cibo (Berridge 2000). La trasmissione dopaminergica mesolimbica, svolgendo un ruolo importante nella gratificazione, risulta notevolmente coinvolta negli effetti legati alla somministrazione di farmaci d'abuso. L'iperattività di questo sistema è alla base dei sintomi "positivi" della schizofrenia, come manie, allucinazioni e deliri, e gli antipsicotici svolgono la loro principale azione terapeutica riducendone l'attività.

Il ruolo globale della DA è, quindi, quello di modulatore fondamentale sia nelle attività motorie sia nei processi cognitivi; inoltre, le molteplici connessioni corticali, le permettono di essere determinante nella discriminazione tra scelte prioritarie, con annessa una valutazione emotiva delle preferenze (Le Moal 1995; Kalivas et al, 2003; Salamone et al, 1997).

La corteccia prefrontale

La PFC è un'area esecutiva, situata nella parte anteriore del lobo frontale, gestisce funzioni cognitive complesse e basa questa sua straordinaria capacità sui numerosi collegamenti subcorticali. La PFC, infatti, riceve numerose afferenze, tra queste le afferenze del talamo collaborano per l'espressione della personalità e dell'umore. I processi che la PFC regola costituiscono le funzioni esecutive quali attenzione e pianificazione, guida i pensieri e le azioni

finalizzate al raggiungimento di un obiettivo, mediando gli impulsi e concedendo flessibilità mentale. *Deficit* funzionali e strutturali in quest'area sono caratterizzati da sintomi quali distrazione, impulsività, disorganizzazione e mancanza di controllo (Brennan e Arnsten, 2008).

La PFC riceve l'innervazione dopaminergica dalle proiezioni mesocorticali, che originano dai corpi cellulari dei neuroni dopaminergici della VTA (Seamans e Yang 2004). L'innervazione dopaminergica alla mPFC mostra una distribuzione laminare, gli strati profondi ricevono la maggior parte degli *input* dopaminergici rispetto agli strati superficiali (Van Eden et al, 1987). Questo è coerente con una maggiore localizzazione di recettori D1 e D2 in questi strati (Dawson et al, 1985; Dubois et al, 1986; Savasta et al, 1986). L'innervazione dopaminergica della PFC mostra considerevoli differenze tra diverse specie; in particolare esistono sostanziali differenze tra i roditori e i primati, sia rispetto alla distribuzione anatomica degli *input* di DA, sia rispetto all'espressione di differenti sottotipi di recettori DA (Berger et al, 1991). C'è una buona correlazione tra la complessiva distribuzione dei recettori D1 e D2 e l'espressione dei rispettivi mRNA per questi recettori (Choi et al, 1995), suggerendo che la grande percentuale dei recettori siano localizzati sul corpo cellulare e sui dendriti delle cellule nella mPFC e non nelle terminazioni afferenti presinaptiche.

L'attività della DA a livello della PFC è quindi correlata al controllo delle funzioni cognitive: tale sistema regola l'attività di aree sottocorticali, influenza l'espressione del movimento ed è importante per focalizzare l'attenzione del soggetto verso stimoli motivazionali con valenza sia negativa che positiva. Ancora, è coinvolta nella regolazione del comportamento emozionale e affettivo. Tale sistema ha una notevole influenza sul tono dell'umore e sull'attenzione, rendendo l'individuo attivo e reattivo verso l'ambiente esterno.

Conessioni

Le cellule piramidali corticali sembrano essere il principale *target* delle afferenze dopaminergiche alla mPFC (Van Eden et al, 1987; Goldman-Rakic et al, 1989; Verney et al, 1990) sebbene i recettori di tipo D1 e D2 siano localizzati anche su altre cellule e le stesse terminazioni dopaminergiche entrino in contatto con cellule non piramidali, come le cellule GABAergiche (Vincent et al, 1993; Verney et al, 1990; Benes et al, 1993; Sesack et al, 1995). Vincent et al, (1995) hanno suggerito che mentre i recettori D2 sono espressi in entrambi i tipi di

cellule, piramidali e non piramidali, i recettori D1 sono espressi preferibilmente a livello delle cellule non piramidali.

Le terminazioni dopaminergiche nella mPFC stabiliscono contatti diretti con le cellule piramidali che proiettano al NAc (Carr et al, 1999). Inoltre, la VTA influisce sulla trasmissione glutamatergica nel NAc che può, a sua volta regolare la trasmissione dopaminergica nella mPFC. Il fatto enfatizzato da Swanson (1982), su cui si è spesso scelto di sorvolare nelle considerazioni funzionali e anatomiche delle interazioni dei neurotrasmettitori nel circuito mesolimbico, è che la VTA contiene un numero considerevole di cellule non dopaminergiche che proiettano nella stessa regione terminale delle cellule dopaminergiche. Per esempio, solo il 30% delle proiezioni VTA-PFC è dopaminergica, allo stesso modo, l'85% delle proiezioni VTA-NAc contengono DA. Perciò, in particolare quando si considera l'influenza della VTA sulla mPFC, si deve considerare che i neuroni non dopaminergici possono giocare un ruolo importante. C'è una buona evidenza che la parte non dopaminergica delle proiezioni dalla VTA alla mPFC sia inibitoria e utilizzi GABA come neurotrasmettitore (Thierry et al, 1980; Albanese e Bentivoglio 1982; Ferron et al, 1984; Steffensen et al, 1998). Ci sono evidenze che dimostrano che entrambi i sottotipi recettoriali dopaminergici siano collocati anche sugli interneuroni GABAergici (Al-Tikriti et al, 1992; Vincent et al, 1993, 1995; Smiley et al, 1994; Deutch et al, 1996; Grobin e Deutch 1998).

Le proiezioni mesocorticali dalla VTA alla PFC giocano un ruolo fondamentale in una serie di processi cognitivi ed emotivi, questi sono spesso stati imputati alla funzionalità dopaminergica, dati recenti indicano che una parte considerevole di neuroni della VTA possiedono marcatori che li identificano come glutamatergici (Gorelova 2012). Il glutammato, infatti, ha un ruolo importante come costituente delle efferenze alla mPFC, ma quest'area riceve anche un numero considerevole di *input* eccitatori glutamatergici da aree corticali e subcorticali (Divac et al, 1977; Kim et al, 1977; Carter 1980, 198; Girault et al, 1986). La diretta interazione tra la DA e il glutammato nella mPFC è supportata dalle osservazioni che le terminazioni dopaminergiche e glutamatergiche sono localizzate in vicina apposizione alle cellule piramidali nella mPFC (Goldman-Rakic et al, 1989; Verney et al, 1990; Pickel e Sesack, 1995; Carr e Sesack, 1996). La PFC è una regione corticale particolarmente ricca di recettori NMDA e AMPA; gli *input* glutamatergici alla mPFC sono, quindi, determinanti per l'attività delle cellule piramidali (Monaghan e Cotman, 1985; Petralia et al, 1994).

Come la VTA invia proiezioni dopaminergiche alla VTA e al NAc, la mPFC invia proiezioni glutammatergiche alla VTA e al NAc (Powell e Leman 1976; Beckstead 1979; Carter 1982; Phillipson e Griffiths 1985; Girault et al, 1986; Sesack et al, 1989; Carr et al, 1999).

Un altro elemento importante nella micro fisiologia della mPFC sono gli interneuroni GABAergici (Esclapez et al, 1987). Gli interneuroni GABAergici sono essenziali per l'attività oscillatoria coordinata tra i sistemi neurali che partecipano alla performance cognitiva. Alterazioni dell'attività del sistema GABAergico contribuiscono alle disfunzioni del sistema dopaminergico interferendo, per esempio, alla normale trasmissione dell'ippocampo ventrale. Nuove terapie farmacologiche per la schizofrenia hanno come *target* il sistema GABAergico, infatti, l'*input* inibitorio da più popolazioni di interneuroni in PFC è probabilmente uno dei sistemi più destabilizzati nella schizofrenia e la manipolazione selettiva di specifiche subunità del recettore GABA potrebbe avere effetti sottili e unici sull'attività della PFC e dei suoi neuroni piramidali (Gill e Grace 2014).

Ancora, i recettori serotoninergici 5-HT_{1A} svolgono il ruolo di autorecettori postsinaptici nei neuroni piramidali e GABAergici del sistema corticale e limbico (Kia et al, 1996). Il rapporto tra PFC e 5-HT nelle funzioni cognitive è controverso. I recettori serotoninergici si trovano in buona parte sui neuroni GABAergici della PFC nel cervello di roditori. Questi neuroni formano estese reti corticali tramite sinapsi elettriche e chimiche (Hestrin e Galarreta 2005). Llado Pelfort (2012) ha dimostrato che usando un agonista serotoninergico è possibile aumentare l'attività dei neuroni piramidali nella mPFC grazie all'azione diretta dell'agonista sugli interneuroni GABAergici. Un aumento dell'attività del neurone piramidale in mPFC può bilanciare la neurotrasmissione monoaminergica in quest'area e facilitare l'attività della mPFC, nelle funzioni superiori, come la *working memory*, che richiedono attività costante dei neuroni piramidali (Williams e Goldman-Rakic 1995; Robbins e Arnsten 2009).

La complessità delle connessioni che i neuroni dopaminergici mesocorticali effettuano con altri neuroni riflette la complessità delle funzioni mediate da questo sistema neuronale ed è alla base della sua sensibilità unica agli stimoli sia stressanti che piacevoli.

Gratificazione

Il piacere è quella sensazione che solitamente segue il soddisfacimento di un bisogno. Può chiaramente presentare molteplici sfumature che lo rendono necessario nell'intero sistema di sopravvivenza che uomini e animali sviluppano per relazionarsi tra loro, in nuovi contesti e nella vita in generale. Il sistema della gratificazione consente agli individui di provare piacere; l'emotività affronta trasversalmente sia la sfera fisica che quella cognitiva e tutte queste componenti possono essere spiegate dalla sensazione di piacere. In questo quadro naturalistico, il piacere si può vedere come un dispositivo biologico a disposizione della selezione naturale e, come tale, volto a favorire la sopravvivenza e l'adattamento all'ambiente (Di Chiara 2005). Le finalità biologiche che subiscono questo meccanismo sono prevalentemente gli istinti come la fame, la sete, il sesso e la cura della prole. Questi sono identificati come stimoli primari e gratificanti, in virtù della loro tendenza a determinare un rinforzo positivo, inteso come meccanismo di feedback, che determina una risposta positiva o negativa alla presentazione dello stimolo stesso. Il comportamento motivato da stimoli gratificanti si distingue principalmente in due fasi, una preparatoria e una consumatoria (Konorsky, 1967). Nella fase preparatoria il piacere consiste in uno stato di euforia e di eccitazione che garantisce il comportamento di ricerca e di approccio all'oggetto che si persegue. Questo è uno stato emotivo nel quale il comportamento è guidato da stimoli che vengono percepiti attraverso i sensi, che non comportano necessariamente una diretta interazione con l'oggetto, ma l'identità può essere acquisita attraverso l'associazione di informazioni. Così, odori, suoni e immagini, associati ad un precedente stimolo piacevole, rappresentano stimoli capaci di attirare l'attenzione. Questi stimoli producono un piacere di tipo sensoriale (Di Chiara e Bassareo 2007), che non è frutto di apprendimento, ma è innato, dato che l'organismo è geneticamente predisposto ad interpretare come piacevoli questi *input* in quanto utili alla sopravvivenza del singolo e della specie. Così, il piacere fornisce, attraverso le sue proprietà motivazionali, uno strumento flessibile per adattare il comportamento alle necessità di un ambiente in continuo cambiamento, rappresentando uno strumento fondamentale di adattamento delle specie all'ambiente e di efficienza degli organismi biologici (Di Chiara 2005).

I centri cerebrali che controllano i meccanismi della gratificazione furono identificati nel 1954 da James Olds e Peter Milner. Essi osservarono che l'autostimolazione elettrica, tramite

comportamento volontario e operante, sulle aree cerebrali del sistema limbico, poteva dar luogo ad un forte stimolo gratificante.

Gratificazione e Dopamina

Il circuito della gratificazione appare molto complesso e integra varie regioni cerebrali, necessarie per caratterizzare emotivamente le esperienze e per dirigere istintivamente la risposta dell'individuo verso attività piacevoli. Numerosi studi dimostrano che nel sistema della gratificazione giocano un ruolo fondamentale il sistema dopaminergico mesolimbico, che controlla la spinta motivazionale per la ricerca dello stimolo gratificante; il sistema oppioide, che media i processi di gratificazione conseguenti al consumo di una sostanza; il sistema glutammatergico, che modula il rilascio della DA in alcune aree cerebrali e il sistema GABAergico, che regola in maniera inibitoria il rilascio di DA a livello del sistema nervoso centrale. Ancora, l'amigdala aiuta a valutare se un'esperienza è piacevole o sgradevole e a formare connessioni tra un'esperienza e altri segnali; il talamo, secreta il CRF che regola il metabolismo; l'ippocampo, contribuisce alla registrazione del ricordo di un'esperienza e alla creazione della memoria cosciente. Le regioni frontali della corteccia, coordinano ed elaborano questo mare d'informazioni concernenti l'esperienza, determinando il comportamento finale di ogni individuo (Hikosaka et al, 2008; Kelley e Berridge, 2002; Stefani e Moghaddam, 2006; Wise, 2002).

La via dopaminergica mesolimbica riveste un ruolo importante nella genesi dell'eccitazione emotiva e del comportamento di attivazione in risposta a stimoli che prevedono una ricompensa (Ikemoto e Panksepp, 1999; Spanagel e Weiss 1999). Questo *pathway* neuronale agisce come una sorta di "interruttore della gratificazione", segnalando agli altri centri cerebrali quanto è piacevole un'attività. La memorizzazione di un'azione, quindi l'apprendimento, è correlata in maniera positiva dall'entità dell'impatto emotivo raggiunto.

Questo circuito neuronale si attiva anche nelle fasi di apprendimento e di stabilizzazione dei comportamenti di dipendenza dovuti alle sostanze d'abuso, al gioco d'azzardo patologico, nei casi di *sex addiction* ed è coinvolto in alcune patologie psichiatriche come il disturbo ossessivo-compulsivo, il *deficit* motivazionale della depressione, il morbo di Alzheimer e le reazioni comportamentali all'attaccamento. L'incapacità di provare piacere rappresenta un sintomo

complesso del quadro clinico, proprio sia della depressione maggiore sia delle sindromi psicopatologiche appartenenti allo spettro schizofrenico (Ettenberg A. 2003).

Roy Wise, alla fine degli anni '70, ipotizzò che la DA avesse il ruolo di substrato neurobiologico del piacere e chiamò questa conclusione l'ipotesi anedonica, dovuta all'osservazione dell'effetto degli antipsicotici sulla riduzione della risposta operante finalizzata all'ottenimento di cibo o di altre ricompense. La teoria di Wise fu rivoluzionaria in quanto attribuiva alla DA un ruolo diverso da quello extrapiramidale, un ruolo di natura affettiva e non solo motoria. Questa ipotesi fu però messa in discussione in studi successivi anche dallo stesso Wise. Nonostante ciò, questa teoria, ha ispirato molti studi volti a provarne o a confutarne l'assunto.

Nel 1989 Berridge e i suoi collaboratori provarono a confutare la teoria dell'anedonia utilizzando un protocollo di reattività al gusto, sfruttando le reazioni comportamentali come indice delle proprietà gratificanti o avversive di un cibo, e che contemporaneamente prevedeva un'azione mirata sulle vie dopaminergiche, usando la 6-OHDA e gli antagonisti recettoriali. Non osservarono modificazioni e assunsero che la DA non medierebbe le proprietà gratificanti del cibo, il cosiddetto *liking*, ma piuttosto il suo desiderio, il *wanting*. *Wanting* e *liking* sono due distinte proprietà del rinforzo, la prima si riferisce alla salienza incentiva dello stimolo, cioè la forza e la motivazione che inducono a dare risposte di approccio e ricerca di contatto con lo stimolo o ancora di attuare comportamenti strumentalizzati alla sua presentazione; la seconda è strettamente legata alla produzione del piacere stesso. Sulla base di queste osservazioni, Berridge e collaboratori, hanno suggerito che la DA media l'associazione di un evento con effetto anticipato, acutizza l'attenzione e attiva il comportamento di ricerca degli stimoli associati alla ricompensa, e cioè la capacità di uno stimolo di essere rilevante e di indurre un comportamento di approccio. La salienza incentiva viene definita come la trasformazione di uno stimolo, percepito o ricordato, associato alla ricompensa in un potente incentivo motivazionale (Berridge e Robinson 1998; Berridge 2007). Ulteriori studi mostrarono che nei ratti con lesioni dei neuroni DAergici nel NAc si manteneva inalterata la capacità di scegliere la ricompensa di maggior valore, a condizione che il suo ottenimento non richiedesse uno sforzo aggiuntivo. Queste osservazioni portano ad ipotizzare che la DA non abbia un ruolo prioritario nella valutazione della ricompensa e nel piacere, ma suggeriscono un suo ruolo nella distribuzione dello sforzo alle risposte finalizzate all'ottenimento di una ricompensa (Salamone et al, 2005). Attualmente si preferisce parlare di un ruolo incentivo-motivazionale della DA e di una forma di piacere associata all'aspettativa della gratificazione, all'euforia e all'esaltazione che ad essa si associano,

più che alla gratificazione vera e propria legata, quest'ultima, alla fase consumatoria del comportamento motivato (Di Chiara e Bassareo 2007).

Questo schema è valido per il comportamento motivato da stimoli naturali come il cibo, per i quali si può distinguere, secondo Konorsky, una fase preparatoria ed una fase consumatoria, caratterizzate da specifici stimoli e modalità comportamentali. In questo caso il *wanting* si riferirebbe alla fase preparatoria ed il *liking* alla fase consumatoria. La situazione si complica nel caso di farmaci e sostanze d'abuso. In questo caso, infatti, gli effetti edonici del farmaco, a differenza di quelli edonici del cibo, sono dipendenti dalla DA.

Le sostanze d'abuso sono perciò in grado di alterare le più nobili funzioni cerebrali che controllano appunto il desiderio, l'umore, i processi dell'apprendimento e della memoria, le capacità di giudizio e la volontà. La DA rilasciata nello *shell* del NAc in seguito al contatto con uno stimolo gratificante, in realtà, potrebbe svolgere un ruolo di facilitazione durante l'apprendimento associativo mediante il quale l'individuo associa una serie di stimoli neutri agli effetti piacevoli dello stimolo gratificante. In particolare, nel caso del cibo, il soggetto associa al gusto e agli effetti calorici e metabolici il colore e il profumo della pietanza e il contesto nel quale ha consumato il pasto. Numerose evidenze hanno permesso di affermare che alla base delle cause della dipendenza vi sia un'alterazione dei meccanismi cerebrali che controllano il sistema della gratificazione e degli stati motivazionali, cioè i comportamenti compulsivi associati al consumo delle sostanze, nonché di numerosi altri sistemi funzionali, come quelli implicati nell'apprendimento e nella memoria. Lo stato motivazionale si può definire come quel comportamento per cui gli organismi focalizzano le proprie azioni verso l'ambiente in relazione alle proprie necessità.

Studi sperimentali negli animali e studi di *brain imaging* nell'uomo indicano che il piacere associato alla liberazione di DA nel NAc corrisponde all'eccitazione motivazionale indotta da stimoli condizionati predittivi della soddisfazione consumatoria. I farmaci psicostimolanti producono un comportamento di esplorazione e ricerca che utilizza modalità comportamentali specie-specifiche. Stimoli gustativi primari aumentano i livelli di DA nel *core* del NAc e nella PFC, indipendentemente dalla valenza positiva o negativa, mentre i livelli di DA nella *shell* del NAc aumentano solo in risposta a stimoli primari appetitivi, ad esempio un cibo gradevole, purché sia inatteso (Di Chiara, 1988). Questi risultati sono del tutto coerenti con la nozione che i *deficit* nel sistema di ricompensa, possono influire sui comportamenti compensativi di ricerca di gratificazione e coinvolgono totalmente il sistema dopaminergico.

Il sistema DAergico mesocorticale gioca un importante ruolo nei processi di ricompensa. Ratti con accesso intermittente allo zucchero o a cibi grassi per poche ore, ogni giorno, per diverse settimane, mostrano comportamenti caratteristici della dipendenza. Questi comportamenti includono il *binging*, il *craving*, e l'iperattività simile a quella prodotta da farmaci stimolanti (Avena et al, 2006). Coerentemente con il suggerimento che tali alimenti abbiano caratteristiche simili alla dipendenza, i ratti nutriti con diete appetibili ad alto contenuto calorico mostrano ridotta sensibilità alle ricompense psicostimolanti, per esempio, questi ratti mostrano alterate risposte nelle fasi di acquisizione durante l'esposizione a cocaina (Carroll et al, 1986; Wellman et al, 2007). Inoltre, l'esposizione cronica a tali alimenti è associata ad alterazioni a lungo termine nelle regioni di ricompensa del cervello, incluso lo striato (Furlong et al, 2014), anche questo riscontrabile nei cambiamenti prodotti dall'esposizione cronica a sostanze stimolanti, come la cocaina e le anfetamine (LeBlanc et al, 2013).

La VTA gioca un ruolo fondamentale nel segnale che induce la ricerca di cibo e la produzione di diversi neuromodulatori, compresi i neuropeptidi e gli ormoni coinvolti nel controllo omeostatico edonistico e del comportamento alimentare (Meyer e Adan, 2014). Il sistema endocannabinoide, partecipando alla modulazione dei circuiti del piacere, è in grado di influenzare i comportamenti legati alla gratificazione. Il sistema dei cannabinoidi endogeni è coinvolto nel processo di gratificazione che media la motivazione e la valutazione edonica del cibo (Williamns e Kirkham, 1999; Kirkham, 2003). L'elevata espressione di CB1 in aree coinvolte nel piacere, costituisce una forte indicazione del diretto coinvolgimento del sistema nelle diverse funzioni psicologiche regolate da queste regioni del cervello, incluso l'appetito. La neurotrasmissione dopaminergica cerebrale è saldamente associata alla gratificazione naturale e delle droghe (Schultz 2002; Di Chiara et al, 2004; Wise, 2008).

In pratica, un evento eccezionale e carico di possibili conseguenze per la sopravvivenza viene marcato con una scarica di DA, che non solo produce eccitazione motivazionale, ma fissa nella memoria alcune caratteristiche salienti del contesto e le associa a quelle del piacere associato all'evento stesso. In questo modo, il cervello collega lo stato emotivo con l'oggetto gratificante e fa sì che quel contesto diventi predittivo di situazioni utili per la sopravvivenza. La DA consolida la memoria di queste associazioni, facendo in modo che l'onda di nuove esperienze non le cancelli.

La regolazione della fame è un fenomeno molto complesso, l'organismo utilizza precisi meccanismi di coordinazione in grado di confrontare la necessità di ingerire nuovi nutrienti e l'effettivo fabbisogno energetico. Tale sistema, descritto nel modello di Teitelbaum e Stellar, individua nell'ipotalamo e nei centri connessi, il nucleo centrale di questa fine regolazione; il modello proposto è tuttora ritenuto valido (Teitelbaum e Stellar, 1954) e non è l'unico sistema all'interno della nostra macchina fisiologica a sfruttare meccanismi di feedback per regolare l'omeostasi. Il cervello ha un ruolo determinante nel processo decisionale che porta all'atto nutritivo, è responsabile dell'integrazione dei segnali ormonali e neurotrasmettitoriali che trasmettono informazioni sullo stato metabolico dell'organismo (Schwartz et al, 2000). Tra i molti fattori che influenzano la decisione di iniziare o smettere di mangiare, hanno ruolo rilevante il contesto sociale, la quantità di cibo disponibile, la dieta ritenuta adeguata, il volume e il contenuto energetico degli alimenti consumati. Più cibo viene ingerito, più la sensazione di pienezza diventa forte e la motivazione a mangiare diminuisce (Rolls, 2000,2002). Seguendo le definizioni di Blundell (1991), usiamo il termine sazietà quando si parla della terminazione del pasto, ci si riferisce allo stato successivo dell'essere sazi (Smeets et al, 2006).

La fame e la sazietà sono quindi il risultato di processi fisiologici complessi. Quanto un cibo sia in grado di stimolare il nostro appetito è proporzionale al piacere che si prova quando si mangia quel determinato alimento, ed è strettamente legato alle proprietà sensoriali del cibo stesso (Berthoud, 2006). Gli alimenti dolci e ricchi di grassi richiamano fortemente l'attività sensoriale e suscitano effetti gratificanti dopo l'ingestione. Il cibo, infatti, non è solo nutrimento, ma è spesso consumato per il piacere che arreca. La regolazione dell'appetito è il bilancio attivo di diversi neurotrasmettitori, che agiscono senza la necessità di un impegno cosciente da parte dell'individuo. L'appetito esprime il desiderio di ricercare alimenti specifici, spesso questa ricerca è stimolata dal contesto o da *input* sensoriali associati, che permettono di far collimare l'idea del cibo con la sensazione emotiva del piacere (Berridge e Robinson, 1998).

Il cibo, come tutti gli stimoli gratificanti naturali necessari per la salvaguardia della specie e per la vita del singolo individuo, è dotato di proprietà di rinforzo, cioè di quelle caratteristiche positive che permettono al soggetto di avvicinarsi ad esso e di consumarlo, traendone beneficio (Bassareo e Di Chiara 1997, 1999; Wise, 2006; Aragona et al, 2008). In particolare il consumo di un cibo dal gusto particolarmente gradevole in ratti alimentati *ad libitum* con cibo standard, induce un aumento immediato della concentrazione extracellulare di DA nello *shell* e nel *core*

del NAc e nella PFC, mentre una precedente esposizione a quello stesso cibo determina l'inibizione selettiva dell'incremento della DA nello *shell*, ma continua a stimolare la trasmissione dopaminergica nel *core* del NAc e nella PFC (Bassareo e Di Chiara, 1997; Gambarana et al, 2003; Rada et al, 2005; Danielli et al, 2010).

Il coinvolgimento accertato dei sistemi dopaminergici nel meccanismo di rinforzo, fa supporre che le alterazioni al sistema dopaminergico siano la base dei disturbi alimentari come la fame compulsiva e la bulimia nervosa (Avena e Bocarsly, 2012). Il cibo non è classificato come sostanza d'abuso, ma in alcune condizioni patologiche può avere caratteristiche molto simili, spingendo l'individuo ad assumerlo in maniera compulsiva, e a diventare dipendente dal suo consumo. Il desiderio di mangiare e la sensazione di sazietà che deriva dall'aver consumato un pasto abbondante sono aspetti del comportamento semplici e naturali, ma che possono degenerare in malattie gravi. Il disturbo del comportamento alimentare, come ogni disturbo del comportamento, ha un aspetto difensivo e adattativo che inizialmente sembra gratificante perché l'angoscia scompare e, contemporaneamente, attiva emotivamente la persona. Si sta sviluppando una sempre maggiore dipendenza nei confronti di questo comportamento, dipendenza in cui si associano fattori psicologici e biologici.

Nello studio di Von Frijtag et al, (2000) le risposte correlate alla ricompensa sono state suddivise in risposte consumatorie e risposte del comportamento appetitivo (Berridge e Robinson, 1998; Ikemoto e Panksepp, 1999). I termini consumatorio e appetitivo si riferiscono a fasi temporali del comportamento motivato, consumatorio non si riferisce obbligatoriamente al consumo, ma al concetto di consumazione, che significa completato o finito (Craig, 1918). Per quanto riguarda il mangiare o il bere, il comportamento consumatorio è composto da comportamenti ingestivi, leccate e morsi, modelli edonistici di gusto-reattività e l'atto di inghiottire la sostanza gratificante o la soluzione (Berridge e Robinson, 1998), e può essere valutato con la quantità e l'assunzione stessa. Il comportamento appetitivo, invece, si riferisce a comportamenti che si osservano quando lo stimolo gratificante viene anticipato con comportamenti che precedono il comportamento consumatorio. I segnali evocati dai comportamenti che riguardano la ricerca del cibo sono coerenti con la proposta che il consumo di alimenti appetibili aumenta la reattività dei circuiti di ricompensa per il consumo alimentare, potenziando i comportamenti di alimentazione e inducendo un consumo maggiore (Volkow et al, 2012).

I comportamenti che riguardano la ricerca del cibo sono diretti a consentire l'acquisizione di tali risultati intrinsecamente gratificanti. Questo può portare a modifiche dei processi neurali che

sono alla base dei processi di apprendimento, attribuendo rilevanza alle indicazioni e le risposte che prevedono un risultato significativo. Disfunzione dei sistemi di ricompensa del cervello possono portare a risposte anormali nei confronti del cibo appetibile. Stimoli ambientali possono aumentare il valore della motivazione alla ricerca del cibo. Il *wanting*, come già descritto, si identifica con l'attribuzione di rilevanza agli stimoli associati e il *liking* è l'effetto piacevole alla fine della consumazione. In termini di cambiamenti comportamentali, nei roditori, a seguito di esposizione a cibi appetibili, le differenze sono state osservate nella produzione delle risposte date nei confronti di cibi gratificanti, e si osservano comportamenti simili al *craving*, come l'incremento di attività indotta dallo zucchero dopo il termine di una dieta (Avena et al, 2005). Inoltre, gli studi che prevedono una riduzione dell'accesso al cibo appetibile (Martire et al, 2014) indicano che i ratti limitano l'assunzione di cibo standard di laboratorio dopo l'esposizione a cibo appetibile ad alto contenuto di grassi e di zucchero, suggerendo una possibile reazione al piacere. Questo suggerimento è supportato dalla riduzione dell'espressione degli mRNA dei recettori CB1 per i cannabinoidi e i recettori μ per gli oppioidi, indicando cambiamenti nelle reazioni edonistiche in seguito ad un'interruzione di stimoli piacevoli (Martire et al, 2014).

Nei ratti, il cannabinoide naturale THC aumenta il *food intake* (Williams et al, 1998) e il consumo di soluzioni dolci. L'uso dell'antagonista per i recettori CB1, SR141617, riduce il *food intake* (Arnone et al, 1997; Colombo et al, 1998; Freedland et al, 2000; McLaughlin et al, 2003). È stato a lungo dimostrato che negli uomini la cannabis aumenta l'appetito e la consumazione di cibo, soprattutto di cibi dolci (Foltin et al, 1988; Yeomans e Gray, 2002). Quindi, i cannabinoidi sembrano in parte influenzare il *food intake* tramite una modificazione della risposta edonica al cibo. È da notare, inoltre, che la *shell* del NAc è un sito altamente sensibile all'azione dei cannabinoidi sull'assunzione di cibo: il 2-AG somministrato in questo sito produce una importante risposta iperfagica (Kirkham et al, 2002). La *shell* è coinvolta nella genesi dell'eccitazione emozionale e nell'attivazione comportamentale in risposta a stimoli potenzialmente gratificanti, inclusa la stimolazione a mangiare. Inoltre, il digiuno aumenta i livelli di anandamide e 2-AG nel sistema limbico (Fride et al, 2005).

Alcuni studi suggeriscono che differenti nutrienti influenzino l'attività del SNC dei mammiferi, per esempio la caffeina (Tang et al, 1989), l'acido succinico (Chen et al, 2003), i fitoestrogeni della soia (Lund et al, 2001), per citarne alcuni. Diversi principi attivi negli alimenti e nelle bevande sono stati identificati come componenti efficaci per migliorare l'umore (Ottley et al, 2000). Per esempio, è stato osservato che l'assunzione di cioccolato è in grado di migliorarne il tono. Il consumo di cioccolato è stato a lungo associato con il divertimento e il piacere.

Affermazioni popolari attribuiscono al cioccolato proprietà stimolanti, rilassanti, euforizzanti, afrodisiache, toniche e antidepressive (Parker et al, 2006).

Il consumo sfrenato di cibo appetibile ha dimostrato di aumentare il valore di rinforzo e gratificante di alimenti, innescando associazioni apprese tra spunti che prevedono la disponibilità di ricompense alimentari. Questi stimoli ambientali esterni, come la vista e l'odore di particolari alimenti, evocano aspettative positive. Queste reazioni sono coinvolte nei meccanismi che portano all'uso cronico di droghe (Jastreboff et al, 2013; Meule et al, 2012, 2014). Fattori sociali e culturali contribuiscono senza dubbio alla diffusione di dipendenze, all'inibizione del controllo, sia legate alle sostanze d'abuso che ai cibi. Nello specifico, ambienti che promuovono le cattive abitudini alimentari e l'inattività fisica sono ritenuti fondamentali nella diffusione del problema dei disordini alimentari (Volkow et al, 2011).

Cibo e Dopamina

I meccanismi neurobiologici della dipendenza possono aiutarci a capire i processi che sfociano nei disordini alimentari. Sia, per quanto riguarda gli esseri umani, per i possibili parallelismi tra contesti culturali affini sia, nei modelli animali, per le analogie fisiologiche che possono associare i meccanismi che si innescano nelle patologie d'abuso e nei disturbi mentali. La DA è implicata in alcune patologie alimentari, come il *binge eating disorder* (Bello e Hajnal 2010), l'obesità (Cota 2006) e la bulimia nervosa (Uher et al, 2004). Queste sono patologie di difficile comprensione, in quanto i sistemi implicati sono numerosi, ma sicuramente un ruolo importante è svolto dal circuito dopaminergico mesocorticale. I neuroni dopaminergici del mesencefalo, infatti, proiettano in differenti regioni, inclusa la PFC, dove il segnale dopaminergico è associato all'apprendimento e alla memoria legata al *reward* (Phillips et al, 2008), compreso il *food reward* (Volkow et al, 2011). Inoltre, l'attività della PFC risulta alterata, in maniera opposta, in risposta al cibo nei soggetti affetti da bulimia e anoressia nervosa (Uher et al, 2004). Anche l'ipotalamo gioca un ruolo chiave nell'integrazione dei segnali che riceve, sia dal punto di vista chimico che come risultante nelle componenti comportamentali dell'alimentazione e della regolazione del peso. Ancora il NAc è un componente funzionalmente legato nelle vie che regolano l'alimentazione (Stratford e Kelley 1999). L'aumento di attività delle vie dopaminergiche nelle strutture corticolimbiche, come la mPFC e il NAc, è stato correlato con gli effetti associati alla presentazione e alla sazietà dopo un cibo palatabile.

I recettori CB1 sono localizzati in diverse regioni cerebrali: nel sistema mesolimbico, dove influiscono nella risposta a stimoli piacevoli derivati non solo dall'assunzione di cibo appetitoso ma anche di sostanze d'abuso, e nell'ipotalamo, nei cui nuclei sono localizzati i neuroni che producono neuropeptidi anoressizzanti in grado quindi di controllare e modulare l'apporto alimentare. Tuttavia, è probabile che queste interazioni possano comportare il coordinamento delle attività dei neuroni dopaminergici della VTA. Evidenze sperimentali suggeriscono che gli endocannabinoidi eserciterebbero un'influenza importante sull'attività dopaminergica mesolimbica (Hermann et al, 2002; Van der Stelt e Di Marzo, 2003; Lupica et al, 2004). E così facendo, possono essere essenziali per l'orientamento verso stimoli motivazionali significativi e appropriate risposte comportamentali, come la ricerca del cibo (Melis et al, 2004; Lupica e Riegel, 2005). In accordo, dosi di Δ^9 -THC con effetto iperfagico stimolano il rilascio di DA nel NAc (Gardner, 2005; Gardner e Vorel, 1998; Malone e Taylor, 1999). Verty et al, (2004b) hanno riportato che l'iperfagia indotta dal Δ^9 -THC è attenuata da una dose inattiva a livello comportamentale dell'antagonista dei recettori D1, SCH23390, suggerendo che il segnale dopaminergico mesolimbico potrebbe essere cruciale per l'azione appetitiva dei cannabinoidi. Il ruolo degli endocannabinoidi nel controllo dell'appetito è ben documentato da numerosi studi che hanno dimostrato come l'anandamide è in grado di stimolare il *food intake* sia tramite una somministrazione sistemica (Williams e Kirkham, 1999; Hao et al, 2000) che direttamente nell'ipotalamo ventromediale (Jamshidi e Taylor, 2001). In effetti, i cambiamenti sull'assunzione di cibo associati al consumo di cannabis potrebbero riflettere un ruolo importante del sistema endocannabinoide sul controllo dell'appetito, sul comportamento alimentare, sul metabolismo energetico e il bilanciamento del peso corporeo (Williams CM, Kirkham et al, 2002). Regioni cerebrali con elevata densità di recettori CB1 sono coinvolte nel controllo dell'alimentazione e del peso corporeo (McLaughlin et al, 2003; Abood, 2005; DiPatrizio e Simansky, 2008). Inoltre, i cambiamenti nell'espressione dei recettori CB1 sono associati a una compromissione metabolica o a stati di obesità (Timofeeva, et al, 2009; Bermudez-Silva FJ, et al, 2010).

Numerosi studi confermano uno stretto rapporto tra il sistema endocannabinoide e il comportamento alimentare. Tra questi sono rilevanti quelli di Di Marzo relativi ai topi *knockout* per i recettori CB1, che hanno mostrato come questi animali, sottoposti a deprivazione di cibo, mangiassero meno rispetto ai controlli e il loro *food intake* non venisse influenzato dal trattamento con SR141716; quest'ultimo, al contrario, riduceva il *food intake* sui topi di controllo agli stessi livelli osservati nei topi *knockout* (Di Marzo et al, 2001). Si presume quindi che vi sia una forte correlazione tra i livelli limbici di endocannabinoidi e di DA e l'aumentato desiderio

verso il cibo gustoso. Numerose evidenze supportano il coinvolgimento degli endocannabinoidi nei processi che regolano l'appetito e la consumazione di cibo. La stimolazione dei recettori CB1 migliora l'apprezzamento del cibo, quindi aumenta la motivazione ad avvicinarsi al cibo e ad iniziare a mangiare. Gli endocannabinoidi appaiono legati alla stimolazione della ricerca di cibo e all'induzione dell'assunzione di cibo, ed anche alla valutazione sensoriale ed edonica del cibo durante l'ingestione (Berridge, 2000; Kirkham e Williams, 2001).

La DA svolgerebbe quindi un ruolo importante nel controllo del *food intake*. Studi su animali indicano che la frequenza dei pasti e la quantità degli stessi sono sotto il controllo dopaminergico e la DA è ritenuta essere la base del meccanismo che permette cambiamenti dell'alimentazione anche in altre sfere comportamentali (Clifton, 2000).

Impulsività

L'impulsività è generalmente considerata una conseguenza del ridotto funzionamento esecutivo. In particolare, l'azione impulsiva è determinata dalla co-presenza di *deficit* dei processi inibitori e forti impulsi (Hofmann et al, 2009). La mancanza di autocontrollo è generalmente associata a psicopatologie, quali schizofrenia o disturbo ossessivo-compulsivo, nonché a problemi di controllo del comportamento aggressivo. Non riuscire a controllare o dirigere le proprie azioni impedisce all'individuo di avere totale padronanza delle sue azioni e delle sue scelte, rendendolo quindi potenzialmente sensibile al condizionamento da parte di un elemento o uno stimolo presente nell'ambiente.

Avanzi e collaboratori (2006) hanno dimostrato che tra i malati di Parkinson il 6% inizia a giocare d'azzardo in modo patologico, contro lo 0.25% della popolazione sana. Dagher e Robbins (2009) suggeriscono che l'alterazione dell'attività dopaminergica indotta dalla terapia farmacologica per la patologia del Parkinson possa spiegare questa aumentata percentuale. L'impulsività è uno dei principali sintomi associati a disturbi del controllo comportamentale, come l'abuso di sostanze e il gioco d'azzardo patologico; è inoltre ben nota la correlazione con alcuni disturbi neuropsichiatrici, come il disturbo bipolare e disturbo di personalità borderline (Dick et al, 2010; Michalczuk et al, 2011; Zucker et al, 2011). Lo scarso controllo, posto in relazione a stimoli di ricompensa e a forti stimoli emotivi, porta all'incremento della motivazione per il conseguimento dell'obiettivo, che tendenzialmente viene associato ad una ricompensa immediata o anche a stimoli negativi (Robinson e Berridge, 2003; Crews e Boettiger 2009).

Visto il coinvolgimento del sistema dopaminergico mesolimbico nella risposta al piacere, studi recenti hanno evidenziato la complessità della risposta impulsiva (Cyders e Smith, 2008; Zucker et al, 2011) che sfocia in fenomeni altrettanto complessi come la dipendenza da sostanze stupefacenti, la compulsività del gioco d'azzardo e altre patologie psichiche, dove la mancanza di controllo gioca un ruolo fondamentale (Castellani e Rugle 1995, Verdejo-García et al, 2008). La DA non è solo la molecola del piacere, il suo ruolo è molto complesso. Interviene, come già detto, nella regolazione delle funzioni cognitive (apprendimento, presa di decisione ponderata, *working memory*), nella regolazione dei comportamenti motivati, nella regolazione del controllo motorio, nelle regolazioni neuro-ormonali, come la risposta allo stress, e in quella del tono dell'umore. La sovra stimolazione delle aree limbiche dopaminergiche potrebbe portare

l'individuo a ricercare maggiormente la novità e la gratificazione e a ridurre la tendenza ad evitare i pericoli e ad avere paura delle punizioni (Bodi et al, 2009). Questo, accompagnato ad una riduzione nell'attività del sistema dopaminergico mesocorticale, porterebbe l'individuo a ricercare il piacere senza curarsi delle conseguenze negative, in maniera compulsiva. È stato recentemente suggerito che queste modificazioni nell'attività del sistema dopaminergico mesocorticolimbico possano essere alla base dello sviluppo di dipendenza (Volkov et al, 2009).

La modulazione dopaminergica della motivazione funziona facilitando il consolidamento di ricordi associati a ricompense o alla possibile previsione di queste (Schultz, 1998); questo appare rilevante per scatenare l'incentivo verso tutti i comportamenti correlati (Volkow et al, 2009). Differenze individuali di base nella funzionalità dopaminergica prefrontale rappresentano il fulcro della variabilità comportamentale impulsiva e del rischio per lo sviluppo di disturbi del controllo degli impulsi, tra cui l'abuso di sostanze (Congdon e Canli 2005; Urcelay e Dalley 2012). Nel lavoro di Barbara J. Weiland del 2014 si vuole dimostrare la relazione tra PFC e NAc durante la fase di elaborazione centrale di anticipazione della ricompensa, associando il meccanismo a variazioni di impulsività. La mPFC è coinvolta nel mediare il rapporto tra esperienza emotiva personale e il contesto ambientale (Phan et al, 2004). Esperimenti con modelli animali supportano questo ruolo della mPFC nell'influenzare il processo decisionale basato sulla ricompensa. Il metabolismo della DA aumenta sia nel NAc che nella mPFC in risposta a stimoli positivi (Herman et al, 1982), tuttavia, il metabolismo della DA risulta aumentato solo quando lo stimolo viene ripresentato nell'ambiente in cui lo stimolo era avvenuto, suggerendo un effetto di condizionamento che permette alla mPFC una funzione di controllo all'interno del sistema centrale DA (Herman et al, 1982). Un recente studio ha dimostrato una relazione tra l'attivazione corticale prefrontale durante un processo decisionale e la disponibilità dei recettori D2-D3 in NAc, che supporta un collegamento interattivo tra l'attività mesolimbico e frontale (Kohno et al, 2013). Gli individui più impulsivi tendono quindi ad essere più inclini ad avere meno controllo frontale in momenti decisionali, soprattutto quando si tratta di stimoli altamente emotivi, e contemporaneamente mostrano una riduzione del rilascio di DA subcorticale. La mPFC è una regione regolatoria associata con l'apprendimento e la valutazione della ricompensa, che media la risposta impulsiva anche attraverso la modulazione del sistema dopaminergico che afferisce al NAc (Weiland et al, 2014). Ratti altamente impulsivi, che hanno quindi difficoltà ad inibire la loro risposta in attesa della comparsa di uno stimolo, mostrano livelli più bassi dei recettori D2 per la DA nello striato e risultano più sensibili all'auto-somministrazione di cocaina, rispetto a soggetti meno impulsivi (Dalley et al, 2008). È quindi

confermato un ruolo importante della PFC nell'inibizione del comportamento e il ruolo della DA che modula la prontezza sia all'inibizione che all'attivazione, monitorando la possibilità di errore e la qualità della risposta (Brown e Robbins 1991; Ghahremani et al, 2012; Bari e Robbins, 2013; Chevrier e Schachar 2010; Nandam et al, 2013).

In particolare, per quanto riguarda il controllo del comportamento alimentare, la capacità di resistere alla tentazione di mangiare richiederebbe il corretto funzionamento dei circuiti neuronali coinvolti nel controllo per opporsi alle risposte condizionate che predicono il desiderio e la ricompensa dall'ingestione di cibo. Studi di *imaging* mostrano che i soggetti obesi potrebbero avere disfunzioni nei *pathways* dopaminergici che regolano sistemi neuronali associati a sensibilità della ricompensa, condizionata e controllo (Volkow et al, 2011). In letteratura esistono numerose evidenze che provano che molti altri circuiti, e non solo quelli che regolano fame e sazietà, incidono sull'assunzione di cibo, e in particolar modo possono giocare un ruolo determinante in quei casi in cui siano presenti a livello centrale *deficit* che portano ad un consumo eccessivo o estremamente ridotto di cibo, come obesità e anoressia (Rolls, 2008). In particolare, il sistema limbico, con il NAc, l'amigdala e l'ippocampo, alcune regioni corticali, come la PFC e i sistemi neurotrasmettitoriali, quali DA, serotonina, oppioidi e cannabinoidi, hanno un ruolo fondamentale nella regolazione degli effetti gratificanti del cibo, agiscono sul sistema della ricompensa e quindi fanno leva sulla motivazione, modificando così i comportamenti alimentari (Passamonti L. et al, 2009). Tuttavia, il coinvolgimento della DA nelle risposte a ricompensa non può essere limitata al solo valore edonistico.

Segnali condizionanti possono scatenare l'atto di assunzione di cibo anche in ratti sazi (Epstein et al, 2009) e, nell'uomo, studi di *imaging* hanno dimostrato che l'esposizione a stimoli alimentari provoca aumenti DA nello striato che sono associati con il desiderio di mangiare il cibo (Volkow et al, 2002). Inoltre la DA è anche coinvolta con la motivazione per eseguire i comportamenti necessari per procurarsi e consumare il cibo. Infatti, il coinvolgimento della DA nella ricompensa alimentare è stato associato a una rilevanza motivazionale (Berridge, 2009), un effetto che è probabile che coinvolga lo striato dorsale e forse anche il NAc (Szczycka et al, 2001). Lo studio di Szczycka et al, del 2001 ha evidenziato il ruolo cruciale della DA nella ricerca del cibo e nella motivazione, infatti in topi deficitari nella produzione di DA a causa dell'inattivazione del gene della tirosina idrossilasi, topi DD, hanno osservato una tendenza alla non nutrizione legata alla mancanza della motivazione a mangiare che poteva essere ridotta ripristinando la trasmissione dopaminergica nello striato dorsale ma non nel NAc.

Numerosi studi associano i disturbi alimentari con *deficit* delle funzioni esecutive cognitive, dell'attenzione e della memoria. Per esempio, la capacità di inibire gli impulsi verso il cibo che diventa oggetto di desiderio varia da individuo a individuo e potrebbe essere uno dei fattori che contribuisce alla vulnerabilità individuale al cibo (Wang et al, 2009). Indipendentemente dal fatto che gli squilibri siano causa o effetto, i disturbi alimentari sembrano essere un fenomeno che ricorda il conflitto tra la ricompensa condizionata, i circuiti motivazionali e il controllo inibitorio, che è tipico dei soggetti che sviluppano una dipendenza da sostanze d'abuso (Volkow et al, 2009). Impulsività, o l'incapacità di inibire le risposte, nonostante le conseguenze negative, potrebbe in parte spiegare perché alcuni individui sono più inclini a sviluppare la dipendenza quando esposti a sostanze d'abuso. La motivazione alla pianificazione e il controllo potrebbero essere pensati come l'opposto dell'impulsività; l'aumento dell'impulsività e la diminuzione della motivazione può rendere gli individui più inclini a sviluppare dipendenza. Questo vede la contrapposizione di due sistemi dopaminergici, quello mesolimbico e quello mesocorticale. Inoltre è importantissimo il bilanciamento dell'attivazione dopaminergica sui recettori D1, che mediano l'azione e promuovono la via comportamentale, rispetto ai D2, che tendono invece ad inibire il comportamento.

I *deficit* inibitori possono influenzare negativamente gli obiettivi di carriera e le relazioni sociali durante l'età adulta. Tuttavia, non tutti i comportamenti impulsivi sono svantaggiosi e un certo grado di perdita di controllo può avere scopo adattativo (Block 2002). Nei mammiferi superiori, la possibilità di esercitare un controllo inibitorio su riflessi automatici e risposte condizionate è probabilmente frutto di un percorso evolutivo per consentire ai processi cognitivi più lentezza per guidare il comportamento in determinate circostanze (Jentsch e Taylor, 1999; Robbins, 1996).

Stress

Lo stress è una risposta psicofisica ad uno o più stimoli che vengono percepiti dall'individuo come eccessivi. Hans Selye fu tra i primi probabilmente a parlare di stress in termini fisiologici, egli lo definì come 'una risposta aspecifica dell'organismo ad ogni richiesta effettuata su di esso' (Selye 1936). Il termine Stress fu introdotto in associazione all'omeostasi da Cannon, sempre nello stesso periodo, in relazione al concetto di omeostasi ed in particolare come turbamento dell'omeostasi stessa. Nel linguaggio comune, il termine stress viene utilizzato per indicare una situazione negativa o dalle conseguenze negative, uno stato di ansia o comunque preoccupazione. Oggi sappiamo che per parlare di stress dal punto di vista fisiologico è indispensabile un rapporto tra il soggetto e l'ambiente nel senso più generale del termine, tanto da poter comprendere singoli oggetti, relazioni ed eventi. Lo stress è una risposta biologica del corpo. La durata dell'evento stressante porta a distinguere lo stress in acuto, che si verifica una sola volta e in breve tempo, e in stress cronico, quando lo stimolo è duraturo e ripetitivo nel tempo (Selye 1976).

È tendenzialmente l'aspetto emotivo, il principale fattore incidente sul tipo di reazione da stress che si verifica. La risposta allo stress coinvolge l'intero organismo, è quindi una reazione sistemica, che partendo dalla periferia arriva al sistema nervoso centrale, il quale, grazie alle sue strutture, è in grado di rielaborare l'insieme di informazioni sensoriali ricevute e di proporre per il fisico dell'individuo una soluzione adattativa che sia al meglio delle proprie risorse. I circuiti neurali che regolano il bisogno di energia convergono sul nucleo paraventricolare, che contiene i corpi cellulari dei neuroni che rilasciano il CRH. Il nucleo *paraventricolare* regola l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e risponde ai livelli di glucocorticoidi e insulina in circolo (Dallman et al, 1995; Nieuwenhuizen e Rütters 2008), questo indica una sovrapposizione tra i sistemi di stress e alimentazione. I glucocorticoidi, secreti dalla ghiandola surrenale, e l'insulina dal pancreas, hanno effetti opposti sulle risposte alimentari, infatti i primi favoriscono l'apporto di cibo, mentre la seconda riduce l'assunzione (Strackel et al, 1995). Lo stress può aumentare o diminuire l'assunzione di cibo, sia nei roditori che nell'uomo (Foster et al, 2006; Groesz et al, 2012; Harris et al, 1998; Marti et al, 1994; McIntosh et al, 1999; Pecoraro et al, 2004; Ryuet al, 2008; Schulz e Laessle, 2012). Nei ratti, la maggior parte degli studi dimostrano che lo stress riduce l'assunzione di cibo, a meno che il cibo appetibile sia presente durante il periodo di stress (Adam e Epel, 2007; Dallman et al, 2006; Pecoraro et al, 2004). Tale consumo coinvolge le aree

sottocorticali che controllano l'eccitazione, lo stress e lo stoccaggio di energia, quindi assistiamo ad un lavoro sinergico tra asse HPA e SNC (Adam e Epel, 2007). Il sistema dopaminergico può avere un'influenza diretta sull'asse HPA attraverso il rilascio di CRH dovuto allo stimolo stressante che aumenta l'attività della DA nella VTA. Questo effetto del CRH sulla DA suggerisce che lo stress evoca una risposta per evitare il fattore potenzialmente nocivo (Bello and Hajnal, 2010). L'assunzione di cibo appetibile è aumentata durante l'esposizione a stimoli stressanti, in questo modo la risposta allo stress viene tamponata, si riscontrano infatti ridotti livelli di corticosterone plasmatico, nei ratti che possono consumare cibo appetibile rispetto a quelli che consumano solo cibo standard (Bell et al, 2002; La Fleur et al, 2005). Il rilascio di DA agisce da feedback negativo verso l'ipotalamo che inibisce ulteriormente il rilascio di CRH, che si traduce in una riduzione dei livelli di corticosterone e cortisolo. Diversi studi hanno anche dimostrato che l'aumento dei livelli di glucocorticoidi promuove l'assunzione di alimenti appetibili (Bhatnagar et al, 2000).

Numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che stimoli stressanti, anche di debole intensità, sono in grado di attivare selettivamente i neuroni mesocorticali (Thierry et al, 1976; Dazzi et al, 1995). Le proiezioni dopaminergiche mesocorticali sono particolarmente sensibili allo stress a basse intensità che non sono sufficienti ad attivare le vie limbiche che proiettano al NAc e allo striato (Fadda et al, 1978; Imperato et al, 1990, 1991, 1992; Nakahara e Nakamura, 1999), inoltre, il rilascio di noradrenalina nella mPFC è ugualmente molto sensibile alla risposta allo stress (Hata et al, 1990; Rossetti et al, 1990; Taber e Fibiger, 1997). È stato dimostrato che uno stress di bassa intensità è in grado di indurre un aumento selettivo dell'output della DA nella PFC (Thierry et al, 1976; Dazzi et al, 1995, 2001). L'aumento è associato ad una compromissione delle performance sia nei ratti che nelle scimmie, testati sulla funzionalità della *working memory* (Murphy et al, 1996). In aggiunta allo stress, la DA nella mPFC aumenta in risposta ad altri stimoli ambientali. Per esempio, l'alimentazione può aumentare il rilascio di DA (Hernandez e Hoebel, 1990; Feenstra e Botterblom, 1996), e come per lo stress, questo effetto appare molto più pronunciato nella mPFC che nelle aree subcorticali (Hernandez e Hoebel, 1988; Bassareo e Di Chiara, 1997). Il rilascio di DA in PFC mediale è inoltre particolarmente sensibile alle novità (Feenstra et al, 1995; Feenstra e Botterblom, 1996; Rebec et al, 1997). Alterazioni nei comportamenti di ricompensa suggeriscono che la regolazione dei circuiti cerebrali della ricompensa e del rinforzo possono essere il fulcro fondamentale per gli effetti dello stress sul comportamento. La VTA è un attore chiave nel sistema di ricompensa del cervello, e la disregolazione di questa regione del cervello è coinvolta sia nella depressione che

nella tossicodipendenza (Nestler e Carlezon, 2006; Kauer e Malenka, 2007; Koob e Volkow, 2010; Lüscher e Malenka, 2011).

Il modello di stress sociale negli animali ha validità predittiva della depressione nell'umano, questa evidenza è suggerita dall'azione simile dell'imipramina sul comportamento e sui sintomi di pazienti umani depressi in cui è stata osservata la ridotta motivazione per gli eventi gratificanti (Auriacombe et al, 1997; Hughes et al, 1985). La desensibilizzazione del sistema mesolimbico dopaminergico è stata osservata anche in altri modelli di anedonia (Di Chiara et al, 1999.; Zacharko e Anisman 1991) e in diversi studi si ipotizza che l'imipramina provveda, attraverso le sue azioni, all'inversione dell'alterazione del sistema dopaminergico mesolimbico (Dziedzicka-Wasylewska e Papp 1996; Papp et al, 1994). Diversi trattamenti con antidepressivi si sono rivelati funzionali nel contrastare le modificazioni comportamentali indotte dallo stress sociale (Koolhaas et al, 1990; Kramer et al, 1999; Meerlo et al, 1997; Willner et al, 1995). Sono disponibili diversi trattamenti efficaci per la depressione e per i disturbi d'ansia, tra cui diverse forme di psicoterapia e farmaci antidepressivi (Bandelow et al, 2012). In letteratura alcune evidenze dimostrano che la somministrazione d'imipramina in cronico possa ripristinare l'edonia in ratti socialmente isolati.

La natura e la direzione di questi effetti sono determinati dalla qualità e dalla durata del fattore di stress applicato e dalla predisposizione genetica dell'organismo stressato. Alti livelli di anedonia sociale possono predisporre l'individuo alla depressione, diminuendo la possibilità di beneficiare dell'impatto psicologico che deriva da attività sociali. Il termine anedonia viene utilizzato per riferirsi alla condizione psicopatologica caratterizzata da un *deficit* nella capacità di provare piacere in attività e situazioni considerate, di norma, gratificanti (Pelizza, 2009). La mPFC non è solo sensibile allo stress acuto, ma anche a quello cronico, perciò, comparati con i controlli, ratti pre-esposti a isolamento sociale o stress imprevedibili mostrano un elevato aumento nei livelli extracellulari sia di DA che di NA e il metabolismo della DA nella mPFC, ma non nel NAc e nello striato in risposta a stress acuto (Gresch et al, 1994).

Modelli animali hanno a lungo suggerito un'interazione tra lo stress e il comportamento della ricerca di droghe. Lo stress altera in modo significativo il comportamento di un animale verso sostanze stupefacenti, aumentando l'assunzione iniziale di droga. Protocolli di stress, sia acuto che cronico, aumentano la auto-somministrazione di psicostimolanti, oppiacei e, in alcuni studi, l'alcol (Piazza et al, 1990; Ramsey e Van Ree, 1993; Goeders e Guerin, 1994; Haney et al, 1995; Miczek e Mutschler, 1996; Kosten et al, 2000). Inoltre, lo stress ripristina la ricerca della

sostanza in animali che hanno interrotto l'auto-somministrazione (Koob e Volcow, 2010). Lo stress che deriva da una sconfitta sociale, quando, per esempio, i roditori sono sconfitti da un aggressore della sua stessa specie, è stato usato come un modello d'incremento della ricerca della sostanza d'abuso (Miczek et al, 2008). La VTA può essere un punto d'intersezione cruciale tra lo stress e la ricerca delle sostanze d'abuso (McFarland et al, 2004). Anche la subordinazione sociale aumenta l'attività di neuroni dopaminergici nella VTA, che si riflette in un aumento della DA rilasciata nel NAc (Tidey e Miczek, 1996).

Come ampiamente detto, un unico modello animale può replicare tutta la miriade di sintomi associati con schizofrenia e depressione, disturbi influenzati da un ambiente sfavorevole nelle fasi di vita (Gainetdinov et al, 2001; Lipska e Weinberger 2000), malattie derivate da una disfunzione di diversi sistemi neurotrasmettitoriali in presenza di concomitanti eventi psicosociali. Sono state condotte numerose ricerche al fine di chiarire i ruoli dei diversi neurotrasmettitori del SNC, tra cui la noradrenalina, la serotonina e la DA. Ciascuno di questi neurotrasmettitori è stato localizzato nei tratti e nei nuclei cerebrali coinvolti nella regolazione del sonno, dell'espressione delle emozioni e della ricompensa dell'appetito.

Isolamento sociale

L'isolamento sociale è un modello di disturbo d'ansia (Haller e Halasz 1999, Lukkes et al, 2009), di abuso di sostanze (Hall et al, 1997, Howes et al, 2000, Advani et al, 2007), di depressione (Migues et al, 2005) e di schizofrenia (Varty et al, 1999, Schubert et al, 2009). Roditori allevati senza contatto sociale mostrano un fenotipo comportamentale anormale, che include un aumento della motilità in risposta ad un nuovo ambiente (Sahakian et al, 1982; Hall et al, 1998), assuefazione alterata (Einon e Morgan, 1976; Gentsch et al, 1982), aumenta l'aggressività (Wongwitdecha e Marsden, 1996; Toth et al, 2008) e aumentata capacità di sottrarsi ad una presa (Petkov e Rousseva 1984; Del Arco et al, 2004). Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'isolamento sociale in età adolescenziale porta ad una aumentata sensibilità allo stress (Lukkes et al, 2009; Weintraub et al, 2010) e inducono *deficit* delle capacità che consentono di discriminare tra stimoli rilevanti e irrilevanti, tipici dei pazienti schizofrenici (Baruch et al, 1988).

L'allevamento di ratti in isolamento sociale post-svezzamento è un modello animale di deprivazione sociale che racchiude le caratteristiche psicopatologiche relative al sistema limbico

negli esseri umani. Numerose evidenze in letteratura suggeriscono che l'isolamento sociale post svezzamento porti ad alterazioni comportamentali e neurochimiche in età adulta (Fone e Porkess, 2008; Lukkes et al, 2009). I comportamenti sociali possono essere influenzati dal *background* genetico e da fattori ambientali, come le condizioni prenatali e le prime esperienze sociali (Hol et al, 1999); infatti, le interazioni sociali sono necessarie per la normale vita degli animali, compresi i roditori. Esponendo i mammiferi a eventi negativi post natali e adolescenziali, come la *maternal separation* e l'isolamento sociale, si notano profondi cambiamenti nello sviluppo del cervello e nel comportamento (Harlow et al, 1965; Heim et al, 2004; Rapoport et al, 2005) che possono contribuire al verificarsi di disturbi psichiatrici.

È stato dimostrato che il sistema dopaminergico mesocorticolimbico subisce importanti modifiche nel corso dello sviluppo adolescenziale, compresi i processi di riduzione dei recettori della PFC e dello striato, e potrebbe essere sensibile alle caratteristiche dell'ambiente (Wright et al, 2008). La deprivazione sociale durante questo periodo si traduce, quindi, in cambiamenti della neurochimica cerebrale. Livelli di DA extracellulare aumentano anche nel NAc durante e dopo episodi aggressivi nei ratti (Koike et al, 2009), aggressività conseguente all'isolamento sociale. I recettori CB1 modulano la trasmissione sinaptica riducendo il rilascio di GABA e glutammato (Misner e Sullivan, 1999; Ohno-Shosaku et al, 2001; Straiker e Mackie, 2005).

L'isolamento sociale può, inoltre, produrre delle alterazioni a lungo termine nel sistema endocannabinoide (Malone et al, 2008; Sciolino et al, 2010). La disregolazione del segnale degli endocannabinoidi è implicata nei disturbi dell'emozione e nella risposta a fattori stressanti (Hill et al, 2005; Eisenstein et al, 2009). Il sistema di segnalazione degli endocannabinoidi regola la trasmissione dopaminergica, sia indirettamente, attraverso la riduzione del rilascio di glutammato e GABA sui neuroni dopaminergici, e sia direttamente, potenzialmente attraverso la formazione degli eterodimeri CB1-D2 (Ferre et al, 2009).

Cuenya et al, (2015) nel loro studio evidenziano la diversa risposta a stimoli comportamentali in animali che hanno subito isolamento sociale e riconducono queste differenze a una ridotta inibizione, sostenendo quindi che gli animali isolati mostrino alti livelli di impulsività. Dati in letteratura indicano che gli animali isolati abbiano una diversa sensibilità ai rinforzi naturali o artificiali. Gli isolati manifestano una maggiore preferenza all'etanolo e una maggiore risposta indotta dalla somministrazione di psicostimolanti come la cocaina, anfetamine, o apomorfina (Vedi Fone e Porkess, 2008). Questi dati si ricollegano con un possibile squilibrio della funzionalità dopaminergica (Phillips, Vacca, e Ahn, 2008). La risposta dopaminergica è

coinvolta anche nella previsione di un errore o nell'imprevedibilità di una ricompensa (Schultz, 2002), per questo lo squilibrio dopaminergico riscontrato negli animali isolati potrebbe influenzare la reazione a stimoli inaspettati.

Nel lavoro di Cabib (2002) viene messo in evidenza come non ci siano marcate differenze tra i valori basali di DA mesocorticale e mesolimbica dei topi isolati, ma la risposta allo stress promuove l'attivazione parallela del metabolismo DA mesocorticale e mesolimbico negli animali vissuti in gruppo. Al contrario, negli animali isolati si è riscontrato un potenziamento dell'attività dopaminergica a livello mesocorticale, ma una riduzione di quella mesolimbica sulla risposta allo stress. Questi risultati indicano bilanciamenti opposti tra le risposte DA mesocorticali e mesolimbiche allo stress, indicando che le risposte centrali e comportamentali allo stress sono altamente dipendenti alle esperienze individuali (Heidbreder, 2000; Robbins, 1996).

Obiettivi

I circuiti mesolimbico e mesocorticale rivestono un ruolo di primaria importanza nella gratificazione naturale (Koob, 1992; Di Chiara, 2002). Studi di microdialisi cerebrale nei ratti confermano l'attivazione di questi *pathways* sia nella fase preparatoria agli stimoli gratificanti, sia nella fase consumatoria (Pfaus et al, 1990; Radhakishun et al, 1988).

L'attività neuronale della corteccia prefrontale in risposta al cibo è alterata, in maniera opposta, in soggetti affetti da bulimia nervosa e anoressia nervosa (Uher et al, 2004). I neuroni dopaminergici del mesencefalo proiettano nella PFC, questa segnalazione è correlata al controllo delle funzioni cognitive, è associata all'apprendimento, al *food reward*, e al comportamento emozionale e affettivo (Volkow et al, 2011). Poiché l'attività del sistema dopaminergico mesocorticolimbico è altamente sensibile sia agli stimoli piacevoli che allo stress, nel mio studio ho voluto valutare la sensibilità dei neuroni di questo sistema alla presentazione di cibo. Per poter valutare l'effetto sia dell'anticipazione che del consumo dello stesso, ho utilizzato un modello di restrizione alimentare che consiste nell'allenare gli animali a consumare il loro pasto (pellet standard di cibo per ratti) per sole due ore al giorno, dalle 11:00 alle 13:00. In questo modo, dopo tre settimane di allenamento, gli animali imparano a riconoscere il momento del pasto ed è possibile pertanto studiare le variazioni della risposta dopaminergica sia nella fase anticipatoria, che in quella consumatoria (Dazzi et al., 2014).

In questi animali ho poi voluto studiare se l'esposizione cronica ad uno stimolo stressante potesse modificare la sensibilità dei neuroni dopaminergici mesocorticolimbici al cibo. Per fare questo ho utilizzato il modello di stress cronico dell'isolamento sociale che consiste nel separare gli animali dai congeneri dal 21° giorno di età, stabulandoli in gabbie singole. Gli animali allevati in condizioni d'isolamento sociale, infatti, presentano alterazioni comportamentali alla sfera cognitiva legate alla funzionalità dell'area corticofrontale. L'impulsività, che è una caratteristica comportamentale strettamente associata alla dipendenza, è strettamente legata all'ipofunzionalità corticofrontale. Inoltre, nuove prove su modelli animali e nell'uomo mostrano che l'impulsività predice l'escalation di assunzione di droga, e aumenta la vulnerabilità alla ricaduta dopo periodi di astinenza. Questo suggerisce che ci può essere un'alterazione sottostante nella funzione del cervello che predispone gli individui a comportamenti impulsivi e aumenta il rischio di sviluppare dipendenza.

Dato il ruolo cruciale del sistema endocannabinoide nella modulazione del comportamento alimentare e dell'attività dei neuroni dopaminergici, ho valutato la capacità dell'antagonista per i recettori CB1 per i cannabinoidi SR141716 e del loro agonista aminoalchilindolico WIN55,212-2 di modificare la risposta dopaminergica all'anticipazione e alla presentazione del cibo.

Ho voluto inoltre verificare se la presentazione di uno stimolo piacevole come il cioccolato, o il trattamento prolungato con il farmaco antidepressivo imipramina potesse alterare la risposta dei neuroni dopaminergici mesocorticali alla presentazione del cibo. Infine, per verificare che le modificazioni nella sensibilità dei sistemi dopaminergici mesocorticale e mesolimbico che s'instaurano in seguito al protocollo di restrizione alimentare da me utilizzato, rappresentassero realmente un meccanismo di sviluppo di dipendenza da cibo, ho voluto confrontare il mio modello con un modello di elevata sensibilità alla dipendenza da sostanze d'abuso. Infatti, modelli animali d'impulsività hanno dimostrato che i roditori più reattivi a stimoli nuovi e che sviluppano una maggiore sensibilità all'autosomministrazione di farmaci, mostrano un maggiore rinforzo legato alle ricompense alimentari, effetti che dipendono dalla funzione dopaminergica (Dellu et al, 1996). Pertanto, ho voluto verificare se, confrontando 4 differenti ceppi di topi, con un background genetico differente, fosse possibile trovare comorbidità tra la sensibilità all'autosomministrazione di cocaina e ricompensa alimentare usando un protocollo di apprendimento invertito.

Materiali E Metodi

La metodica della microdialisi cerebrale prevede l'inserimento in specifiche aree cerebrali di una fibra da dialisi. La microdialisi, accoppiata alla cromatografia liquida ad alta pressione, HPLC, consente di monitorare le quantità extracellulari del neurotrasmettitore DA. La tecnica della microdialisi si basa sul principio che le sostanze con un peso molecolare inferiore a 50000 Daltons presenti nel liquido interstiziale attraversano la fibra da dialisi mediante un principio di diffusione passiva secondo gradiente di concentrazione, mentre quelle con peso molecolare superiore vengono escluse e rimangono all'esterno della fibra. Di conseguenza nel passaggio attraverso la fibra, il Ringer si arricchisce delle sostanze presenti nello spazio sinaptico che ritroveremo così nel dializzato all'uscita dalla fibra.

Le fibre da dialisi sono costruite qualche giorno prima dell'esperimento, sono costituite da uno scheletro metallico, contenente i due capillari di silice fusa e dalla membrana, una sottile fibra da dialisi, composta da un copolimero acrilico di sodio-meta-allil-solfonato, ed un *cutoff* di 50000 Daltons, (Hospal Dasco, Bologna, Italia). Lo scheletro metallico è costituito da due porzioni, che costituiranno rispettivamente l'ingresso del liquido di perfusione e l'uscita del dializzato. La membrana, la cui lunghezza dipende dall'area in cui andrà inserita: 1 cm per mPFC e 1,2 cm per la *shell* del NAc, accoglie al suo interno i capillari di silice, e la sua superficie è rivestita da colla, tranne che nella porzione dializzante, anche questa variabile in base all'area in cui verrà inserita: 4 mm per la mPFC e 2 mm per il NAc dall'estremità distale. Quest'ultima costituisce la porzione attiva, attraverso la quale avvengono gli scambi secondo gradiente di concentrazione tra soluzione di perfusione e ambiente extracellulare dell'area cerebrale nella quale la fibra viene impiantata. Prima del loro utilizzo le fibre vengono testate "in vitro" per valutarne la percentuale di recupero rispetto ad una soluzione di DA a concentrazione nota. Vengono quindi utilizzate solo le fibre con una percentuale di recupero pari al 15 ± 4 %.

Animali

Ratti maschi Sprague Dawley del ceppo CD (Charles River, Como, Italia) di circa due mesi di vita sono stati allevati nel nostro stabulario e mantenuti sotto un ciclo artificiale di 12 ore di luce, 12 di buio (la luce si accende alle 08:00 e si spegne alle 20:00), a temperatura costante di 22° C, e umidità relativa del 65 %. Hanno avuto libero accesso all'acqua e al cibo standard di laboratorio in ogni momento fino all'applicazione del protocollo di restrizione alimentare. Sono

stati fatti tutti gli sforzi per ridurre al minimo la sofferenza degli animali. La cura degli animali e la gestione in tutte le procedure sperimentali sono state effettuate secondo la Direttiva del Consiglio del 24 Novembre 1986 della Comunità Europea (86/609/CEE). Sono stati inoltre approvati i protocolli sperimentali dal Comitato dell'Università di Cagliari per l'Etica Animale.

PROTOCOLLO DI ISOLAMENTO SOCIALE

Allo svezzamento, il ventunesimo giorno di vita, gli animali sono stati assegnati arbitrariamente o al gruppo di controllo GH, e stabulati 8 per gabbia, o al gruppo degli isolati ISO, stabulati in gabbie singole. Una parte dei ratti ISO sono stati reinseriti in gruppo dopo le quattro settimane di isolamento per altre 4 settimane, ISO + GH, per valutare se l'ambiente socialmente arricchito è in grado di modificare i cambiamenti indotti nella sensibilità dei neuroni dopaminergici mesocorticali durante le fasi di anticipazione e consumazione del cibo. I ratti ISO e ISO + GH sono stati esposti al protocollo della restrizione alimentare rispettivamente dal giorno 35PN durante il periodo di isolamento e dal giorno 49PN quando gli animali sono stati reinseriti in gruppo.

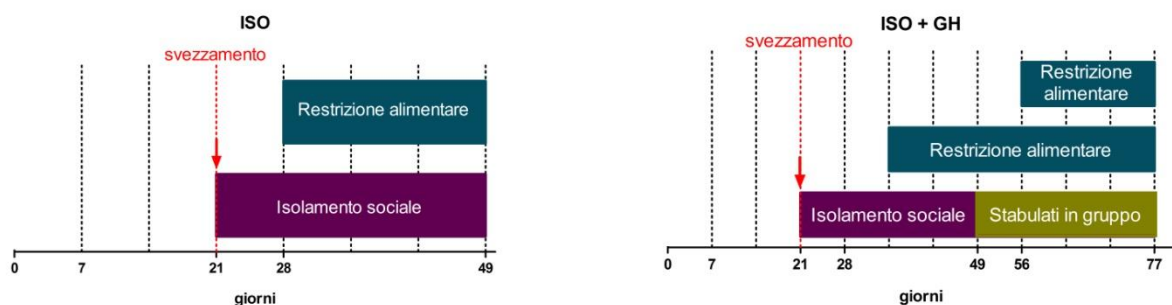


Figura 1 Rappresentazione schematica dei protocolli d'isolamento sociale e isolamento sociale seguito dal reinserimento in gruppo.

PROTOCOLLO DELLA RESTRIZIONE ALIMENTARE

Sia i ratti appartenenti al gruppo GH che i ratti appartenenti al gruppo ISO sono stati ulteriormente assegnati arbitrariamente o al gruppo di controllo, che riceve cibo e acqua *ad libitum*, o al gruppo *food restricted* (FR). Come è stato descritto precedentemente (Ghiani 1998), agli animali FR è consentito l'accesso al loro pasto quotidiano (cibo in pellet per ratti; Dieta standard GLP, Mucedola, Italia) solo per 2 ore, dalle 11:00 alle 13:00, mentre l'acqua era disponibile *ad libitum*. Il peso degli animali e il cibo consumato sono stati misurati giornalmente durante le tre settimane nelle quali il regime di FR veniva applicato.

I ratti ISO e ISO + GH sono stati esposti al protocollo della restrizione alimentare rispettivamente al giorno 35 durante il periodo di isolamento e al giorno 49 quando gli animali sono stati reinseriti in gruppo.

TRATTAMENTO LIGANDI RECETTORE CB1

Un gruppo di ratti è stato sottoposto al trattamento cronico (due volte al giorno per 21 giorni) con l'antagonista dei recettori CB1 per i cannabinoidi, SR141716 (1 mg/kg, i.p.). Diversi animali sono stati sottoposti al trattamento acuto (40 minuti prima della presentazione del cibo, il giorno dell'esperimento) con SR141716 (1 mg/kg, i.p.), con WIN 55,212-2 (5 mg/kg, i.p.) o con entrambi i farmaci. L'SR141716 è stato sciolto in etanolo/Tween 80/salina (1:1:16, v/v/v), il WIN 55,212-2 in acqua distillata contenente una goccia di Tween 80/ml. Entrambi i farmaci sono stati somministrati in un volume di 3 ml/kg, e un volume identico di soluzione salina è stato somministrato ai controlli.

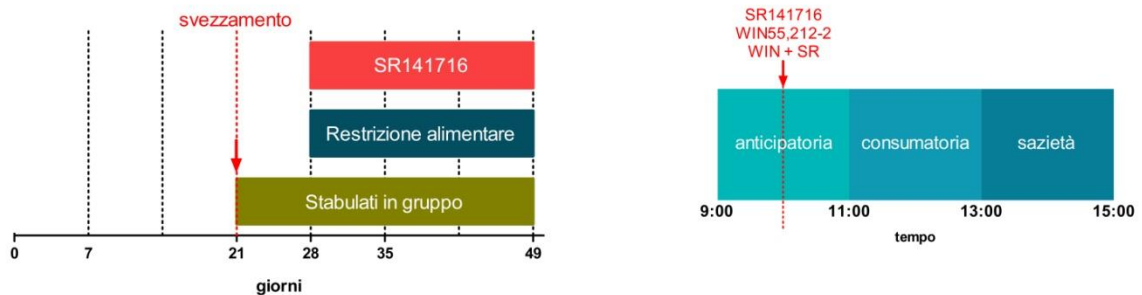


Figura 2 Rappresentazione grafica dei protocolli di somministrazione cronica e acuta dei ligandi del recettore CB1.

TRATTAMENTO CON CIOCCOLATO E IMIPRAMINA

Nella seconda settimana di applicazione del protocollo di restrizione alimentare, una parte degli animali appartenenti sia al gruppo GH che al gruppo ISO, sono stati ulteriormente divisi in due gruppi, denominati Ch (cioccolato) e Ch-AD (cioccolato-antidepressivo). I due gruppi hanno ricevuto tutti i giorni, una volta al giorno, un'ora prima della presentazione del cibo (h 10:00) per due settimane, rispettivamente 1.4 g di cioccolato bianco in pellet e 20 mg/Kg di imipramina che sono stati sciolti in un pellet di cioccolato identico a quello che ricevevano gli animali del gruppo Ch.

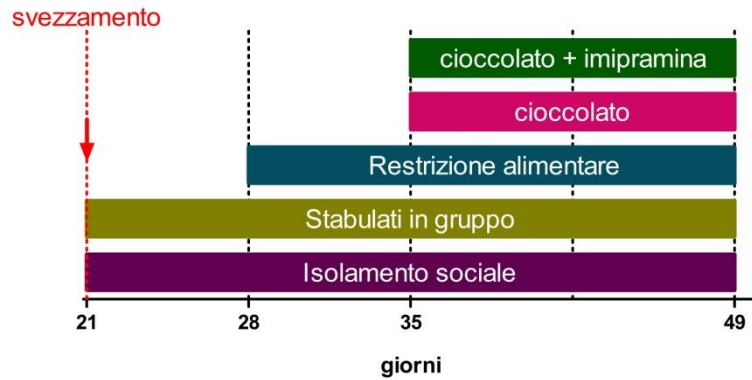


Figura 3 Rappresentazione schematica del protocollo di somministrazione di cioccolato e imipramina

Chirurgia

I ratti sono stati anestetizzati con cloralio idrato alla dose di 0.4 g/kg, i.p. e immobilizzati su un apparato stereotassico che permette l’impianto della fibra da microdialisi nelle aree cerebrali in esame, secondo le seguenti coordinate (Paxinos 1982):

- mPFC. A + 3,2 mm; L + 0,8 mm; V – 5,3 mm
- shell NAc. A + 2,2 mm; L + 1,0 mm; V – 7,8 mm

Una volta inserita, la fibra viene fissata al cranio con una sostanza cementante e la ferita cutanea viene suturata in modo che l’animale al suo risveglio sia in grado di muoversi senza impedimenti.

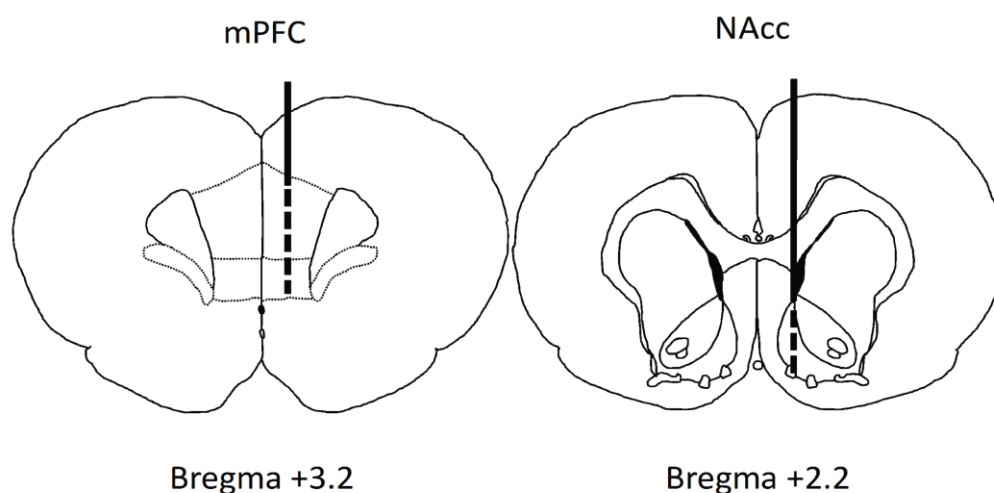


Figura 4 Rappresentazione schematica della localizzazione della fibra per dialisi nella mPFC e nella shell del NAc.

Procedura degli esperimenti

Gli esperimenti vengono effettuati 24 h dopo l'impianto della fibra da dialisi per consentire il recupero dato dallo stress chirurgico, con animali svegli e liberi di muoversi all'interno di cubi di plexiglas, nei quali vengono posizionati subito dopo l'operazione. La soluzione di perfusione, Ringer (3 mM KCl, NaCl 125 mM, CaCl₂ 1.2 mM, 1 mM MgCl₂, 23 mM NaHCO₃, 1,5 mM potassio fosfato, pH 7.3), ha una concentrazione salina analoga a quella del liquido extracellulare, viene pompata attraverso il tubo d'ingresso della fibra con un flusso costante di 2.0 µl/min. I campioni di dializzato (40 µl) sono stati raccolti ogni 20 min nell'intervallo di tempo 8:30-15:00, e immediatamente iniettati in un sistema HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) dotato di colonna cromatografica a fase inversa (LC-18-DB Supelco) e accoppiato a un rivelatore elettrochimico per la determinazione della DA (*Glassy Carbon UniJet Working Electrode*, 6mm di diametro), come precedentemente descritto (Dazzi 1997). Per la misurazione di DA è stata applicata una differenza di potenziale di +650 mV. La fase mobile è rappresentata da tampone fosfato (NaH₂PO₄ 73.4 mM, NaCl 4.4 mM, OSA 3 mM, EDTA 0.1 mM, Metanolo al 10%, pH 3,2). Sono state valutate le concentrazioni di DA nella fase anticipatoria (le due ore antecedenti la presentazione del cibo), nella fase consumatoria (le due ore durante le quali il cibo era a disposizione degli animali), e nella fase di sazietà (le due ore successive la rimozione del cibo). La media dei valori relativi alla concentrazione del neurotrasmettitore nei primi due campioni è stata valutata come 100 %, e tutti i valori successivi sono stati espressi come media ± SEM rispetto al valore basale.

Istologia

Alla fine dell'esperimento i ratti vengono anestetizzati con una soluzione satura di cloralio idrato per poter essere sacrificati e sottoposti alla rimozione dei cervelli che vengono tagliati in sezioni coronali e osservate al microscopio per valutare la corretta posizione della fibra con l'ausilio dell'atlante di Paxinos e Watson (1998). Tutti i ratti in cui la sonda era situata al di fuori della regione di destinazione sono stati esclusi dall'analisi.

Attività motoria

Gli animali sono stati posti in un *motility meter* (*Omnitech Electronics Inc.*), un macchinario dotato lateralmente di cellule fotoelettriche che registrano gli spostamenti dell'animale. Le cellule fotoelettriche sono localizzate su due barre poste parallelamente tra loro e separate dalla

gabbia e operano trasmettendo, le une alle altre, raggi infrarossi che vengono interrotti al passaggio dell'animale. Più saranno frequenti i movimenti dell'animale e maggiormente verranno interrotti i raggi dello strumento, permettendo ad appositi contatori di registrare tutte le interruzioni provocate dall'animale. Ogni gabbia consiste in una gabbia 41x41x30 centimetri di polipropilene e di PVC espanso appositamente progettata per l'attenuazione del suono .

Il comportamento esplorativo spontaneo è stato misurato in ratti FR in tempi diversi dopo il periodo di applicazione del regime di restrizione alimentare: durante la Fase anticipatoria (2 ore, 1 ora e 5 min prima della presentazione del cibo), alla fine dell'esposizione al cibo e 2 ore dopo la rimozione del cibo. Il gruppo di ratti alimentati *ad libitum* sono stati testati come controlli agli stessi tempi. Si ottengono così i seguenti gruppi sperimentali:

- Controllo
- FR
- Controllo + SR
- FR + SR
- Controllo ISO
- FR ISO

Per ciascuna delle fasi temporali e per ogni gruppo sono stati utilizzati otto ratti.

Il giorno del test, i ratti sono stati introdotti nel locale di prova per standardizzare le condizioni ambientali e lasciati acclimatare per 1 h prima dell'inizio dell'esperimento. Sono stati successivamente posti individualmente nella gabbia di prova. Gli animali sono stati isolati dal rumore del registratore e della stampante utilizzata per acquisire i dati mettendo questi dispositivi in una stanza diversa.

I parametri valutati sono stati l'attività orizzontale, l'attività verticale, il tempo totale trascorso in movimento e la distanza totale percorsa. Ogni *trials* era articolato in 6 registrazioni, effettuate ogni 5 minuti, iniziando immediatamente dopo aver posizionato il ratto nella gabbia, per un periodo totale di 30 min.

Test comportamentale

Un totale di 64 topi maschi adulti (12 topi per ceppo) appartenenti ai ceppi C57BL/6J, A/J, CBA/J e DBA/2J, sono stati stabulati alla *University of California Los Angeles (UCLA)* e fatti abituare per 14 giorni prima dell'inizio degli esperimenti. Sono stati stabulati 4 per gabbia, inizialmente con cibo e acqua *ad libitum*. Tre giorni prima dell'inizio dei test, i topi hanno ricevuto accesso limitato al cibo nella loro gabbia, sufficiente a mantenere $\pm 85\%$ del peso corporeo iniziale per tutto il test.

I topi sono stati addestrati e testati tutti i giorni nei box singoli per il comportamento operante *Med Associates (St. Albans, Vermont)* dotati di una matrice orizzontale con cinque aperture *nose-poke* su un lato della scatola e un'apertura con fotocellula attrezzata per dispensare il cibo. Gli animali sono stati abituati per tre giorni all'ambiente del test con il pellet di ricompensa sempre a disposizione per ogni trial; questa fase di esperimento è chiamata abituação. Nella fase di training invece ai topi veniva presentato un solo foro illuminato per trial, assegnato in modo casuale a un foro adiacente al foro centrale, destra o sinistra. Il *nose-poke* nel buco illuminato portava alla consegna di un singolo pellet (Noyes senza polvere pellets; *Sandown* scientifico, Middlesex, UK) nel compartimento alimentare situato sulla parete della camera opposta rispetto alle luci. Il recupero del pellet dal foro avviava immediatamente la prova successiva. Un *nose-poke* in qualsiasi foro non illuminato determinava un time-out di 5 secondi. Gli animali che hanno mostrato una tendenza laterale sono stati esclusi dallo studio. La tendenza laterale è stata definita come una tendenza a scegliere preferenzialmente (più del 55% delle volte) uno dei due fori (corrisponde a più del 5% di errori sullo stesso foro). Tutti gli animali sono stati testati in sessioni giornaliere che si sono concluse dopo 1 ora o 100 *trials*. Le procedure sperimentali sono state implementate usando software personalizzato scritto in Visual Basic ACM.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati confrontando i gruppi con l'ANOVA a due vie per misure ripetute, usando come fattori il trattamento e il tempo. I valori grezzi delle concentrazioni di DA sono stati utilizzati per l'analisi, con concentrazioni basali assolute indicate nei risultati. Confronti post hoc sono stati fatti con i test Newman-Keuls o Bonferroni. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo per tutti gli esperimenti. Tutti i dati sono espressi come $media \pm SEM$.

Risultati

Nel mio studio ho voluto valutare per prima cosa le concentrazioni extracellulari di DA nella mPFC di ratti allenati a consumare il loro pasto quotidiano in sole 2 ore al giorno (11:00 - 13:00). I valori basali in questi animali non differivano significativamente diversi da quelli degli animali che disponevano di cibo *ad libitum* (Controlli: 13.5 ± 3.05 fmol/campione da 40 μ l ; FR: 12.5 ± 2.95 fmol/campione da 40 μ l). Nei ratti FR le concentrazioni extracellulari di DA aumentano significativamente già 80 minuti prima della presentazione del cibo e mostrano un ulteriore aumento del 200%, rispetto ai valori basali, 20 min prima di ricevere il cibo raggiunge un valore massimo di +320% durante l'assunzione di cibo. Il valore si riduce progressivamente nella fase finale dell'assunzione, per tornare ai valori basali 40 minuti dopo la rimozione del cibo. Nei ratti che hanno avuto libero accesso al cibo durante tutto il giorno, la concentrazione extracellulare di DA non mostra variazioni significative durante tutto l'esperimento.

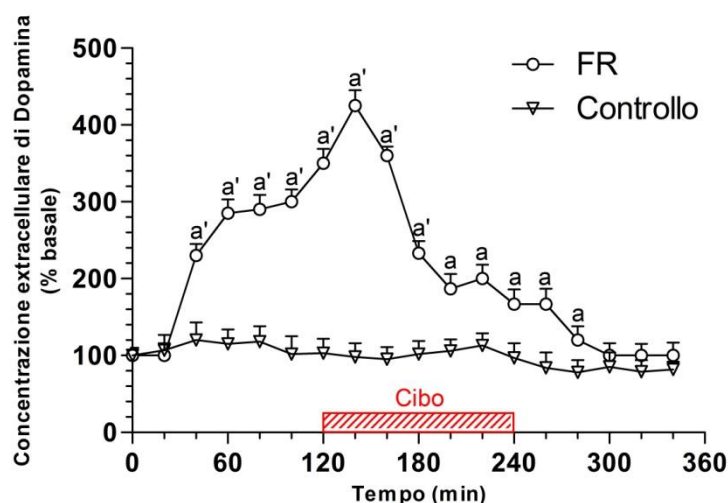


Figura 5 Effetto dell'anticipazione e della presentazione del cibo sulle concentrazioni extracellulari di DA nella PFC in ratti allenati ad un regime di restrizione alimentare. Il gruppo FR ha avuto il cibo a disposizione per 2 ore ogni giorno, dalle 11 alle 13. Il gruppo Controllo ha avuto cibo *ad libitum* 24h al giorno per tutto il trattamento. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. $aP < 0.05$; $a'P < 0.01$ vs valori basali

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo della presentazione del cibo [$F(1,96)=3.846$; $P < 0.001$].

Poiché il sistema endocannabinoide riveste un ruolo importante nel controllo del comportamento alimentare, ho esaminato l'effetto del blocco e della stimolazione del recettore, rispettivamente con l'antagonista SR141716 (1 mg / kg, i.p.) e l'agonista WIN 55,212-2 (5 mg / kg, i.p.) sull'aumento delle concentrazioni extracellulari di DA indotto dalla presentazione del cibo nei ratti FR.

I farmaci sono stati somministrati ai diversi gruppi di animali 40 min prima della presentazione del cibo. I ratti non sottoposti a restrizione alimentare hanno ricevuto le stesse dosi di SR141617 e WIN 55,212-2; in questi animali, le dosi somministrate non hanno indotto nessun effetto significativo sulle concentrazioni di DA.

La somministrazione acuta dell'antagonista CB1, SR141716, riduce drasticamente l'aumento della concentrazione extracellulare di DA osservato nei ratti FR in seguito all'anticipazione e alla presentazione del cibo.

L'ANOVA ha rivelato un significativo effetto del trattamento [$F(3,324)=12,0308$, $P<0,01$], un significativo effetto della presentazione del cibo [$F(18,324)=2,1568$, $P<0,01$], e una significativa interazione tra i fattori [$F(54,324)=1,2687$, $P<0,01$].

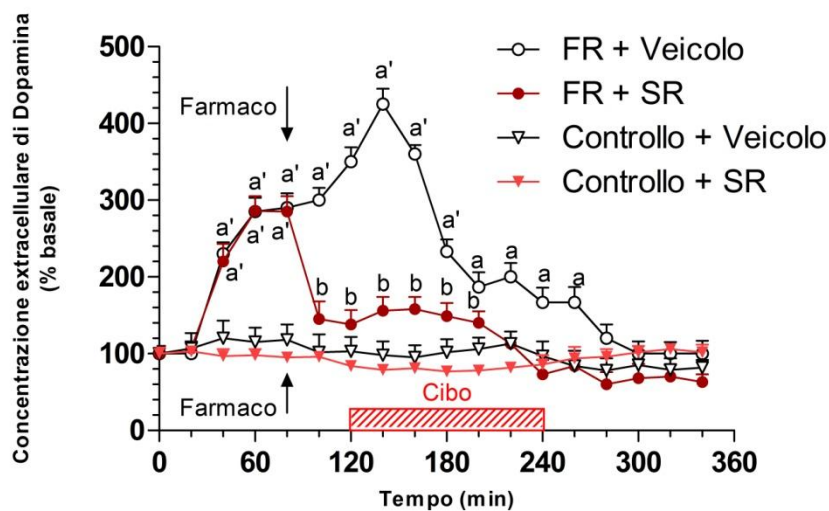


Figura 6 Effetto dell'anticipazione e consumazione di cibo in animali FR sulla concentrazione di DA extracellulare in mPFC: modulazione con antagonisti del recettore CB1. Il gruppo FR ha avuto il cibo per 2 ore ogni giorno, dalle 11 alle 13. Il gruppo Controllo ha avuto cibo ad libitum per tutto il trattamento. Gli animali hanno ricevuto una somministrazione acuta di veicolo o SR141716 (1 mg/kg, i.p.) 40 min prima della presentazione del cibo. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. $aP<0,05$; $a'P<0,01$ vs valori basali; $bP<0,01$ vs il corrispondente valore del gruppo trattato con veicolo.

È stato dimostrato che la somministrazione cronica di SR141716 sviluppa tolleranza comportamentale e biochimica (Rubino 2000), mentre l'effetto anoressizzante viene mantenuto (Maccioni 2008). Per valutare se la tolleranza può incidere sulla capacità di questo farmaco di antagonizzare l'aumento della produzione di DA nella mPFC, indotto dalla restrizione alimentare, ho valutato l'effetto della somministrazione cronica di SR141716 (1 mg/kg, i.p., 2 volte al giorno, per 21 giorni) in ratti FR.

La concentrazione basale di DA non viene significativamente modificata dal trattamento a lungo termine con SR141617. Negli animali trattati cronicamente con questo farmaco, l'aumento dell'output di DA nella fase anticipatoria risulta completamente antagonizzato, mentre durante la fase consumatoria si registra una riduzione significativa dell'aumento osservato nei ratti trattati con veicolo (+80%).

L'ANOVA ha rivelato un significativo effetto del trattamento [$F(1,189)=1.947$, $P<0.001$], un significativo effetto della presentazione del cibo [$F(18,189)=0.763$, $P<0.001$], e una significativa interazione tra i fattori [$F(18,189)=4.951$, $P<0.001$].

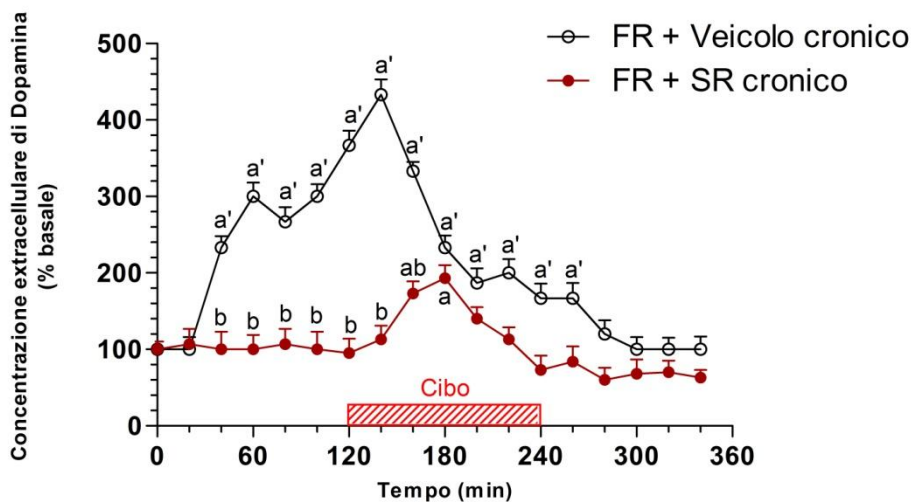


Figura 7 Concentrazioni extracellulari di DA in mPFC durante le fasi di anticipazione e di consumo di cibo in animali FR: modulazione con antagonisti del recettore CB1. Il gruppo FR ha avuto il cibo a disposizione per 2 ore ogni giorno, dalle 11 alle 13. Gli animali hanno ricevuto una somministrazione cronica di veicolo o SR141716 (1 mg/kg, i.p.) due volte al giorno. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. $aP<0.05$; $a'P<0.01$ vs valori basali; $bP<0,01$ vs il corrispondente valore del gruppo trattato con veicolo.

Alla luce dei risultati ottenuti con l'antagonista dei recettori CB1, ho voluto valutare l'effetto dell'agonista degli stessi recettori, WIN 55,212-2. La somministrazione acuta di WIN 55,212-2 non induce modificazioni significative nelle concentrazioni extracellulari di DA nei due gruppi di animali: la concentrazione extracellulare di DA aumenta (+100% circa) 80 min prima della presentazione del cibo, con un aumento massimo del +350% circa 20 min dopo la presentazione del cibo, durante la fase consumatoria, con un andamento molto simile a quello osservato negli animali trattati con veicolo..

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo della presentazione del cibo [$F(3,360) = 3.2564$, $P < 0.01$], un effetto non significativo della somministrazione di WIN 55,212-2 [$F(18,360) = 0.2486$, $P = 0.1248$], e un'interazione non significativa tra i due fattori [$F(54,360) = 0.8596$, $P = 0.9536$].

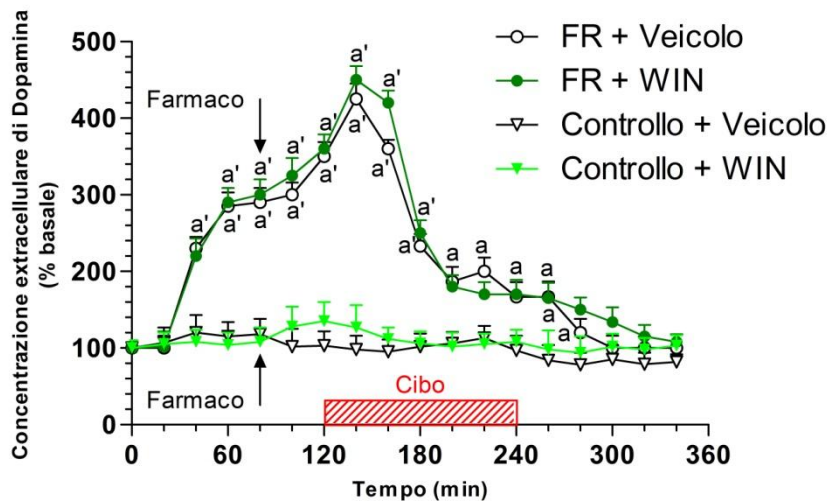


Figura 8 Concentrazione di DA extracellulare in mPFC durante le fasi di anticipazione e di consumo di cibo in animali FR: modulazione con agonisti del recettore CB1. Il gruppo FR ha avuto il cibo a disposizione per 2 ore ogni giorno, dalle 11 alle 13. Il gruppo Controllo ha avuto cibo ad libitum per tutto il trattamento. Gli animali hanno ricevuto una somministrazione acuta di veicolo o WIN 55212-2 (5 mg / kg, i.p.) 40 min prima della presentazione del cibo. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. $aP < 0.05$; $a'P < 0.01$ vs valori basali.

Dati precedenti (De Luca et al, 2012) indicano che i neuroni mesolimbici dopaminergici che proiettano alla *shell* del NAc non rispondono in modo significativo alla presentazione di un cibo familiare. Ho voluto quindi verificare la risposta di questi neuroni al protocollo di restrizione alimentare.

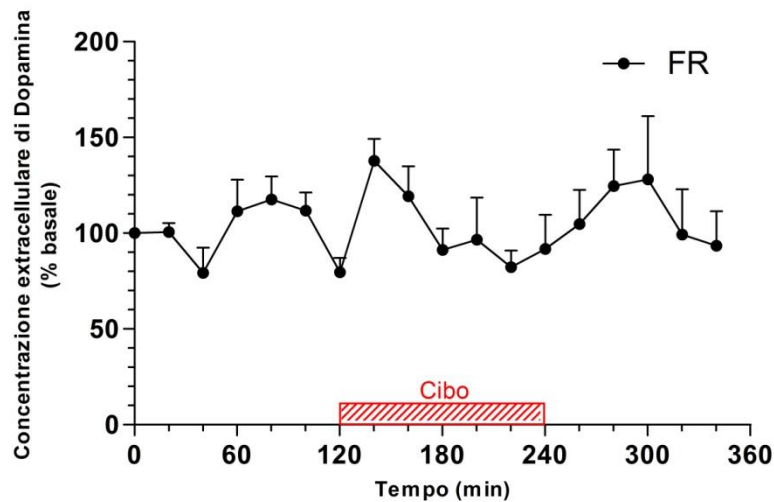


Figura 9 Effetto dell'anticipazione e della presentazione del cibo sulle concentrazioni extracellulari di DA nella *shell* del NAc in ratti allenati ad un regime di restrizione di cibo. Il gruppo FR ha avuto il cibo per 2 ore ogni giorno, dalle 11 alle 13. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM.

In accordo con le evidenze precedenti (De Luca et al, 2012) le concentrazioni extracellulari di DA nella *shell* del NAc mostrano un andamento molto differente da quello osservato in mPFC. In particolare, nel NAc si osserva un aumento significativo solo nel campione immediatamente successivo alla presentazione del cibo (+60%). Le concentrazioni extracellulari di DA ritornano a valori basali già nel campione successivo.

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo della presentazione del cibo [$F(17,108)= 1.11$; $P = 0.3523$].

Ho voluto inoltre valutare se la somministrazione di WIN 55,212-2 potesse modificare questa risposta. Come mostra la figura 4, nei ratti FR la somministrazione acuta di WIN 55,212-2 (5 mg/kg, i.p.), 40 min prima dell'esposizione al cibo induce un significativo aumento delle concentrazioni extracellulari di DA sia durante la fase anticipatoria (+ 60% del basale) che quella consumatoria (+ 130%). Questo effetto è completamente antagonizzato dalla somministrazione contemporanea di SR1416171, confermando il coinvolgimento dei recettori CB1.

L'ANOVA ha dimostrato un effetto significativo del trattamento [$F(1,190)=2.058; P<0.01$]; un effetto significativo delle misure ripetute [$F(18,119) = 1.359; P<0.01$]; ed una significativa interazione tra i fattori [$F(18,190) = 9.264; P<0.01$].

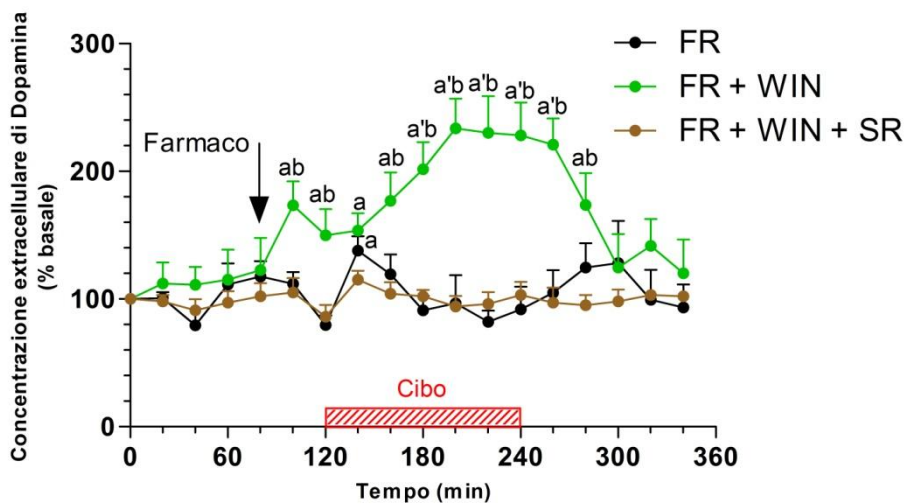


Figura 10 Effetto dell'anticipazione e della presentazione del cibo sulle concentrazioni extracellulari di DA nello shell del NAc in ratti allenati ad un regime di restrizione di cibo: modulazione con ligandi del recettore CB1. Il gruppo FR ha avuto il cibo a disposizione per 2 ore ogni giorno, dalle 11 alle 13. Gli animali hanno ricevuto una somministrazione acuta di veicolo, o WIN 55,212-2 (5 mg/kg, i.p.), o una combinazione di WIN 55,212-2 (5 mg/kg, i.p.) e SR141716 (1 mg/kg, i.p.) 40 min prima della presentazione del cibo. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. $aP<0.05$; $a'P<0.01$ vs valori basali; $bP<0,01$ vs il valore del corrispondente trattato con veicolo.

Dato il ruolo cruciale della DA nella mPFC nella modulazione della risposta allo stress, per valutare se l'esposizione a uno stress cronico possa modificare la sensibilità di questi neuroni nella fase anticipatoria e consumatoria di cibo, ho voluto analizzare l'effetto dell'isolamento sociale come modello di stress cronico, sulle variazioni dopaminergiche in ratti sottoposti ad un regime di restrizione alimentare, comparando i dati con quelli precedenti ottenuti in animali stabulati in gruppo (GH; *group housed*).

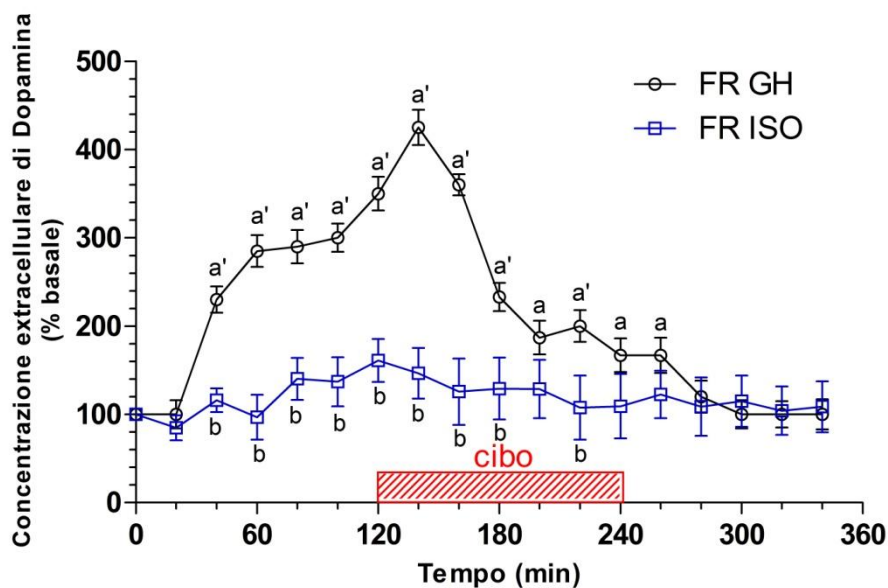


Figura 11 Effetto dell'isolamento sociale sull'aumento delle concentrazioni extracellulari di DA, indotto dall'anticipazione e dalla presentazione del cibo, nella mPFC di ratti allenati ad un regime di restrizione alimentare. Gli animali hanno avuto a disposizione il cibo per 2 ore ogni giorno, dalle 11 alle 13. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. $aP < 0.05$; $a'P < 0.01$ vs valori basali; $bP < 0.01$ vs controlli.

Sorprendentemente, nei ratti isolati l'allenamento al cibo non induce il marcato aumento della concentrazione extracellulare di DA nella PFC, nè nella fase anticipatoria nè in quella consumatoria che si osserva invece nei ratti stabulati in gruppo.

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo della presentazione del cibo [$F(1,315)=1.425$; $P < 0.001$]; un effetto significativo dell'isolamento [$F(1,315)=0.236$; $P < 0.001$]; ed un effetto significativo dell'interazione tra i fattori [$F(1,315)=2.015$; $P < 0.001$].

Considerando la risposta differente al protocollo di restrizione alimentare tra ratti vissuti in gruppo e ratti socialmente isolati, ho voluto valutare se nel NAc la FR potesse indurre una risposta diversa rispetto a quella osservata negli animali GH.

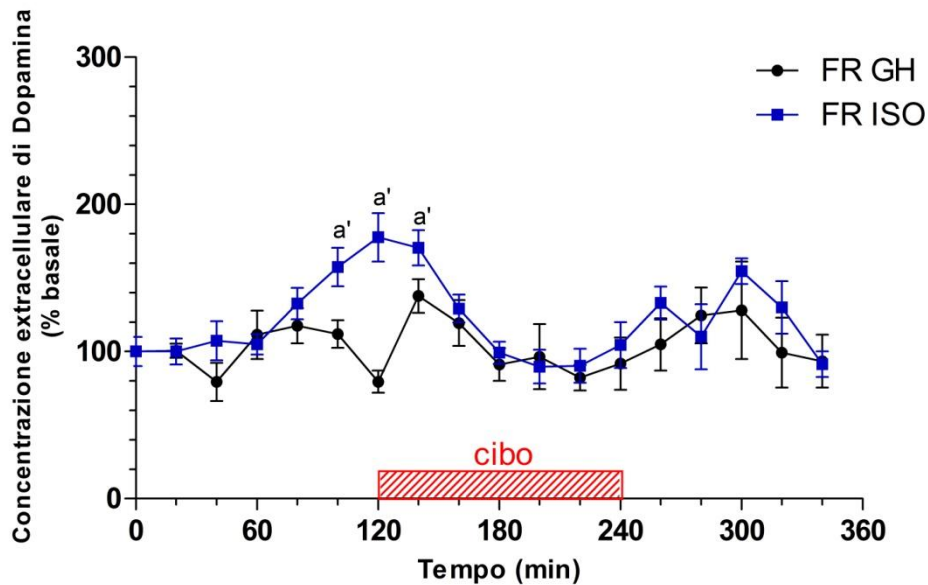


Figura 12 Effetto dell'isolamento sociale sull'aumento delle concentrazioni extracellulari di DA, indotto dall'anticipazione e dalla presentazione del cibo, nella shell del NAc di ratti allenati ad un regime di restrizione alimentare. Il gruppo FR ha avuto a disposizione il cibo per 2 ore ogni giorno, dalle 11 alle 13. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. $a'P < 0.01$; vs valori basali.

Negli animali isolati, contrariamente a quelli stabulati in gruppo, l'anticipazione del cibo induce un aumento significativo (+90%) delle concentrazioni extracellulari di DA nella *shell* del NAc già 40 min prima della presentazione del cibo; l'aumento persiste per 20 min dopo la presentazione dello stesso, per tornare poi ai valori basali.

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo della presentazione del cibo [$F(17,216) = 3.53$; $P < 0.0001$]; un effetto significativo del trattamento [$F(1,216) = 12.87$; $P = 0.0004$]; ed un effetto non significativo dell'interazione tra i fattori [$F(17,216) = 1.59$; $P = 0.0676$].

Poiché studi precedenti hanno dimostrato che la restrizione alimentare aumenta l'*arousal* in molte specie di mammiferi (Weed 1997), ho voluto verificare se negli animali FR, l'anticipazione e il consumo di cibo sono associati ad una alterata attività esplorativa spontanea valutata con il *Motility Meter*.

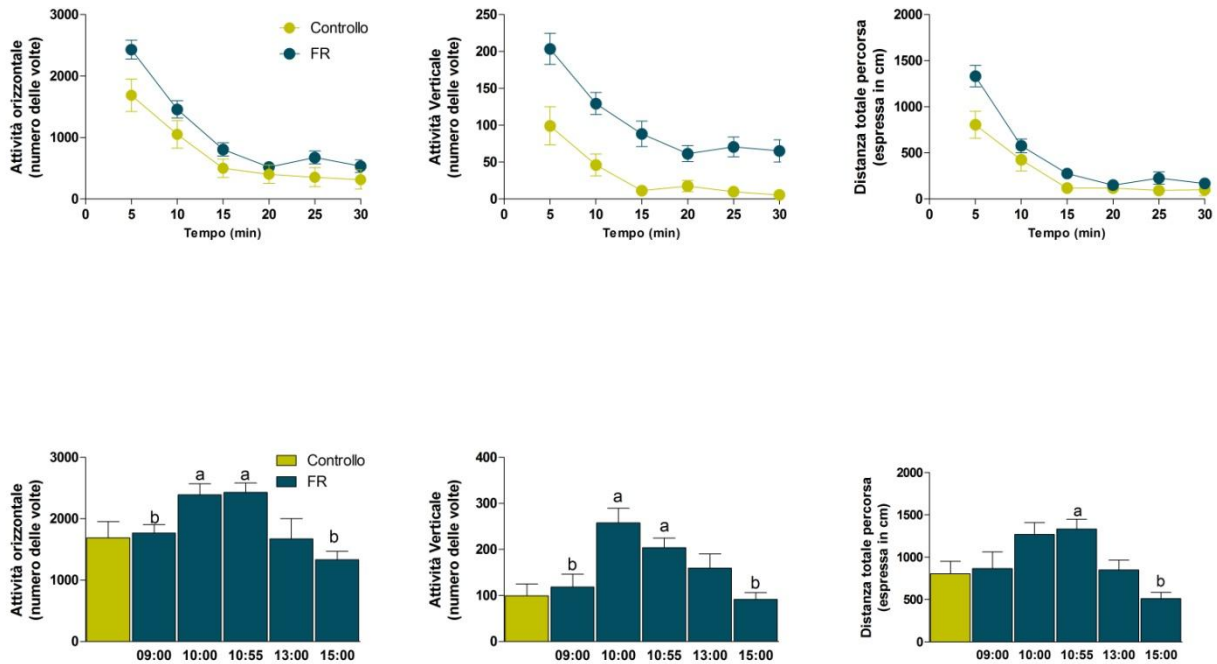


Figura 13 Effetto dell'attività esplorativa spontanea in ratti FR e animali nutriti ad libitum. L'attività esplorativa è stata valutata con il motility meter dopo 3 settimane di FR. I parametri misurati sono stati: l'attività orizzontale, l'attività verticale, e la distanza totale percorsa. I valori indicano la media \pm SEM delle registrazioni da 5 min a 30 min (grafici a dispersione) o dei primi 5 minuti (grafici a barre). $aP < 0.05$ vs controllo; $bP < 0.05$ vs 5' prima del gruppo FR.

I dati indicano che i ratti FR testati 5 minuti prima del consumo alimentare mostrano un aumento dell'attività orizzontale e verticale, e percorrono una distanza maggiore, rispetto agli animali alimentati *ad libitum*.

L'ANOVA ha rivelato: per l'attività orizzontale, $F(5,49)=5.267$, $aP < 0.05$ vs ratti alimentati *ad libitum*; per l'attività verticale, $F(5,49)=6.232$, $aP < 0.05$ vs ratti nutriti libitum; per la distanza totale, $F(5,49)=5.640$, $aP < 0,05$ vs ratti alimentati *ad libitum*.

Inoltre, gli animali FR testati 2 ore dopo o 2 h prima del consumo di cibo, quando i livelli di DA sono simili a quelli osservati in animali alimentati *ad libitum*, hanno mostrato una attività esplorativa simile ai ratti di controllo ($bP < 0.05$ vs FR 5 minuti prima, analisi post-hoc Newman-Keuls).

Alla luce di questi risultati, e delle evidenze che suggeriscono che l'isolamento sociale modifica l'attività motoria degli animali (Morgan 1973; Sahakian et al, 1975), ho voluto verificare se l'isolamento fosse in grado di modificare la risposta motoria degli animali all'anticipazione e alla presentazione del cibo.

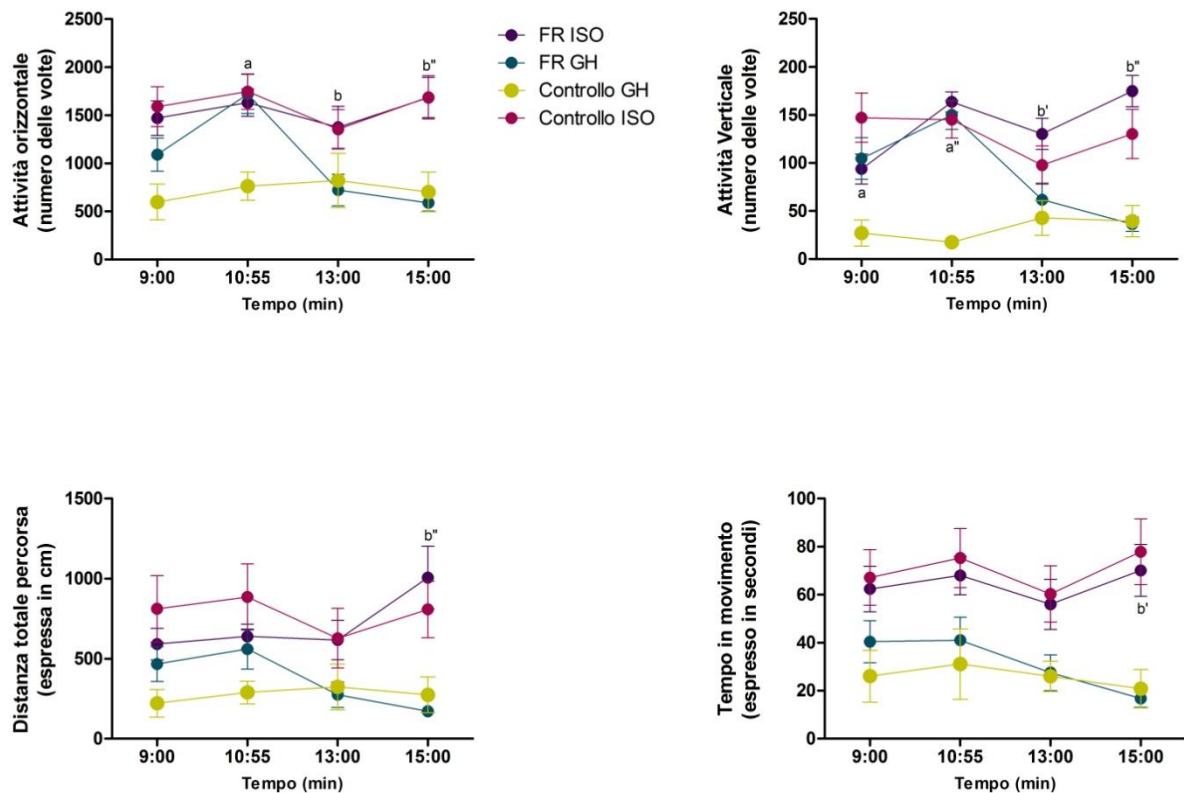


Figura 14 Effetto dell'attività esplorativa spontanea in ratti FR, animali nutriti ad libitum e sottoposti ad isolamento sociale. L'attività esplorativa è stata valutata con il motility meter dopo 4 settimane di Isolamento sociale e 3 settimane di FR. I parametri misurati sono stati: l'attività orizzontale, l'attività verticale, la distanza totale percorsa e il tempo trascorso in movimento. I valori indicano la media \pm SEM delle registrazioni di 30 minuti effettuate a cavallo dei punti critici del protocollo, per evidenziare possibili variazioni indotte dall'anticipazione e dalla presentazione del cibo. $aP < 0.05$; $a'P < 0.01$ vs Controllo GH; $bP < 0.05$; $b'P < 0.01$ vs gruppo FR GH.

Dal grafico è possibile notare come entrambi i gruppi ISO, sia quelli sottoposti a FR che quelli con il cibo disponibile *ad libitum*, mostrino un marcato aumento dell'attività esplorativa motoria rispetto al gruppo di controllo (GH) e a quello vissuto in gruppo sottoposto a FR (FR GH).

Per l'attività orizzontale l'ANOVA ha rivelato un effetto significativo dell'andamento temporale delle curve [$F(3,204) = 4.55$; $P = 0.0041$]; un effetto significativo del protocollo di isolamento sociale [$F(3,204) = 7.14$; $P = 0.0003$]; ed un effetto significativo legato all'interazione tra i fattori [$F(9, 204) = 3.34$; $P = 0.0008$]. Per l'attività verticale l'ANOVA ha rivelato un effetto significativo dell'andamento temporale delle curve [$F(3,204) = 4.05$; $P = 0.0080$]; un effetto

significativo del protocollo di isolamento sociale [$F(3,204)= 14.18$; $P <0.0001$]; ed un effetto significativo legato all'interazione tra i fattori [$F(9, 204)= 6.56$; $P <0.0001$]. Per la distanza totale percorsa l'ANOVA ha rivelato un effetto non significativo dell'andamento temporale delle curve [$F(3,204)= 1.26$; $P = 0.2900$]; un effetto significativo del protocollo di isolamento sociale [$F(3,204)= 5.49$; $P = 0.0019$]; ed un effetto significativo legato all'interazione tra i fattori [$F(9, 204)= 3.11$; $P = 0.0016$]. Per il tempo trascorso in movimento l'ANOVA ha rivelato un effetto non significativo dell'andamento temporale delle curve [$F(3,204)= 1.86$; $P = 0.1371$]; un effetto significativo del protocollo di isolamento sociale [$F(3,204)= 6.94$; $P = 0.0004$]; ed un effetto non significativo legato all'interazione tra i fattori [$F(9, 204)= 1.38$; $P = 0.2002$].

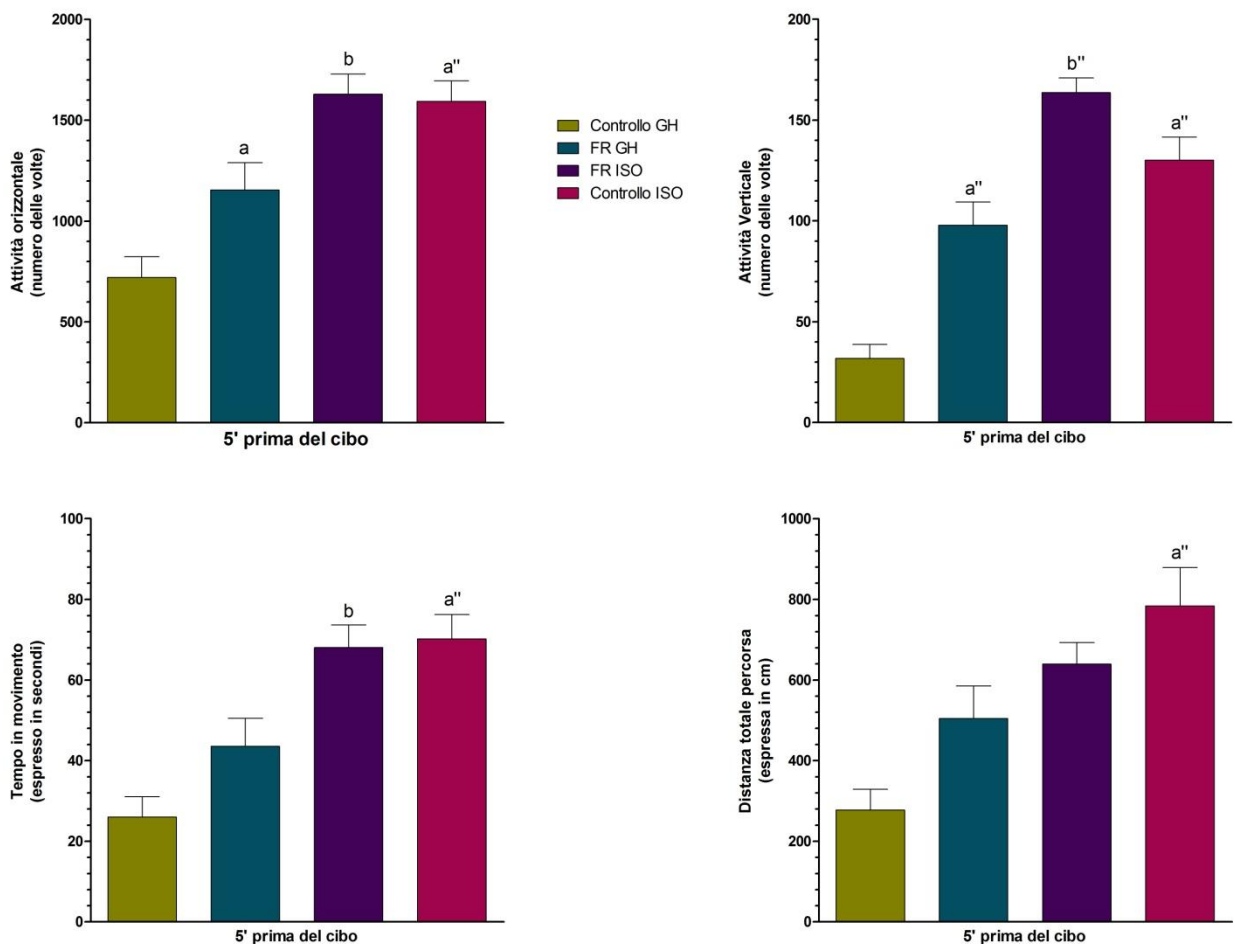


Figura 15 Effetto dell'attività esplorativa spontanea in ratti FR, animali nutriti ad libitum e sottoposti ad isolamento sociale. L'attività esplorativa è stata valutata con il motility meter dopo 4 settimane di Isolamento sociale e 3 settimane di FR. I parametri misurati sono stati: l'attività orizzontale, l'attività verticale, la distanza totale percorsa e il tempo trascorso in movimento. I valori indicano la media \pm SEM delle registrazioni di 30 minuti effettuate 5 minuti prima di ricevere il cibo. $aP < 0.05$; $a''P < 0.001$ vs Controlli GH; $bP < 0.05$ vs FR GH.

Negli animali isolati, il protocollo di restrizione alimentare non è in grado di indurre ulteriori aumenti nell'attività motoria come si osserva invece negli animali GH.

Per l'attività orizzontale l'ANOVA ha rivelato un effetto significativo relativo all'applicazione del protocollo di restrizione alimentare [$F(1, 188)= 4.47$; $P<0.05$]; un effetto significativo del protocollo di isolamento sociale [$F(1,188)= 36.91$; $P<0.0001$]; ed un effetto non significativo legato all'interazione tra i fattori [$F(1, 188)= 3.20$; $P = 0.0751$]. Per l'attività verticale l'ANOVA ha rivelato un effetto significativo relativo all'applicazione del protocollo di restrizione alimentare [$F(1,188)= 27.13$; $P<0.0001$]; un effetto significativo del protocollo di isolamento sociale [$F(1,188)= 73.78$; $P<0.0001$]; ed un effetto non significativo legato all'interazione tra i fattori [$F(1,188)= 2.90$; $P = 0.0903$]. Per il tempo trascorso in movimento l'ANOVA ha rivelato un effetto non significativo relativo all'applicazione del protocollo di restrizione alimentare [$F(1,188)= 1.67$; $P = 0.1972$]; un effetto significativo del protocollo di isolamento sociale [$F(1,188)= 33.25$; $P<0.0001$]; ed un effetto non significativo legato all'interazione tra i fattori [$F(1,188)= 2.75$; $P = 0.0989$]. Per la distanza totale percorsa l'ANOVA ha rivelato un effetto non significativo relativo all'applicazione del protocollo di restrizione alimentare [$F(2,369)= 14,35$; $P<0.0001$]; un effetto significativo del protocollo di isolamento sociale [$F(2, 369)= 23,25$; $P<0.0001$]; ed un effetto non significativo legato all'interazione tra i fattori [$F(4,369)= 1,567$; $P =0,1824$].

Poiché alcuni dei parametri modificati dall'isolamento sociale possono essere ripristinati esponendo gli animali ad una condizione sociale, ho voluto valutare se le modificazioni osservate nell'effetto dell'allenamento al cibo negli animali isolati potessero essere prevenute da un ambiente socialmente arricchito, ed ho pertanto reinserito in gruppo per altre 4 settimane, gli animali precedentemente isolati .

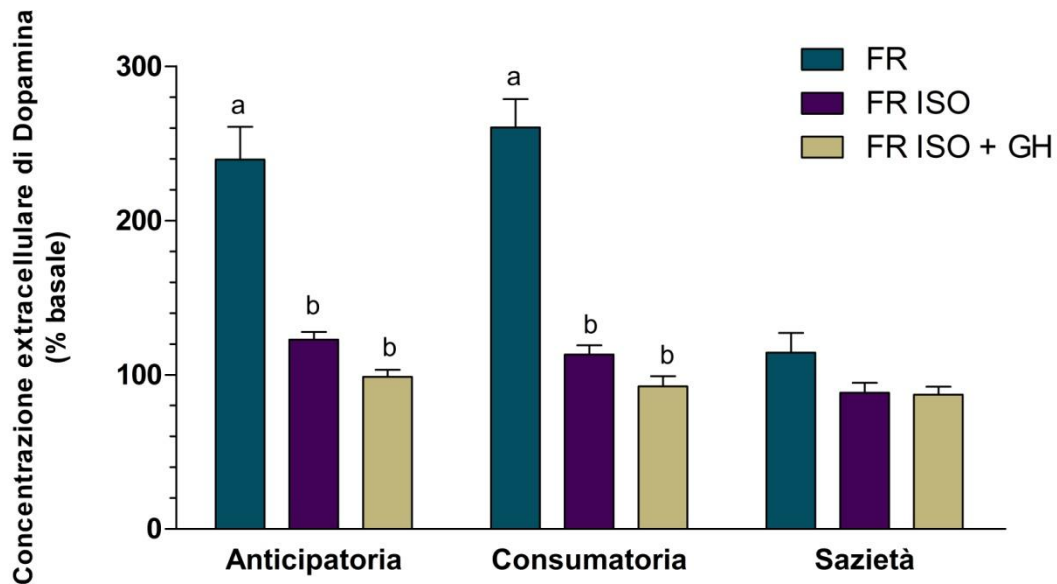


Figura 16 Effetto dell'isolamento sociale sull'aumento delle concentrazioni extracellulari di DA, indotto dall'anticipazione e dalla presentazione del cibo, nella mPFC di ratti allenati ad un regime di restrizione alimentare. Il gruppo FR ha avuto il cibo per 2 ore ogni giorno, dalle 11 alle 13. I gruppi ISO sono stati isolati allo svezzamento. Per valutare gli effetti dell'ambiente socialmente arricchito, un gruppo di ratti ISO è stato stabulato in gruppo dopo le 4 settimane di isolamento per altre 4 settimane (ISO+GH). I dati rappresentano la media \pm SEM e sono espressi come percentuale dei valori basali.

^aP < 0.05 vs valori basali; ^bP < 0.01 vs animali GH.

I miei risultati mostrano che in questi animali persiste l'insensibilità dei neuroni dopaminergici mesocorticali all'effetto sia dell'anticipazione che della consumazione di cibo, suggerendo che l'isolamento sociale induca effetti a lungo termine su questo parametro. È, infatti, marcata la differenza significativa tra gli animali ISO e quelli vissuti in gruppo, ma non è possibile apprezzare differenze significative tra i ratti socialmente isolati e quelli che hanno subito il reinserimento in un ambiente socialmente arricchito.

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo nel tempo [F(2,369)= 14,35; P<0.0001]; un effetto significativo del protocollo di isolamento [F(2, 369)= 23,25; P<0.0001]; ed un effetto non significativo legato all'interazione tra i fattori [F(4,369)= 1,567; P =0,1824].

In questa parte del mio studio ho voluto valutare se uno stimolo, piacevole o farmacologico, fosse in grado di ripristinare la risposta dopaminergica mesocorticale all'anticipazione e al consumo del cibo negli animali isolati. Per fare ciò ho somministrato agli animali, un'ora prima della presentazione del cibo standard, un pellet di cioccolato.

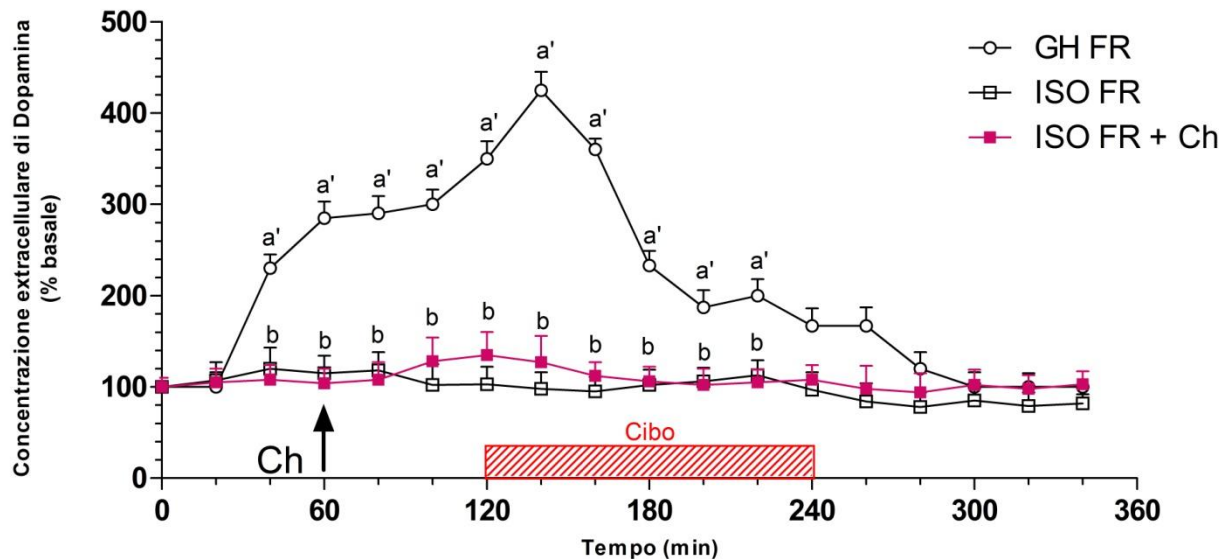


Figura 17 Effetto dell'anticipazione e della presentazione del cibo sulle concentrazioni extracellulari di DA, in ratti isolati allenati ad un regime di restrizione di cibo. Il cibo è stato reso accessibile agli animali isolati, dalle 11:00 alle 13:00, ogni giorno per circa 3 settimane. Un gruppo di animali ha ricevuto una somministrazione cronica di cioccolato (1.4 g, una volta al giorno, per 2 settimane) un'ora prima della presentazione del cibo (ore 10:00). I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. a' $P < 0.01$ vs valori basali; b $P < 0.05$ vs FR.

La somministrazione cronica di cioccolato (1.4 gr al giorno), un'ora prima della presentazione giornaliera del cibo, non modifica in maniera significativa la risposta al cibo standard dei neuroni dopaminergici mesocorticali nei ratti isolati. La concentrazione extracellulare di DA nella PFC, infatti, non varia tra il gruppo degli animali isolati e il gruppo degli animali isolati che hanno ricevuto il cioccolato.

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo nel tempo [$F(17,170)=2,03$; $P < 0.05$]; un effetto non significativo del trattamento [$F(1,170)=0,04$; $P = 0,8456$]; ed un effetto non significativo dell'interazione tra i fattori [$F(17,170)=1,10$; $P = 0,3528$].

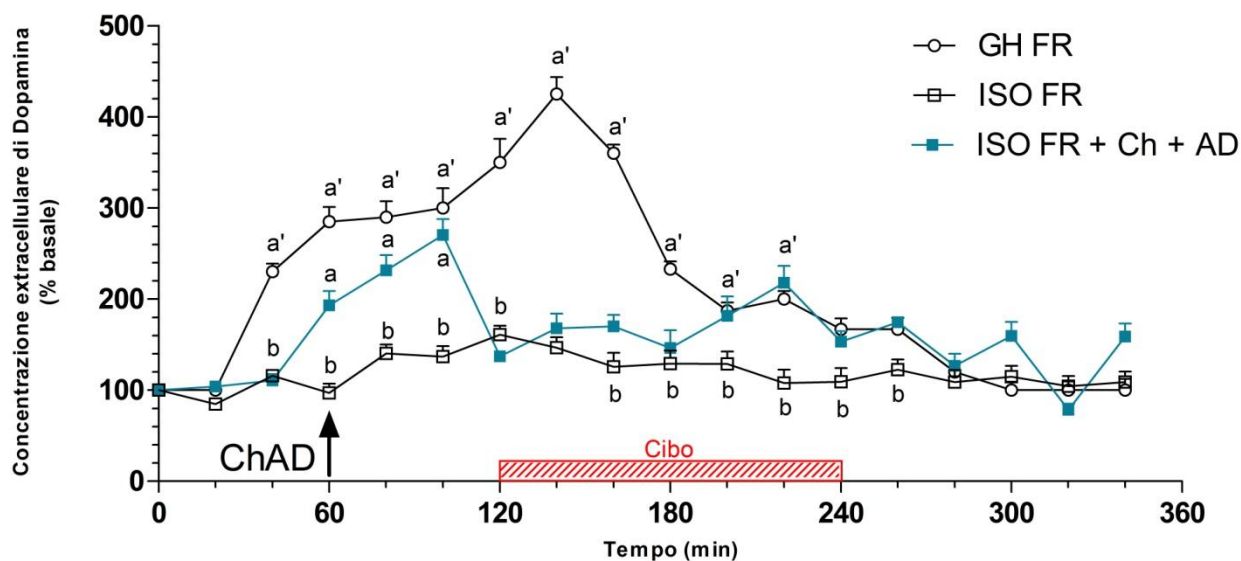


Figura 18 Effetto della somministrazione cronica di imipramina sulle variazioni delle concentrazioni extracellulari di DA in ratti FR isolati. Il cibo è stato reso accessibile agli animali stabulati in gruppo, isolati e isolati e trattati con imipramina dalle 11:00 alle 13:00, ogni giorno per circa 3 settimane. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. $aP < 0.05$; $a'P < 0.01$ vs valori basali; $bP < 0.05$ vs GHFR.

Dato che lo stimolo piacevole da solo non era in grado di ripristinare la risposta al cibo, ho voluto valutare l'effetto di un trattamento cronico con antidepressivi. È stato infatti dimostrato in precedenza (Dazzi et al, 2001) che la somministrazione cronica di imipramina è in grado di antagonizzare la risposta dei neuroni dopaminergici allo stress acuto. Per evitare la manipolazione degli animali isolati, che è stato dimostrato essere in grado di invertire molti degli effetti dell'isolamento (Sciolino et al, 2010), ho somministrato il farmaco attraverso il pellet di cioccolato.

La somministrazione cronica d'imipramina disciolta in un pellet di cioccolato (20 mg/Kg di imipramina in 1.4 g di cioccolato una volta al giorno, per 2 settimane) ripristina parzialmente (+170%) la risposta dei neuroni dopaminergici mesocorticali all'anticipazione del cibo. L'aumento è massimo 40 min dopo la somministrazione del pellet contenente il farmaco e torna ai valori basali dopo 60 min. Il trattamento cronico con imipramina non è però in grado di ripristinare l'aumento osservato nei ratti GH durante la fase consumatoria.

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo nel tempo [$F(17,270) = 39.74$; $P < 0.0001$]; un effetto significativo del trattamento [$F(2,270) = 197.99$; $P < 0.0001$]; ed un effetto significativo dell'interazione tra i fattori [$F(34,270) = 14.15$; $P < 0.0001$].

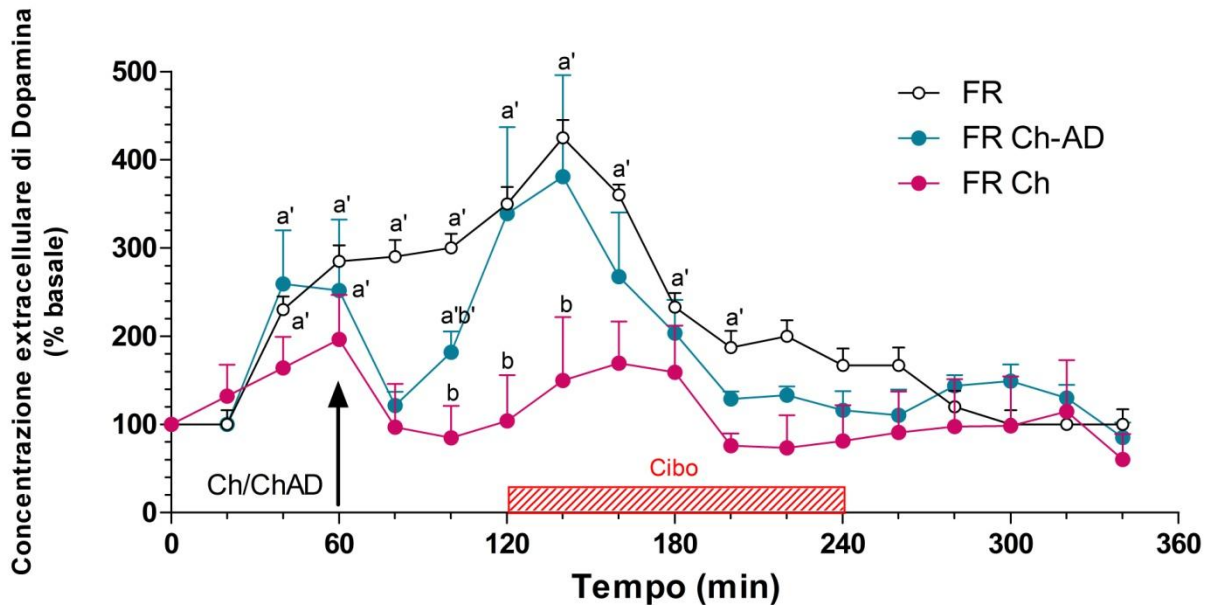


Figura 19 Effetto della somministrazione di cioccolato e di imipramina sull'aumento delle concentrazioni extracellulari di DA, indotto dall'anticipazione e dalla presentazione del cibo, nella PFC di ratti stabulati in gruppo ed allenati ad un regime di FR. Gli animali FR hanno ricevuto il cibo dalle 11:00 alle 13:00 ogni giorno per 3 settimane prima dell'inizio degli esperimenti. Un gruppo di animali ha ricevuto una somministrazione cronica di cioccolato (1,4 g) contenente 20 mg/Kg di imipramina, un altro gruppo ha ricevuto solo 1,4 g di cioccolato; entrambi i gruppi una volta al giorno, un'ora prima della presentazione del cibo (ore 10:00), per 2 settimane prima dell'inizio degli esperimenti. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. a' $P < 0.01$ vs valori basali; b $P < 0.05$; b' $P < 0.01$ vs FR.

Anche negli animali stabulati in gruppo l'assunzione di cioccolato o d'imipramina, induce modificazioni significative nella concentrazione corticale di DA in risposta al cibo. In particolare, nel gruppo che assume, un'ora prima del cibo, il pellet di cioccolato, si osserva un andamento bifasico con un primo aumento di circa il 100% della concentrazione extracellulare di DA, prima e durante la consumazione del cibo appetibile; questo aumento torna ai valori basali nel campione immediatamente successivo alla presentazione del cioccolato. Il secondo aumento (+70% rispetto ai valori basali) si osserva durante la consumazione del cibo standard, dura per circa 40 min e torna ai valori basali nella seconda ora, durante la quale il cibo è a disposizione degli animali. Anche la somministrazione cronica di cioccolato (1,4 g) contenente 20 mg/Kg di imipramina, un'ora prima della presentazione giornaliera del cibo induce due distinte risposte: la prima relativa all'esposizione al cioccolato (fase anticipatoria, +150%), la seconda durante la consumazione del cibo standard (fase consumatoria, +250%) con aumenti superiori a quelli osservati con la somministrazione del solo cioccolato.

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo nel tempo [$F(17,162)=37,95$; $P < 0.0001$]; un effetto significativo del trattamento [$F(2,162)=102,79$; $P < 0.0001$]; ed un effetto significativo dell'interazione tra i fattori [$F(34,162)=12,55$; $P < 0.0001$].

Durante l'esperienza presso la *University of California Los Angeles (UCLA)*, all'interno di una collaborazione tra il nostro laboratorio e quello del professor J.D. Jentsch, ho potuto studiare le differenze presenti tra 4 diversi ceppi di topi sulla sensibilità di questi animali nella risposta condizionata. Poiché questi ceppi geneticamente differenti hanno mostrato una differente sensibilità all'*addiction*, ho voluto valutare se fosse possibile rilevare un parallelo aumento della sensibilità al *food intake*.

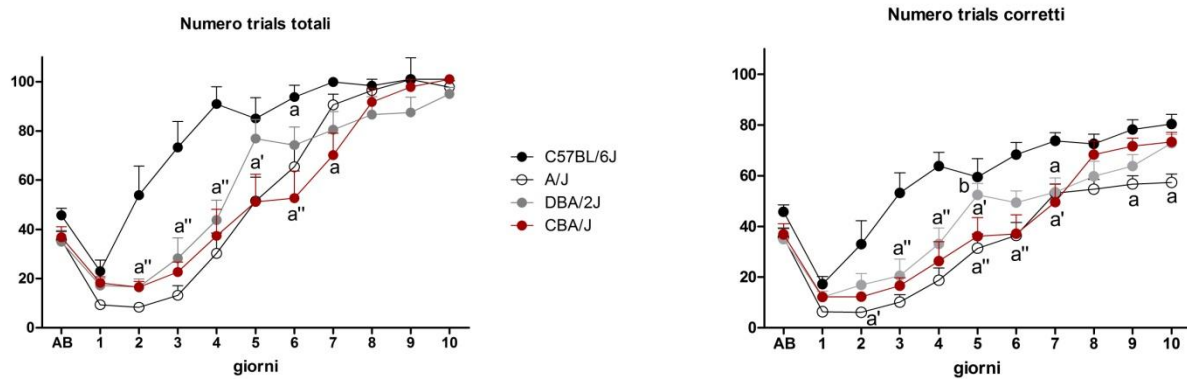


Figura 20 Differenze nella risposta condizionata di topi di diversi ceppi a ricompensa alimentare.

Il primo punto della curva si riferisce al giorno di ambientazione (AB) alla gabbia del test, seguono dieci osservazioni quotidiane, della durata di massimo 1 h o 100 *trials*. I dati sono espressi come percentuale media dei valori basali \pm SEM. $aP<0.05$; $a' P<0.01$; $a'' P<0.001$ vs C57BL/J; $b P<0.05$ vs A/J.

I grafici mostrano il confronto sul numero totale di *trials* portati a termine e sul numero totale di *trials* corretti (con ricompensa di cibo). È interessante notare che il giorno dell'ambientazione nei 4 gruppi non si apprezzano differenze significative, che invece compaiono a partire dal secondo giorno di test. Il ceppo C57BL/J raggiunge prima degli altri ceppi la soglia massima di *trials* consentita per giorno e mostra il maggior numero di risposte corrette (ottiene \pm 80 pellet per sessione su 100 disponibili).

L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo nel tempo [$F(10, 440)= 141.05$; $P<0.0001$]; un effetto significativo sulle differenze tra ceppi diversi [$F(3, 440)= 7.82$; $P= 0.0003$]; ed un effetto estremamente significativo dell'interazione tra i fattori [$F(30, 440)= 4.97$; $P<0.0001$]. L'ANOVA ha rivelato un effetto significativo nel tempo [$F(10, 440)= 99.17$; $P<0.0001$]; un effetto significativo sulle differenze tra ceppi diversi [$F(3, 440)= 12.91$; $P<0.0001$]; ed un effetto estremamente significativo dell'interazione tra i fattori [$F(30, 440)= 2.62$; $P<0.0001$].

Discussione

Durante il periodo del mio dottorato, ho utilizzato un protocollo di restrizione alimentare come modello sperimentale per studiare le variazioni nella risposta dei neuroni dopaminergici mesocorticali alla presentazione del cibo.

Infatti, numerose evidenze scientifiche che associano i disordini alimentari alle malattie psichiatriche e all'aumento della sensibilità all'abuso di sostanze, sia negli umani che nei ratti (Ross 1999), suggeriscono un coinvolgimento sia dei neuroni dopaminergici che di altri sistemi neuro modulatori nella fisiopatologia di questi disturbi. I miei dati mostrano che, nei ratti allenati a consumare il loro pasto quotidiano per sole due ore al giorno, dalle 11:00 alle 13:00, le concentrazioni extracellulari di DA in mPFC aumentano già 80 minuti prima della presentazione del cibo, continuano a salire raggiungendo livelli massimi 20 minuti prima della consumazione, per ritornare gradualmente ai livelli basali dopo la rimozione del cibo. Questi aumenti sono coerenti con precedenti evidenze che suggeriscono che i neuroni dopaminergici nella mPFC sono altamente sensibili allo stato emotivo associato alla previsione di una ricompensa (Schultz, 2001). In accordo con un ruolo importante della DA nel mediare l'anticipazione della ricompensa, nei ratti che si nutrono *ad libitum*, cioè che hanno avuto a disposizione cibo per tutte le ore della giornata, nei quali non è presente alcuna emozione anticipatoria, non è stata osservata alcuna modificazione significativa nelle concentrazioni basali di DA.

Poiché il sistema endocannabinoide riveste un ruolo importante nel controllo del comportamento alimentare, ho voluto valutare se il blocco o la stimolazione del recettore per i cannabinoidi CB1, rispettivamente con l'antagonista SR141716 e l'agonista WIN 55,212-2 potesse modificare la risposta dopaminergica indotta dalla presentazione del cibo nei ratti FR. La somministrazione acuta di WIN55,212-2 non ha modificato l'aumento di DA indotto dall'anticipazione del consumo di cibo, mentre il blocco del recettore CB1 con l'SR141716A è in grado di antagonizzare questo effetto sia nella fase anticipatoria che in quella consumatoria. I miei risultati mostrano inoltre che in seguito a somministrazione cronica di questo farmaco, per il quale è noto si instauri tolleranza ad alcuni effetti (Rubino et al, 2000), la capacità di antagonizzare l'aumento della concentrazione extracellulare di DA nella mPFC, osservato nei ratti FR, permane.

Nei ratti non sottoposti a restrizione alimentare le stesse dosi di SR141617 e WIN 55,212-2 non hanno indotto nessun effetto significativo sulle concentrazioni di DA. L'osservazione che la somministrazione acuta di WIN55,212-2 sia inefficace nel modificare in mPFC la risposta dei neuroni dopaminergici alla restrizione alimentare, è in accordo con risultati ottenuti nel nostro laboratorio che mostrano che l'espressione e la funzione dei recettori CB1 sono *down-regolati* nella mPFC di ratti FR (Dazzi et al, 2014) durante la fase anticipatoria e suggerisce che l'inibizione dell'attività dei recettori CB1 indotta dal protocollo di restrizione potrebbe essere significativamente correlata con l'aumento di DA osservato. Infatti, è stato suggerito che il sistema endocannabinoide possa modulare il rilascio di DA in PFC indirettamente attraverso l'attivazione dei recettori CB1 localizzati nelle terminazioni GABAergiche a livello presinaptico, i quali inibirebbero il rilascio del GABA che si tradurrebbe in una disinibizione delle terminazioni glutamatergiche che proiettano alla VTA. Un incremento del rilascio di glutammato in VTA può quindi stimolare i neuroni dopaminergici che proiettano dalla VTA alla PFC e aumentare così il rilascio di DA in questa regione (Egerton et al, 2006).

La *down-regulation* dei recettori CB1 è stata confermata dall'*immunoblot* e dall'immunoistochimica, che rivelano una significativa diminuzione della localizzazione dei recettori CB1 nella mPFC dei ratti FR durante la fase anticipatoria (Dazzi et al, 2014). Questi risultati sono coerenti con precedenti studi che mostrano una diminuzione dei livelli di mRNA del recettore CB1 nella corteccia cingolata come risultato della restrizione alimentare (Timofeeva E, 2009; Bello et al, 2012). Presi tutti assieme, questi dati suggeriscono che l'espressione e la funzionalità dei recettori CB1 sono alterate durante entrambe le fasi nei ratti FR, e supportano ulteriormente l'ipotesi che modificazioni del comportamento alimentare e del peso corporeo possono alterare la normale funzione di questi sistemi neuromodulatori (McLaughlin et al, 2003; Abood 2005; DiPatrizio e Simansky, 2008; Monteleone et al, 2012).

Il sistema endocannabinoide potrebbe funzionare come segnale per il rimodellamento sinaptico della mPFC a livello delle terminazioni GABAergiche collegate alla risposta eccessiva dei neuroni dopaminergici osservata negli animali sottoposti a restrizione alimentare durante le fasi di anticipazione e di consumo di cibo. La marcata risposta dopaminergica nella mPFC di ratti FR, associata all'anticipazione e la presentazione di cibo, sarebbe legata alla rimodulazione dei meccanismi presinaptici che contribuiscono alla regolamentazione del rilascio di GABA in questa regione del cervello, suggerendo che questi cambiamenti potrebbero essere attivati da una diminuzione della densità e della funzione dei recettori CB1 in risposta ad un rilascio maggiore di endocannabinoidi dopo l'anticipazione e il consumo di cibo (Kirkham et al, 2002), che,

modificando l'equilibrio tra i recettori espressi sulle terminazioni GABAergiche, inciderebbe sul rilascio di DA.

Nel complesso, i miei dati sono in linea con quelli di studi precedenti e sottolineano il ruolo del sistema endocannabinoide nel controllo di sistemi neurotrasmettitoriali, come quello dopaminergico, dove contribuiscono direttamente ai meccanismi di incentivazione e di ricompensa nei roditori e probabilmente anche negli esseri umani (Bello et al, 2012; Timofeeva et al, 2009).

I miei dati dimostrano che, al contrario di quanto osservato in mPFC, le concentrazioni extracellulari di DA nella *shell* del NAc mostrano solo un piccolo e transitorio aumento nel campione che segue la presentazione del cibo. Questi risultati sono in accordo con dati precedenti (Di Chiara et al, 2002) che mostrano che, nella *shell* del NAc la risposta dopaminergica alla presentazione di un cibo, anche palatabile, scompare quando il cibo diventa noto, mentre in mPFC questa permane anche in seguito a ripetute esposizioni.

Per valutare se anche il sistema dopaminergico mesolimbico fosse sotto il controllo modulatore del sistema endocannabinoide, ho voluto valutare se la somministrazione dell'agonista per i recettori CB1 WIN 55,212-2 potesse modificare la risposta al cibo dei neuroni dopaminergici nella *shell* del NAc. La somministrazione acuta di WIN 55,212-2 induce un significativo aumento delle concentrazioni extracellulari di DA in quest'area, sia durante la fase anticipatoria, che in quella consumatoria. Questo effetto è completamente antagonizzato dalla somministrazione contemporanea di SR141617, confermando il coinvolgimento dei recettori CB1 nella regolazione dopaminergica associata ad uno stimolo alimentare. La capacità dell'SR141617 di antagonizzare l'effetto della somministrazione combinata di WIN55,212-2 è in accordo con le evidenze che dimostrano che l'SR141617 possiede un'affinità più alta per il sito di legame del recettore CB1 (Hirst et al, 1996). Questo dato suggerisce che probabilmente a livello della *shell* del NAc il sistema non lavora al suo massimo potenziale e quindi la somministrazione di WIN 55,212-2 è in grado di modulare positivamente il rilascio dopaminergico.

I miei dati sono in accordo con recenti risultati del gruppo di Di Chiara (De Luca et al, 2011) i quali hanno recentemente evidenziato come la somministrazione di THC sia in grado di indurre un aumento delle concentrazioni extracellulari di DA nella *shell* del NAc anche in seguito a somministrazione di un cibo già noto. Gli stimoli naturali, specialmente quando nuovi e non familiari, sono, infatti, capaci di aumentare la DA nello *shell* del NAc, ma quest'effetto subisce

una lenta abitudine già dopo una singola esposizione (Bassareo, 2002). Il THC aumenta, inoltre, la percezione gradevole dei cibi e il *reward* dei cibi dolci, suggerendo che la componente gustativa del cibo sia importante per gli effetti del THC nel comportamento di rinforzo dato dal cibo (Solinas and Goldberg, 2005). Mahler et al, (2007) hanno mostrato che iniezioni di anandamide aumentano le reazioni edoniche al saccarosio.

La mia osservazione che sia la somministrazione acuta che quella cronica dell'antagonista per i CB1 SR141716 attenuino marcatamente l'aumento di DA nella mPFC sia durante la fase anticipatoria che in quella consumatoria della restrizione alimentare, e che la somministrazione acuta di WIN 55,212-2 aumenti la DA nel NAc in risposta alla presentazione del cibo, effetto che viene completamente antagonizzato dal blocco dei recettori CB1 con SR141716, confermano un ruolo importante del sistema endocannabinoide nella regolazione dell'attività dei neuroni dopaminergici in seguito ad applicazione del protocollo di restrizione alimentare.

Dato il ruolo cruciale della DA nella mPFC nella modulazione della risposta allo stress, per valutare se l'esposizione a uno stress cronico possa modificare la sensibilità di questi neuroni nella fase anticipatoria e consumatoria di cibo, ho voluto analizzare l'effetto dell'isolamento sociale come modello di stress cronico, sulle variazioni dopaminergiche in ratti sottoposti ad un regime di restrizione alimentare, comparando i dati con quelli precedenti. Sorprendentemente, nei ratti isolati l'allenamento al cibo non induce il marcato aumento della concentrazione extracellulare di DA nella PFC, né nella fase anticipatoria né in quella consumatoria, che si osserva invece nei ratti stabulati in gruppo. Dato il ruolo cruciale che i neuroni dopaminergici mesocorticali rivestono nella mediazione della risposta agli stimoli esterni, la mancata risposta di questi neuroni alla presentazione e al consumo del cibo, suggerisce che negli animali isolati, ci sia un ridotto controllo sulle funzioni esecutive, che potrebbe essere tradotto con una maggiore impulsività. Numerosi sono gli studi di *brain imaging* che riflettono la correlazione tra la diminuzione di massa grigia nelle zone frontali e l'insorgenza di *deficit* cognitivi ed esecutivi. Il ruolo della DA nel controllo inibitorio è ben riconosciuto e un'alterazione nella sua funzione potrebbe contribuire a disturbi comportamentali, come i disturbi alimentari. Inoltre alcuni studi sottolineano la correlazione tra la ridotta espressione dei recettori D2 nello striato in caso di soggetti obesi, che si tradurrebbe in ridotta attività della PFC (Volkow et al, 2008).

Negli animali isolati, contrariamente a quelli stabulati in gruppo, l'anticipazione del cibo induce un aumento significativo delle concentrazioni extracellulari di DA nella *shell* del NAc; l'aumento persiste per 20 min dopo la presentazione del cibo per tornare poi ai valori basali.

I miei dati suggeriscono che lo stress alteri sia la percezione del piacere legata all'euforia che porta al desiderio del cibo, che quella legata alla consumazione del cibo; sono inoltre in accordo con l'osservazione che lo stress è in grado di scatenare o esacerbare i sintomi di patologie legate all'assunzione di cibo. La DA svolge un ruolo importante in questi processi e nei circuiti che regolano il *reward*. Alcuni studiosi, come Berridge (2007), sostengono che la DA del circuito mesocorticolimbico favorisca la motivazione ad intraprendere comportamenti gratificanti, che egli chiama il “volere”, più che il “piacere” del *reward*.

La risposta dello *shell* nel NAc ai cibi appetibili è in grado di stimolare un *reward* diverso da quello promosso dalle sostanze d'abuso, che aumentano altresì la DA nello *shell*, ma non subiscono abitudine (De Luca, 2011). Il cibo quindi potrebbe essere assimilabile, negli *eating disorders*, a una droga e agire sui circuiti cerebrali che regolano queste componenti della gratificazione. Le aree della PFC sono attivate nei soggetti tossicodipendenti durante l'intossicazione e l'esposizione ai segnali associati alla sostanza stessa, ma sono disattivate durante l'assenza (Goldstein e Volkow, 2002). Allo stesso modo, nei ratti, l'inibizione della mPFC blocca il ripristino della ricerca della droga (McFarland e Kalivas 2001; McLaughlin e See, 2003; McFarland et al, 2004), e l'inibizione alla ricerca a sua volta richiama l'attivazione della corteccia infralimbica (Peters et al, 2008). Con l'uso ripetuto di droghe, la ricerca è spesso innescata dall'associazione di altri stimoli appresi, in cui la DA gioca un ruolo fondamentale nella valutazione di questi stimoli come stimoli rilevanti (Cornish e Kalivas 2001; Hyman 2005; Jay 2003; Kelley 2004; McFarland e Kalivas, 2001; Rebec et al, 1997).

Gli studi clinici indicano che le anomalie strutturali, fisiologiche e funzionali all'interno della PFC facilitano un processo decisionale alterato e lo sviluppo di comportamenti dipendenti, come il desiderio e la ricerca (Ehrman et al, 1992; Foltin e Haney 2000; Franklin et al, 2002). Attraverso il sistema dopaminergico mesocorticolimbico le sostanze stupefacenti mediano le loro proprietà di rinforzo e hanno in comune la capacità di aumentare le concentrazioni di DA (Di Chiara e Imperato, 1988; Nestler, 2005).

Le funzionalità esecutive includono la capacità di controllare l'attenzione, la cognizione, le emozioni, cioè autoregolarsi (Cacioppo et al, 2000). L'isolamento sociale, negli uomini, viene sfruttato come atteggiamento attraverso il quale è possibile modulare il sistema della gratificazione per estendere la sua funzione protettiva di cognizione sociale ed emozionale (Cacioppo et al, 2009). Individui solitari sono stati trovati ad avere minori probabilità di

impegnarsi in un regolare esercizio fisico, o di ponderare una reazione emozionale nei confronti di un evento emotivo (Hawkley et al, 2009).

I ratti isolati sottoposti al protocollo di restrizione alimentare potrebbero quindi presentare un bilanciamento della neurotrasmissione corticolimbica alterata, simile a quella riscontrabile nei soggetti che abusano di sostanze, in cui la mancata risposta dopaminergica in PFC indica una maggiore impulsività, che ha come conseguenza un mancato controllo del comportamento inibitorio. Numerosi altri studi associano i disturbi alimentari con *deficit* delle funzioni esecutive cognitive, dell'attenzione e della memoria. Per esempio, la capacità di inibire gli impulsi verso il cibo che diventa oggetto di desiderio varia da individuo a individuo e potrebbe essere uno dei fattori che contribuisce alla loro vulnerabilità al cibo (Wang et al, 2009).

Esistono evidenze che legano una ridotta attività dopaminergica in PFC con l'obesità ed una iperattività di quest'area con l'anoressia, che coinciderebbe con un eccesso di controllo del comportamento alimentare (Alonso-Alonso e Pasqual-Leone, 2007). Queste modifiche anatomiche, fisiologiche e comportamentali si riflettono nel modello animale dell'isolamento sociale. Infatti, cervelli provenienti da animali isolati mostrano una riduzione nella densità delle spine dendritiche nella PFC e nell'ippocampo (Silva-Gomez et al, 2003), ed un ridotto volume cerebrale nella PFC (Schubert et al, 2009). La mPFC è coinvolta nel mediare il rapporto tra esperienza emotiva personale e il contesto ambientale (Phan et al, 2004); durante il processo decisionale, una maggiore attivazione della mPFC rappresenta la volontà di massimizzare il rinforzo relativo alla ricompensa (Rogers et al, 2004). Esperienze come l'isolamento sociale, in particolare durante le prime fasi della vita, aumentano il rischio per un individuo di sviluppare tossicodipendenza e disturbi psichiatrici (Lu et al, 2003b; Meyer-Lindenberg e Tost, 2012; Sinha, 2008). Gli animali isolati mostrano aumenti nella quantità di cibo ingerita, nell'auto-somministrazione di droghe, associate ad un aumento di rilascio di DA nel NAc dopo l'assunzione e la somministrazione (Brenes e Fornaguera, 2008; Fabricius et al, 2011; Howes et al, 2000; Smith et al, 1997). Animali socialmente isolati mostrano un aumento nell'apprendimento dell'associazione di stimoli che conducono alla somministrazione di droga. Inoltre, una volta acquisita, la memoria associata al farmaco è più resistente in animali isolati. Nel lavoro di Whitaker 2013 viene suggerito che i cambiamenti di segnalazione e di plasticità sinaptica indotti dall'isolamento sociale potrebbero rappresentare un potenziale meccanismo attraverso il quale la vulnerabilità alla dipendenza viene regolata in questo modello animale.

Evidenze in letteratura dimostrano che è possibile annullare alcuni degli effetti indotti dall'isolamento sociale esponendo gli animali ad una nuova condizione sociale. I miei risultati mostrano che reinserendo in gruppo gli animali isolati per altre 4 settimane, persiste l'insensibilità dei neuroni dopaminergici mesocorticali all'effetto sia dell'anticipazione che della consumazione di cibo, suggerendo che l'isolamento sociale induce effetti a lungo termine su questo parametro.

Fattori di stress sociale e psicologico sono parte della vita quotidiana e sono sempre più riconosciuti come fattori negativi sulla salute metabolica e la sfera emozionale. Lo stress può svolgere un ruolo determinante nelle scelte alimentari (-Alonso and Pascual-Leone, 2007). Diversi studi hanno dimostrato che l'esposizione allo stress influenzi l'assunzione di cibo (Greeno et al, 1994; Wallis et al, 2004; 2009). Nel ratto in generale l'esposizione ad uno stress incide sull'ingestione di cibo e sul peso dell'animale (Bhatnagar et al, 2006). In accordo, studi su ratti isolati mostrano una diminuzione delle risposte appetitive (Von Frijtag et al, 2000). Ratti che sono stati esposti a una serie di eventi stressanti mostrano una ridotta sensibilità agli stimoli positivi, correlata ad una diminuzione di una serie di comportamenti consumatori. Per esempio, si osserva un diminuito consumo di una soluzione di saccarosio dopo esposizione ad uno stress lieve (Papp et al, 1991; Monleon et al., 1995) o la perdita di status sociale (Willner et al, 1995). Questi cambiamenti comportamentali sono ripristinati dal trattamento cronico con antidepressivi (Monleon et al, 1995; Moreau et al, 1992; Willner et al, 1995).

Alla luce di queste evidenze, nel mio studio ho voluto utilizzare un cibo altamente gradevole, come il cioccolato, sia come stimolo positivo, sia come veicolo di somministrazione del farmaco antidepressivo imipramina, per tentare di ripristinare la risposta del sistema dopaminergico mesocorticale al cibo indotta dall'isolamento sociale sul sistema dopaminergico. È, infatti, noto che il consumo di un cibo palatabile, in ratti alimentati con cibo standard, induce un aumento immediato della DA extracellulare nello *shell* (Wilson et al, 1995; Bassareo and Di Chiara, 1997; Gambarana et al, 2003; Sahr et al, 2008), nel *core* del NAc e nella PFC (Bassareo and Di Chiara 1997, 1999a, 1999b; Gambarana et al, 2003).

La somministrazione cronica di un cibo altamente piacevole, come il cioccolato, può interagire con diversi sistemi neurotrasmettitoriali (tra cui DA, serotonina e endorfine), che contribuiscono all'appetito, alla ricompensa e alla regolazione dell'umore. La somministrazione cronica di cioccolato, un'ora prima della presentazione giornaliera del cibo, non modifica in maniera significativa la risposta al cibo standard dei neuroni dopaminergici mesocorticali nei ratti isolati.

È stato dimostrato in precedenza (Dazzi et al, 2001) che la somministrazione cronica di imipramina è in grado di antagonizzare la risposta dei neuroni dopaminergici allo stress acuto. Nei miei esperimenti ho somministrato l'imipramina disciolta in un pellet di cioccolato per evitare la manipolazione degli animali legata alle procedure d'iniezione del farmaco. È stato infatti dimostrato che la manipolazione può antagonizzare molte delle modificazioni indotte dall'isolamento sociale (Sciolino et al, 2010; Pritchard et al, 2013). I miei dati dimostrano che la somministrazione cronica d'imipramina disciolta in un pellet di cioccolato è in grado di ripristinare solo parzialmente la risposta dei neuroni dopaminergici mesocorticali all'anticipazione del cibo.

Negli animali stabulati in gruppo l'assunzione di cioccolato o d'imipramina, induce modificazioni significative nella concentrazione corticale di DA in risposta al cibo. In particolare, nel gruppo che assume, un'ora prima del cibo, il pellet di cioccolato, si osserva un andamento bifasico, prima e durante la consumazione del cibo appetibile e durante la consumazione del cibo standard.

In questo gruppo sperimentale le concentrazioni di DA aumentano in prossimità dell'esposizione al cibo altamente appetibile, spostando quindi la curva che descrive l'andamento delle concentrazioni di DA in prossimità dello stimolo positivo più forte. Anche la somministrazione cronica d'imipramina induce due distinte risposte che mostrano un'intensità simile a quella degli animali di controllo: la prima relativa all'esposizione al cioccolato, la seconda durante la consumazione del cibo standard. Nella fase anticipatoria, il piacere, mediato dalla DA, è dettato da uno stato di euforia ed eccitazione che porta alla ricerca del desiderio e da stimoli distali percepiti attraverso olfatto e vista. Macht and Dettmer (2006) hanno dimostrato nel loro studio che mangiare cioccolato induce nelle persone in buona salute dei cambiamenti emotivi positivi: aumenta l'attivazione, riduce l'affaticamento, suscita gioia. Vari studi hanno dimostrato che gli individui, in uno stato d'animo negativo o alterato, possono mangiare anche in assenza dello stimolo della fame, per ricavare conforto (Hepworth et al, 2010; Willner and Healy, 1994; Macht and Mueller, 2007). Gli stati affettivi sembrano essere strettamente collegati con il consumo di cioccolato. La fase di *craving*, vale a dire l'intenso desiderio di mangiare un determinato alimento, precede spesso l'assunzione di cioccolato (Hill and Heaten-Brown, 1994; Gibson and Desmond, 1999; Michener and Rozin, 1994; Willner et al, 1998). I miei risultati sono in linea con gli studi di Yamada et al, del 2009 che mostrano che la somministrazione a cronica di cacao determina un aumento delle concentrazioni di serotonina nell'amigdala, nello striato e del *turnover* della serotonina nell'ippocampo e nella PFC.

I miei risultati dimostrano che solo il trattamento farmacologico è in grado di ripristinare parzialmente la risposta dei neuroni dopaminergici mesocorticali all'anticipazione del cibo negli animali isolati. L'imipramina è in grado di aumentare le concentrazioni extracellulari di DA nella PFC (Dazzi et al, 2002) tramite il blocco del trasportatore di membrana per la noradrenalina, NET. Negli animali isolati, tuttavia, l'aumento osservato non sembra essere dovuto al blocco del *reuptake*. Infatti, nei ratti che ricevono cioccolato ed imipramina, l'aumento di DA è evidente già 20 min prima della presentazione del pellet di cioccolato, torna a valori basali 20 min dopo la somministrazione dello stesso per aumentare di nuovo raggiungendo il massimo 60 minuti dopo la somministrazione. Questo andamento suggerisce che l'aumento osservato sia dovuto ad un ripristino della sensibilità dei neuroni dopaminergici all'anticipazione del cibo più che al blocco del *reuptake* del neurotrasmettitore.

Nel complesso, i miei dati suggeriscono che lo stress cronico, rappresentato dall'isolamento sociale, sia in grado di alterare sia la percezione del piacere legata all'euforia che porta al desiderio del cibo, che quella legata alla consumazione del cibo.

In particolare, dato il ruolo importante che i neuroni dopaminergici mesocorticali rivestono nel comportamento perseverante (Arnsten, 2011), una riduzione nella risposta di questi neuroni all'attesa e alla presentazione del cibo potrebbe tradursi in un mancato controllo dell'individuo sulla quantità di cibo ingerita, indipendentemente dal piacere provato durante l'assunzione dello stesso.

Nello studio di Weed del 1997 si dimostra che la restrizione alimentare può aumentare lo stato di *arousal* in molte specie di mammiferi, per questo ho voluto verificare se nei nostri animali FR, l'anticipazione e il consumo di cibo fossero associati ad una alterata attività esplorativa spontanea. In accordo con le osservazioni precedenti (Weed et al, 1997), i miei dati indicano che i ratti FR testati 5 minuti prima del consumo alimentare mostrano un aumento dell'attività orizzontale e verticale, e percorrono una distanza maggiore, rispetto agli animali alimentati *ad libitum*. Inoltre, gli animali FR testati 2 ore dopo o 2 h prima del consumo di cibo, quando i livelli di DA sono simili a quelli osservati in animali alimentati *ad libitum*, hanno mostrato una attività esplorativa simile ai ratti di controllo.

I miei risultati dimostrano che la *down*-regolazione di recettori CB1 che si trovano nei ratti FR (Dazzi et al, 2014) nella fase anticipatoria, è associato ad un aumento dell'attività esplorativa durante questa fase; questi dati sono in linea con i dati recenti (Marongiu et al, 2012) che hanno dimostrato in topi *knockout* per i CB1 un aumento moderato dell'attività locomotoria, coerente

con l'attivazione del circuito neuronale mesocorticale. L'aumento della DA in PFC sembrerebbe coinvolto anche nello stato di *arousal*, che viene espresso dagli animali come aumento di motilità, indotto dalla presentazione e dalla consumazione del cibo nei ratti *food restricted*. La DA rilasciata in mPFC svolge infatti un ruolo importante nei comportamenti motori: in alcuni studi è stato dimostrato che il blocco dei recettori D1 e D2 in mPFC, promosso da antagonisti dopaminergici, riduce l'attività motoria spontanea e blocca completamente quella indotta dalla somministrazione sistemica di amfetamina (Bast et al, 2002). Anche la totale deplezione della DA in mPFC, indotta da 6-OHDA, porta ad una diminuzione della motilità sia spontanea che indotta da amfetamina (Tzschentke, 2001). Si può quindi ipotizzare che la DA rilasciata nella fase anticipatoria sia un possibile meccanismo alla base di questa aumentata motilità.

Alla luce di questi risultati, e delle evidenze che suggeriscono che l'isolamento sociale modifica l'attività motoria degli animali (Morgan, 1973; Sahakian et al, 1975), ho voluto verificare se l'isolamento fosse in grado di modificare la risposta motoria degli animali all'anticipazione e alla presentazione del cibo. Dal grafico è possibile notare come entrambi i gruppi ISO, sia quelli sottoposti a FR sia quelli con il cibo disponibile *ad libitum*, mostrano un marcato aumento dell'attività esplorativa motoria rispetto al gruppo di controllo e a quello vissuto in gruppo sottoposto a FR. Negli animali isolati, il protocollo di restrizione alimentare non è in grado di indurre ulteriori aumenti nell'attività motoria come si osserva invece negli animali GH, anche se dalla *time course* si evidenzia una leggera differenza, peraltro significativa, nell'aumento di attività verticale, parametro che potrebbe essere paragonato ad una forma di ricerca e interpretato come una fase di aspettativa, confermata dall'aumento delle concentrazioni di DA extracellulare nel NAc.

Questi dati sono in parte in disaccordo con l'ipotesi che negli animali isolati vi sia un aumento dei sintomi anedonici, ma sono in accordo con altri studi nei quali è stato registrato un aumento della motilità dei ratti isolati (Syme 1973). Valzelli (1973) descrive l'aumento di motilità come una risposta generalmente più esasperata ad un ambiente nuovo, un livello di tensione probabilmente maggiore spinge questi animali ad un aumento dell'attività locomotoria spontanea.

Il cibo è uno stimolo gratificante naturale necessario per la sopravvivenza e la prosecuzione della specie e proprio per questo motivo è dotato di proprietà di rinforzo, quindi di caratteristiche positive che inducono il soggetto a essere attratto da esso e a consumarlo, traendone effetti benefici. In letteratura questo viene chiamato comportamento motivato ed è caratterizzato da

proprietà incentive (Bindra, 1968; Bolles, 1975) e funzionali. Il comportamento motivato è dipendente da numerosi e diversi fattori, uno dei quali è stato suggerito potrebbe essere imputabile a differenze nel patrimonio genetico. In accordo, è stato osservato che in ceppi geneticamente differenti di topi si può osservare una differente sensibilità all'*addiction* da farmaci. In accordo, Serova e Naumenko (1995) studiando il comportamento dominante illustrano come funzionalità comportamentali siano strettamente legate sia più globalmente alle differenze del genotipo, ma più nello specifico come queste differenze possano tradursi in differenze strutturali e neurochimiche di importanti sistemi neurotrasmettitoriali, come il sistema catecolaminergico. Nel mio studio ho voluto valutare se le differenze presenti tra i 4 diversi ceppi di topi sulla sensibilità di questi animali nella risposta condizionata, si traducevano in un parallelo aumento della sensibilità al *food intake*.

I miei risultati suggeriscono che i topi del ceppo C57BL/6J sarebbero più motivati sia ad ottenere la ricompensa sia a lavorare più duramente per ottenerla; in accordo, questo ceppo mostra un aumento delle risposte corrette agli stimoli condizionati rispetto agli altri. È ben nota in letteratura la capacità di questo ceppo di avere una rapida acquisizione e un buon mantenimento di auto somministrazione di cocaina (Grahame et al, 1995); in generale gli animali appartenenti a questo ceppo sono un buon modello di risposta gratificante agli stimoli (Crawley et al, 1996). L'aumentata sensibilità all'*addiction* di questo ceppo è stato associato a modificazioni nella trasmissione dopaminergica (Puglisi e Cabib, 1996).

I miei risultati suggeriscono inoltre un maggiore disinteresse e una mancanza di motivazione nei confronti della ricompensa da parte del gruppo A/J, che pur raggiungendo il numero totale massimo di *trials* tra il nono e il decimo giorno di test, ottiene meno pellet rispetto agli altri. In generale il ceppo di topi C57 mostra bassi livelli di ansia e di vincoli emotivi quando sottoposto a test comportamentali, mentre i ceppi albini, come il ceppo A/J, rappresentano un modello iperansioso e ipersensibile (Crawley et al, 1996). Da dati di altri test di apprendimento risulta evidente come i ceppi da me utilizzati, mostrino livelli di rendimento nell'apprendimento differenti, il ceppo che impara più velocemente e meglio si conferma essere il ceppo C57, seguito da DBA, CBA e A/J (Owen et al, 1997; Upchurch and wehner, 1998; Ammassari-Teule et al, 1993; Roullet and Lassalle, 1995; Paylor et al, 1993).

Il dato relativo al giorno di *habituation*, nel quale gli animali erano liberi di consumare il pellet di cibo senza il vincolo dello stimolo condizionante, nel quale non sono state osservate differenze tra i diversi ceppi, suggerisce che le differenze sull'apprendimento e associazione

dell'*input* nei confronti di una ricompensa gradita, come un pellet di cibo, siano legate alla motivazione all'apprendimento per ottenere la ricompensa, oltre alla evidente tendenza di alcuni ceppi di mostrare disinteresse nei confronti della ricompensa stessa.

I miei dati sono in accordo con i recentissimi dati di Bassareo et al, (2015) che dimostrano come durante la risposta al cibo, ricompensa dell'attività operante, i livelli di DA aumentino nello *shell* del NAc, sottolineando l'importanza che eventuali differenze nel comportamento operante potrebbero essere legate a variazioni nella trasmissione dopaminergica di queste aree e del loro impatto sui complessi meccanismi di ricompensa e gratificazioni, mediati appunto da quest'area del NAc.

Il ruolo cruciale che le variazioni dopaminergiche, sia a livello striatale che a livello corticale, rivestono nel controllo dell'impulsività e della programmazione, suggeriscono che esse possano rappresentare il meccanismo principale di sviluppo di dipendenze. Tra i neurotrasmettitori cerebrali, la DA è quello più coinvolto nel meccanismo della tossicodipendenza, non solo come substrato del meccanismo di ricompensa, ma, più in generale, come substrato dei meccanismi di apprendimento e neuroadattamento alle droghe (Di Chiara 2004).

In conclusione, i miei risultati confermano un ruolo chiave della DA nella PFC nella risposta al cibo, sia palatabile sia standard, e sono in accordo con numerose evidenze che suggeriscono che la PFC rappresenti un'area fondamentale nel controllo dell'assunzione di cibo (Alonso-Alonso and Pascual-Leone, 2007). È stato dimostrato, infatti, che, nella metà degli anni '90, l'aumento di peso era un effetto collaterale comune nei pazienti lobotomizzati che avevano cioè subito un trattamento chirurgico che disconnetteva il lobo frontale dal resto del cervello (Freeman and Watts, 1950). L'innervazione mesocorticale è responsabile del ruolo determinante della PFC nella dipendenza dalle sostanze d'abuso. La dipendenza da droghe è inoltre associata con la marcata diminuzione sia dei recettori D2 sia del rilascio di DA (Volkow ND, et al, 2009). Questa caratteristica comune induce a pensare che individui possano diventare dipendenti ai cibi gradevoli allo stesso modo in cui diventerebbero dipendenti da droghe (Avena et al, 2008; Volkow et al, 2005).

Nei mammiferi, la risposta allo stress agisce come motore di plasticità cerebrale d'interfaccia tra ambiente e comportamento e fornisce un meccanismo mediante il quale l'ambiente potrebbe influenzare la funzione della PFC. I miei risultati suggeriscono che nei ratti isolati l'esposizione cronica del protocollo di restrizione alimentare induca modificazioni importanti e persistenti nella funzionalità del sistema dopaminergico mesocorticolimbico. I miei dati suggeriscono in

particolare che l'esposizione cronica allo stress riduca la sensibilità dei neuroni mesocorticali aumentando al contempo quella dei neuroni mesolimbici, al cibo, con un meccanismo molto simile a quello osservato nello sviluppo della dipendenza da sostanze d'abuso (Volkov et al, 2001). Queste alterazioni sarebbero importanti nelle manifestazioni dei sintomi di patologie legate all'assunzione di cibo, come l'anoressia o la bulimia. In queste patologie la modificazione nel controllo dell'attività dei neuroni dopaminergici mesocorticolimbici sarebbe tale da indurre nei soggetti affetti, atteggiamenti esasperati nei confronti del cibo.

I sistemi dopaminergici della mPFC e del NAC mediano i meccanismi di ricompensa coinvolti nell'assunzione di cibo incidendo sia sui comportamenti legati alla sfera del piacere nei confronti del cibo, sia su quella rivolta alla ricerca di cibo. Sebbene questi due meccanismi siano separati, agiscono di concerto per modulare i comportamenti alimentari. I miei dati hanno evidenziato un'importante correlazione tra comportamento alimentare e attività del sistema dopaminergico, ed in particolare suggeriscono che l'isolamento sociale possa alterare il bilanciamento delle componenti mesocorticale e mesolimbica.

Disturbi d'impulsività e compulsività sono associati a soggetti dipendenti da sostanze d'abuso ma anche a individui obesi, che scelgono la somministrazione, di droghe o di cibo, impulsivamente senza sviluppare percorsi cognitivi in grado di dare una valutazione complessiva del comportamento. L'obesità è associata a perdita di analisi cognitiva nei confronti dello stimolo alimentare. Infatti, la capacità di inibire gli stimoli a mangiare cibo gradevole varia tra gli individui e potrebbe essere uno dei fattori che costituiscono la vulnerabilità alle patologie alimentari. Non è casuale la comorbidità confermata tra l'obesità e patologie in cui la funzionalità corticale è compromessa, come nei *deficit* di attenzione (ADHD), nel morbo di Alzheimer e altre forme di demenza.

In questo meccanismo la funzionalità sub corticale del NAc prevarica la ridotta funzionalità della corteccia, che si traduce in atteggiamento impulsivo con lo sbilanciamento delle funzioni cognitive ed emotive che tendono ad un rinforzo dal valore incentivo motivazionale, supportato dalla mancanza di controllo sulle pulsioni, che può, quindi, sfociare in un consumo non condizionato di cibo.

I miei risultati potrebbero quindi rivelarsi molto importanti nello studio delle patologie legate all'assunzione del cibo, quali anoressia, bulimia e *binge eating*. Le future direzioni della ricerca di base dovrebbero puntare ad una migliore comprensione delle interazioni a livello molecolare, cellulare, e di circuito dei processi omeostatici e di ricompensa che regolano l'assunzione di cibo;

comprendendo il coinvolgimento di altri sistemi neurotrasmettitoriali e gli adattamenti omeostatici associati all'esposizione cronica di cibi particolarmente piacevoli ad alto contenuto calorico.

Referenze

- Abood ME. Molecular biology of cannabinoid receptors. Handbook Exp. Pharmacol. 2005. 168, 81–115.
- Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. Physiol. Behav. 2007. 91,449-458
- Advani T, Hensler JG, Koek W. Effect of early rearing conditions on alcohol drinking and 5-HT1A receptor function in C57BL/6J mice. Int J Neuropsychopharmacol 2007. 10:595– 607.
- Albanese A And Bentivoglio M. The organization of dopaminergic and non-dopaminergic mesencephalocortical neurons in the rat brain research. Elsevier Biomedical Press 1982. 238, 421-425 421.
- Alonso-Alonso M, Pascual-Leone A. The right brain hypothesis for obesity. JAMA. 2007. 297(16):1819-22
- Al-Tikriti MS, Roth RH, Kessler RM, Innis RB. Autoradiographic localization of dopamine D1 and D2 receptors in rat cerebral cortex following unilateral neurotoxic lesions. Brain Res. 1992. 575(1):39-46.
- Aragona BJ, Cleaveland NA, Stuber GD, Day JJ, Carelli RM, Wightman RM. Preferential enhancement of dopamine transmission within the nucleus accumbens shell by cocaine is attributable to a direct increase in phasic dopamine release events. J Neurosci. 2008. 28(35):8821-31.
- Argilli E, Sibley DR, Malenka RC, England PM, Bonci A. Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. J Neurosci. 2008. 28(37):9092-100.
- Arnone M, Maruani J, Chaperon F, Thiébot MH, Poncelet M, Soubrié P, Le Fur G. Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. Psychopharmacology (Berl). 1997. 132(1):104-6.
- Arnsten AF, Pliszka SR. Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention *deficit*/hyperactivity disorder and related disorders. Pharmacol Biochem Behav. 2011 Aug;99(2):211-6.
- Auriacombe M, Reneric JP, Le Moal M. Animal models of anhedonia Psychopharmacology (Berl). 1997. 134(4):337-8; discussion 371-7.
- Avanzi M, Baratti M, Cabrini S, Uber E, Brighetti G, Bonfà F. Prevalence of pathological gambling in patients with Parkinson's disease. Mov Disord. 2006. 21: 2068-2072.
- Avena NM, Bocarsly ME. Dysregulation of brain reward systems in eating disorders: neurochemical information from animal models of binge eating, bulimia nervosa, and anorexia nervosa. Neuropharmacology. 2012. 63(1):87-96

- Avena NM, Long KA, Hoebel BG. Sugar-dependent rats show enhanced responding for sugar after abstinence: evidence of a sugar deprivation effect. *Physiol Behav.* 2005 Mar. 16;84(3):359-62.
- Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev* 2008. 32(1):20–39.
- Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Sugar bingeing in rats. *Curr Protoc Neurosci.* 2006. Chapter 9:Unit9.23C
- Avena NM, Susan Murray, and Gold MS. Comparing the effects of food restriction and overeating on brain reward systems *Exp Gerontol.* 2013. 48(10): 1062–1067.
- Bandelow B, Sher L, Bunevicius R, Hollander E, Kasper S, Zohar J, Möller HJ; WFSBP Task Force on Mental Disorders in Primary Care; WFSBP Task Force on Anxiety Disorders, OCD and PTSD. Guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders, obsessive-compulsive disorder and posttraumatic stress disorder in primary care. *Int J Psychiatry Clin Pract.* 2012 Jun;16(2):77-84.
- Bari A, Robbins TW. Inhibition and impulsivity: behavioral and neural basis of response control. *Prog Neurobiol.* 2013. 108:44-79.
- Bassareo V, Di Chiara G. Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci.* 1997. 17, 851–861.
- Bassareo V, Cucca F, Musio P, Lecca D, Frau R, Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine responsiveness to sucrose in rats: role of response contingency and discriminative/conditioned cues. *Eur J Neurosci.* 2015
- Bassareo V, De Luca MA, Di Chiara G. Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *J Neurosci.* 2002. 22(11):4709-19.
- Bassareo V, Di Chiara G. Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci.* 1999. 11(12):4389-97.
- Bast T, Pezze MA, Feldon J. Dopamine receptor blockade in the rat medial prefrontal cortex reduces spontaneous and amphetamine-induced activity and does not affect prepulse inhibition. *Behav Pharmacol.* 2002. 13(8):669-73.
- Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res.* 1979. 19;175(2):191-217.
- Belin D, Everitt B. Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron.* 2008. 57:432–441.

- Bello NT, Coughlin JW, Redgrave GW, Ladenheim EE, Moran TH, Guarda AS. Dietary conditions and highly palatable food access alter rat cannabinoid receptor expression and binding density. *Physiol. Behav.* 2012. 105, 720–726.
- Bello NT, Hajnal A. Dopamine and binge eating behaviors. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010. 97(1):25-33.
- Benes FM, Vincent SL, Molloy R. Dopamine-immunoreactive axon varicosities form nonrandom contacts with GABA-immunoreactive neurons of rat medial prefrontal cortex. *Synapse.* 1993. 15(4):285-95.
- Berger B, Gaspar P, Verney C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. *Trends Neurosci.* 1991. 14(1):21-7.
- Berke JD, Hyman SE: Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 2000. 25:515-532.
- Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav.* 2010. 95(4):375-82.
- Berridge and Kringelbach. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals *Psychopharmacology (Berl).* 2008. 199(3): 457–480.
- Berridge KC, Robinson TE, What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews,* 1998. 28, 309-69.
- Berridge KC, Robinson TE. Parsing reward. *Trends Neurosci* 2003. 26(9):507–13.
- Berridge KC, Venier IL, Robinson TE. Taste reactivity analysis of 6-hydroxydopamine-induced aphagia: implications for arousal and anhedonia hypotheses of dopamine function. *Behav Neurosci.* 1989. 103, 36-45.
- Berridge KC. ‘Liking’ and ‘wanting’ food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol. Behav.* 2009. 97, 537–550.
- Berridge KC. Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 1996. 20(1):1–25.
- Berridge KC. Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000. 24(2):173-98.
- Berridge KC. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl).* 2007. 191(3):391-431.

- Berthoud HR. Homeostatic and non-homeostatic *pathways* involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity* (Silver Spring). 2006. 14 Suppl 5:197S-200S.
- Bhatnagar S, Vining C, Iyer V, Kinni V. Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. *J Neuroendocrinol*. 2006. 18(1):13-24.
- Bhatnagar S, Bell ME, Liang J, Soriano L, Nagy TR, Dallman MF. Corticosterone facilitates saccharin intake in adrenalectomized rats: does corticosterone increase stimulus salience? *J Neuroendocrinol*. 2000. 12(5):453-60.
- Bjorklund A, Dunnett SB: Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 2007. 30:19.
- Blundell J. Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends Pharmacol Sci* 1991. 12:147–57.
- Bodi N, Keri S, Nagy H, Moustafa A, Myers CE, Daw N, Dibo G, Takats A, Berezki D, Gluck MA Reward-learning and the novelty seeking personality: a between- and within-subjects study of the effects of dopamine agonists on young Parkinson's patients, *Brain* 2009. 132: 2385-2395.
- Brennan AR, Arnsten AF. Neuronal mechanisms underlying attention *deficit* hyperactivity disorder: the influence of arousal on prefrontal cortical function. *Ann N Y Acad Sci*. 2008. 1129:236-45.
- Brown VJ, Robbins TW. Simple and choice reaction time performance following unilateral striatal dopamine depletion in the rat. Impaired motor readiness but preserved response preparation. *Brain*. 1991. 114 (Pt 1B):513-25.
- Brozoski TJ, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS. Cognitive *deficit* caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science*. 1979. 31;205(4409):929-32.
- Bubser M, Schmidt WJ. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat prefrontal cortex increases locomotor activity, impairs acquisition of delayed alternation tasks, but does not affect uninterrupted tasks in the radial maze. *Behav Brain Res*. 1990. 37(2):157–168.
- Cabib S, Ventura R, Puglisi-Allegra S. Opposite imbalances between mesocortical and mesoaccumbens dopamine responses to stress by the same genotype depending on living conditions. *Behav Brain Res*. 2002. 129(1-2):179-85.
- Cacioppo JT, Berntson GG, Sheridan JF, McClintock MK. Multilevel integrative analyses of human behavior: social neuroscience and the complementing nature of social and biological approaches. *Psychol Bull*. 2000. 126(6):829-43.
- Cacioppo JT, Fowler JH, Christakis NA. Alone in the crowd: the structure and spread of loneliness in a large social network. *J Pers Soc Psychol*. 2009. 97(6):977-91

- Carr DB, O'Donnell P, Card JP, Sesack SR. Dopamine terminals in the rat prefrontal cortex synapse on pyramidal cells that project to the nucleus accumbens. *J Neurosci*. 1999 Dec 15;19(24):11049-60.
- Carr DB, Sesack SR. Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic *targets* and relation to dopamine terminals. *J Comp Neurol*. 1996. 369(1):1-15.
- Carroll ME, Lac ST, Walker MJ, Kragh R, Newman T. Effects of naltrexone on intravenous cocaine self-administration in rats during food satiation and deprivation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986. 238(1):1-7.
- Carter CJ, Pycock CJ. Behavioural and biochemical effects of dopamine and noradrenaline depletion within the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res*. 1980. 192(1):163-76.
- Carter CJ. Topographical distribution of possible glutamatergic *pathways* from the frontal cortex to the striatum and substantia nigra in rats. *Neuropharmacology*. 1982. 21(5):379-83.
- Castellani B, Rugle L. A comparison of pathological gamblers to alcoholics and cocaine misusers on impulsivity, sensation seeking, and craving. *Int J Addict*. 1995. 30(3):275-89.
- Castellano C, Zocchi A, Cabib S, Puglisi-Allegra S. Strain-dependent effects of cocaine on memory storage improvement induced by post-training physostigmine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996 Feb;123(4):340-5.
- Chen SW, Xin Q, Kong WX, Min L, Li JF. Anxiolytic-like effect of succinic acid in mice. *Life Sci*. 2003. 73(25):3257-64.
- Chen TY, Die Zhang, Andrei Dragomir, Kunikazu Kobayashi², Yasemin Akay¹ and Metin Akay. Investigating the influence of PFC transection and nicotine on dynamics of AMPA and NMDA receptors of VTA dopaminergic neurons *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* 2011. 8:58.
- Chen TY, Zhang D, Dragomir A, Akay YM, Akay M: Complexity of VTA DA neural activities in response to PFC transection in nicotine treated rats. *J Neuroengineering and Rehabilitation* 2011. 8:13.
- Chen TY, Zhang D, Dragomir A, Akay YM, Akay M: The effects of nicotine exposure and PFC transaction on the time-frequency distribution of VTA DA neurons' firing activities. *Med Biol Eng Comput* 2011. 49(5):605-612.
- Chevrier A, Schachar RJ Error detection in the stop signal task. *Neuroimage*. 2010. 53(2):664-73.
- Chiu CQ, Puente N, Grandes P, Castillo PE. Dopaminergic modulation of endocannabinoid-mediated plasticity at GABAergic synapses in the prefrontal cortex. *J. Neurosci*. 2010. 30, 7236–7248.
- Choi WS, Machida CA, Ronnekleiv OK. Distribution of dopamine D1, D2, and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995. 31(1-2):86-94.

- Clifton PG. Meal patterning in rodents: psychopharmacological and neuroanatomical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 2000. 24(2):213–22.
- Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci.* 1998. 63(8):PL113-7.
- Congdon E, Canli T. A neurogenetic approach to impulsivity. *J Pers.* 2008. 76(6):1447-84.
- Cornish JL, Kalivas PW. Repeated cocaine administration into the rat ventral tegmental area produces behavioral sensitization to a systemic cocaine challenge. *Behav Brain Res.* 2001. 126(1-2):205-9.
- Cota D, Tschöp MH, Horvath TL, Levine AS. Cannabinoids, opioids and eating behavior: the molecular face of hedonism? *Brain Res Rev.* 2006. 51(1):85-107.
- Craig W. Appetites and aversions as constituents of instincts *Biol. Bull.* 34. 1918. pp. 91–107.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl).* 1997. 132(2):107-24.
- Crews FT, Boettiger CA. Impulsivity, frontal lobes and risk for addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2009. 93, 237–247.
- Cuenya L, Mustaca A, Kamenetzky G. Postweaning isolation affects responses to incentive contrast in adulthood. *Dev Psychobiol.* 2015. 57(2):177-88.
- Cyders MA, Smith GT. Clarifying the role of personality dispositions in risk for increased gambling behavior. *Pers Individ Dif.* 2008. 45(6):503-508.
- Czéh B, Perez-Cruz C, Fuchs E, Flügge G. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res.* 2008.190(1):1-13.
- Dagher A, Robbins TW. Personality, Addiction, Dopamine: Insights from Parkinson’s Disease, *Neuron* 2009. 61: 502-510.
- Dalley JW, Mar AC, Economidou D, Robbins TW. Neurobehavioral mechanisms of impulsivity: fronto-striatal systems and functional neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008 Aug;90(2):250-60.
- Dallman Mary F, James P Warne, Michelle T Foster, and Norman C Pecoraro. Glucocorticoids and insulin both modulate caloric intake through actions on the brain *J Physiol.* 2007. 583(Pt 2): 431–436.

- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Sebastian RJ. The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 1995. 771:730-42
- Danielli B, Scheggi S, Grappi S, Marchese G, De Montis MG, Tagliamonte A, Gambarana C. Modifications in DARPP-32 phosphorylation pattern after repeated palatable food consumption undergo rapid habituation in the nucleus accumbens shell of non-food-deprived rats. *J Neurochem.* 2010. 112(2):531-41.
- Dawson TM, Gehlert DR, Yamamura HI, Barnett A, Wamsley JK. D-1 dopamine receptors in the rat brain: autoradiographic localization using [3H]SCH 23390. *Eur J Pharmacol.* 1985. 108 (3):323-5.
- Dazzi L, Giuseppe Talani, Francesca Biggio, Cinzia Utzeri, Valeria Lallai, Valentina Licheri, Stefano Lutz, Maria Cristina Mostallino, Pietro Paolo Secci, Giovanni Biggio, Enrico Sanna, Involvement of the Cannabinoid CB1 Receptor in Modulation of Dopamine Output in the Prefrontal Cortex Associated with Food Restriction in Rats *PLOS ONE.* 2014. Volume 9-3-e92224.
- Dazzi L, Ladu S, Spiga F, Vacca G, Rivano A, Pira L, Biggio G. Chronic treatment with imipramine or mirtazapine antagonizes stress- and FG7142-induced increase in cortical norepinephrine output in freely moving rats. *Synapse.* 2002 Jan;43(1):70-7.
- Dazzi L, Motzo C, Imperato A, Serra M, Gessa GL, Biggio G. Modulation of basal and stress-induced release of acetylcholine and dopamine in rat brain by abecarnil and imidazenil, two anxiolytic gamma-aminobutyric acid A receptor modulators. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995. 273(1):241-7.
- Dazzi L, Serra M, Porceddu ML, Sanna A, Chessa et al. Enhancement of basal and pentylenetetrazol (PTZ)-stimulated dopamine release in the brain of freely moving rats by PTZ-induced kindling. *Synapse* 1997. 26, 351–358.
- Dazzi L, Seu E, Cherchi G, Biggio G. Inhibition of stress-induced dopamine output in the rat prefrontal cortex by chronic treatment with olanzapine. *Biol Psychiatry.* 2004. 55(5):477-83.
- Dazzi L, Vacca G, Ladu S, Pisu MG, Serra M, Biggio G. Long-term treatment with antidepressant drugs reduces the sensitivity of cortical cholinergic neurons to the activating actions of stress and the anxiogenic drug FG 7142. *Neuropharmacology.* 2001. 41(2):229-37.
- De Luca MA, Solinas M, Bimpisidis Z, Goldberg SR, Di Chiara G. Cannabinoid facilitation of behavioral and biochemical hedonic taste responses. *Neuropharmacology* 2012. 63, 161–168.
- Deltu F, Piazza PV, Mayo W, Le Moal M, Simon H. Novelty-seeking in rats--biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology.* 1996. 34(3):136-45.
- Deutch AY, Duman RS. The effects of antipsychotic drugs on Fos protein expression in the prefrontal cortex: cellular localization and pharmacological characterization. *Neuroscience.* 1996. 70(2):377-89.

- Di Chiara G e Bassareo V. What dopamine does and does not do in drug addiction, *Current Opinion in Pharmacology* 2007. 7, 69- 76.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection *Neuropharmacology* 2004. 47 227–241
- Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988. 85(14):5274-8.
- Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res*. 2002 Dec 2;137(1-2):75-114.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Jári Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature (Lond)* 2001. 410:822–825.
- Dick DM, Smith G, Olausson P, Mitchell SH, Leeman RF, O'Malley SS, Sher K. Understanding the construct of impulsivity and its relationship to alcohol use disorders. *Addict Biol*. 2010 Apr;15(2):217-26
- Dietrich, M. and Horvath, T. Feeding signals and brain circuitry. *Eur. J. Neurosci*. 2009. 30, 1688–1696
- DiPatrizio NV, Simansky KJ. Activating parabrachial cannabinoid CB1 receptors selectively stimulates feeding of palatable foods in rats. *J. Neurosci*. 2008. 28, 9702–9709.
- Divac I, Pettigrew JD, Holst MC, McKenzie JS. Efferent connections of the prefrontal cortex of echidna (*Tachyglossus aculeatus*). *Brain Behav Evol*. 1987. 30(5-6):321–327.
- Divac I, Lavail JH, Rakic P, Winston KR. Heterogeneous afferents to the inferior parietal lobule of the rhesus monkey revealed by the retrograde transport method. *Brain Res*. 1977. 123(2):197-207.
- Dong Y, Cooper D, Nasif F, Hu XT, White FJ. Dopamine modulates inwardly rectifying potassium currents in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2004. 24(12):3077-85.
- Dong Y, Nasif FJ, Tsui JJ, Ju WY, Cooper DC, Hu XT, Malenka RC, White FJ: Cocaine-induced plasticity of intrinsic membrane properties in prefrontal cortex pyramidal neurons: adaptations in potassium currents. *J Neurosci* 2005. 25:936-940.
- Dubois A, Savasta M, Curet O, Scatton B. Autoradiographic distribution of the D1 agonist [3H]SKF 38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D2 dopamine receptors. *Neuroscience*. 1986. 19(1):125-37.

- Dziejzicka-Wasylewska M, Willner P, Papp M. Changes in dopamine receptor mRNA expression following chronic mild stress and chronic antidepressant treatment. *Behav Pharmacol.* 1997;8(6-7):607-618.
- Egerton A, Allison C, Brett RR, Pratt JA. Cannabinoids and prefrontal cortical function: insights from preclinical studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2006. 30,680-695.
- Eisenstein SA, Holmes PV, Hohmann AG. Endocannabinoid modulation of amphetamine sensitization is disrupted in a rodent model of lesion-induced dopamine dysregulation. *Synapse.* 2009. 63(11):941-50.
- Epstein LH, Temple JL, Roemmich JN, Bouton ME. Habituation as a determinant of human food intake *Psychol Rev.* 2009. 116(2): 384-407.
- Esclapez M, Campistron G, Trottier S. Immunocytochemical localization and morphology of GABA-containing neurons in the prefrontal and frontoparietal cortex of the rat. *Neurosci Lett.* 1987. 15;77(2):131-6.
- Ettenberg A, McFarland K. Effects of haloperidol on cue-induced autonomic and behavioral indices of heroin reward and motivation. *Psychopharmacology (Berl).* 2003. 168(1-2):139-45.
- Fadda F, Gessa GL, Marcou M, Mosca E, Rossetti Z. Evidence for dopamine autoreceptors in mesocortical dopamine neurons. *Brain Res.* 1984 Feb. 293(1):67-72.
- Fadda, F., Argiolas, A., Melis, M.R., Tissari, A.H., Onali, P., Gessa, G.L. 1978. Stress-induced increases in 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) levels in the cerebral cortex and in the accumbens: reversal by diazepam. *Neuropharmacology* 1978. 12, 2219-2224.
- Feenstra MGP, Botterblom MHA, 1996. Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain Res.* 1996. 742, 17-24.
- Feenstra MGP, van der Weij W, Botterblom MHA, Concentration-dependent dual action of locally applied N-methyl-D-aspartate on extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex in vivo. *Neurosci. Lett.* 1995. 201, 175-178.
- Ferré S, Goldberg SR, Lluís C, Franco R. Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function. *Neuropharmacology.* 2009. 56 Suppl 1:226-34
- Ferron A, Thierry AM, Le Douarin C, Glowinski J Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic system on spontaneous activity or excitatory response induced from the thalamic mediodorsal nucleus in the rat medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 1984. 302(2):257-65.
- Foltin RW, Fischman MW, Byrne MF. Effects of smoked marijuana on food intake and body weight of humans living in a residential laboratory. *Appetite.* 1988. 11(1):1-14.

- Foltin RW, Haney M. Conditioned effects of environmental stimuli paired with smoked cocaine in humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000. 149(1):24-33.
- Fone KC, Porkess MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Aug;32(6):1087-102.
- Freedland CS, Poston JS, Porrino LJ. Effects of SR141716A, a central cannabinoid receptor antagonist, on food-maintained responding. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000. 67(2):265-70.
- Freeman W. Mass action versus mosaic function of the frontal lobe. *Bull Los Angel Neuro Soc*. 1950. 15(4):220-4
- Fride E, Bregman T, Kirkham TC. Endocannabinoids and food intake: newborn suckling and appetite regulation in adulthood. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005. 230(4):225-34. Review.
- Fukuda A, Mody I, Prince DA. Differential ontogenesis of presynaptic and postsynaptic GABAB inhibition in rat somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 1993. 70, 448–452.
- Furlong TM, Jayaweera HK, Balleine BW, Corbit LH. Binge-like consumption of a palatable food accelerates habitual control of behavior and is dependent on activation of the dorsolateral striatum. *J Neurosci*. 2014. 34(14):5012-22
- Fuxe K, Agnati L, Mascagni F, Kuga S, Helmer-Matyjek E, Goldstein M. Central dopamine agonist activity on the 8-alpha-amino-ergoline CU 32-085. *Brain Res*. 1985. 328(2):325-32.
- Gable SL *J Pers*. Approach and avoidance social motives and goals. 2006 Feb. 74(1):175-222.
- Gainetdinov RR, Mohn AR, Bohn LM, Caron MG. Glutamatergic modulation of hyperactivity in mice lacking the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 98:11047–11054.
- Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int* 2003. 42 (2): 107-14.
- Gambarana C, Masi F, Leggio B, Grappi S, Nanni G, Scheggi S, De Montis MG, Tagliamonte A. Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas. *Neuroscience*. 2003. 121(1):179-87.
- Gao M, Liu CL, Yang S, Jin GZ, Bunney BS, Shi WX: Functional coupling between the prefrontal cortex and dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 2007. 27:5414-5421.
- Gardner EL, Vorel SR. Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol Dis*. 1998 Dec;5(6 Pt B):502-33.
- Gardner A, Mallet PE. Suppression of feeding, drinking, and locomotion by a putative cannabinoid receptor 'silent antagonist'. *Eur J Pharmacol*. 2006. 530(1-2):103-6.

- Gessa G.L. and Serra G. Dopamine and Mental Depression, *Advances in the Biosciences*, 1990. vol. 77, Pergamon Press, Oxford- New York.
- Ghahremani DG, Lee B, Robertson CL, Tabibnia G, Morgan AT, De Shetler N, Brown AK, Monterosso JR, Aron AR, Mandelkern MA, Poldrack RA, London ED. Striatal dopamine D₂/D₃ receptors mediate response inhibition and related activity in frontostriatal neural circuitry in humans. *J Neurosci*. 2012. 32(21):7316-24
- Ghiani CA, Dazzi L, Maciocco E, Flore G, Maira G et al. Antagonism by abecarnil of enhanced acetylcholine release in the rat brain during anticipation but not consumption of food. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998. 59, 657–662.
- Gill KM and Grace AA. The role of $\alpha 5$ GABAA receptor agonists in the treatment of cognitive *deficits* in schizophrenia *Curr Pharm Des.* 2014. 20(31): 5069–5076.
- Girault JA, Spampinato U, Desban M, Glowinski J, Besson MJ. Enhancement of glutamate release in the rat striatum following electrical stimulation of the nigrothalamic *pathway*. *Brain Res.* 1986. 374(2):362-6.
- Goeders NE, Guerin GF. Non-contingent electric footshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1994. 114: 63–70
- Goldman-Rakic PS, Leranth C, Williams SM, Mons N, Geffard M. Dopamine synaptic complex with pyramidal neurons in primate cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989. 86(22):9015-9.
- Goldman-Rakic PS. Circuitry of the frontal association cortex and its relevance to dementia. *Arch Gerontol Geriatr.* 1987. 6(3):299-309.
- Goldman-Rakic PS. Motor control function of the prefrontal cortex. *Ciba Found Symp.* 1987. 132:187-200.
- Goldstein RZ, Volkow ND. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry.* 2002. 159(10):1642-52.
- Gorelova N, Mulholland PJ, Chandler LJ and Seamans JK. The Glutamatergic Component of the Mesocortical *Pathway* Emanating from Different Subregions of the Ventral Midbrain Cerebral Cortex February 2012. 22:327—336
- Gresch PJ, Sved AF, Zigmond MJ, Finlay JM. Stress-induced sensitization of dopamine and norepinephrine efflux in medial prefrontal cortex of the rat. *J Neurochem.* 1994. 63(2):575-83.
- Grobin AC, Deutch AY. Dopaminergic regulation of extracellular gamma-aminobutyric acid levels in the prefrontal cortex of the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998. 285(1):350-7.
- Hall FS, Humby T, Wilkinson LS, Robbins TW. The effects of isolation-rearing on sucrose consumption in rats. *Physiol Behav* 1997. 62:291–297.

- Haller J, Halasz J. Mild social stress abolishes the effects of isolation on anxiety and chlordiazepoxide reactivity. *Psychopharmacology (Berl)* 1999. 144:311–315.
- Haney M, Maccari S, Le Moal M, Simon H, Piazza PV. Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. *Brain Res* 1995. 698: 46–52
- Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM. Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol.* 2000. 392(3):147-56.
- Harlow HF, Dodsworth RO, Harlow MK (1965) Total social isolation in monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54: 90–97.
- Hata N, Nishikawa T, Umino A, Takahashi K, Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptor in tonic inhibitory control of dopaminergic transmission in rat medial frontal cortex. *Neurosci. Lett.* 1990. 120, 101–104
- Hawkey LC, Thisted RA, Cacioppo JT *Health Psychol.* Loneliness predicts reduced physical activity: cross-sectional & longitudinal analyses. 2009. 28(3):354-63.
- Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran MC, Nelson P. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience.* 2000. 100(4):749-68.
- Heim S, Kissler J, Elbert T, Rockstrah B (2004) Cerebral lateralization in schizophrenia and dyslexia: neuromagnetic responses to auditory stimuli. *Neuropsychologia* 42: 692–697
- Heimer L, de Olmos J, Alheid GF, Záborszky L. “Perestroika” in the basal forebrain: opening the border between neurology and psychiatry. *Progress in Brain Research,* 1991. 87, 109-65.
- Herman JP, Guillonneau D, Dantzer R, Scatton B, Semerdjian-Rouquier L, Le Moal M. Differential effects of inescapable footshocks and of stimuli previously paired with inescapable footshocks on dopamine turnover in cortical and limbic areas of the rat. *Life Sci.* 1982. 30(25):2207-14
- Hermann H, Marsicano G, Lutz B. Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience.* 2002. 109(3):451-60.
- Hernandez L, Hoebel BG, Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the nucleus accumbens. *Physiol. Behav.* 1988. 44, 599–606
- Hernandez L, Hoebel BG, Feeding can enhance dopamine turnover in the prefrontal cortex. *Brain Res. Bull.* 1990. 25, 975–979

- Hestrin S, Galarreta M. Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci.* 2005. 28(6):304-9.
- Hikosaka O, Bromberg-Martin E, Hong S, Matsumoto M. New insights on the subcortical representation of reward. *Curr Opin Neurobiol.* 2008. 18(2):203-8.
- Hill MN, Patel S, Carrier EJ, Rademacher DJ, Ormerod BK, Hillard CJ, Gorzalka BB. Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology.* 2005. 30(3):508-15.
- Hirst RA, Almond SL, Lambert DG. Characterisation of the rat cerebella CB1 receptor using SR141716A, a central cannabinoid receptor antagonist. *Neurosci Lett.* 1996. 220(2):101-4.
- Hofmann, W., Friese, M., Strack, F. Impulse and self-control from a dualsystems perspective. *Perspectives on Psychological Science.* 2009. 4, 162–176.
- Hol T, Van den Berg CL, Van Ree JM, Spruijt BM. Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behav Brain Res.* 1999. 100(1-2):91-7.
- Howes SR, Dalley JW, Morrison CH, Robbins TW, Everitt BJ. Leftward shift in the acquisition of cocaine self-administration in isolation-reared rats: relationship to extracellular levels of dopamine, serotonin and glutamate in the nucleus accumbens and amygdala-striatal FOS expression. *Psychopharmacology (Berl).* 2000. 151:55– 63.
- Hughes JR, Pleasants CN, Pickens RW. Measurement of reinforcement in depression: a pilot study. *J Behav Ther Exp Psychiatry* 1985. 16:231–236
- Hyman SE. Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry.* 2005 Aug;162(8):1414-22.
- Hyman SE.
- Ikemoto S, Panksepp J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999. 31(1):6-41.
- Imperato A, Mele A, Scrocco MG, Puglisi-Allegra S. Chronic cocaine alters limbic extracellular dopamine. Neurochemical basis for addiction. *Eur. J. Pharmacol.* 1992. 212, 299–300.
- Imperato A, Puglisi-Allegra S, Casolini P, Angelucci L. Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res.* 1991. 538, 111
- Imperato A, Scirocco MG, Bacchi S, Angelucci L. NMDA receptors and in vivo dopamine release in the nucleus accumbens and caudatus. *Eur. J. Pharmacol.* 1990. 187, 555–556

- Jamshidi N, Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*. 2001. 134:1151–1154.
- Jastreboff AM, Sinha R, Lacadie C, Small DM, Sherwin RS, Potenza MN. Neural correlates of stress- and food cue-induced food craving in obesity: association with insulin levels. *Diabetes Care*. 2013. 36(2):394-402
- Jentsch JD, Andrusiak BS, Tran A, Bowers MB, Roth RH D9-tetrahydrocannabinol increases prefrontal cortical catecholaminergic utilization and impairs spatial *working memory* in the rat: blockade of dopaminergic effects with HA966. *Neuropsychopharmacol*. 1997. 16(6), 426–432.
- Jentsch JD, Taylor JR. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999. 146(4):373-90.
- Kalivas PW, McFarland K, Bowers S, Szumlinski K, Xi ZX, Baker D. Glutamate transmission and addiction to cocaine. *Ann N Y Acad Sci*. 2003. 1003:169-75.
- Kalivas PW. Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants. *Drug Alcohol Depend* 1995. 37:95-100.
- Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2007. 8(11):844-58.
- Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci*. 2002. 22(9):3306-11.
- Kelley AE. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron*. 2004. 44(1):161-79.
- Kia HK, Brisorgueil MJ, Daval G, Langlois X, Hamon M, Vergé D. Serotonin1A receptors are expressed by a subpopulation of cholinergic neurons in the rat medial septum and diagonal band of Broca--a double immunocytochemical study. *Neuroscience*. 1996. 74(1):143-54.
- Kim JS, Hasler R, Hau P, Paik KS. Effect of frontal cortex ablation on striatal glutamic acid level in rat. *Brain Res*. 1977. 132(2):370-4.
- Kiritoshi T, Sun H, Ren W, Stauffer SR, Lindsley CW, Conn PJ, Neugebauer V. Modulation of pyramidal cell output in the medial prefrontal cortex by mGluR5 interacting with CB1. *Neuropharmacology* 2013.66, 170–178.
- Kirkham T, Williams C. Endogenous cannabinoids and appetite. *Endocannabinoids and appetite* 231. *Nutr Res Rev* . 2001.14:65–86,

- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* 2002. 136, 550–557.
- Kirkham TC, Williams CM. Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiol Behav* 2002. 76:241–250.
- Kirkham TC. Endogenous cannabinoids: a new *target* in the treatment of obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003. 284(2):R343-4.
- Kobayashi M, Takei H, Yamamoto K, Hatanaka H, Koshikawa N. Kinetics of GABAB autoreceptor-mediated suppression of GABA release in rat insular cortex. *J. Neurophysiol.* 2012. 107, 1431–1442.
- Kohno M, Ghahremani DG, Morales AM, Robertson CL, Ishibashi K, Morgan AT, Mandelkern MA, London ED.
- Konorsky J, *Integrative activity of the brain*, Oxford University Press, Oxford, 1967
- Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward *pathways*. *Trends Pharmacol Sci.* 1992. 13(5):177-84.
- Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology.* 2010. 35(1):217-38
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W., Blokhuis, H.J., Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999. 23, 925 – 935.
- Kosten TA, Miserendino MJ, Kehoe P. Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Brain Res* 2000. 875: 44–50.
- Kramer, M., Hiemke, C., Fuchs, E., Chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in tree shrews: time-dependent behavioral and endocrine effects. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999. 23, 937 – 947
- Le Moal M, Simonnet G. Neurobiology of dependence. *Rev Prat.* 1995. 45(11):1351-8.
- LeBlanc KH, Maidment NT, Ostlund SB. Impact of repeated intravenous cocaine administration on incentive motivation depends on mode of drug delivery. *Addict Biol.* 2014.19(6):965-71.
- LeBlanc KH, Maidment NT, Ostlund SB. Repeated cocaine exposure facilitates the expression of incentive motivation and induces habitual control in rats. *PLoS One.* 2013. 8(4):e61355.
- Whitaker LR, Mickael Degoulet, and Hitoshi Morikawa. Social Deprivation Enhances VTA Synaptic Plasticity and Drug-Induced Contextual Learning *Neuron.* 2013. 77(2): 335–345.

- Li CR, Huang GB, Sui ZY, Han EH, Chung YC. Effects of 6-hydroxydopamine lesioning of the medial prefrontal cortex on social interactions in adolescent and adult rats. *Brain Res.* 2010. 1346:183-9
- Li Y, Hu XT, Berney TG, Vartanian AJ, Stine CD, Wolf ME, White FJ: Both glutamate receptor antagonists and prefrontal cortex lesions prevent induction of cocaine sensitization and associated neuroadaptations. *Synapse* 1999. 34:169-180.
- Li Y, Vartanian AJ, White FJ, Xue XJ, Wolf ME. Effects of the AMPA receptor antagonist NBQX on the development and expression of behavioral sensitization to cocaine and amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 1997. 134:266-276.
- Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: Schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology.* 2000;23:223–239.
- Lladó-Pelfort L, Santana N, Ghisi V, Artigas F, Celada P. 5-HT1A receptor agonists enhance pyramidal cell firing in prefrontal cortex through a preferential action on GABA interneurons. *Cereb Cortex.* 2012. 22(7):1487-97.
- Lukkes J, Vuong S, Scholl J, Oliver H, Forster G. Corticotropin-releasing factor receptor antagonism within the dorsal raphe nucleus reduces social anxiety-like behavior after early-life social isolation. *J Neurosci* 2009. 29:9955–9960.
- Lund TD, Lephart ED. Dietary soy phytoestrogens produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze. *Brain Res.* 2001. 913(2):180-4.
- Lund TD, West TW, Tian LY, Bu LH, Simmons DL, Setchell KD, Adlercreutz H, Lephart ED. Visual spatial memory is enhanced in female rats (but inhibited in males) by dietary soy phytoestrogens. *BMC Neurosci.* 2001. 2:20.
- Lupica CR, Riegel AC, Hoffman AF. Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *Br J Pharmacol.* 2004 Sep;143(2):227-34.
- Lupica CR, Riegel AC. Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology.* 2005. 48(8):1105-16.
- Lüscher C. and Malenka R. C. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling *Neuron.* 2011. 69(4): 650–663.
- Maccioni P, Pes D, Carai MA, Gessa GL, Colombo G. Suppression by the cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant, of the reinforcing and motivational properties of a chocolate-flavoured beverage in rats. *Behav. Pharmacol.* 2008. 19, 197–209.

- Mahler SV, Smith KS, Berridge KC. Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology*. 2007. 32(11):2267-78.
- Malone DT, Taylor DA. Modulation by fluoxetine of striatal dopamine release following Delta9-tetrahydrocannabinol: a microdialysis study in conscious rats. *Br J Pharmacol*. 1999 . 128(1):21-6.
- Mansvelder HD, McGehee DS. Long-term potentiation of excitatory *inputs* to brain reward areas by nicotine. *Neuron*. 2000. 27(2):349-57.
- Marongiu MF, Poddie D, Porcu S, Manchinu MF, Castelli MP et al. Reversible Disruption of Pre-Pulse Inhibition in Hypomorphic-Inducible and Reversible CB1/2 Mice. *Plos One* 2012. 7(4), e35013.
- Martire SI, Maniam J, South T, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ. Extended exposure to a palatable cafeteria diet alters gene expression in brain regions implicated in reward, and withdrawal from this diet alters gene expression in brain regions associated with stress. *Behav Brain Res*. 2014 May 15;265:132-41
- Martire SI, Westbrook RF, Morris MJ. Effects of long-term cycling between palatable cafeteria diet and regular chow on intake, eating patterns, and response to saccharin and sucrose. *Physiol Behav*. 2015. 139:80-8.
- McFarland K, Davidge SB, Lapish CC, Kalivas PW. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci*. 2004. 24(7):1551-60.
- McFarland K, Kalivas PW. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci*. 2001. 21(21):8655-63.
- McGlashan and Hoffman. Schizophrenia as a disorder of developmentally reduced synaptic connectivity. *Arch Gen Psychiatry*. 2000. 57(7):637-648.
- McLaughlin PJ, Winston K, Swezey L, Wisniecki A, Aberman J et al. The cannabinoid CB1 antagonists SR 141716A and AM 251 suppress food intake and food-reinforced behavior in a variety of tasks in rats. *Behav. Pharmacol*. 2003. 14,583–538.
- McLaughlin J, See RE. Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and the basolateral amygdala attenuates conditioned-cued reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003. 168(1-2):57-65.
- Meerlo, P., Overkamp, G.J.F., Koolhaas, J.M., Behavioural and physiological consequences of a single social defeat in Roman high and low-avoidance rats. *Psychoneuroendocrinology* 1997. 22, 155 – 168.
- Melis M, Pistis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, et al. Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J Neurosci*. 2004. 24(1), 53–62.

- Melis MR, Succu S, Mascia MS, Argiolas A. PD-168077, a selective dopamine D4 receptor agonist, induces penile erection when injected into the paraventricular nucleus of male rats. *Neurosci Lett*. 2005. 379(1):59-62.
- Melis T, Succu S, Sanna F, Boi A, Argiolas A et al. The cannabinoid antagonist SR 141716A (Rimonabant) reduces the increase of extracellular dopamine release in the rat nucleus accumbens induced by a novel high palatable food. *Neurosci. Lett*. 2007. 419, 231–235.
- Merali Z, Graitson S, MacKay JC, and Kent P. Stress and eating: a dual role for bombesin-like peptides *Front Neurosci*. 2013. 7: 193.
- Meule A, Kübler A. The translation of substance dependence criteria to food-related behaviors: different views and interpretations. *Front Psychiatry*. 2012. 3:64.
- Meule A. Are certain foods addictive? *Front Psychiatry*. 2014. 5:38
- Meye FJ, Ramakers GM, Adan RA. The vital role of constitutive GPCR activity in the mesolimbic dopamine system. *Transl Psychiatry*. 2014. 4:e361
- Meyer-Lindenberg A, Tost H Neural mechanisms of social risk for psychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2012. 15(5):663-8
- Michalczuk R, Bowden-Jones H, Verdejo-Garcia A, Clark L. Impulsivity and cognitive distortions in pathological gamblers attending the UK National Problem Gambling Clinic: a preliminary report. *Psychol Med*. 2011. 41(12):2625-35
- Miczek KA, Mutschler NH. Activational effects of social stress on IV cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1996. 128: 256–64.
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther*. 2008. 120(2):102-28
- Misner D.L., Sullivan J.M. Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. *Journal of Neuroscience*. 1999;19:6795–6805.
- Moghaddam B, Jackson M. Effect of stress on prefrontal cortex function. *Neurotox Res*. 2004. 6(1):73-8.
- Monaghan DT, Cotman CW. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci*. 1985. 5(11):2909-19.
- Monteleone P, Piscitelli F, Scognamiglio P, Monteleone AM, Canestrelli B et al. Hedonic eating is associated with increased peripheral levels of ghrelin and the endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol in healthy humans: a pilot study. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2012. 97(6), E917–924.

- Morgan, M. J. Effects of post-weaning environment on learning in the rat. *Anita. Behav.* 1973. 21: 429-442.
- Morris MJ, Beilharz JE, Maniam J, Reichelt AC, Westbrook RF. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward *pathways*, stress, and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014. pii: S0149-7634(14)00333-9.
- Nakahara D, Nakamura M. Differential effect of immobilization stress on in vivo synthesis rate of monoamines in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of conscious rats. *Synapse.* 1999. 32(3):238-42.
- Nandam LS, Hester R, Wagner J, Dean AJ, Messer C, Honeysett A, Nathan PJ, Bellgrove MA. Dopamine D₂ receptor modulation of human response inhibition and error awareness. *J Cogn Neurosci.* 2013. 25(4):649-56.
- Nestler EJ. The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect.* 2005. 3(1):4-10.
- Nieuwenhuizen AG, Rutters F. The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiol Behav.* 2008. 94(2):169-77.
- Ohno-Shosaku T., Tsubokawa H., Mizushima I., Yoneda N., Zimmer A., Kano M. Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience.* 2002;22:3864–3872.
- Oleson EB, Beckert MV, Morra JT, Lansink CS, Cachope R et al. Endocannabinoids shape accumbal encoding of cue-motivated behavior via CB1 receptor activation in the ventral tegmentum. *Neuron* 2012. 73(2), 360–73.
- Ottley C. Food and mood. *Nurs Stand.* 2000. 15(2):46-52.
- Papp M, Klimek V, Willner P. Parallel changes in dopamine D₂ receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine. *Psychopharmacology (Berl)* 1994. 115(4):441–446.
- Parker G, Roy K, Mitchell P, Wilhelm K, Mahli G, Hadzi-Pavlovic D. Atypical depression: a reappraisal. *American Journal of Psychiatry* 2002. 159, 1470–1479.
- Parker, G, Parker, I, Brotchie, H. Mood state effects of chocolate. *J. Affect. Disord.* 2006. 92, 149–159.
- Passamonti L, Rowe JB, Schwarzbauer C, Ewbank MP, von dem Hagen E, Calder AJ. Personality predicts the brain's response to viewing appetizing foods: the neural basis of a risk factor for overeating. *J. Neurosci.* 2009. 29, 43–51
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press: San Diego, CA. 1982.

- Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*. 2004. 145(8):3754-62.
- Pelfort LL, Santana N, Ghisi V, Artigas F and Celada P. 5-HT1A Receptor Agonists Enhance Pyramidal Cell Firing in Prefrontal Cortex Through a Preferential Action on GABA Interneurons Cerebral Cortex 2012.22:1487– 1497
- Pelizza L, Ferrari A. Anhedonia in schizophrenia and major depression: state or trait? *Ann Gen Psychiatry*. 2009 Oct 8;8:22.
- Peters J, LaLumiere RT, Kalivas PW. Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. *J Neurosci*. 2008 Jun 4;28(23):6046-53.
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ. The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J Neurosci*. 1994. 14(10):6102-20.
- Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ. Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci*. 1994. 14(2):667-96.
- Pfaus JG, Mendelson SD, Phillips AG. A correlational and factor analysis of anticipatory and consummatory measures of sexual behavior in the male rat. *Psychoneuroendocrinology*. 1990. 15(5-6):329-40.
- Phan KL, Taylor SF, Welsh RC, Ho SH, Britton JC, Liberzon I. Neural correlates of individual ratings of emotional salience: a trial-related fMRI study. *Neuroimage*. 2004. 21(2):768-80.
- Phillips AG, Vacca G, Ahn S. A top-down perspective on dopamine, motivation and memory. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008. 90(2):236-49. Epub 2007 Nov 28.
- Phillipson OT, Griffiths AC. The topographic order of *inputs* to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*. 1985. 16(2):275-96.
- Piazza PV, Deminiere JM, le Moal M, Simon H. Stress- and pharmacologically induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. *Brain Res* 1990. 514: 22–6.
- Pistis M, Ferraro L, Pira L, Flore G, Tanganelli S, Gessa GL, Devoto P. D9-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*. 2002. 948, 155–158.
- Polter AM and Kauer JA. Stress and VTA synapses: implications for addiction and depression *European Journal of Neuroscience*, 2014. Vol. 39, pp. 1179–1188,

- Powell EW, Leman RB. Connections of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 1976. 105(3):389-403.
- Pritchard LM, Van Kempen TA, Zimmerberg B. Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. *Neurosci Lett.* 2013. 536:47-51.
- Rada P, Avena NM, Hoebel BG. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience.* 2005. 134(3):737-44.
- Radhakishun FS, van Ree JM, Westerink BH. Scheduled eating increases dopamine release in the nucleus accumbens of food-deprived rats as assessed with on-line brain dialysis. *Neurosci Lett.* 1988. 85(3):351-6.
- Ramsey NF, Van Ree JM. Emotional but not physical stress enhances intravenous cocaine self-administration in drug-naive rats. *Brain Res* 1993. 608: 216– 22.
- Rapoport JL, Addington A, Frangou S (2005) The neurodevelopmental model of schizophrenia: what can very early onset cases tell us? *Curr Psychiatry Rep* 7: 81–82.
- Rebec GV, Grabner CP, Johnson M, Pierce RC, Bardo MT, Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience* 1997. 76, 707–714.
- Risk-taking behavior: dopamine D2/D3 receptors, feedback, and frontolimbic activity. *Cereb Cortex.* 2015. 25(1):236-45.
- Robbins TW, Arnsten AF. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci.* 2009. 32:267-87.
- Robbins TW, Jones GH, Wilkinson LS. Behavioural and neurochemical effects of early social deprivation in the rat. *J Psychopharmacol.* 1996. 10(1):39-47.
- Robinson and Berridge *Addiction Annual Review of Psychology*, 54 2003. pp. 25-53
- Rolls BJ, Bell EA, Waugh BA. Increasing the volume of a food by incorporating air affects satiety in men. *Am J Clin Nutr* 2000. 72:361– 8
- Rolls BJ, Roe LS. Effect of the volume of liquid food infused intragastrically on satiety in women. *Physiol Behav* 2002. 76:623–31.
- Rolls ET. Functions of the orbitofrontal and pregenual cingulate cortex in taste, olfaction, appetite and emotion. *Acta Physiol. Hung.* 2008. 95, 131–164
- Ross HE, Ivis F. Binge eating and substance use among male and female adolescents. *Int. J. Eat. Disord.* 1999. 26, 245–260.

- Rossetti ZL, Portas C, Pani L, Carboni S, Gessa GL, Stress increases noradrenaline release in the frontal cortex: prevention by diazepam. *Eur. J. Pharmacol.* 1990. 176, 229–231
- Rubino T, Viganò D, Zagato E, Sala M, Parolaro D. In vivo characterization of the specific cannabinoid receptor antagonist, SR141716A: behavioral and cellular responses after acute and chronic treatments. *Synapse* 2000. 35, 8–14.
- Rubino T, Massi P, Viganò D, Fuzio D, Parolaro D. Long-term treatment with SR141716A, the CB1 receptor antagonist, influences morphine withdrawal syndrome. *Life Sci.* 2000. 66(22):2213-9.
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron.* 2003. 37(4):577-82.
- Sahakian BJ, Burdess C, Luckhurst H, Trayhurn P. Hyperactivity and obesity: the interaction of social isolation and cafeteria feeding. *Physiol Behav.* 1982. 28(1):117-24.
- Sahakian BJ, Robbins TW, Morgan MJ and Iversen SD. The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in socially-deprived and control rats. *Brain Res.*1975. 84: 195-205,
- Salamone JD, Correa M, Farrar A, Mingote SM. Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology (Berl).* 2007. 191(3):461-82.
- Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol.* 2005. 5(1):34-41.
- Salamone JD, Cousins MS, Snyder BJ. Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997. 21(3):341-59.
- Savasta M, Alain Dubois I And Bernard Scatfon Autoradiographic Localization Of D 1 Dopamine Receptors In The Rat Brain With [3h]Sch 23390 *Brain Research*, 375 . 1986. 291-301 291 Elsevier
- Schilström B, Nomikos GG, Nisell M, Hertel P, Svensson TH: N-methyl-D-aspartate receptor antagonism in the ventral tegmental area diminishes the systemic nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 1998. 82:781-789.
- Schubert MI, Porkess MV, Dashdorj N, Fone KC, Auer DP. Effects of social isolation rearing on the limbic brain: a combined behavioral and magnetic resonance imaging volumetry study in rats. *Neuroscience* 2009. 159:21–30.
- Schultz W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron.* 2002. 36(2):241-63.
- Schultz W. Reward signaling by dopamine neurons. *The Neuroscientist* 2001. 7, 293–302.
- Schultz W. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol.* 1998. 80(1):1-27. Review.

- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000. 404:661–71
- Sciolino NR, Bortolato M, Eisenstein SA, Fu J, Oveisi F, Hohmann AG, and Piomelli D. Social isolation and chronic handling alter endocannabinoid signaling and behavioral reactivity to context in adult rats *Neuroscience*. 2010. 168(2): 371–386.
- Seamans JK, Yang CR. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex *Jeremy K. Progress in Neurobiology* 74. 2004. 1–57
- Selye H. A Syndrome Produced By Diverse Nocuous Agents. *Nature* 1936. 138: 32.
- Selye H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J*. 1976. 115(1):53-6.
- Selye H. Stress without Distress. 1976. pp 137-146
- Serova LI, Naumenko EV. Involvement of the brain catecholaminergic system in the regulation of dominant behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996. 53(2):285-90.
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol*. 1989. 290(2):213-42.
- Sesack SR, Snyder CL, Lewis DA. Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. *J Comp Neurol*. 1995. 363(2):264-80
- Sesack SR, Pickel VM. Ultrastructural relationships between terminals immunoreactive for enkephalin, GABA, or both transmitters in the rat ventral tegmental area. *Brain Res*. 1995. 672(1-2):261-75
- Silva-Gomez AB, Rojas D, Juarez I, Flores G. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Res* 2003. 983:128 –136.
- Sinha R. Modeling stress and drug craving in the laboratory: implications for addiction treatment development. *Addict Biol*. 2009. 14(1):84-98.
- Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage* 2003. 19, 1709–1715
- Smeets Paul AM, Cees de Graaf, Annette Stafleu, Matthias JP van Osch, Rutger AJ Nievelstein, and Jeroen van der Grond Effect of satiety on brain activation during chocolate tasting in men and women *Am J Clin Nutr* 2006. 83:1297–305

- Smiley JF, Goldman-Rakic PS. Silver-enhanced diaminobenzidine-sulfide (SEDS): a technique for high-resolution immunoelectron microscopy demonstrated with monoamine immunoreactivity in monkey cerebral cortex and caudate. *J Histochem Cytochem.* 1993. 41(9):1393-404.
- Smiley JF, Levey AI, Ciliax BJ, Goldman-Rakic PS. D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994. 91(12):5720-4.
- Solinas M, Goldberg SR. Motivational effects of cannabinoids and opioids on food reinforcement depend on simultaneous activation of cannabinoid and opioid systems. *Neuropsychopharmacology.* 2005. 30(11):2035-45.
- Spanagel R, Weiss F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci.* 1999 Nov;22(11):521-7.
- Stefani MR, Moghaddam B. Rule learning and reward contingency are associated with dissociable patterns of dopamine activation in the rat prefrontal cortex, nucleus accumbens, and dorsal striatum. *J Neurosci.* 2006. 26(34):8810-8.
- Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ. Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci.* 1998. 18(19):8003-15.
- Straiker A., Mackie K. Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. *Journal of Physiology.* 2005;569:501–517.
- Stratford TR, Kelley AE. Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci.* 1999. 19(24):11040-8.
- Sutton SK, Davidson RJ. Prefrontal brain asymmetry: A biological substrate of the behavioral approach and inhibition systems. *Psychological Science.* 1997. 8:204–210.
- Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull.* 1982. 9(1-6):321-53.
- Syme, L. A., Social isolation at weaning: some effects on two measures of activity, Anita. *Learn. Behav.,* 1 1973. 161-163.
- Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 2001. 30, 819–828
- Taber MT, Fibiger HC. Feeding-evoked dopamine release in the nucleus accumbens: regulation by glutamatergic mechanisms. *Neuroscience* 1997. 76, 1105–1112.
- Tang M, Kuribara H, Falk JL. Anxiolytic effect of caffeine and caffeine-clonazepam interaction: evaluation by NaCl solution intake. *Pharmacol Biochem Behav* 1989. 32:773–6.

- Teitelbaum P, Stellar E. Recovery From The Failure To Eat Produced By Hypothalamic Lesions. *Science*. 1954. 120(3126):894-5.
- Thierry AM, Tassin JP, Blanc G, Glowinski J. Selective activation of mesocortical DA system by stress. *Nature*. 1976;263:242–244.
- Thierry AM, Deniau JM, Herve D, Chevalier G. Electrophysiological evidence for non-dopaminergic mesocortical and mesolimbic neurons in the rat. *Brain Research* Volume 201, Issue 1, 10 November 1980. Pages 210–214
- Tidey JW, Miczek KA. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*. 1996 May 20;721(1-2):140-9.
- Timofeeva E, Baraboi ED, Poulin AM, Richard D. Palatable high-energy diet decreases the expression of cannabinoid type 1 receptor messenger RNA in specific brain regions in the rat. *J. Neuroendocrinol*. 2009. 21, 982–992.
- Tomasi D, Volkow ND. Striatocortical *pathway* dysfunction in addiction and obesity: differences and similarities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013. 48(1):1-19.
- Tong ZY, Overton PG, Martinez-Cue C, Clark D: Do non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area play a role in the responses elicited in A10 dopaminergic neurons by electrical stimulation of the prefrontal cortex? *Exp. Brain Res* 1998. 118:466-476.
- Townsend, Mary C *Essentials of psychiatric/mental health nursing : concepts of care in evidence-based practice* RC440.T689 2011. 616.8970231—dc22
- Tzschentke TM. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog Neurobiol* 2001. 63:241-320.
- Uher R, Murphy T, Brammer MJ, Dalgleish T, Phillips ML, Ng VW, Andrew CM, Williams SC, Campbell IC, Treasure J. Medial prefrontal cortex activity associated with symptom provocation in eating disorders. *Am J Psychiatry*. 2004. 161(7):1238-46.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*. 2001. 411(6837):583-7.
- Urcelay GP, Dalley JW Linking ADHD, impulsivity, and drug abuse: a neuropsychological perspective. *Curr Top Behav Neurosci*. 2012. 9:173-97
- Valzelli, L., The 'isolation syndrome' in mice, *Psychopharmacologia (Bed.)*, 31. 1973. 305-320.

- Van der Stelt M, Di Marzo V. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol.* 2003. 480(1-3):133-50. Review.
- Van Eden CG, Hoorneman EM, Buijs RM, Matthijssen MA, Geffard M, Uylings HB. Immunocytochemical localization of dopamine in the prefrontal cortex of the rat at the light and electron microscopical level. *Neuroscience.* 1987. 22(3):849-62.
- Van Vliet-Ostapchouk JV, Hofker MH, van der Schouw YT, Wijmenga C, Onland-Moret NC. Genetic variation in the hypothalamic *pathways* and its role on obesity. *Obes. Rev.* 2009. 10, 593– 609
- Varty GB, Braff DL, Geyer MA. Is there a critical developmental 'window' for isolation rearing-induced changes in prepulse inhibition of the acoustic startle response? *Behav Brain Res* 1999.100:177–183.
- Verdejo-García A, Lawrence AJ, Clark L. Impulsivity as a vulnerability marker for substance-use disorders: review of findings from high-risk research, problem gamblers and genetic association studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008. 32(4):777-810.
- Verney C, Alvarez C, Geffard M, Berger B. Ultrastructural Double-Labeling Study of Dopamine Terminals and GABA-Containing Neurons in Rat Anteromedial Cerebral Cortex. *Eur J Neurosci.* 1990. 2(11):960-972.
- Verty AN, McGregor IS, Mallet PE. The dopamine receptor antagonist SCH 23390 attenuates feeding induced by Delta9-tetrahydrocannabinol. *Brain Res.* 2004. 1020(1-2):188-95
- Vincent SL, Khan Y and Benes FM. Cellular Distribution of Dopamine D₁ and D₂ Receptors in Rat Medial Prefrontal Cortex *The Journal of Neuroscience.* 1993. 13(6): 2551-2554
- Vincent SL, Khan Y, Benes FM. Cellular colocalization of dopamine D₁ and D₂ receptors in rat medial prefrontal cortex. *Synapse.* 1995. 19(2):112-20.
- Volkow ND Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Franceschi D, Wong C, Gatley SJ, Gifford AN, Ding YS, Pappas N. 'Nonhedonic' food motivation in humans involves dopamine in the dorsal striatum and methylphenidate amplifies this effect. *Synapse* 2002. 44, 175–180
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology* 2009. 56 (Suppl. 1), 3–8
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Baler R. Food and drug reward: overlapping circuits in human obesity and addiction. *Curr Top Behav Neurosci.* 2012.11:1-24.
- Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Thanos PK, Logan J, Alexoff D, Ding YS, Wong C, Ma Y, Pradhan K. Low dopamine striatal D₂ receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: possible contributing factors. *Neuroimage* 2008. 42, 1537–1543

- Volkow ND, Wang GJ and Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity Trends in Cognitive Sciences. 2011. Vol. 15, No. 1
- Volkow ND, Wise RA. How can drug addiction help us understand obesity? Nat Neurosci 2005. 8(5):555–60.
- Volkow ND. Drug abuse and mental illness: progress in understanding comorbidity. Am J Psychiatry. 2001. 158(8):1181-3
- Von Frijtag JC, Reijmers LG, Van der Harst JE, Leus IE, Van den Bos R, Spruijt BM. Defeat followed by individual housing results in long-term impaired reward- and cognition-related behaviours in rats. Behav Brain Res. 2000. 117(1-2):137-46.
- Wang GJ, Volkow ND, Telang F, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Zhu W, Wong CT, Thanos PK, Geliebter A, Biegonek A, Fowler JS. Evidence of gender differences in the ability to inhibit brain activation elicited by food stimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. 106, 1249–1254
- Weed JL, Lane MA, Roth GS, Speer DL, Ingram DK. Activity measures in rhesus monkeys on long-term calorie restriction. Physiol. Behav. 1997. 62(1), 97–103.
- Weiland BJ, Heitzeg MM2, Zald D, Cummiford C, Love T, Zucker RA, Zubieta JK. Psychiatry Research: Neuroimaging 223. 2014. 244–252
- Weinberger DR, Berman KF, Chase TN. Mesocortical dopaminergic function and human cognition. Ann N Y Acad Sci. 1988. 537:330-8.
- Wellman PJ, Nation JR, Davis KW. Impairment of acquisition of cocaine self-administration in rats maintained on a high-fat diet. Pharmacol Biochem Behav. 2007. 88(1):89-93.
- Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. Psychopharmacology (Berl). 1999. 143(3):315-7.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS. Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. Nature. 1995. 376(6541):572-5.
- Williams CM, Rogers PJ, Kirkham TC. Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. Physiol Behav. 1998. 65(2):343-6.
- Williams CM, Kirkham TC. Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. Physiol Behav. 2002. 76(2):241-50.
- Willner P, D'Aquila PS, Coventry T, Brain P. Loss of social status: preliminary evaluation of a novel animal model of depression. J Psychopharmacol. 1995 Jan;9(3):207-13.

- Wise R. Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci.* 2009. 32:517–524.
- Wise RA, Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis, *Behavioral and Brain Sciences.* 1982. 5, 39-87.
- Wise RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron.* 2002. 36(2):229-40.
- Wise RA. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res.* 2008 Oct;14(2-3):169-83.
- Wise RA. Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006. 361(1471):1149–58.
- Wolf ME. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* 1998. 54:679-720.
- Wright LD, Hébert KE, Perrot-Sinal TS. Periadolescent stress exposure exerts long-term effects on adult stress responding and expression of prefrontal dopamine receptors in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2008. 33(2):130-42
- Yeomans MR, Gray RW. Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002. 26(6):713-28. Review.
- Zacharko RM, Anisman H. Stressor-induced anhedonia in the mesocorticolimbic system. *Neurosci Biobehav Rev.* 1991. 15(3):391-405.
- Zucker N, Von Holle A, Thornton LM, Strober M, Plotnicov K, Klump KL, Brandt H, Crawford S, Crow S, Fichter MM, Halmi KA, Johnson C, Kaplan AS, Keel P, LaVia M, Mitchell JE, Rotondo A, Woodside DB, Berrettini WH, Kaye WH, Bulik CM. The significance of repetitive hair-pulling behaviors in eating disorders. *J Clin Psychol.* 2011 Apr;67(4):391-403.