



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA IN TOSSICOLOGIA**

Farmacologia e Farmacoterapia delle Tossicodipendenze

Ciclo XXV

**Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'etanolo:  
studio di *Self-administration* orale nel ratto.**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/14 FARMACOLOGIA

Presentata da:	Dott.ssa Giulia Muggironi
Coordinatore Dottorato:	Prof. Gaetano Di Chiara
Relatore	Prof. Marco Diana
Co-Relatore:	Prof.ssa Alessandra T. Peana

Esame finale anno accademico 2011 – 2012

Abstract .....	3
Introduzione .....	4
Effetti comportamentali dell'acetaldeide .....	8
Basi neurochimiche degli effetti dell'acetaldeide .....	10
L-cisteina.....	11
Antagonisti oppioidergici .....	15
Acido Alfa Lipoico.....	15
Scopo della ricerca .....	17
Materiali e metodi .....	19
Self administration .....	21
Risultati .....	33
<i>Self administration</i> di Acetaldeide .....	33
Effetti della L-Cisteina sulla <i>Self administration</i> di Acetaldeide .....	37
Effetti degli antagonisti oppioidi sulla <i>Self administration</i> di Acetaldeide.....	48
Effetti dell'acido alfa lipoico sulla <i>self administration</i> di etanolo .....	56
Discussione.....	62
Conclusione.....	69
Bibliografia.....	70

## Abstract

Our line of research was focused on the study of the motivational and rewarding properties of ethanol. Particularly, our research activity examined the role of acetaldehyde, in mediating the reinforcing properties of ethanol. We show that acetaldehyde is orally self-administered by Wistar rats and possesses its own motivational and reinforcing effects. Interestingly, we have observed that acetaldehyde reinforcing effects are reduced by L-Cysteine, a not essential amino acid, which was previously shown to reduce ethanol self-administration. Furthermore, acetaldehyde self-administration was reduced by the pre-treatment with the nonselective opioid receptor antagonist, naltrexone, and with the  $\mu_1$ -selective opioid receptor antagonist, naloxonazine. This suggests an involvement of the endogenous opioid system in the central actions of acetaldehyde as an ethanol metabolite. In order to further our understanding on the role of centrally formed acetaldehyde in the mechanism of action of alcoholic beverages, we studied the role of catalase, the main enzymatic system that oxidizes ethanol to acetaldehyde in the central nervous system. In this phase we studied the effect of alpha-lipoic acid, an antioxidant agent which is able to reduce  $H_2O_2$  concentrations in the brain, on ethanol oral self-administration. These experiments show that alpha-lipoic acid intraperitoneal administration reduced all self-administration phases in a dose-dependent manner.

These studies underscore the role of acetaldehyde in the motivational properties of ethanol and suggest that acetaldehyde may be a pharmacological “target” for devising new therapeutic strategies in alcoholism.

## Introduzione

L'alcolismo è un disturbo neuropsichiatrico, caratterizzato da episodi di assunzione cronica, astinenza e ricaduta (Crews et al., 1996; Fadda e Rossetti, 1998; Nestler e Aghajanian, 1997). Si ipotizza che molti degli effetti neurofarmacologici, neurochimici, neurotossici e comportamentali dell'etanolo siano mediati dall'azione del suo primo metabolita, l'acetaldeide (Deitrich, 2004; Hunt, 1996; Quertemont et al., 2005a, 2005b; Smith et al., 1997; Zimatkin e Dietrich, 1997).

Numerosi studi supportano questa teoria secondo cui le proprietà rinforzanti dell'etanolo siano verosimilmente generate da una complessa serie di effetti, sia centrali che periferici, indotti sia dall'etanolo che dai suoi metaboliti.

L'Acetaldeide costituisce il primo metabolita dell'etanolo, e viene prodotta principalmente a livello periferico per opera dell'alcol deidrogenasi (ADH) e del citocromo P450 e, nel sistema nervoso centrale (SNC), dalla catalasi.

Il ruolo svolto dall'acetaldeide nella dipendenza da etanolo è controverso, inizialmente si riteneva avesse esclusivamente effetti avversivi, tanto da sfruttarne l'accumulo nella terapia di disintossicazione dell'alcolismo.

Questi effetti avversivi son stati ricondotti all'accumulo periferico di acetaldeide, infatti, il blocco dell'enzima aldeide deidrogenasi (ALDH), principale sistema metabolizzante l'acetaldeide in periferia, provoca una sindrome che rappresenta, ancora oggi, la strategia farmacologica più utilizzata allo scopo di scoraggiare l'assunzione di etanolo.

Il primo composto approvato nel trattamento dell'alcolismo dalla US FDA è stato il Tetraetiltiuramdisolfuro, meglio conosciuto col nome di disulfiram o commercialmente come Antabuse.

La principale azione farmacologica del disulfiram coinvolge l'enzima ALDH, responsabile della metabolizzazione periferica dell'acetaldeide ad acetato. Il disulfiram inibisce l'ALDH incrementando le concentrazioni di acetaldeide.

I sintomi indotti dalla contemporanea somministrazione di etanolo e disulfiram consistono in *flushing* facciale, sudorazione e leggero mal di testa e si presentano immediatamente dopo l'assunzione di etanolo. Con l'aumento dell'intensità si presentano nausea, tachicardia, palpitazioni, iperventilazione, ipotensione e dispnea. Vomito, depressione respiratoria e pressoria, collasso cardiovascolare, aritmie, infarto perdita di coscienza, convulsioni e morte sopraggiungono nelle intossicazioni più severe (Suh et al., 2006). In forte contrasto con questi dati Chevens nel 1953 osservò che alcuni pazienti traevano invece beneficio dall'assunzione di basse dosi di bevande alcoliche in concomitanza all'assunzione di disulfiram. Questa osservazione è stata in seguito confermata da altri lavori in cui si è visto che gli inibitori dell'ALDH, potenziavano gli effetti euforizzanti e piacevoli di basse dosi di etanolo (Brown et al., 1983).

Dopo gli studi sul disulfiram diverse teorie hanno sostenuto una connessione tra acetaldeide e alcolismo (Carpenter e MacLeod 1952; Davis e Walsh 1970; Griffiths et al. 1974; Myers e Veale 1969; Truitt e Walsh 1971). Quella più estrema sostiene che l'acetaldeide sia responsabile di tutti gli effetti associati all'etanolo e che l'alcolismo dovrebbe essere chiamato più propriamente acetaldeismo (Raskin 1975; Truitt e Walsh 1971). Al contrario altri studi sostengono che l'acetaldeide non abbia un ruolo significativo nel mediare gli effetti centrali dell'etanolo, in quanto solo minime tracce di acetaldeide sono state ritrovate nel liquido cerebrospinale e nel cervello dopo assunzione di etanolo (Eriksson et al. 1980; Pikkarainen et al. 1979; Kiianmaa and Virtanen 1978; Sippel 1974).

Questa ipotesi concorda con l'osservazione che l'acetaldeide sarebbe in grado di passare attraverso la barriera ematoencefalica solo ad alte concentrazioni (Eriksson 1977; Petersen and Tabakoff 1979; Sippel 1974; Tabakoff et al. 1976) suggerendo quindi, che l'acetaldeide non potrebbe contribuire agli effetti comportamentali e farmacologici dell'alcol. Successivamente con la dimostrazione della formazione dell'acetaldeide all'interno del SNC attraverso le catalasi è stata ripresa la teoria del ruolo dell'acetaldeide negli effetti biologici dell'etanolo (Cohen et al. 1980).

Affinché si possa sostenere il ruolo dell'acetaldeide negli effetti rinforzanti dell'etanolo è condizione imprescindibile che essa agisca all'interno del sistema nervoso centrale. In considerazione del fatto che il principale sistema metabolizzante l'etanolo, l'enzima ADH, non è presente all'interno del sistema nervoso centrale (SNC) ( Galter et al., 2003), la formazione locale di acetaldeide dopo assunzione di etanolo è stata a lungo tema di dibattito (Hunt, 1996; Hipólito et al., 2007; Deng and Deitrich, 2008). Inoltre, i due enzimi attivi a livello centrale, CYP2E1 e le catalasi hanno un ruolo secondario nella rimozione dell'etanolo dall'organismo in condizioni fisiologiche (Lieber, 2004), infatti, dopo somministrazione acuta di etanolo, il CYP2E1 sembra rimuovere dall'organismo solo il 3% circa del totale (Hipólito et al., 2007), inoltre l'inibizione della catalasi, determinata utilizzando il 3-amino-1,2,4-triazolo (ATZ), è stato dimostrato causare minime alterazione dei livelli periferici di etanolo (Aragon et al., 1989; Correa et al., 1999a,b, 2000; Sanchis-Segura et al., 1999a). D'altra parte, nonostante l'acetaldeide venga prodotta dal metabolismo periferico dell'etanolo anche ad alte concentrazioni il passaggio dal sangue al cervello è reso particolarmente difficoltoso a causa della presenza dell'ALDH sulla barriera ematoencefalica (Deitrich, 1987; Eriksson and Sippel, 1977; Hunt, 1996; Zimatkin, 1991). Inoltre l'ALDH presente nel fegato converte rapidamente l'acetaldeide in acetato, tanto che son state ritrovate concentrazioni ematiche molto basse di acetaldeide dopo somministrazione di dosi moderate di etanolo (Quertemont and Tambour, 2004). In aggiunta, sugli eritrociti è presente la stessa isoforma dell'ALDH predominante nel fegato (Deng and Deitrich, 2008), questa potrebbe contribuire alla metabolizzazione dell'acetaldeide che sfugge al metabolismo epatico.

La fonte più plausibile di acetaldeide all'interno del SNC è la metabolizzazione *in situ* dell'etanolo sopravvissuto al metabolismo periferico e giunto, come tale, all'interno del SNC, in accordo con questa idea è stato riportato l'incremento nel cervello degli enzimi metabolizzanti l'acetaldeide, dopo ripetute somministrazioni di etanolo, suggerendo che l'acetaldeide sia presente nel cervello dopo il consumo di etanolo (Amit et al., 1977), e che si formi direttamente nel

cervello ad opera delle catalasi (Cohen et al., 1980). Vari studi in seguito hanno dimostrato che l'etanolo viene metabolizzato ad acetaldeide negli omogenati di cervello di ratto (Aragon and Amit, 1993; Aragon et al., 1992; Gill et al., 1992; Zimatkin and Lindros, 1996; Zimatkin et al., 1998) e nelle colture di tessuto neuronale (Reddy et al., 1995; Eysseric et al., 1997; Hamby-Mason et al., 1997) attraverso l'azione perossidasi della catalasi. A conferma degli studi in vitro, anche studi in vivo hanno riportato che la somministrazione di inibitori delle catalasi previene gli effetti dell'etanolo (Aragon et al., 1991a), questo costituisce una conferma indiretta del ruolo della catalasi negli effetti dell'etanolo (Aragon et al., 1991a).

Studi di immunocistochimica hanno mostrato che la catalasi è concentrata in specifici nuclei (Moreno et al., 1995; Zimatkin and Lindros, 1996), questo suggerisce che l'acetaldeide potrebbe essere prodotta localmente in quantità farmacologicamente attive. Studi più recenti di micro dialisi hanno mostrato che l'inibizione farmacologica della catalasi porta una riduzione della quantità di acetaldeide nello striato (Jamal et al., 2007). Tuttavia, poiché parte dell'ossidazione dell'etanolo rimane comunque presente nonostante l'inibizione della catalasi, è necessario considerare il coinvolgimento dell'enzima CYP2E1 anche a livello celebrale, è infatti ampiamente dimostrata la sua presenza nel cervello umano (Miksys e Tyndale, 2004) e in diverse aree e tipi di cellule cerebrali nei roditori (Montoliu et al., 1995; Tindberg e Ingelman-Sundberg, 1996; Vaglini et al., 2004; Sanchez - Catalan et al., 2008). Inoltre l'inibizione farmacologica delle CYP2E1 riduce l'accumulo di acetaldeide negli omogenati di cervello di ratto incubati con etanolo (Zimatkin et al., 2006). Da questi studi emerge che il sistema delle catalasi sia responsabile del metabolismo cerebrale dell'etanolo per il 60%, e le CYP2E1 solo per il 20% (Zimatkin et al., 2006) altri sistemi di minore entità mediano la formazione della restante quantità.

## Effetti comportamentali dell'acetaldeide

Vari studi sostengono che l'acetaldeide, sia derivata dall'etanolo che di per se, sia in grado di indurre effetti motivazionali che comportamentali sia se somministrata perifericamente che a livello centrale (Quertemont et al., 2005; Correa et al., 2012).

Da numerosi studi scientifici emerge che l'acetaldeide svolge un ruolo chiave nel mediare le proprietà rinforzanti dell'etanolo (McBride et al., 2002; Quertemont et al., 2005; Font et al., 2006a; Peana et al., 2008; 2009, 2010b). Infatti, è stato dimostrato che il blocco dell'enzima alcol deidrogenasi tramite il 4-metil pirazolo (4-MP) previene non solo la *place preference* condizionata indotta dalla somministrazione intragastrica di etanolo ma riduce l'autosomministrazione orale di etanolo e la stimolazione del sistema mesolimbico (Foddai et al., 2004; Melis et al., 2007; Peana et al., 2008b). Inoltre, la *place-preference* condizionata e l'auto somministrazione orale indotte dall'etanolo sono state ridotte da molecole in grado di sequestrare l'acetaldeide come la D-penicillamina la cui azione si traduce in una riduzione dell'attività biologica dell'etanolo (Font et al., 2006a; Peana et al., 2008). Ancora, la somministrazione per via intracerebroventricolare di D-penicillamina si è rivelata utile nel prevenire il consumo volontario di etanolo nel ratto (Font et al., 2006b). Questi effetti possono essere attribuiti alla minore disponibilità di acetaldeide nel sistema nervoso centrale (Isse et al., 2005). Inoltre gli effetti comportamentali sono coerenti con gli studi di microdialisi nel nucleus accumbens dove si assiste, dopo pretrattamento con D-penicillamina, ad una riduzione del "release" di dopamina (DA). In particolare è stato osservato che la D-penicillamina previene l'attivazione della trasmissione dopaminergica e quindi il rilascio di DA nel *Nucleus Accumbens* in seguito alla somministrazione intragastrica di etanolo (Enrico et al., 2009). Numerosi altri studi hanno riportato che l'acetaldeide possiede effetti rinforzanti propri (Smith et al., 1984; Quertemont e De Witte, 2001), e come il nostro stesso gruppo di ricerca ha dimostrato, la somministrazione intragastrica di acetaldeide induce una *place-preference* condizionata e attiva la trasmissione dopaminergica (Meli et al., 2007; Peana et al., 2008; Enrico et al., 2009). Inoltre, i ratti si auto-somministrano l'acetaldeide per via orale (Peana

et al., 2010b) coerentemente con quanto già osservato da Myers et al., in cui l'acetaldeide viene autosomministrata per via endovenosa (Myers et al., 1982) o come dimostrato da altri ricercatori, in cui l'acetaldeide viene autosomministrata per via intracerebroventricolare e nella area ventrale tegmentale (VTA) (Brown et al., 1979; McBride et al., 2002; Takayama e Uyeno, 1985; Rodd-Henricks et al., 2002).

Inoltre, un'amminoacido non essenziale, la L-cisteina ha ridotto la *place preference* da etanolo e da acetaldeide somministrati per via intragastrica (Peana et al., 2009) e l'autosomministrazione orale di etanolo e acetaldeide (Peana et al., 2009; 2010; 2013). Questo potrebbe essere correlato alla diminuzione del *release* di DA nel *nucleus accumbens* in animali pretrattati con la L-cisteina prima del trattamento con etanolo e acetaldeide somministrati per via intragastrica. (Sirca et al., 2011). Il meccanismo con cui tale aminoacido agisce sull'etanolo e l'acetaldeide non è ancora noto ma si ritiene possa essere efficace in virtù del suo noto effetto antiossidante. In questo momento, il nostro team sta portando avanti diversi lavori per convalidare l'ipotesi che la L-cisteina possa stimolare il trasportatore cistina/glutamato, sotto regolato in diverse dipendenze (cocaina, marijuana, eroina ecc). Mediante tale meccanismo d'azione, ipotizziamo che la L-cisteina possa ripristinare il tono glutamatergico, alterato dopo trattamento con etanolo. La L-cisteina è stata proposta come sequestrante dell'acetaldeide solo *in vitro* (Nagasawa et al., 1987), per cui il suo meccanismo d'azione non può essere assimilabile a quello della D-penicillamina. I livelli ematici di acetaldeide non vengono alterati dal pretrattamento con L-cisteina sia in esperimenti di *self-administration* per l'etanolo che per l'acetaldeide (Peana et al., 2010; 2012) e questo risultato è coerente con quanto riportato da Nagasawa (1987). Ciò nonostante, i livelli ematici di etanolo ma non di acetaldeide si riducono in ratti pretrattati con L-cisteina in tests di *self-administration*. In questi esperimenti la L-cisteina, riducendo le varie fasi della *self-administration*, riduce l'intake con conseguente riduzione di etanolo ma non di acetaldeide nel sangue. In particolare la L-cisteina non altera la concentrazione di acetaldeide sia nel plasma che nel cervello. L'acetaldeide come riportato nell'introduzione è difficile da misurare perciò non possiamo e-

scudere un meccanismo di “sequestro” in vivo, contrariamente con quanto riportato da Nagasawa (1987).

## **Basi neurochimiche degli effetti dell'acetaldeide**

L'acetaldeide è responsabile di molti effetti farmacologici che non sono chiaramente distinguibili da quelli del suo precursore, l'etanolo.

Riguardo al meccanismo d'azione col quale l'acetaldeide medi questi effetti o li produca di per sé, non si conosce molto. Nessuna evidenza dimostra, infatti, che l'acetaldeide interagisca con gli stessi recettori su cui agisce l'etanolo. Essa sembra non interagire né con il recettore per il GABA<sub>A</sub>, né con quelli per il glutammato (Wang et al., 2000). In uno studio condotto su fette di cervelli di ratti “*ethanol-sensitive*”, l'acetaldeide sembra essere affine soltanto per il recettore  $\alpha 1$  della glicina e non per GABA<sub>A</sub>, NMDA o AMPA (Mascia et al., 2001). Molti lavori riportano che l'acetaldeide altera il turnover catecolaminergico del SNC (Barbaccia et al., 1982). In particolare, molti recenti lavori hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo del sistema mesolimbico dopaminergico nella mediazione dei probabili effetti rinforzanti dell'acetaldeide. Molte sostanze d'abuso, infatti, incluso l'etanolo, producono un incremento nelle concentrazioni di dopamina in molte regioni del sistema limbico, in particolare nella *shell* del *nucleus accumbens* (Di Chiara e Imperato, 1988; Carboni et al., 1989; Imperato e Di Chiara, 1986) Altro probabile meccanismo d'azione ipotizzato per l'acetaldeide è l'interazione con oppioidi endogeni. Infatti, a basse concentrazioni l'acetaldeide stimola la secrezione di  $\beta$ -endorfine similmente all'etanolo. Si è visto che l'aumento delle concentrazioni di  $\beta$ -endorfine, indotto dall'etanolo, è inibito dal blocco della catalasi indotto dal 3-ATZ, il che farebbe pensare che l'effetto dell'etanolo sia mediato dalla sua conversione in acetaldeide (Reddy et al., 1995). Ed inoltre, poiché le  $\beta$ -endorfine modulano l'attività dei neuroni dopaminergici nella VTA (Gianoulakis, 2004), l'aumento della concentrazione di tale neuropeptide potrebbe essere responsabile degli effetti stimolanti dell'acetaldeide sui neuroni dopaminergici, mediando in questo modo i suoi effetti di rinforzo.

L'acetaldeide inoltre interagendo col sistema catecolaminergico è capace di formare, con i vari neurotrasmettitori, addotti o prodotti di condensazione e polimerizzazione. L'acetaldeide ha la capacità di condensare con indolamine endogene per formare alcaloidi quali le tetraidro- $\beta$ -carboline (THBC) e le tetraidroisochinoline; e con la dopamina portando alla formazione di salsolinolo. Tali alcaloidi, in particolare il salsolinolo e la tetraidropapaverina, sembrano essere coinvolti nell'eziologia dell'abuso di alcol e negli effetti di rinforzo dell'etanolo (Davis e Walsh, 1970b).

## **L-cisteina**

La L-cisteina [Acido 2-R-ammino-3-mercapto propanoico] è l'enantiomero levogiro della cisteina, un amminoacido non essenziale per l'organismo umano, contenente un gruppo tiolico. Nel nostro organismo viene prodotta a partire da un altro amminoacido, la metionina, tramite una reazione di trans-metilazione, che trasforma la metionina in omocisteina, seguita dalla reazione di tran-solfurazione, che trasforma l'omocisteina in cisteina. In certe condizioni o periodi della vita (p. es. durante lo sviluppo) in caso di carenza di vitamina B e di alcolismo è necessario assumere la L-cisteina mediante la dieta, in quanto la sua produzione potrebbe essere inibita o ridotta. La cistina, costituita da due molecole di cisteina legate da un ponte disolfuro, è indispensabile per il processo di cheratinizzazione ed è presente in grandi quantità nello strato esterno dell'epidermide. Nell'animale si è dimostrato che un'alimentazione priva o povera di cistina determina una evidente diminuzione nella produzione di tessuto pilare.

La cisteina, insieme alla glicina e al glutammato, sono i peptidi che costituiscono la molecola del glutatione, caratterizzato dall'aver forti proprietà antiossidanti. La L-cisteina infatti ha avuto e ha tuttora un largo utilizzo come integratore alimentare per il suo elevato potere antiossidante e di rinforzo e protezione dei capelli.

Due gruppi -SH, posti in ambiente ossidante possono legarsi tramite un ponte disolfuro -S-S- perdendo una molecola di acqua. Questo legame fa sì che due unità di cisteina poste in punti di

versi della catena polipeptidica (o su due polipeptidi diversi) possano legarsi tra loro, ottenendo così le strutture terziaria e quaternaria della proteina, strutture da cui dipende l'azione biologica della proteina stessa.

Il derivato N-acetilico della cisteina, la N-acetil-cisteina (NAC) è usato in medicina come antidoto nell'avvelenamento cronico da metalli pesanti, dato che entra direttamente nella sintesi del glutatione. La NAC è utilizzata anche come mucolitico, per via del suo gruppo sulfidrilico capace di aprire i ponti disolfuro delle glicoproteine del muco, aumentandone la fluidità e favorendo la *clearance* muco-ciliare.

La L-cisteina che si trasforma ben presto in cistina svolge il suo effetto a livello del SNC in seguito all'attraversamento della barriera ematoencefalica che ha luogo grazie al suo legame con il trasportatore degli amminoacidi eccitatori (Chen e Swanson, 2003). Infatti, la NAC e la L-cisteina sono state, e sono tuttora, principali molecole oggetto di studio sui possibili meccanismi di prevenzione della fase di ricaduta nella tossicodipendenza. Vari studi hanno dimostrato che la somministrazione di NAC o L-cisteina riduce il desiderio di assunzione, e quindi la ricaduta in seguito ad un periodo di astinenza, di sostanze d'abuso come etanolo (Peano et al., 2010; 2013), cocaina (LaRowe et al., 2007; Markidian et al., 2007), cannabis (Gray et al., 2010) e nicotina (Schmaal et al., 2011).

Numerosi studi su modelli di auto somministrazione hanno dimostrato che la L-cisteina riduce significativamente l'assunzione di etanolo per via orale, nonché il comportamento di ricerca dello stesso (Peano et al., 2010; 2013). E' stato dimostrato che in vivo, la L-cisteina riduce efficacemente la letalità nel ratto indotta dall'acetaldeide (Sprince et al., 1974) e che previene, nell'uomo, il possibile contributo dell'acetaldeide (prodotta oltre che in seguito all'assunzione di etanolo anche in conseguenza dell'esposizione al fumo di tabacco), nella cancerogenesi nel tratto gastrointestinale, nonché nella cardiomiopatia dovuta ad abuso di bevande alcoliche (Salaspuro, 2007; Salaspuro et al., 2002 e 2006). Recenti ricerche hanno inoltre investigato l'effetto che la L-

cisteina svolge nelle proprietà di rinforzo dell'etanolo e quindi dell'acetaldeide nel ratto. Numerosi dati dimostrano che la somministrazione di L-cisteina previene la CPP indotta sia dall'etanolo sia dall'acetaldeide (Peana et al., 2009) nonché il comportamento di auto somministrazione di etanolo (Peana et al., 2010). La L-cisteina potrebbe quindi avere importanti effetti sulle proprietà neurobiologiche dell'etanolo (Sirca et al., 2011). Inoltre, al fine di chiarire le basi neurofarmacologiche della L-cisteina sulle proprietà comportamentali indotte dall'assunzione di etanolo e acetaldeide (Peana et al., 2009 e 2010), sono stati effettuati degli studi di microdialisi in vivo, per valutare il rilascio di DA a livello dell' *AcbSh*, in seguito a somministrazione intragastrica di etanolo e acetaldeide (Sirca et al., 2011). Il pretrattamento con L-cisteina (30 mg/kg, ip) annulla la stimolazione del rilascio di DA nella *shell* dell'*accumbens* del ratto, indotta da somministrazione di etanolo e acetaldeide, senza però alterare e influenzare i livelli basali di dopamina (Sirca et al., 2011). La stessa dose di L-cisteina, inoltre, non interferisce con il rilascio di dopamina, indotta dalla morfina, suggerendo quindi che il pretrattamento con questo amminoacido colpisce in particolare le proprietà stimolanti dell'etanolo, probabilmente formando un addotto stabile con acetaldeide, evitando così le sue proprietà stimolanti il rilascio di dopamina (Sirca et al., 2011).

La L-cisteina ha un ruolo fondamentale anche nei confronti della trasmissione glutammatergica, coinvolta nell'attivazione del sistema dopaminergico nella VTA (Deng et al., 2009; Xiao et al., 2009). Basse concentrazioni di L-cisteina inibiscono il rilascio a livello sinaptico di glutammato tramite un'interazione con gli autorecettori presinaptici mGluR (Croucher et al., 2001). Tuttavia, il blocco dei recettori NMDA nella VTA non impedisce direttamente il rilascio di dopamina nell'*accumbens* indotto da etanolo (Ericson et al., 2003). Nel sistema nervoso centrale, la concentrazione extracellulare del Glutammato è sotto il controllo di specifici trasportatori di membrana che permettono il mantenimento delle concentrazioni di glutammato al di sotto dei livelli neurotossici (Takahashi et al., 1997). Il rilascio e l'eliminazione del glutammato a livello sinaptico sono regolati da sistemi omeostatici che vengono racchiusi sotto la denominazione *glutamma-*

*te homeostasis* (Mulholland et al., 2008). La disregolazione della concentrazione di glutammato osservata dopo prolungati periodi di esposizione a farmaci d'abuso è associata a dei cambiamenti funzionali di componenti chiave senza un meccanismo di controllo omeostatico, incluso lo scambiatore cisteina-glutammato e il trasportatore del glutammato EAAT2/GLT-1 (Kathryn et al., 2010). La L-Cisteina è ossidata in cistina nel compartimento extracellulare nel SNC (Shih et al., 2001) e successivamente la cistina viene riassorbita tramite uno scambiatore  $\text{Na}^+$ -indipendente come lo scambiatore cistina-glutammato e un trasportatore ad alta affinità  $\text{Na}^+$ -dipendente per il glutammato (McBean, 2002). In realtà lo scambiatore antiporto cistina-glutammato favorisce il rilascio di glutammato non vescicolare nel compartimento extrasinaptico, il quale andrà a stimolare il recettore metabotropico per il glutammato (mGluR) nell'*accumbens* e nella corteccia prefrontale (Baker et al., 2002; Moran et al., 2005; Xi et al., 2002) regolando i livelli extracellulari di glutammato e dopamina (Baker et al., 2002).

Questo trasportatore rappresenta un sistema prevalentemente espresso a livello delle cellule gliali, che svolge un ruolo critico nella regolazione dei livelli extracellulari di glutammato (Baker et al., 2002). E' ampiamente espresso a livello cerebrale ed è responsabile del trasporto di cistina, quale precursore della biosintesi del glutatione (principale difesa cellulare nei confronti di stress ossidativo ad azione detossificante) (Griffith 1999; Sato et al., 2002). Lo scambiatore catalizza il rilascio di una molecola di glutammato in cambio del riassorbimento di una di cisteina, rispettando il rapporto stechiometrico di 1:1 (McBean, 2002); la ridotta funzione e/o l'espressione di tale scambiatore a livello dell'*accumbens* sembrano essere i principali motivi alla base della ridotta produzione di glutammato extracellulare in roditori sottoposti ad assunzione cronica di cocaina (Baker et al., 2003; Szumlinski et al., 2004).

## **Antagonisti oppioidergici**

### **Naltrexone**

Il naltrexone è un antagonista oppioide, congenere del naloxone, rispetto a quest'ultimo è attivo per via orale ed ha una più lunga durata d'azione (circa 24 ore).

Agisce come antagonista a lunga emivita degli oppioidi, sia spiazzandoli, sia impedendone l'accesso ai recettori. La disassuefazione dei tossicodipendenti costituisce la più importante indicazione all'uso del naltrexone.

Dopo assunzione per via orale, il picco plasmatico si ha dopo un'ora. L'assorbimento nel tratto gastroenterico è completo, e il farmaco viene metabolizzato a livello epatico con un importante effetto di primo passaggio. Il principale metabolita è il 6-b-naltrexolo, dotato di un ridotto effetto terapeutico.

Il naltrexone si lega scarsamente alle proteine plasmatiche (20,7%). Viene eliminato quasi completamente attraverso le urine; l'emivita di eliminazione di una dose singola è di circa 10,3 ore e quella del metabolita attivo 6-b-naltrexolo di 12,7 ore.

### **Naloxonazina**

La naloxonazina è un antagonista selettivo dei recettori  $\mu_1$ , inizialmente ha un effetto reversibile che diviene irreversibile dopo qualche ora, mentre dopo le 24 ore dalla somministrazione il blocco si estende anche ad altri sottotipi recettoriali.

## **Acido Alfa Lipoico**

L'acido alfa lipoico (1,2-dithiolane-3-pentanoic acid, ALA) è un cofattore essenziale per gli enzimi mitocondriali ed è stato descritto come un nuovo antiossidante biologico ed un potente radical scavenger (Somani et al., 2000).

L'ALA è un coenzima prodotto endogenamente che neutralizza varie specie reattive dell'ossigeno (ROS), chela metalli di transizione, previene i danni proteici e la perossidazione dei lipidi di membrana e attraverso l'iterazione con la vitamina C e il glutatione (Biewenga et al., 1997). Questo agente partecipa al riciclo della vitaina C ed E, incrementa i livelli di glutatione, e sopprime la glicazione non enzimatica (Suzuki et al., 1992).

L'ALA ha effetto protettivo nei confronti dei danni indotti dall'etanolo nel cervello legati alla sua capacità di ridurre la formazione di pro-ossidanti o incrementare il sequestro di queste specie reattive. (Packer et al., 1995; Pirlich et al., 2002; Shirpoor et al., 2008). Inoltre la somministrazione acuta di ALA migliora l'attività della glutatione perossidasi in differenti aree cerebrali del ratto e diminuisce la concentrazione dei ROS, specialmente della H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Bilska et al., 2007).

Anche se con obiettivi diversi, Mardones negli anni 50, riporta che l'ALA rituce l'assunzione volontaria di etanolo nei ratti (Mardones et al., 1954).

## Scopo della ricerca

Alla luce delle informazioni e delle considerazioni fatte nella parte introduttiva, con l'obbiettivo di caratterizzare gli effetti rinforzanti dell'acetaldeide e il suo possibile ruolo nella dipendenza da etanolo abbiamo articolato questo lavoro in più fasi.

Il nostro punto di partenza è stato dimostrare che l'acetaldeide viene autosomministrata per via orale e induce effetti rinforzanti propri, a questo punto ci siamo concentrati sui possibili meccanismi alla base di questi effetti e abbiamo utilizzato come strumento di indagine la L-cisteina. Abbiamo scelto di testare questa sostanza nei confronti dell'autosomministrazione di acetaldeide sulla base dei vari lavori che ne hanno attestato l'efficacia nei confronti degli effetti indotti dall'etanolo e dall'acetaldeide stessa. In particolare, la L-cisteina è stata testata sulla fase di a) acquisizione e mantenimento di un comportamento di auto somministrazione orale per l'acetaldeide; e b) sulla fase di *reinstatement* sull'*operandum* dopo una fase di estinzione per l'acetaldeide. In aggiunta abbiamo testato l'efficacia della L-cisteina sulle proprietà rinforzanti dell'acetaldeide tramite il *progressive ratio (PR)*. Nei nostri esperimenti è stato incluso anche il PR per l'etanolo, allo scopo di valutare direttamente le differenze rispetto all'acetaldeide nelle stesse condizioni sperimentali. Il *break point* costituisce un indice della motivazione dell'animale verso l'agente rinforzante, che nei nostri esperimenti è rappresentato da una soluzione allo 0.2 % (p/v) di acetaldeide e da una soluzione al 10% (v/v) di etanolo. Allo scopo di determinare se la L-cisteina potesse alterare la motivazione alla *self-administration* di sostanze non farmacologicamente rinforzanti, l'abbiamo testata, agli stessi dosaggi utilizzati nei confronti dell'etanolo e dell'acetaldeide, sull'auto-somministrazione di una soluzione di saccarina alla concentrazione dello 0.2% (p/v). In ogni fase della *self-administration* è stato registrato il numero dei *nose-pokes* inattivi come misura dei comportamenti non specifici.

Poiché il sistema oppioide è coinvolto negli effetti rinforzanti dell'etanolo, in una seconda fase del lavoro abbiamo utilizzato degli antagonisti oppioidergici sull'acetaldeide nelle diverse fasi della *self-administration*. A questo scopo abbiamo utilizzato il naltrexone e la naloxonazi-

na, rispettivamente, un antagonista non-selettivo e un antagonista selettivo per i recettori  $\mu 1$  degli oppioidi, in ratti addestrati ad auto somministrarsi acetaldeide (0,2% p/v). Anche in questo caso i due antagonisti sono stati testati sulle fasi di mantenimento e di *reinstatement* sull'operandum (*nose-poke*) conseguente ad una fase di estinzione per l'acetaldeide e sul PR. Inoltre, per testare la specificità del naltrexone e della naloxonazina, abbiamo testato questi antagonisti nei ratti addestrati ad auto-somministrarsi un non-farmaco d'abuso, la saccarina (0,05%). Abbiamo registrato le risposte sul *nose poke* inattivo in tutte le fasi del test in quanto sono indicativi di comportamenti non specifici

Alla luce di queste evidenze ci siamo concentrati sulla catalasi- $H_2O_2$  cerebrale, principale sistema enzimatico, responsabile dell'ossidazione dell'etanolo in acetaldeide a livello centrale (Zimatkina and Buben, 2007; Deng and Deitrich, 2008) nella *self administration* di etanolo, in considerazione dell'importante ruolo che l'acetaldeide gioca nelle proprietà motivazionali dell'etanolo. Con l'intento di arrivare a possibili nuovi farmaci, utili nella prevenzione e/o nel trattamento dell'alcolismo, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su un lavoro di Ledesma e Aragon (2012). Ledesma e Aragon hanno dimostrato che il decremento della concentrazione cerebrale di  $H_2O_2$  indotto dalla somministrazione di ALA inibisce l'attività locomotoria indotta dall'etanolo suggerendo che il sistema catalasi  $H_2O_2$  e la formazione di acetaldeide a livello centrale, svolge un ruolo negli effetti dell'etanolo (Ledesma and Aragon, 2012). L'enzima catalasi, utilizza l' $H_2O_2$  come co-substrato per formare il composto I (Cohen and Sinet, 1980). Numerose prove suggeriscono che il composto I sia il sistema maggiormente implicato nella produzione di acetaldeide dal metabolismo dell'etanolo nel cervello. Sembra dunque possibile che catalasi ed  $H_2O_2$  determinino la velocità di formazione dell'acetaldeide nel sistema nervoso centrale (SNC), (Ledesma e Aragon, 2012).

Considerando questi studi che suggeriscono che l' $H_2O_2$  cerebrale abbia un ruolo negli effetti comportamentali prodotti dall'etanolo (Pastor et al. 2002; Manrique et al. 2006), abbiamo ipotiz-

zato che la riduzione dei livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indotti dalla somministrazione di ALA, possano influenzare la self administration orale da l'etanolo.

Perciò in questa fase della ricerca abbiamo studiato l'effetto dell'acido alfa lipoico (ALA) sulla self administration orale di etanolo.

## **Materiali e metodi**

Il nostro studio è stato eseguito in conformità alla legge italiana DL 116, 1992, che consente la sperimentazione su animali da laboratorio solo dopo la presentazione e l'approvazione di un progetto di ricerca da parte del Ministero della Salute (Roma, Italia), e in stretto accordo con le direttive del Consiglio Europeo (n. 2007/526/ CE).

Ogni procedura è stata eseguita con l'obiettivo di minimizzare la sofferenza ed il disagio degli animali e di ridurre il più possibile il numero degli animali utilizzati.

### **Animali**

Per gli studi di *self administration* abbiamo utilizzato 72 ratti Wistar maschi (Harlan, Udine, Italia) del peso di 175-225g, i quali sono stati alloggiati in gruppi di due in gabbie in plexiglass (*home cage*) con libero accesso ad acqua e cibo.

Per gli studi di *drug discrimination* abbiamo utilizzato 18 ratti Sprague Dawley maschi (Harlan, Italy) i quali sono stati alloggiati singolarmente in gabbie di Plexiglass (*home cage*). Il peso corporeo degli animali è stato mantenuto approssimativamente costante intorno ai 325 g attraverso la regolazione dell'apporto calorico mantenendo un illimitato l'accesso all'acqua.

Le condizioni ambientali sono state monitorate e tenute sotto controllo (temperatura  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; umidità 60-65%) con un ciclo luce/buio nell'arco delle 12h (luce accesa dalle h 8:00 alle ore 20:00).

## Sostanze

L'acetaldeide ( $\geq 99,5\%$  - Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stata disciolta in acqua di rubinetto (*tap water*) come soluzioni peso su volume (p/v). Per evitarne l'evaporazione, abbiamo preparato le soluzioni mantenendo il *beaker* di preparazione sotto ghiaccio ( $0^{\circ}\text{C}$ ). Inoltre, l'acetaldeide è sempre stata utilizzata nella forma diluita, in modo da ridurre la tensione superficiale e aumentare la solvatazione per prevenirne così l'evaporazione e quindi la perdita dell'acetaldeide. Al fine di escludere la possibile formazione di polimeri dell'acetaldeide nel nostro set-up sperimentale, abbiamo analizzato tramite NMR la soluzione di acetaldeide in momenti diversi, 1, 4 e 6 ore dopo la preparazione.

Le soluzioni di etanolo (v/v) sono state ottenute per diluizione di etanolo al 95% (Farmacopea Statunitense National Formulary, 1995) con acqua del rubinetto.

La saccarina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stata disciolta in acqua di rubinetto fino ad una concentrazione dello, 0.2 e 0.05 % p/v. Tutte le soluzioni delle sostanze sono state preparate prima di ogni sessione operante.

La L-cisteina, acido (R)-2-ammino-3-mercaptopropionico cloro idrato, (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stata disciolta in una soluzione di Tris (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (0,3 M in acqua demineralizzata) con un pH finale di 7.4. La somministrazione per via intraperitoneale di L-cisteina (10-140 mg/kg/ml) o di soluzione salina è stata eseguita 30 minuti prima di ciascuna sessione operante di auto somministrazione orale. Tutte le diluizioni del farmaco sono state preparate giornalmente prima di ciascuna sessione di esperimento.

Il naltrexone, sotto forma di cloridrato, (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stato disciolto in una soluzione fisiologica (0,9% NaCl). Il naltrexone alle dosi di 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mg/kg/ml e la soluzione salina sono stati somministrati per via intraperitoneale 30 minuti prima di ogni sessione di *self-administration*.

La naloxonazina anch'essa sotto forma di cloridrato, (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (Dhawan et al., 1996) è stata disciolta in soluzione salina o fisiologica, e somministrata per via intraperito-

neale alle dosi di 10 e 15 mg/kg/ml, la somministrazione è stata effettuata 5 e 24 ore prima di ogni sessione di *self-administration*. Le concentrazioni sia del naltrexone che della naloxonazina sono state calcolate come basi libere. Le dosi di questi antagonisti, da noi utilizzate, sono state scelte sulla base delle proprietà farmacocinetiche di questi agenti estrapolate da precedenti lavori (Ciccocioppo et al., 2002; Lê et al., 1999; Pastor e Aragon, 2006; Arias et al., 2010).

L'ALA (Sigma Aldrich, Milano, Italia) è stato disciolto in una soluzione tampone, Tris (0,3 M, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) sino ad un pH finale di 7,4. Le somministrazioni intraperitoneali (ip) di salina (soluzione fisiologica 0,9%, corrispondenti a ALA 0), o dell'ALA (50, 62.5, 75, 87.5 e 100 mg/kg/ml), sono state effettuate 30 minuti prima di ogni sessione di *self-administration*. Le dosi di ALA sono state calcolate ed espresse come base libera e sono state scelte sulla base di precedenti risultati, in cui si è visto che queste dosi sono prive di effetti sedativi e di effetti sulla coordinazione motoria, ma hanno soppresso l'attività locomotoria indotta dall'etanolo.

## **Self administration**

### **Apparecchiatura per gli studi di *self administration***

In tutti gli esperimenti da noi condotti abbiamo utilizzato gabbie apposite per lo studio del comportamento operante, inserite all'interno di armadi ventilati e in condizioni ambientali controllate (Med Associates Inc. USA, Basile, Italia). Ogni box è dotato di un piccolo serbatoio che consente all'animale di bere (*drinking cup*), il quale può contenere fino a 0,5 ml di liquido, corrispondenti a 5 infusioni. La *drinking cup* è posizionata tra i due *nose-pokes*, sopra il pavimento al centro del pannello frontale del *box*; i *nose-pokes* si trovano a 3 cm di distanza alla destra ed alla sinistra della *drinking cup*.

Uno stimolo discriminante è situato al di sopra di ciascun *nose-poke*; su quello attivo una luce bianca, mentre al di sopra di quello inattivo una debole luce rossa. Solamente l'esplorazione del *nose-poke* attivo porta all'infusione e quindi alla somministrazione di 0,1 ml di soluzione.

Nell'ambito degli esperimenti, viene registrato sia il numero di *nose pokes* attivi che inattivi, in particolare il numero di *nose pokes* inattivi effettuati serve come controllo della specificità delle risposte all'interno dei box operanti. La disponibilità del liquido all'interno della *drinking cup* è segnalato dall'accensione della luce generale del box, situata in alto sulla parete della gabbia opposta alla *drinking cup*, che si accende soltanto durante l'infusione.

Dopo ciascuna infusione si ha un periodo di *time out* di 2 sec. durante il quale la luce bianca sopra il *nose-poke* attivo rimane spenta, ai *nose pokes* effettuati durante questo periodo non consegue alcuna infusione. Ai lati della *drinking cup* è stato posto un rilevatore ad infrarossi, il quale registra tutti gli accessi alla *drinking cup* durante le sessioni. I box sono collegati ad un *personal computer* dotato di un apposito *software* per la programmazione delle sessioni e per la registrazione dei dati nelle varie fasi della *self-administration*.

## **Protocollo sperimentale**

### **Acquisizione di un comportamento di auto somministrazione orale**

Gli studi di *self administration* orale prevedono una prima fase di acquisizione in cui gli animali, che non sono mai stati trattati con alcuna sostanza, apprendono come ottenere la soluzione di etanolo o di acetaldeide attraverso l'esplorazione dei *nose-pokes*. I ratti vengono addestrati per mezzo di un protocollo sperimentale che prevede un rapporto fisso (*fixed ratio*) uguale ad 1, in cui ad ogni *nose-poke* attivo esplorato segue una infusione pari a 0,1 ml di soluzione. Per i primi 3 giorni di *training* la disponibilità di acqua nella *home cage* è limitata a 5 minuti al giorno, questo allo scopo di facilitare l'acquisizione del comportamento operante in risposta agli effetti rinforzanti della soluzione. Il *training* prevede l'infusione della sostanza a concentrazione minima per i primi 6 giorni, a partire dal settimo giorno la concentrazione aumenta gradualmente ogni giorno. Nel caso del training con etanolo si parte da una soluzione al 5% (v/v) fino ad arrivare al

10 %; per quanto riguarda l'auto somministrazione di acetaldeide si è partiti da una concentrazione dello 0,1% (p/v), fino al raggiungimento di una concentrazione finale dello 0,2%.

Quando gli animali raggiungono un comportamento di ricerca stabile, cioè per almeno 3 sessioni il comportamento operante è costante, si considera raggiunta la fase di mantenimento. Di solito la stabilità si ottiene dopo circa 15 giorni dall'inizio del *training*. Anche in questa fase la durata delle sessioni è di 30 minuti, con un rapporto fisso pari a 1 (FR1) e sono condotte nelle medesime condizioni delle sessioni del *training*.

A questo punto si può considerare acquisito il comportamento operante e possono essere studiati i vari protocolli di rinforzo e di ricerca.

### **Estinzione e *reinstatement* del comportamento al bere (*drinking behavior*).**

Questo protocollo prevede, dopo il raggiungimento di una *baseline* stabile di auto somministrazione, una fase di estinzione del comportamento operante in cui non vi è più la consegna di acetaldeide, seguita da una fase ricaduta in cui viene resa nuovamente disponibile l'acetaldeide. Questo protocollo permette di studiare il comportamento di ricaduta al bere (*drinking behavior*). Ad eccezione per la presenza della sostanza, le sessioni sono identiche alla fase di *training*, per cui al *nose-poke* attivo segue la presentazione degli stimoli ambientali quali la luce della gabbia, il rumore della pompa di infusione e la luce bianca sopra il *nose-poke* attivo. La fase di estinzione dura cinque giorni consecutivi. Dopo l'ultima sessione di estinzione inizia la fase di *reinstatement*, in cui l'animale ha nuovamente a disposizione l'acetaldeide. Questa sessione dura sempre 30 minuti e viene condotta in condizioni identiche alle sessioni di mantenimento. Per questi esperimenti abbiamo osservato gli animali per 5 sessioni.

### ***Progressive ratio***

In base a questo protocollo, il numero di *nose-pokes* attivi necessari per la consegna della sostanza rinforzante aumenta sistematicamente. Il punto per cui l'animale smette di rispondere entro un

determinato periodo è definito “*break point*” o “punto di rottura” e rappresenta un indice motivazionale dell'animale a compiere il “lavoro” e quindi da una buona indicazione circa l'efficacia rinforzante di una sostanza d'abuso. Allo scopo di stabilire una *baseline* stabile di risposta al *progressive ratio* e per testare l'attendibilità degli esperimenti, i ratti sono stati sottoposti a due sessioni con questo protocollo di rinforzo, intervallate da due sessioni di normale *training* con FR1 (Richardson e Roberts, 1996; Arnold e Roberts, 1997; Besheer et al., 2008). Secondo il programma di *progressive ratio* il numero di *nose-poke* attivi necessari per ottenere un'infusione di acetaldeide aumenta di 1 ogni volta che un'infusione viene rilasciata, cioè per ottenere la prima infusione è necessario 1 *nose-poke*, 2 *nose-pokes* per ottenere la seconda infusione, 3 *nose-pokes* per la terza infusione e così via (Besheer et al., 2008). Le sessioni terminano quando intercorrono almeno 30 minuti dopo l'ultima infusione, tempo in cui l'animale si arresta (Richardson and Roberts, 1996; Arnold and Roberts, 1997).

### **Estinzione e ricaduta di un comportamento di ricerca (*reinstatement of seeking behavior*)**

Questo protocollo permette lo studio del comportamento di ricerca verso l'etanolo, e in particolare la ricaduta di un comportamento di ricerca indotto da un *priming* dopo una fase di estinzione. Questo tipo di esperimento si articola in tre fasi, dopo la prima fase di *training* per la *self-administration* orale, segue una seconda fase detta di estinzione del comportamento operante e infine la terza fase del ripristino del comportamento operante detta anche *reinstatement*.

Nella fase di *training* per la *self-administration*, i ratti sono stati addestrati ad un *fixed ratio* uguale ad 1 (FR1) in cui ad ogni *nose-poke* attivo segue un'infusione, in sessioni giornaliere della durata di 30 minuti. Questa fase di *training* a FR1 dura tra le 12 e le 15 sessioni. Quando i ratti raggiungono una *baseline* stabile di *self-administration* per almeno 3 giorni consecutivi, la *fixed ratio* viene portata a FR2, nella quale per ottenere l'infusione è necessaria l'esplorazione di 2 *nose-pokes* attivi. Al raggiungimento di una *baseline* stabile per 4-5 sessioni si passa ad una FR3

per circa 8-19 sessioni. Prima di passare al programma successivo è necessario che i ratti abbiano un comportamento ed un *intake* stabile per almeno 3 giorni consecutivi.

Una volta acquisito un comportamento stabile di *self-administration* con un programma a FR3, i ratti sono stati sottoposti ad un protocollo di estinzione, nel quale sia l'etanolo che gli stimoli ambientali sono stati rimossi (Maccioni et.al, 2008; Kuhn and Kobb,2010). Le sessioni di estinzione vengono portate avanti per 4-9 giorni fino a quando i ratti effettuano meno di 15 *nose-pokes* attivi, soddisfacendo in questo modo il criterio del programma in estinzione.

Durante le fasi di *training* ed estinzione i ratti sono stati pretrattati 30 minuti prima di ogni sessione operante per via intraperitoneale (i.p.), con soluzione salina, per abituarli ai successivi trattamenti.

L'ultima fase sperimentale è quella del *reinstatement* o ricaduta, dopo un periodo di estinzione, in cui sono stati effettuati i test.

La sessione di *reinstatement* inizia con la consegna non contingente (*priming*), nel nostro caso di 0,2 ml di etanolo al 10% (v/v) nella *drinking-cup*, seguita da un'unica infusione di 0,1 ml di etanolo al 10% (v/v) in seguito all'esplorazione del *nose-poke* attivo a FR3. Durante i restanti minuti della sessione, viene registrato il numero dei *nose-pokes* attivi fiutati ma non viene rilasciato etanolo (Wang et al., 2010).

L'esperimento è stato condotto utilizzando un protocollo sperimentale di *counterbalanced design*, con un risultato finale di 3 test per ratto. Il test di *reinstatement* è seguito da una settimana in cui riprendono il training a FR3 e riprendono rapidamente ad auto-somministrarsi l'etanolo, una volta raggiunta una *baseline* stabile di auto-somministrazione si può passare nuovamente alla fase di estinzione (Carnicella et al., 2008). Questa procedura di riacquisizione, tra due sessioni di estinzione e ricaduta, previene la possibile perdita dell'efficacia del *priming*, che può ridursi a causa di esposizioni ripetute, come dimostrato dal grado di ricaduta durante i tre tests.

### **Effetto della L-cisteina nei confronti della *self administration* di acetaldeide**

La L-cisteina è stata testata sull'auto somministrazione orale di acetaldeide in vari protocolli sperimentali. In particolare è stato studiato l'effetto della L-cisteina sull'acquisizione di un comportamento di auto somministrazione orale per l'acetaldeide. È stata somministrata la L-cisteina alle dosi di 0, 20 e 40 mg/kg per via intraperitoneale 30 minuti prima dell'inizio della sessione operante sin dal primo giorno di *training* per un periodo totale di 15. La L-cisteina è stata testata nella fase di mantenimento alle dosi di 0, 80 e 100 mg/kg, 30 minuti prima di ogni sessione operante per 2 giorni (2 sessioni), e sulla fase di ricaduta al bere dopo un breve periodo di estinzione. I ratti sono stati pretrattati per via intraperitoneale con L-cisteina alle dosi di 0, 100, 120 e 140 mg/kg, 30 minuti prima della sessione operante, a partire dal giorno seguente l'ultima sessione di estinzione, ogni dose è stata testata per 5 giorni. Gli esperimenti sono stati condotti ogni dieci giorni, usando un *Latin Square counterbalanced design* utilizzando 6-8 animali per ogni dose studiata.

L-cisteina è stata testata inoltre sul *progressive ratio* per l'acetaldeide e per l'etanolo alle dosi di 0, 100, 120 e 140 mg/kg, utilizzando un *Latin Square counterbalanced design* impiegando 6-8 animali per ogni dose studiata. Gli esperimenti con la L-cisteina sono stati condotti ad intervalli di 7 giorni. Tra una sessione di test *progressive ratio* e l'altra sono state eseguite due sessioni di *drug-free* in cui abbiamo constatato che la *self-administration* (*intake* e *behavior*) torna rapidamente ai livelli basali, ma sono necessarie due sessioni per assicurare la stabilità della risposta.

## **Trattamenti con naltrexone e naloxonazina nei confronti della *self administration* di acetaldeide**

Abbiamo testato degli antagonisti del sistema oppioide nei confronti delle varie fasi dell'auto somministrazione di acetaldeide, in particolare sulla fase di mantenimento, al raggiungimento di una risposta stabile, i ratti sono stati pretrattati per via intraperitoneale con il naltrexone alle dosi di 0,2; 0,4 e 0,8 mg/kg per cinque giorni (5 sessioni). Le dosi di naltrexone sono state testate utilizzando un "*Latin square design*" impiegando 6-8 animali. Le somministrazioni delle varie dosi di naltrexone sono state intervallate da almeno due giorni in cui non è stato somministrato alcun farmaco (*wash out*).

Inoltre, sulla fase di ricaduta al bere acetaldeide dopo un breve periodo di estinzione, abbiamo testato il naltrexone alle dosi di 0,2; 0,4; 0,8 mg/kg . Le dosi somministrate sono state assegnate ad ogni ratto in modo casuale e testate ognuna per cinque giorni (5 sessioni) . Gli esperimenti sono stati condotti ogni dieci giorni, usando un *Latin Square counterbalanced design* utilizzando 6-8 animali per ogni dose studiata.

Il naltrexone è stato testato nei confronti del *progressivo ratio* alle dosi di 0,4 e 0,8 mg/kg, utilizzando un *Latin Square counterbalanced design* impiegando 6-8 animali per ogni dose studiata. Gli esperimenti con il naltrexone sono stati condotti a intervalli di 7 giorni. Tra una sessione di test *progressive ratio* e l'altra sono state eseguite due sessioni di *drug-free* in cui abbiamo constatato che la *self-administration* torna rapidamente ai livelli basali, ma sono necessarie due sessioni per assicurare la stabilità della risposta. La risposta al PR1 è stata nuovamente valutata per determinare se i "*break point*" fossero cambiati dopo il test con il naltrexone.

La naloxonazina è stata testata sulla fase di mantenimento alle dosi di 10 e 15 mg/kg, 5 e 24 ore prima di ogni sessione di *self-administration* per l'acetaldeide (0,2%). Ogni sessione della durata di 30 minuti ha mantenuto le stesse condizioni del *training* a FR1. Entrambe le dosi di naloxonazina sono state testate utilizzando n = 5-6 animali.

### **Effetto dell'ALA nei confronti della *self administration* di etanolo**

L'acido alfa lipoico (ALA) è stato testato su varie fasi della *self administration* per l'etanolo, in particolare sulla fase di mantenimento alle dosi di 50, 62.5, 75, 87.5 e 100 mg/kg/ml, per una sola sessione. Questa sessione è stata condotta nelle medesime condizioni del *training* a FR1.

Le dosi di ALA sono state testate utilizzando un *Latin square design* impiegando 6-8 animali per gruppo. I vari tests con ALA son stati intervallati da almeno due sessioni senza trattamenti farmacologici, durante le quali abbiamo constatato che il comportamento operante ritorna ai livelli della fase di mantenimento già il giorno successivo al test, ma sono state necessarie due sessioni per assicurare una *baseline* di risposta stabile.

Per testare la validità dell'ALA nei confronti delle proprietà motivazionali dell'etanolo, abbiamo testato l'ALA alle dosi di 62.5 e 75 mg/kg, sul break point per l'etanolo. I tests sono stati effettuati utilizzando un "*Latin square counterbalanced design*", con 6-8 animali per gruppo.

L'ALA è stato testato sul reinstatement del comportamento di ricerca indotto da un priming di etanolo. Dopo una fase di estinzione, i ratti sono stati divisi in tre gruppi, il primo o gruppo di controllo è stato pretrattato con una soluzione salina (ALA 0), mentre gli altri due gruppi son stati pretrattati con ALA alle dosi di 62.5 mg/kg e 75 mg/kg, rispettivamente. Tutti i pretrattamenti sono stati effettuati 30 minuti prima di ciascuna sessione di reinstatement.

### **Self administration di saccarina**

#### **Acquisizione di un comportamento operante di auto somministrazione orale per la saccarina**

Anche nel *training* di auto somministrazione orale per la saccarina, per i primi tre giorni di *training* con la saccarina (0,2% p/v o 0.05%), la disponibilità della *tap water* nella *home cage* è stata limitata a cinque minuti al giorno dopo ogni sessione allo scopo di facilitare l'acquisizione del comportamento operante. Durante questo periodo, ad ogni esplorazione del *nose-poke* attivo segue un infusione della soluzione di saccarina. Dopo i primi tre giorni la *tap*

*water* è stata resa completamente disponibile nella *home cage* e per i successivi tre giorni si è continuato con l'auto somministrazione di saccarina, sono stati necessari 6 giorni per il raggiungimento di una baseline stabile per l'auto somministrazione orale di saccarina, questa fase è detta mantenimento. Una volta raggiunta una *baseline* stabile di auto somministrazione, gli animali passano alla fase di estinzione in cui non vi è più la consegna della soluzione di saccarina nella *drinking-cup*. Le sessioni sono identiche alla fase di *training* per cui al *nose-poke* attivo segue la presentazione degli stimoli ambientali quali la luce della gabbia, il rumore della pompa di infusione e la luce bianca sopra il *nose-poke* attivo. La fase di estinzione dura cinque giorni consecutivi. L'effetto da deprivazione è stato studiato a partire dal giorno seguente l'ultima sessione di estinzione. Questa sessione dura sempre 30 minuti e viene condotta in condizioni identiche alle sessioni di mantenimento per l'intera durata della fase (5 giorni)

### **Trattamenti con L-cisteina**

La L-cisteina è stata testata nei confronti della self administration da saccarina (0.2%) nella fase di acquisizione sono state utilizzate le dosi di 0 e 40 mg/kg, nella fase di mantenimento le dosi di 0, 100 e 120 mg/kg e, nella fase di *reinstatement* del *drinking behavior* le dosi di 0, 100 e 120 mg/kg. I trattamenti son stati effettuati per via intraperitoneale 30 minuti prima delle sessioni operanti. Ogni sessione è durata 30 minuti ed è stata condotta nelle stesse condizioni delle sessioni di auto somministrazione con fixed ratio 1. La L-cisteina è stata somministrata per tutta la durata del training nel caso dei test sull'acquisizione.

### **Trattamenti con naltrexone e naloxonazina**

Il naltrexone è stato testato nei confronti della fase di mantenimento dell'autosomministrazione di saccarina alle dosi di 0,4 e/o 0,8 mg/kg per tre sessioni giornaliere, la naloxonazina alle dosi di 10 e 15 mg/kg, per una sessione/giorno, 5 e 24 ore prima della sessione di auto somministrazione di saccarina. Le dosi di naltrexone e naloxonazina so-

no state testate utilizzando 16 animali. Gli esperimenti con la naloxonazina sono stati eseguiti alla fine. la somministrazione di ciascuno dei due antagonisti è stata intervallata da due sessioni in cui non è stato somministrato alcun farmaco.

### **Trattamenti con ALA**

L'ALA è stato testato nei confronti della fase di mantenimento dell'auto somministrazione di saccarina (0.05%) alle dosi di 0 e 62.5 mg/kg, 30 minuti prima della sessione.

In tutte le fasi sperimentali abbiamo registrato il numero di *nose-pokes* inattivi esplorati durante tutte le sessioni di *self-administration* come indice comportamentale di una risposta non specifica.

### **Analisi statistica**

#### **Trattamenti con L-cisteina**

I dati della fase di acquisizione della self administration orale per l'acetaldeide e la saccarina sono stati analizzati per mezzo dell'analisi della varianza ANOVA a due vie per misure ripetute, al fine di analizzare le risposte ai nose-pokes attivi durante ciascuna sessione.

La discriminazione tra i nose-pokes è un fattore chiave per la distinzione tra il comportamento contingente al rinforzo e un generale incremento o decremento dell'attività locomotoria. Per ogni dose di L-cisteina testata, è stata analizzata la discriminazione tra i nose-pokes attivi e inattivi all'interno di ogni sessione. In presenza di differenze statisticamente significative (valori di  $p < 0,05$ ) è stato effettuato il post-hoc test (contrast)

#### **Trattamenti con naltrexone e naloxonazina**

Per quanto riguarda l'analisi dei dati, relativi alla fase di mantenimento della *self-administration* di acetaldeide e saccarina sono state prese in considerazione le medie di tre sessioni consecutive,

ovvero, le ultime tre sessioni con soluzione salina e le prime tre sessioni con le due dosi di nal-trexone. Questo ha permesso di ovviare alla complessità del disegno sperimentale.

Per la naloxonazina, è stata presa in considerazione l'ultima sessione con la soluzione salina e la prima sessione con ciascuna delle due dosi studiate. I dati sono stati esaminati per mezzo dell'analisi della varianza (ANOVA) a due vie per misure ripetute. Inoltre, è stata effettuata l'analisi della discriminazione tra i *nose-poke* attivi e inattivi, fondamentale in quanto rappresenta un fattore chiave per la distinzione tra il comportamento contingente al rinforzo o un generale incremento o decremento dell'attività locomotoria. In presenza di differenze statisticamente significative (valori di  $P < 0,05$ ) è stato effettuato il Tukey's post-hoc test.

Poiché gli effetti dell'estinzione e della deprivazione sono strettamente correlati al soggetto sperimentale, l'analisi statistica si è focalizzata sui fattori interni al gruppo come le alterazioni delle risposte ai *nose-pokes* e la discriminazione tra i *nose-pokes* stessi. I dati sono stati analizzati tramite l'ANOVA a due vie per misure ripetute.

Tutti i valori rappresentano la media ( $\pm$  SEM) delle ultime tre sessioni consecutive nella fase di mantenimento, le prime tre della fase di estinzione e le prime tre nella fase di *deprivation effect*. In presenza di differenze statisticamente significative (valori di  $P < 0,05$ ) è stato effettuato il Tukey's post-hoc test.

Il *break point* inteso come numero di infusioni ottenute prima del termine della sessione è stato analizzato utilizzando l'ANOVA a due vie per misure ripetute (tempo). In presenza di differenze statisticamente significative (valori di  $p < 0,05$ ) è stato effettuato il Tukey's post-hoc test. L'esplorazione dei *nose-poke* inattivi durante le fasi del test di *progressive ratio* è stata analizzata tramite l'ANOVA a una via. In presenza di differenze statisticamente significative (valori di  $P < 0,05$ ) è stato effettuato il Tukey's post-hoc test.

## **Trattamenti con ALA**

Per l'analisi dei dati relativi alle fasi di mantenimento e di *reinstatement* indotto da *priming* della *self-administration* di etanolo, come anche per il mantenimento della *self-administration* di sacarina, i risultati sono stati riportati come  $media \pm SEM$  (errore medio standard). Per i dati dell'ALA, è stata presa in considerazione l'ultima sessione con soluzione salina e la prima sessione con le due dosi di ALA testate. I dati sono stati esaminati con l'ANOVA a due vie per misure ripetute. Inoltre, è stata effettuata l'analisi della discriminazione tra i *nose-pokes* attivi ed inattivi per ogni trattamento in presenza di differenze statisticamente significative (valori di  $p < 0.05$ ), è stato effettuato il test di Tukey's *post-hoc*.

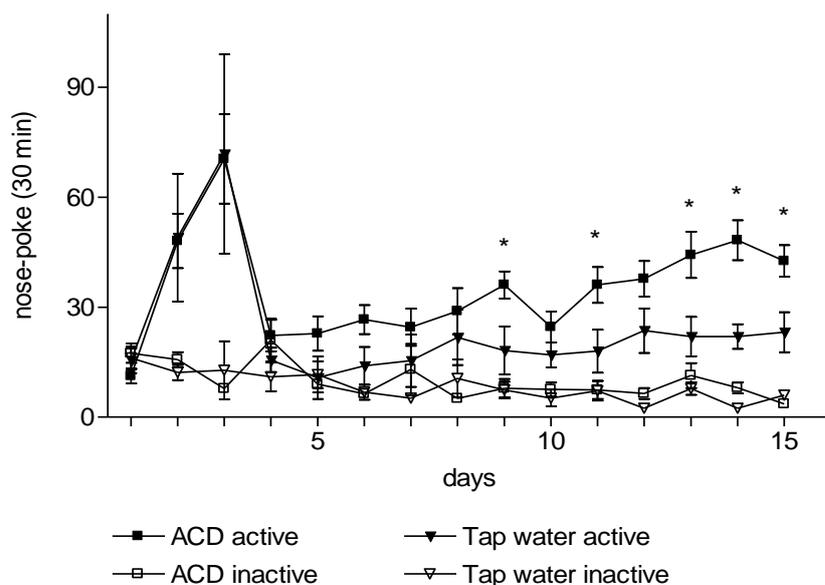
Il *break point* per l'etanolo, inteso come numero di infusioni ottenute prima del termine della sessione è stato analizzato utilizzando l'ANOVA ad una via. L'esplorazione dei *nose-pokes* inattivi durante le fasi del test di *progressive ratio* è stata analizzata tramite l'ANOVA ad una via. In presenza di differenze statisticamente significative (valori di  $P < 0.05$ ) è stato effettuato il *Tukey's post-hoc test*.

## Risultati

### *Self administration* di Acetaldeide

#### Acquisizione di un comportamento di auto somministrazione orale per l'acetaldeide

Durante la sessione di acquisizione, i ratti ( $n=11$ ) che si sono autosomministrati l'acetaldeide hanno effettuato un maggior numero di *nose-pokes* attivi rispetto al gruppo che si è autosomministrato tap water ( $N=5$ ) (Fig. 1) a partire dal nono giorno di *training*. In particolare, si è visto un significativo effetto di gruppo per quanto riguarda i *nose-pokes* effettuati durante i nove giorni con acetaldeide rispetto alla tap water [ $F(1,14)=4,69$ ,  $p=0,048$ ]; un significativo effetto di sessione [ $F(14,196)=8,92$ ,  $p<0.00001$ ] ma non si sono viste interazioni gruppo x sessione. Gli animali addestrati ad autosomministrarsi l'acetaldeide hanno mostrato (Fig. 2), una significativa discriminazione tra i *nose-pokes* attivi ed inattivi per la maggior parte delle sessioni durante tutte le fasi di acquisizione [Wilks' Lambda: 0,000793; Rao's R: 420.1407;  $p<0,0001$ ; analisi MANOVA a una via].

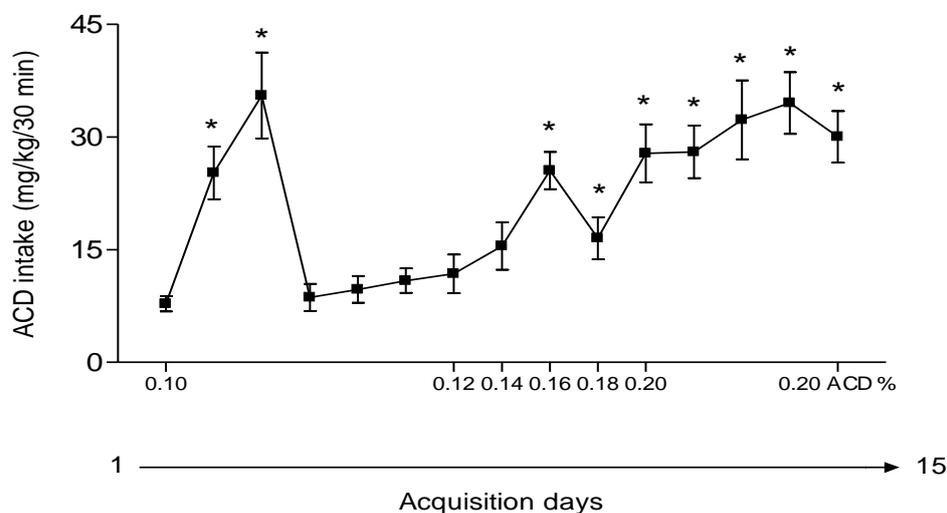


**Figura.1** Sviluppo di un comportamento di auto somministrazione orale per l'acetaldeide. Risposte per ogni sessione misurate come numero di nose-poke attivi e inattivi durante il training di acquisizione per tap water e acetaldeide.

\* indica una differenza statisticamente significativa tra i nose pokes attivi di tap water e acetaldeide (ANOVA a due vie per misure ripetute seguita dal test post hoc, tukey)

In aggiunta, la Figura 2 mostra l'*intake* del gruppo che si è autosomministrato l'acetaldeide in funzione del numero dei *nose-pokes* attivi esplorati o fiutati. Infatti per gli animali che si sono somministrati l'acetaldeide, la ANOVA a una via ha mostrato un significativo effetto di *intake* (mg/kg) durante le quindici sessioni di acquisizione [ $F(14,150)=9,01$ ,  $p<0,00001$ ]. Dopo nove giorni di *self-administration* con acetaldeide dove le concentrazioni della soluzione vanno dallo 0,16 allo 0,2%, gli animali hanno consumato una maggiore quantità di acetaldeide (che va da  $16,51\pm 2,80$  a  $34,51\pm 4,10$  mg/kg/30 min) rispetto alle prime otto sessioni, a partire dal quarto giorno, da  $8,64\pm 1,79$  a  $15,48\pm 3,15$  mg/kg/30 min). L'*intake* di acetaldeide dopo l'undicesima sessione rimane stabile. Si è misurato inoltre il rapporto tra accessi alla drinking cup mediante un rivelatore ad infrarossi durante il periodo di time-out, (85%) rispetto alle infusioni totali, e si è constatato inoltre che gli accessi totali alla drinking cup durante l'intera

sessione sono stati del 170% rispetto alle infusioni totali. Questa misurazione è indicativa del fatto che i ratti hanno effettivamente bevuto.

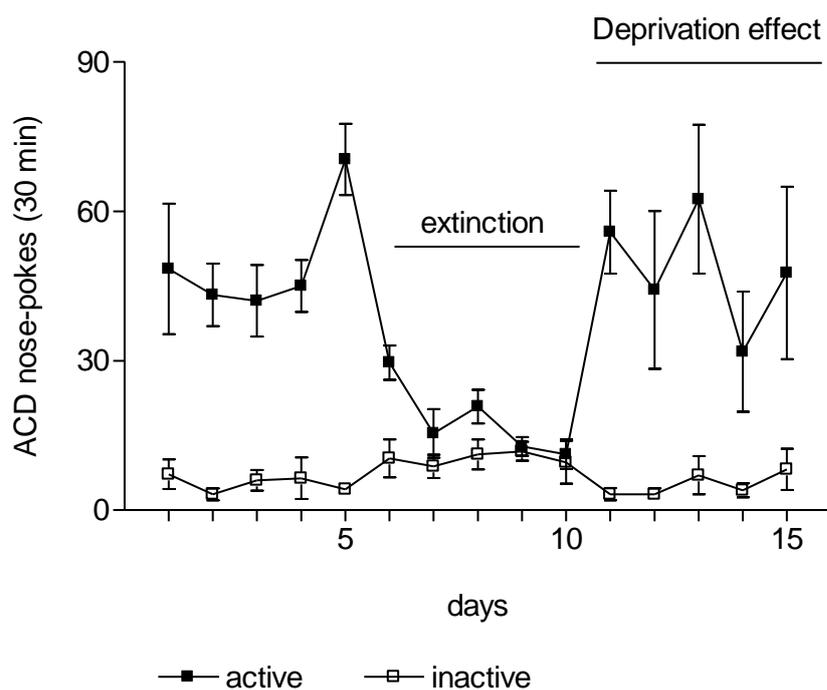


**Figura 2** Intake, espresso come la media  $\pm$  l'errore standard, di acetaldeide espresso in mg/kg per sessione (30 min). \* indica  $p < 0.05$  rispetto al 1° e 4° giorno durante le sessioni con acetaldeide. (ANOVA a una via e post hoc test tukey)

### Effetti comportamentali della deprivazione dopo un'estinzione da acetaldeide

Dopo che gli animali hanno raggiunto una *base-line* stabile di auto somministrazione di acetaldeide sono stati sottoposti ad un periodo di estinzione di cinque giorni. Dopo questo periodo di estinzione i ratti ritrovano l'acetaldeide dopo avere completato l'*operandum*, ovvero dopo aver fiutato i *nose-pokes* attivi sarà attivata la pompa di infusione che fornisce la soluzione di acetaldeide allo 0,2%. Il numero di *nose-poke* attivi effettuati in questa fase è un indice del comportamento motivazionale per il bere l'acetaldeide. Questo tipo di protocollo è stato usato principalmente per indagare sugli effetti indotti dall'acetaldeide in seguito alla deprivazione in animali addestrati ad autosomministrarsi l'acetaldeide. Dopo il periodo di estinzione, successivo a 15 giorni di *self-administration* i ratti sono stati esposti a condizioni identiche a quelle del training con una soluzione di acetaldeide allo 0,2%. Durante queste sessioni i ratti hanno

risposto effettuando un maggior numero di nose-pokes attivi rispetto a quelli inattivi. La MANOVA su questi dati ha mostrato che gli animali discriminano significativamente tra nose-pokes attivi e quelli inattivi, sia prima [Wilks' Lambda: 0,031; Rao's R: 25,0065;  $p=0,004$ ], che dopo la fase di estinzione ma non durante i cinque giorni di estinzione, quando la *drinking cup* è vuota [Wilks' Lambda: 0,023; Rao's R: 33,732;  $p=0,002$ ], (Fig.4).



**Figura. 4** Effetti della deprivazione dopo 5 giorni di estinzione dall'acetaldeide. Il grafico mostra il numero di nose pokes attivi e inattivi espresso come media  $\pm$  l'errore standard durante ogni sessione (30 minuti) la discriminazione tra nose-pokes attivi e inattivi è statisticamente significativa sia prima [Wilks' Lambda: 0,031; Rao's R: 25,0065;  $p=0,004$ ], che dopo la sessione di estinzione [Wilks' Lambda: 0,023; Rao's R: 33,732;  $p=0,002$ ], ma non durante i cinque giorni di estinzione (MANOVA).

## **Effetti della L-Cisteina sulla *Self administration* di Acetaldeide**

### **Effetto della L-Cisteina sull'acquisizione di un comportamento di *Self-Administration* orale per l'acetaldeide**

La figura 5, i pannelli a e b mostra l'acquisizione del comportamento di *self-administration* orale per l'acetaldeide e l'effetto della L-cisteina (0.20 e 0.40 mg/kg), somministrata 30 minuti prima di ogni sessione di lavoro per tutti i 15 giorni di acquisizione. L'analisi della varianza (ANOVA) a due vie condotta su questi dati ha rivelato un effetto statisticamente significativo del pretrattamento [ $F(2,18)=7.17$ ,  $p=0,0051$ ], di *nose-pokes* [ $F(29,522)=13,66$ ,  $p<0,00001$ ] ed una significativa interazione tra il pretrattamento ed il numero dei *nose-pokes* durante ogni sessione [ $F(58,522)=13.66$ ,  $p<0.00001$ ]. Durante le sessioni di acquisizione per la *self-administration* orale di acetaldeide (Fig.5, pannelli a e b), i ratti pretrattati con salina hanno effettuato un numero di *nose-pokes* attivi maggiore rispetto a quelli inattivi. In particolare, a partire dal nono giorno di acquisizione, si può notare una discriminazione tra i *nose-pokes* attivi, ai quali è associata l'infusione di acetaldeide, rispetto ai *nose-pokes* inattivi, la cui attivazione non porta a nessun effetto. Il post-hoc test ha indicato che la dose di 20 mg/kg di L-cisteina non risulta efficace sulla riduzione dei *nose-pokes* attivi nella *self-administration* di acetaldeide (Fig.5, pannello a).

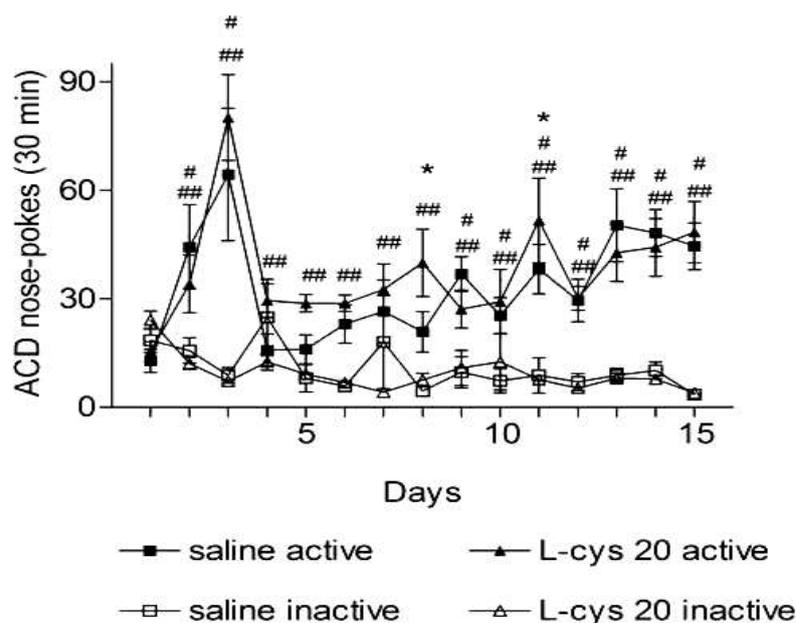
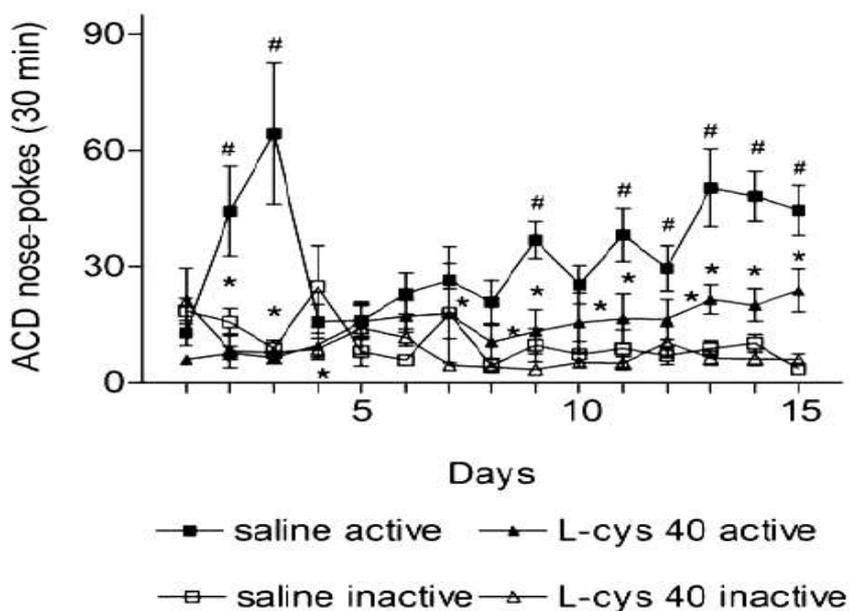


Figura 5 pannello a Effetto della L-cisteina (20 mg/Kg) sull'acquisizione di un comportamento di auto somministrazione orale per l'acetaldeide il grafico mostra il numero di nose pokes attivi e inattivi, espresso come media  $\pm$  l'errore standard, per ogni sessione operante (30 min). \* indica una differenza statisticamente significativa tra i nose pokes attivi del gruppo trattato con L-Cisteina e il gruppo trattato con salina (ANOVA a due vie per misure ripetute) # (salina) e ## (L-cisteina) indica una differenza statisticamente significativa tra i nose pokes attivi e quelli inattivi (ANOVA a due vie per misure ripetute, planned comparisons post hoc test;  $p < 0,05$ )

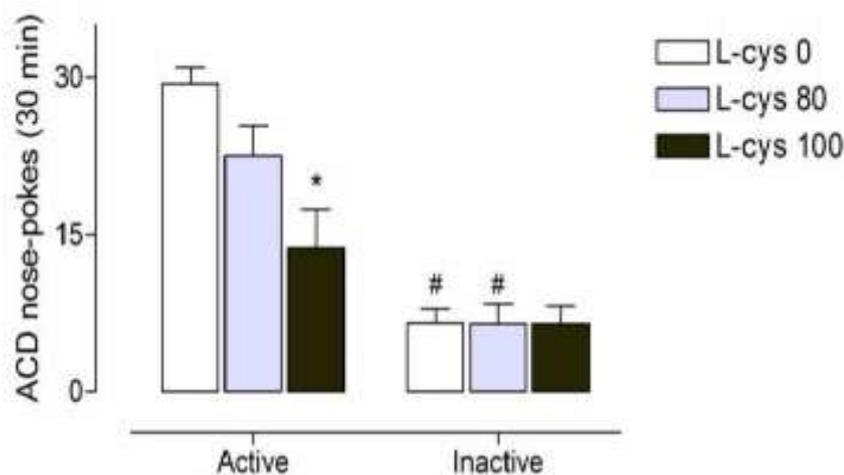
Invece una dose più alta di L-cisteina (40 mg/kg) è più attiva, riducendo significativamente il numero dei *nose-pokes* attivi per l'acetaldeide nella maggior parte delle sessioni (Fig.5 pannello a). Questa dose ha inoltre significativamente ridotto la discriminazione dei *nose-pokes* per quanto riguarda l'autosomministrazione del gruppo acetaldeide rispetto al gruppo della salina. Il pretrattamento con le varie dosi di L-cisteina non ha alterato invece il comportamento operante per l'auto somministrazione di *tap water* [ $F(3,44) = 0.92, p > 0.05$ ] (dati non mostrati), così come non ha modificato il numero di *nose-pokes* inattivi del gruppo pretrattato con la salina, indicando così un'assenza di attivazione comportamentale non specifica, così come un'assenza di attivazione o riduzione comportamentale non specifica, così come un'assenza di effetti stimolanti o di diminuzione dell'attività locomotoria degli animali (Fig.5, pannello pannello a e b).



**Figura 5** pannello b Effetto della L-cisteina (40 mg/Kg) sull'acquisizione di un comportamento di auto somministrazione orale per l'acetaldeide il grafico mostra il numero di nose pokes attivi e inattivi, espresso come media  $\pm$  l'errore standard, per ogni sessione operante (30 min). \* indica una differenza statisticamente significativa tra i nose pokes attivi del gruppo trattato con L-Cisteina e il gruppo trattato con salina (ANOVA a due vie per misure ripetute) # (salina) e ## (L-cisteina) indica una differenza statisticamente significativa tra i nose pokes attivi e quelli inattivi (ANOVA a due vie per misure ripetute, planned comparisons post hoc test;  $p < 0,05$ )

### Effetto della L-Cisteina sulla fase di mantenimento di un comportamento di *Self-Administration* orale per l'acetaldeide

La fase di mantenimento indica l'andamento dell'auto somministrazione per via orale dell'acetaldeide. Le medie riguardanti la baseline (Media  $\pm$  E.S.) per i due giorni precedent i test con L-cisteina (0, 80 e 100 mg/kg) sulla autosomministrazione di acetaldeide sono risultate le seguenti:  $28,69 \pm 2,20$ ;  $29,98 \pm 2,17$  (nose-pokes attivi). La figura 6 mostra che la L-cisteina ha ridotto significativamente il numero di nose-pokes attivi per acetaldeide.



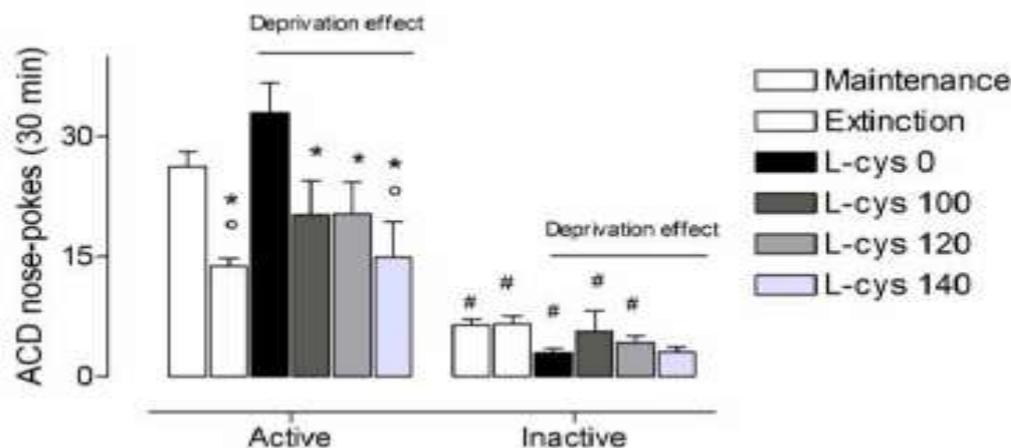
**Figura 6** Il grafico mostra la media  $\pm$  l'errore standard del numero dei nose-pokes attivi ed inattivi nell'auto somministrazione di acetaldeide (0,2%) in seguito al pretrattamento con L-cisteina alle dosi di 0; 80 e 100 mg/kg. Tutti i dati rappresentano la media di 2 sessioni consecutive, in particolare sono state prese in considerazione le ultime 2 sessioni nella fase di mantenimento e le prime 2 sessioni dei trattamenti con L-cisteina.

\* indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di nose-pokes effettuati dai gruppi trattati con L-cisteina rispetto al gruppo di controllo L.-cisteina 0 mg/kg o soluzione salina. # indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di nose-pokes attivi ed inattivi all'interno dello stesso gruppo. I dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA 2 way) seguita dal Tukey's post hoc test. ( $P < 0,05$ ).

L'ANOVA a 2 vie per misure ripetute ha mostrato un effetto statisticamente significativo per quanto riguarda il pretrattamento [ $F(2,95)=4,76$ ,  $p=0,011$ ], per il numero di *nose-pokes* esplorati x sessione [ $F(1,95)=62,37$ ,  $p < 0,00001$ ] ed una significativa interazione tra pretrattamento e numero di *nose-pokes* esplorati [ $F(2,95)=7,05$ ,  $p=0,0014$ ]. La dose minima efficace di L-cisteina (100 mg/kg) ha ridotto significativamente il numero di *nose-pokes* attivi per l'acetaldeide rispetto al pretrattamento con salina (o L-cisteina 0 mg/kg; Tukey post hoc test;  $p=0,00014$ ). inoltre questa dose di L-Cisteina ha ridotto la discriminazione rispetto al gruppo pretrattato con salina ( $p=0,00012$ ). non si è visto nessun cambiamento statisticamente significativo nel numero di *nose-pokes* inattivi durante tutti i trattamenti.

## **Estinzione ed effetto da privazione sul comportamento di *Self-Administration* orale per l'acetaldeide**

I ratti che si sono autosomministrati l'acetaldeide allo 0.2% hanno mostrato durante la fase di estinzione una diminuzione della discriminazione tra i *nose-pokes* e di conseguenza, dopo avere ripreso l'assunzione di acetaldeide, i ratti hanno mostrato un graduale *reinstatement* della risposta ai *nose-pokes* attivi. La figura 7 mostra l'effetto della L-cisteina (0 o salina, 100, 120 e 140 mg/kg) sull'effetto da privazione dell'auto somministrazione orale di acetaldeide in seguito all'estinzione da acetaldeide. Per il pretrattamento con L-cisteina, l'ANOVA a due vie eseguita su questi dati ha mostrato un effetto di pretrattamento [ $F(5,217)=53,43$ ,  $p=0,00012$ ], un effetto *nose-poke* x sessione [ $F(1,217)=1,65$ ,  $p<0,000001$ ] ed una significativa interazione pretrattamento x *nose-pokes* x sessione [ $F(5,217)=78,05$ ,  $p=0,000001$ ]. Durante la sessione di mantenimento con l'acetaldeide gli animali hanno effettuato un numero maggiore di *nose-pokes* attivi rispetto a quelli inattivi (Fig.7). In seguito al pretrattamento con L-cisteina (100, 120, 140 mg/kg), somministrata 30 minuti prima dell'inizio di ogni sessione di privazione, si è vista una significativa riduzione del numero di *nose-pokes* attivi rispetto al gruppo trattato con salina (o L-cisteina 0). La dose efficace più alta di L-cisteina (140 mg/kg) ha indotto una riduzione del numero di *nose-pokes* attivi anche rispetto alla fase di mantenimento, in cui i ratti sono stati pretrattati solo con salina. Inoltre, questa dose di L-cisteina ha leggermente ridotto la discriminazione dei *nose-pokes* rispetto al mantenimento e al pretrattamento con L-cisteina (0, 100 e 120 mg/kg). Nessun cambiamento significativo del numero di *nose-pokes* inattivi è stato registrato durante tutti i pretrattamenti, indicando un'assenza di effetti comportamentali non specifici.

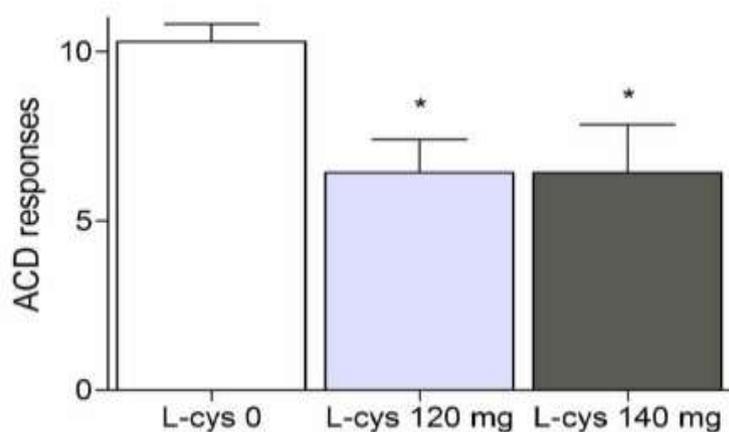


**Figura 7** Il grafico mostra gli effetti del pretrattamento con L-cisteina (0, 100, 120 e 140 mg/kg) sulla media  $\pm$  l'errore standard del numero dei nose-pokes attivi ed inattivi in seguito alla fase di estinzione e al successivo reintegro di acetaldeide. Tutti i dati rappresentano la media di due sessioni consecutive, \* indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di nose-pokes effettuati dai gruppi trattati con L.cisteina rispetto al gruppo di controllo L.cisteina 0 mg/kg o soluzione salina. # indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di nose-pokes attivi ed inattivi all'interno dello stesso gruppo. I dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA 2 way) seguita dal Tukey's post hoc test. ( $P < 0,05$ ).

### Effetto della L-cisteina sul *break point* per l'acetaldeide

La L-cisteina ha indotto una significativa diminuzione dose-dipendente nel *break-point* ottenuto con l'acetaldeide [ $F(2,69)=11.50$ ,  $p=0.000049$ ]; fig. 8). Entrambe le dosi di L-cisteina (120 e 140 mg/kg) hanno ridotto il *break-point* dell'acetaldeide ( $6,42 \pm 0,98$ ,  $p=0,0026$  e  $6,42 \pm 1,42$ ,  $p=0,0007$ , rispettivamente; Tukey post hoc test) rispetto al gruppo a cui è stata somministrata la salina ( $10.29 \pm 0.52$ ). Inoltre, le dosi di L-cisteina (0, 100, 120 e 140 mg/kg) non hanno alterato il numero dei *nose-pokes* inattivi durante l'acetaldeide *PR performance* [ $F(2,69)=2.77$ ,  $p=0.07$ ] indicando un'assenza di effetti comportamentali non specifici. La barra che indica la salina è stata ottenuta dalla media dei break points totali per la baseline del PR dell'acetaldeide durante l'andamento del test. E' stata stabilita una PR baseline attendibile per

l'acetaldeide, l'etanolo e la saccarina perché i valori del break point non sono variati con test ripetuti o sotto varie condizioni (es. iniezioni di salina e post-test).



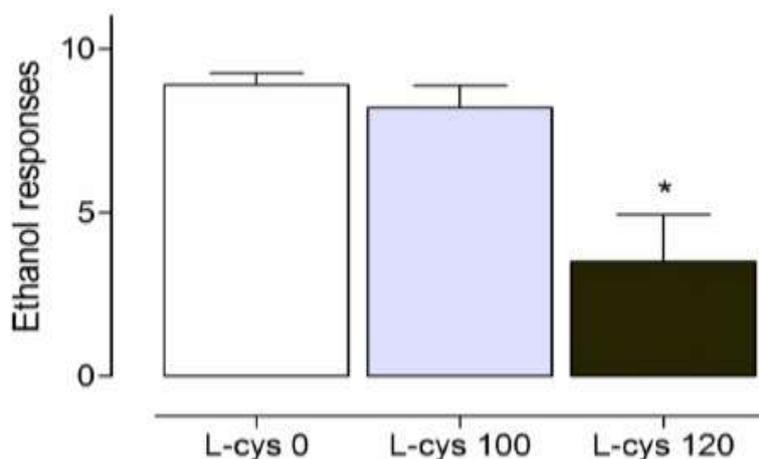
**Figura 8** Effetto della L-cisteina (120 e 140 mg/kg) sul break point dell'acetaldeide.

\* indica una differenza statisticamente significativa dei gruppi trattati con L.cisteina rispetto al gruppo di controllo L.cisteina 0 mg/kg o soluzione salina. (ANOVA a una via e Tukey's post hoc test,  $p < 0,05$ )

### Effetto della L-cisteina sul *Progressive ratio* per l'etanolo

La L-cisteina ha indotto una significativa diminuzione nel break point dell'etanolo ([ $F(2,76)=14,48$ ,  $p=0,000005$ ]; fig. 9).

In particolare, la dose efficace più alta testata (120 mg/kg) ha ridotto il break point dell'etanolo rispetto al gruppo pretratto con salina ( $p=0,00011$ ; Tukey post hoc test). In aggiunta, non si sono notate differenze statisticamente significative tra i *nose-pokes* inattivi relativi alle varie dosi di L-cisteina rispetto al gruppo trattato con salina [ $F(2,76)=0.72$ ,  $p=0.49$ ], questo indica un'assenza di effetti comportamentali non specifici. La barra della salina è stata ottenuta dalla media dei *break point* totali per la baseline relativa al *progressive ratio* dell'etanolo precedente al test.



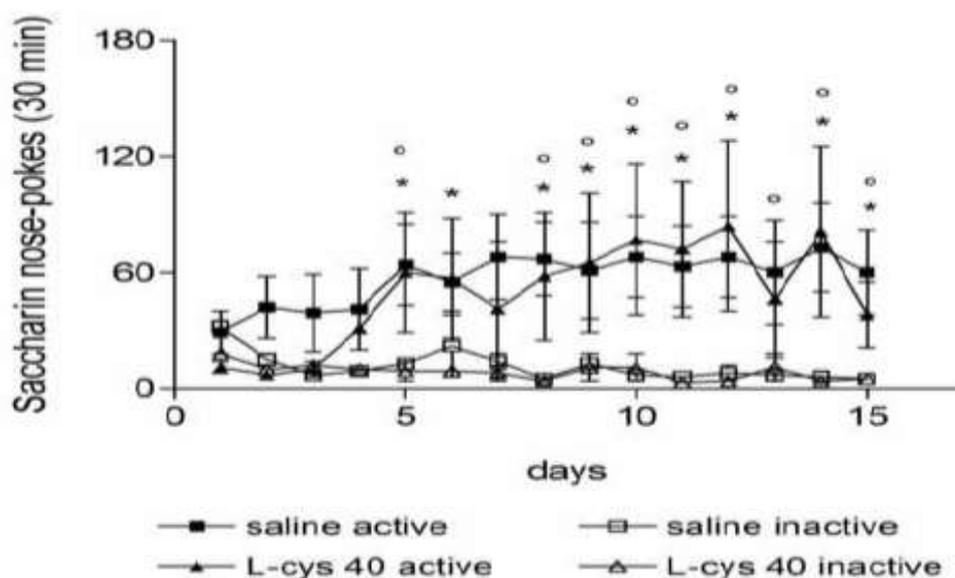
**Figura 9** Effetto della L-cisteina (100 e 120 mg/kg) sul break point dell'etanolo.

\* indica una differenza statisticamente significativa dei gruppi trattati con L.cisteina rispetto al gruppo di controllo L.cisteina 0 mg/kg o soluzione salina. (ANOVA a una via e Tukey's post hoc test,  $p < 0,05$ )

### **Effetto della L-cisteina sull'acquisizione di un comportamento di *Self-Administration* orale per la saccarina**

La figura 10 pannello a mostra la media dei nose-pokes attivi ed inattivi esplorati durante la sessione giornaliera di auto somministrazione orale di una soluzione di saccarina (0.2%) per 15 giorni consecutivi. La L-cisteina non ha modificato la risposta operante per la saccarina.

Infatti il confronto tra nose-pokes attivi ed inattivi tra i due gruppi (salina e L-Cisteina) non mostra differenze durante tutte le sessioni di acquisizione pretrattamento: [ $F(1,6)=0,10$ ,  $p=0,76$ ]; *nose-poke* x sessione:  $F(29,174)=3,49$ ,  $p < 0,00001$ ; interazione pretatrattamento x *nose-poke* x sessione: [ $F(29,174)=0,42$ ,  $p=0,99$ ].



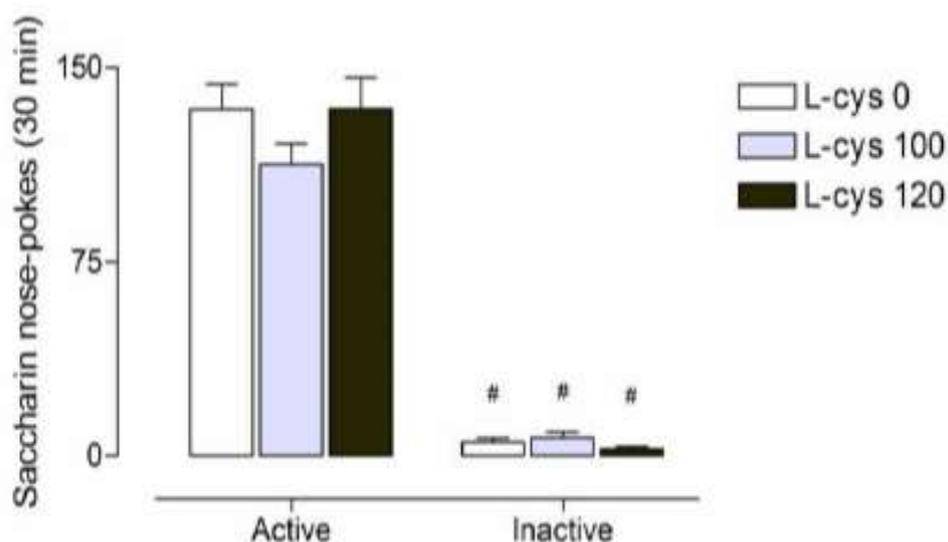
**Figura 10** Effetto della L-cisteina (40 mg/Kg) sull'acquisizione di un comportamento di auto somministrazione orale per la saccarina il grafico mostra il numero di nose pokes attivi e inattivi, espresso come media  $\pm$  l'errore standard, per ogni sessione operante (30 min).

\* indica una differenza statisticamente significativa tra i nose pokes attivi del gruppo trattato con L-cisteina e il gruppo trattato con salina (ANOVA a due vie per misure ripetute)

° indica una differenza statisticamente significativa tra i nose pokes attivi e quelli inattivi del gruppo trattato con L-cisteina (ANOVA a due vie per misure ripetute, planned comparisons post hoc test;  $p < 0,05$ )

### Effetto della L-cisteina sulla fase di mantenimento di un comportamento di *Self-Administration* orale per la saccarina

La L-cisteina non ha modificato le risposte dei *nose-pokes* attivi per il rinforzo di saccarina, così come la discriminazione dei *nose-pokes* (Fig. 11). L'ANOVA a due vie per misure ripetute non ha mostrato differenze statisticamente significative rispetto al pretrattamento [ $F(2,53)=1,18$ ,  $p=0,31$ ] ma un significativo effetto *nose-pokes* x sessione [ $F(1,53)=533,12$ ,  $p < 0,00001$ ] e nessuna significativa interazione pretrattamento x *nose-pokes* x sessione [ $F(2,53)=1,38$ ,  $p=0,26$ ]. Non si sono evidenziate variazioni significative dei *nose-pokes* inattivi durante tutti i pretrattamenti ([ $F(2,53)=0,67$ ,  $p=0,52$ ]).



**Figura 11** Effetto della L-cisteina (100 e 120 mg/Kg) sul mantenimento di un comportamento di auto somministrazione orale per la saccarina. Tutti i dati rappresentano la media di 2 sessioni consecutive. # indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di nose-pokes attivi ed inattivi all'interno dello stesso gruppo.

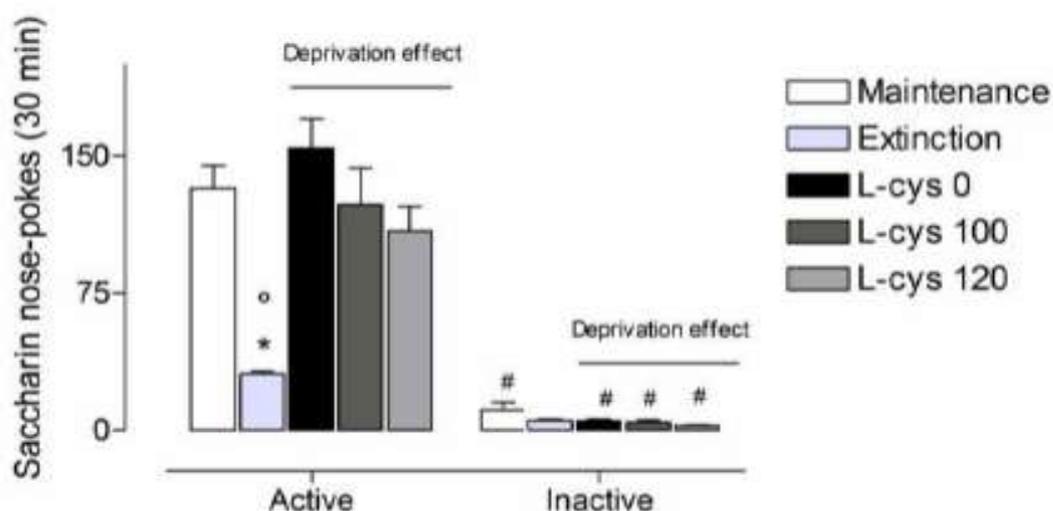
I dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA 2 way) seguita dal Tukey's post hoc test. ( $P < 0,05$ )

### Estinzione ed effetto da deprivazione sul comportamento di *Self-Administration* orale per la saccarina

Durante la fase di mantenimento della saccarina, il numero dei *nose-pokes* attivi è stato significativamente maggiore rispetto a quelli inattivi ( $p = 0,00016$ ). Nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate nella fase di deprivazione dell'acetaldeide, i ratti che si sono autosomministrati saccarina allo 0.2%, hanno mostrato un comportamento di estinzione, con una riduzione della discriminazione tra i *nose-pokes* ( $p = 0,088$ ; Tukey post hoc test). In seguito al ripristino della disponibilità di saccarina, si è registrato un graduale *reinstatement* della risposta ai *nose-pokes* attivi (effetto da deprivazione) (Fig. 12).

Per il pretrattamento con L-cisteina (0 o salina, 100 e 120 mg/kg) l'ANOVA a due vie effettuata su questi dati ha rivelato un effetto statisticamente significativo di pretrattamento [ $F(4,63) = 260,18$ ,  $p < 0,000001$ ], di *nose-pokes* x session [ $F(1,63) = 1,65$ ,  $p < 0,000001$ ] e una si-

gnificativa interazione pretrattamento x *nose-pokes* x session [F(4,63)=227,65,  $p < 0,000001$ ]. Il pretrattamento con L-cisteina (0, 100 e 120 mg/kg) non ha influito sull'effetto da deprivazione della saccarina. Inoltre, queste dosi di L-cisteina non hanno modificato la discriminazione tra i *nose-pokes* ( $p < 0,05$ ) durante la fase di mantenimento ed i vari pretrattamenti con L-cisteina (0, 100 e 120 mg/kg).



**Figura 12** Il grafico mostra gli effetti del pretrattamento con L-cisteina (0, 100 e 120 mg/kg) sulla media  $\pm$  l'errore standard del numero dei *nose-pokes* attivi ed inattivi in seguito alla fase di estinzione e al successivo reintegro della saccarina. Tutti i dati rappresentano la media di due sessioni consecutive,

\* indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di *nose-pokes* effettuati dai gruppi trattati con L.cisteina rispetto al gruppo di controllo L.cisteina 0 mg/kg o soluzione salina.

° indica una differenza statisticamente significativa rispetto alla fase di mantenimento

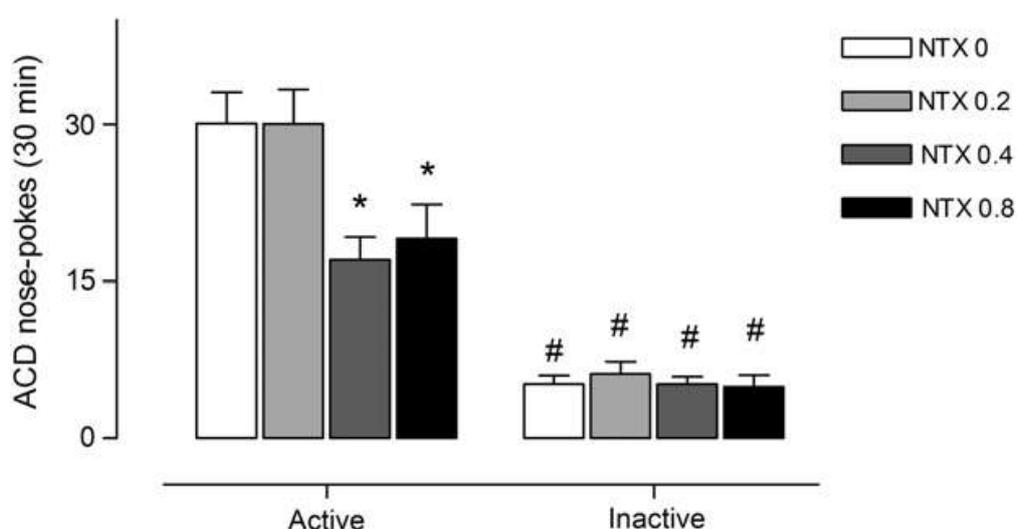
# indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di *nose-pokes* attivi ed inattivi all'interno dello stesso gruppo.

I dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA 2 way) seguita dal Tukey's post hoc test. ( $P < 0,05$ )

## Effetti degli antagonisti oppioidi sulla *Self administration* di Acetaldeide

### Effetto del naltrexone sul mantenimento di un comportamento di auto somministrazione orale per l'acetaldeide

Durante la fase di mantenimento, gli animali hanno un comportamento di auto somministrazione costante per l'acetaldeide, raggiungendo una *baseline* stabile. I trattamenti con naltrexone (NTX 0; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/kg) sono stati effettuati dopo tre giorni di stabilità della media dei *nose-pokes* (Media  $\pm$ SEM). In questo esperimento abbiamo visto che il naltrexone ha ridotto significativamente il numero dei *nose-pokes* attivi cui segue l'infusione di acetaldeide (Fig.13).



**Figura 13** Il grafico mostra la media  $\pm$  l'errore standard del numero dei *nose-pokes* attivi ed inattivi nell'auto somministrazione di acetaldeide (0,2%) in seguito al pretrattamento con naltrexone alle dosi di 0; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/kg. Tutti i dati rappresentano la media di tre sessioni consecutive, in particolare sono state prese in considerazione le ultime tre sessioni nella fase di mantenimento e le prime tre sessioni dei trattamenti con naltrexone.

\* indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di *nose-pokes* effettuati dai gruppi trattati con naltrexone rispetto al gruppo di controllo NTX 0 mg/kg o soluzione salina.

# indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di *nose-pokes* attivi ed inattivi all'interno dello stesso gruppo.

I dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA 2 way) seguita dal Tukey's post hoc test. ( $P < 0,05$ ).

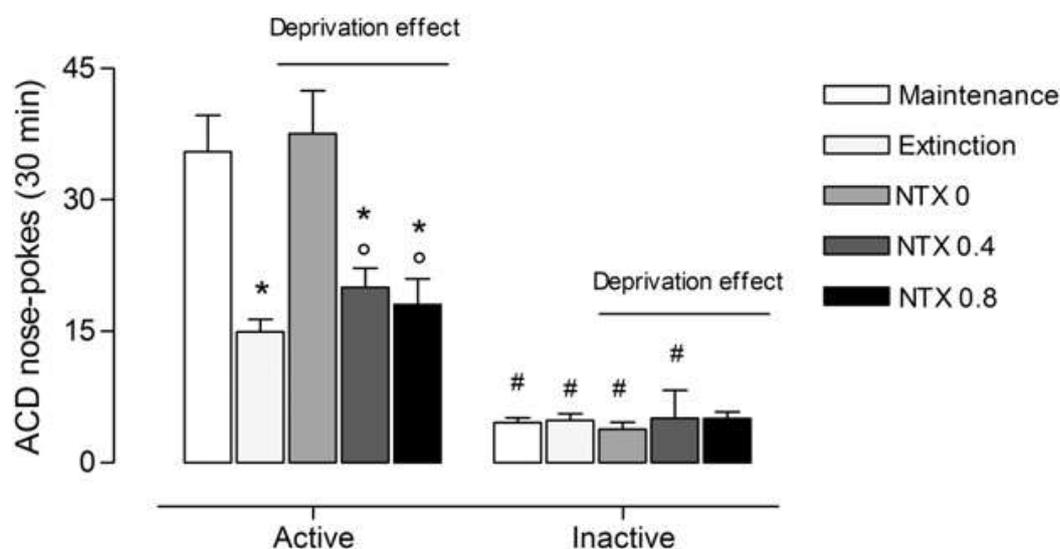
L'ANOVA a due vie per misure ripetute ha mostrato un significativo effetto di pretrattamento ( $F[3,80]=50,83$ ,  $P=0,0028$ ), di *nose-pokes* durante la sessione ( $F[1,80]=1,377$ ,  $P < 0,00001$ ) ed

una significativa interazione pretrattamento x *nose-pokes* ( $F[3,80]=44,23$ ,  $P=0,0063$ ). Le due dosi più alte di naltrexone (0,4 e 0,8 mg / kg) hanno ridotto significativamente il numero dei *nose-pokes* attivi per l'acetaldeide, così come l'*intake*, calcolato in base al numero di *nose-pokes* attivi effettuati. L'*intake* per il gruppo pretrattato con salina o NTX 0 mg/kg è stato di  $23,33\pm 1,63$  mg/kg, mentre quello relativo ai gruppi pretrattati con naltrexone è stato di  $14,61\pm 2,19$  mg/kg per la dose di 0,4 mg/kg e di  $16,40\pm 2,75$  mg/kg per la dose di 0,8 mg/kg (Tukey's post hoc test;  $P<0,05$ ).

Inoltre, nessuna delle dosi di naltrexone ha mostrato effetti sulla discriminazione tra i *nose-pokes* attivi ed inattivi ( $P<0,05$ ) rispetto al pretrattamento con soluzione salina ( $P<0,05$ ). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative sul numero di *nose-poke* inattivi durante tutti i pretrattamenti (Fig. 13).

### **Effetto del naltrexone sull'effetto da deprivazione nel comportamento di auto-somministrazione orale per l'acetaldeide**

I ratti che si sono autosomministrati l'acetaldeide allo 0,2 % hanno mostrato durante la fase di estinzione una riduzione della discriminazione tra i *nose-pokes* attivi ed inattivi e in seguito alla ripresentazione di acetaldeide, hanno mostrato un graduale ripristino del numero di *nose-pokes* attivi. La figura 14 mostra gli effetti del pretrattamento con naltrexone alle due dosi maggiori sull'effetto da deprivazione nell'auto somministrazione orale di acetaldeide in esperimenti condotti dopo l'ultimo giorno di estinzione da acetaldeide.



**Figura 14** Il grafico mostra gli effetti del pretrattamento con naltrexone alle dosi di 0; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/kg sulla media  $\pm$  l'errore standard del numero dei nose-pokes attivi ed inattivi in seguito alla fase di estinzione e al successivo reintegro di acetaldeide. Tutti i dati rappresentano la media di tre sessioni consecutive, in particolare sono state prese in considerazione le ultime tre sessioni nella fase di mantenimento e le prime tre dei trattamenti con naltrexone, le prime tre della fase di estinzione e le prime tre della fase di deprivation effect.

\* indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di nose-pokes attivi effettuati dai gruppi trattati con naltrexone rispetto al gruppo di controllo NTX 0 mg/kg o soluzione salina.

# indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di nose-pokes attivi ed inattivi all'interno dello stesso gruppo.

° indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di nose-pokes attivi effettuati dai gruppi trattati con naltrexone rispetto a quelli ottenuti nella fase di mantenimento.

I dati sono stati analizzati mediante una analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA 2 way) seguita dal Tukey's post hoc test. ( $P < 0,05$ ).

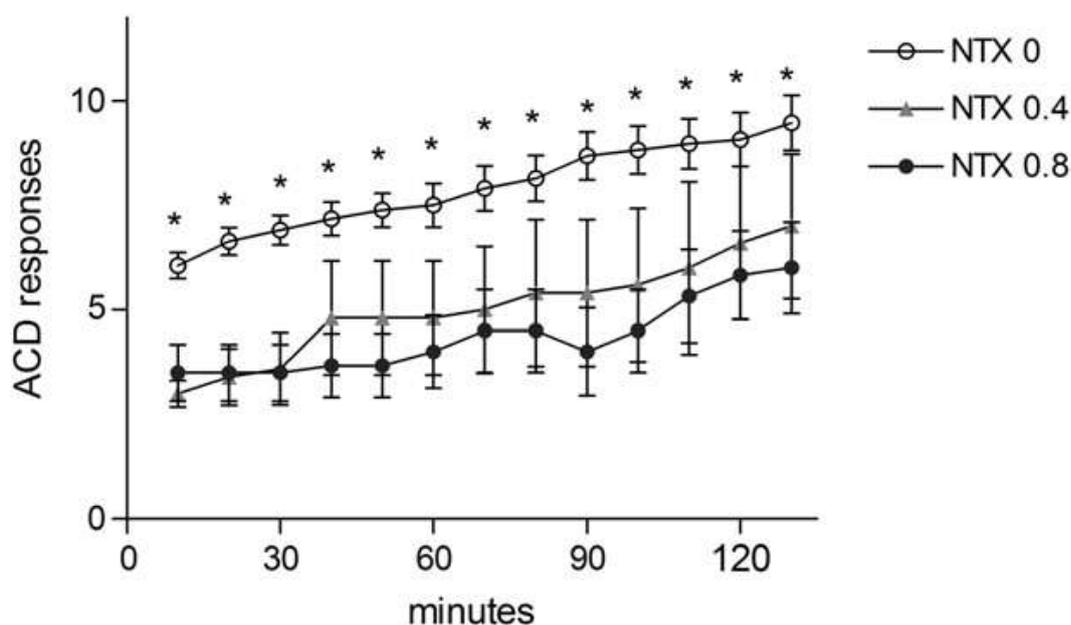
Riguardo al pretrattamento con naltrexone, l'ANOVA a due vie, ha rilevato un significativo effetto di pretrattamento ( $F[4,95]=82,214$ ,  $P < 0,00001$ ), di nose-pokes durante la sessione ( $F[1,95]=1,572$ ,  $P < 0,000001$ ) ed una significativa interazione pretrattamento x nose-pokes ( $F[4,95]=116,550$ ,  $P=0,000001$ ). Durante la sessione di mantenimento con l'acetaldeide le risposte sono risultate significativamente più frequenti sui nose-pokes attivi rispetto a quelli inattivi (Fig. 14). Il naltrexone (0,4 e 0,8 mg/kg) somministrato 30 minuti prima dell'inizio di ogni sessione di deprivation, ha ridotto significativamente il numero dei nose-pokes attivi, rispetto al gruppo trattato con soluzione salina, vale a dire NTX 0 mg/kg (Fig. 14). L'effetto del naltrexone (0,4 e 0,8 mg/kg) è significativo anche rispetto alla fase di mantenimento, in cui i ratti sono stati trattati solo con soluzione salina.

Inoltre, il naltrexone alla dose di 0,8 mg/kg ha ridotto la discriminazione tra i *nose-pokes* attivi ed inattivi rispetto al pretrattamento con soluzione salina (NTX 0 mg/kg). Non è stata registrata nessuna differenza statisticamente significativa nel numero di *nose-pokes* inattivi rispetto a tutti i pretrattamenti, indicando quindi un'assenza di effetti comportamentali non specifici.

### **Effetto del naltrexone sul *progressive ratio* per l'acetaldeide**

Relativamente al pretrattamento con naltrexone sul *progressive ratio* per l'acetaldeide, l'ANOVA a due vie per misure ripetute ha mostrato un significativo effetto di pretrattamento ( $F[2,48]=5,29$ ,  $P=0,008$ ) e un significativo effetto di tempo ( $F[12,576]=19,47$ ,  $P<0,00001$ ). Entrambe le dosi di naltrexone (0,4 e 0,8 mg/kg) hanno indotto una significativa diminuzione del *break point*, più in dettaglio; per la dose di 0,4 mg/kg:  $7,00\pm 1,73$  mentre per la dose di 0,8 mg/kg:  $6,00\pm 1,10$  rispetto al gruppo pretrattato con soluzione salina o NTX 0 mg/kg:  $9,48\pm 0,66$  (Tukey's post hoc test;  $P<0,05$ ). Inoltre, le dosi di naltrexone (0,4 e 0,8 mg/kg) non hanno modificato il numero di *nose-pokes* inattivi indicando un'assenza di effetti comportamentali non specifici ( $F[2,30]=0,43$ ,  $P=0,65$ ).

La curva relativa al pretrattamento con soluzione salina o NTX 0 mg/kg è stata ottenuta dalla media totale delle sessioni di PR per l'acetaldeide che hanno costituito la *baseline* del *progressive ratio*. Si è considerata stabile la *baseline* in cui i valori del *break point* non differivano in modo statisticamente significativo.



**Figura 15** Il grafico mostra l'andamento delle risposte ottenute secondo il programma di rinforzo PR1 per l'autosomministrazione di acetaldeide e in seguito al pretrattamento con naltrexone. Gli incrementi delle curve indicano un aumento del numero di infusioni durante la sessione di test della durata di 130 minuti.

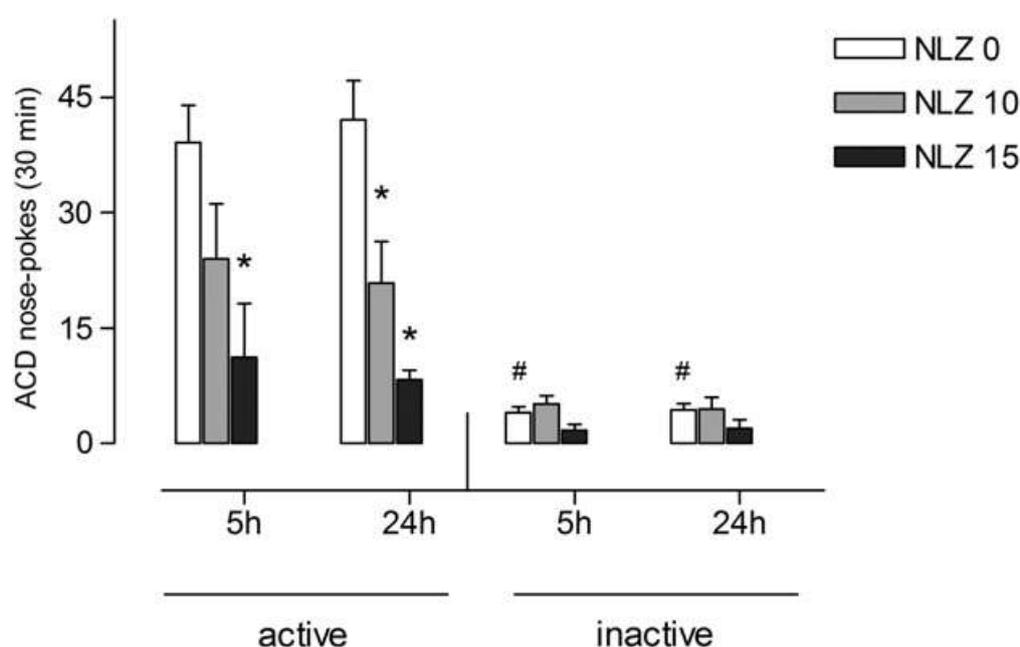
\* indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di infusioni effettuate dai gruppi pretrattati con naltrexone ad entrambe le dosi rispetto al gruppo pretrattato con soluzione salina (NTX 0 mg/kg).

I dati sono stati analizzati mediante una analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA 2 way) seguita dal Tukey's post hoc test ( $P < 0,05$ ).

### **Effetto della naloxonazina sul mantenimento di un comportamento di auto somministrazione orale per l'acetaldeide**

La naloxonazina ha significativamente ridotto il numero di *nose-poke* attivi relativi all'infusione di acetaldeide (Fig. 16). L'ANOVA a due vie per misure ripetute ha mostrato un significativo effetto principale di pretrattamento ( $F[5,41]=4,71$ ,  $P=0,0017$ ), dei *nose-pokes* durante la sessione ( $F[1,41]=49,9$ ,  $P < 0,00001$ ) ed una significativa interazione pretrattamento x *nose-pokes* ( $F[5,41]=4,20$ ,  $P=0,0035$ ). La dose più bassa di naloxonazina (10 mg/kg) ha ridotto significativamente il numero dei *nose-pokes* attivi per l'acetaldeide 24 ore dopo il pretrattamento in cui abbiamo rilevato un valore di  $13,13 \pm 3,19$ , rispetto al pretrattamento con soluzione salina, vale a dire NLZ 0 mg/kg:  $24,13 \pm 3,06$  mg/kg. La stessa dose di naloxonazina ha inoltre ridotto l'*intake* della soluzione di acetaldeide in maniera statisticamente significativa (Tukey's post hoc test

$P < 0.05$ ). La dose più alta di naloxonazina (15 mg/kg) ha ridotto significativamente il numero dei *nose-poke* attivi per l'acetaldeide a 5 e 24 ore dal pretrattamento, rispettivamente  $2,88 \pm 0,81$  e  $5,24 \pm 0,54$  mg/kg rispetto al pretrattamento con soluzione salina vale o NLZ 0 mg/kg:  $23,33 \pm 2,82$  dopo 5 ore dal pretrattamento e  $24,13 \pm 3,06$  mg/kg dopo 24 ore. La stessa dose di naloxonazina ha inoltre ridotto significativamente l'*intake* (Tukey's post hoc test;  $P < 0.05$ ). Inoltre, entrambe le dosi di naloxonazina (a 5 e 24 ore), hanno ridotto l'effetto sulla discriminazione tra i *nose-pokes* attivi ed inattivi rispetto al pretrattamento con soluzione salina ( $P < 0.05$ ). Non ci sono differenze statisticamente significative tra il numero dei *nose-pokes* inattivi tra tutti i pretrattamenti (Fig. 16).



**Figura 16** Il grafico mostra la media  $\pm$  l'errore standard del numero dei *nose-pokes* attivi ed inattivi nell'auto somministrazione di acetaldeide (0,2%) in seguito al pretrattamento con naloxonazina alle dosi di 0; 10 e 15 mg/kg, 5 e 24 ore prima l'inizio della sessione.

\* indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di *nose-pokes* effettuati dai gruppi trattati con naltrexone rispetto al gruppo di controllo NTX 0 mg/kg o soluzione salina.

# indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di *nose-pokes* attivi ed inattivi all'interno dello stesso gruppo.

I dati sono stati analizzati mediante una analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA 2 way) seguita dal Tukey's post hoc test. ( $P < 0,05$ ).

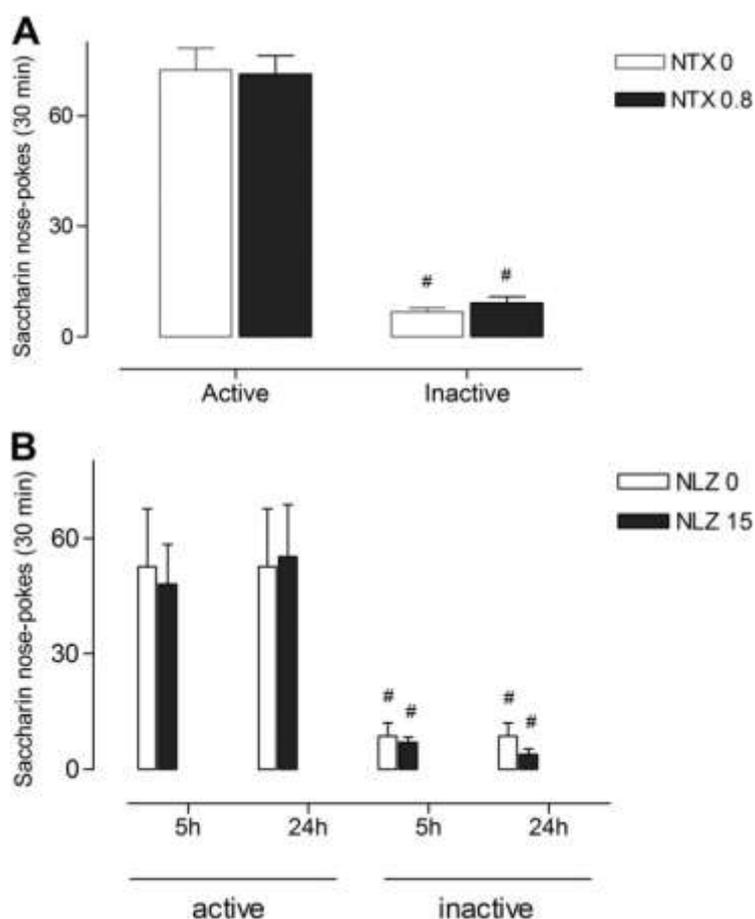
## **Effetti del naltrexone e della naloxonazina sul mantenimento di un comportamento di auto somministrazione orale per la saccarina**

I dati dei *nose-pokes* sia attivi che inattivi, relativi all'autosomministrazione di saccarina, sono espressi come media dei *nose-pokes* registrati nel corso delle ultime tre sessioni della fase di mantenimento e delle prime tre sessioni del trattamento con naltrexone (0 e 0,8 mg/kg)

Il naltrexone alla dose di 0,8 mg/kg non ha modificato il numero dei *nose-pokes* attivi a cui è seguita un'infusione di saccarina allo 0,05%, o la discriminazione tra i *nose-pokes* attivi ed inattivi (Fig. 17 pannello a). L'ANOVA a due vie per misure ripetute ha mostrato un significativo effetto dei *nose-pokes* durante la sessione ( $F[1,46]=2,33$ ,  $P<0,00001$ ), ma non ha mostrato un effetto di pretrattamento ( $F[1,46]=0,031$ ,  $P=0,86$ ), e nemmeno una significativa interazione pretrattamento x *nose-pokes* ( $F[1,46]=0,18$ ,  $P=0,67$ ). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative sul numero di *nose-pokes* inattivi rispetto a tutti i pretrattamenti (Fig. 17 pannello a).

La naloxonazina alla dose di 15 mg/kg non ha modificato il numero dei *nose-pokes* attivi o la discriminazione tra i *nose-pokes* sia dopo 5 che 24 ore dal pretrattamento (Fig. 17 pannello b).

L'ANOVA a due vie per misure ripetute ha mostrato un significativo effetto dei *nose-pokes* durante la sessione ( $F[1,21]=3,45$ ,  $P<0,0001$ ), ma non ha mostrato un effetto di pretrattamento ( $F[2,21]=0,05$ ,  $P=0,95$ ), e nemmeno una significativa interazione pretrattamento x *nose-pokes* ( $F[2,21]=0,15$ ,  $P=0,86$ ). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative riguardo al numero di *nose-pokes* inattivi tra tutti i pretrattamenti (Fig. 17, pannello b).



**Figura 17** (Pannello a) Il grafico mostra la media  $\pm$  l'errore standard del numero dei nose-pokes attivi ed inattivi nell'auto somministrazione di saccarina (0,05%) in seguito al pretrattamento con naltrexone alle dosi di 0; 0.8mg/kg

(Pannello b) Il grafico mostra la media  $\pm$  l'errore standard del numero dei nose-pokes attivi ed inattivi nell'auto somministrazione di saccarina (0,05%) in seguito al pretrattamento con naloxonazina alle dosi di 0; 15 mg/kg, 5 e 24 ore prima l'inizio della sessione.

# indica una differenza statisticamente significativa tra il numero di nose-pokes attivi ed inattivi all'interno dello stesso gruppo.

I dati sono stati analizzati mediante una analisi della varianza a due vie per misure ripetute (ANOVA 2 way) seguita dal Tukey's post hoc test. ( $P < 0,05$ ).

## **Effetti dell'acido alfa lipoico sulla *self administration* di etanolo**

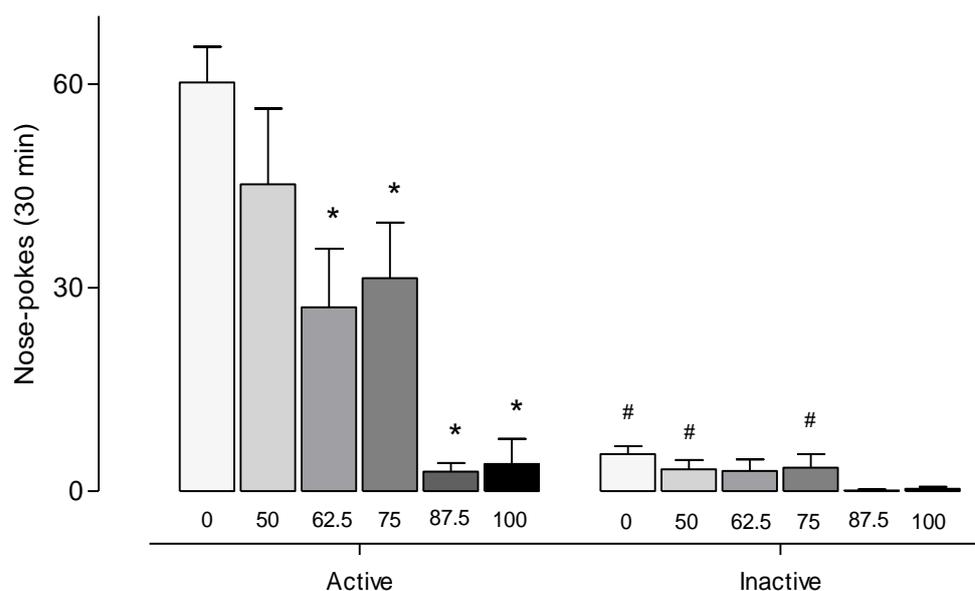
### **Effetto dell'ALA sul mantenimento di un comportamento di auto-somministrazione orale per l'etanolo**

Durante la fase di mantenimento gli animali hanno raggiunto un comportamento di auto-somministrazione orale stabile per l'etanolo. In questo esperimento abbiamo notato che il *ALA* ha ridotto significativamente il numero dei *nose-pokes* attivi per l'ottenimento di etanolo (Fig. 18).

L'ANOVA a due vie per misure ripetute ha mostrato un significativo effetto di pretrattamento [F(5,41) 1.287,  $p < 0.0001$ ], di *nose-pokes* all'interno della sessione [F(1,41)=8.895,  $p < 0.0001$ ] ed una significativa interazione pretrattamento x *nose-pokes* [F(5,41)=1.154,  $p < 0.0001$ ].

L'*ALA* alle dosi di 62,5 , 75 , 87,5 e 100mg/kg, hanno ridotto significativamente il numero dei *nose-pokes* attivi per l'etanolo (Fig. 9), così come l'*intake*, rispettivamente di  $0.76 \pm 0.25$ ;  $0.88 \pm 0.22$ ;  $0.88 \pm 0.04$  e  $0.12 \pm 0.11$  mg/kg, rispetto a quello del gruppo pretrattato con salina o *ALA* 0 che è stato di  $1.91 \pm 0.10$  mg/kg (*Tukey's post hoc test*;  $p < 0.05$ ).

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i *nose-pokes* inattivi durante tutti i pretrattamenti (Fig.18).

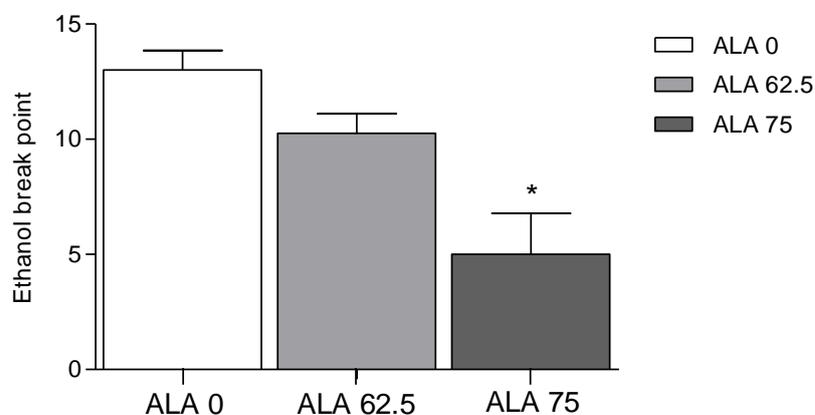


**Fig. 18.** La figura mostra la media ( $\pm$  SEM) del numero dei nose-pokes attivi e inattivi durante la fase di mantenimento dell'auto-somministrazione orale per l'etanolo (10%) dopo pretrattamento con ALA alle dosi di 0, 50, 62.5, 75, 87.5 e 100 mg/kg. Tutti i valori rappresentano la media di 6-8 ratti. \* indica una significativa differenza tra il numero di nose-pokes attivi dei gruppi trattati con ALA rispetto al gruppo trattato con salina (o ALA 0).# indica una significativa discriminazione tra i nose-pokes attivi e inattivi. (ANOVA a due vie per misure ripetute e Tukey post hoc test;  $p < 0.05$ ).

### Effetto dell'ALA sul *progressive ratio* per l'etanolo

Il pretrattamento con ALA ha indotto una significativa diminuzione del *break point* per l'etanolo (Fig.10) [ $F(2,21)=1.004$ ,  $p=0.00087$ ]. In particolare, la dose più alta di ALA (75 mg/kg) ha indotto una riduzione del *break point* di etanolo ( $5.00 \pm 1.78$ ,  $p=0.00075$ ; *Tukey's post hoc test*), rispetto al gruppo pretrattato con salina ( $13.00 \pm 0.85$ ). Inoltre, entrambe le dosi di ALA testate (0, 62.5 e 75 mg/kg) non hanno modificato il numero dei *nose-pokes* inattivi durante le sessioni di PR [ $F(2,21)=1.50$ ,  $p=0.24$ ], indicando un'assenza di effetti comportamentali non specifici.

La curva relativa al pretrattamento con soluzione salina o ALA 0 mg/kg è stata ottenuta dalla media totale delle sessioni di PR per l'etanolo che hanno costituito la *baseline* del *progressive ratio*. Si è considerata stabile la *baseline* quando i valori del *break point* non differivano in modo statisticamente significativo nelle varie condizioni (i.p., iniezioni di salina e *post-test*).



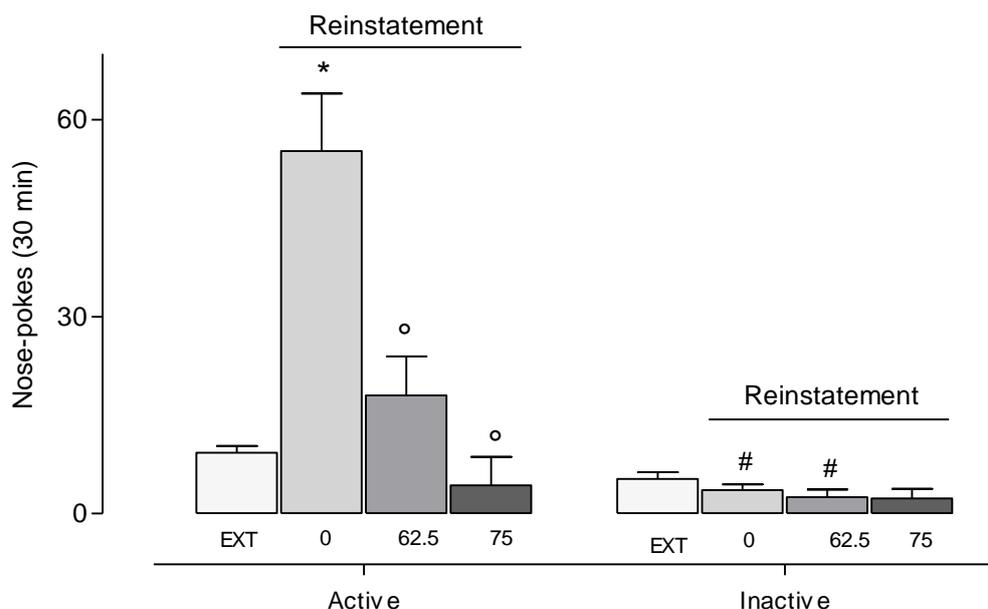
**Fig. 19** La figura mostra la media ( $\pm$  SEM) del break-point per l'etanolo (10%) raggiunta dopo pretrattamento con ALA (0, 62.5 e 75 mg/kg). \* indica una significativa differenza confrontata con la somministrazione di ALA 0. (ANOVA a una via per misure ripetute e Tukey post hoc test;  $p < 0.05$ ).

### **Effetto dell'ALA sul reinstatement indotto da un priming di etanolo**

Durante la fase di mantenimento che precede la prima sessione di estinzione tutti i tre gruppi hanno raggiunto un comportamento stabile di *self-administration*, effettuando rispettivamente una media di  $141.00 \pm 10.01$ ,  $169.54 \pm 17.39$ ,  $141.69 \pm 8.93$  *nose-pokes* attivi esplorati, corrispondenti a  $1.12 \pm 0.076$ ,  $1.35 \pm 0.15$  e  $1.07 \pm 0.11$  g/kg di etanolo ingeriti per sessione. Ad ogni sessione i ratti hanno inoltre effettuato una media di  $6.61 \pm 1.54$ ,  $11.92 \pm 4.69$ ,  $5.23 \pm 0.75$  di *nose-pokes* inattivi. Nella fase di estinzione il numero medio di *nose-pokes* attivi esplorati è stato di  $9.29 \pm 1.01$ , mentre per i *nose-pokes* inattivi è stato di  $5.28 \pm 1.02$  (Fig.20). Per i ratti che hanno ricevuto il *priming* di etanolo e pretrattati con soluzione salina, la presentazione, nella fase di *reinstatement*, degli stimoli precedentemente associati all'etanolo ha indotto il ripristino di un comportamento di ricerca pari a 55 risposte per sessione. Come mostrato nella figura.20, l'ALA influisce sulla ricaduta di un comportamento di ricerca per l'etanolo indotta da un *priming*, si son

mostrate efficaci le dosi di ALA di 62.5 e 75 mg/kg, le stesse che sono risultate significativamente efficaci nel mantenimento. L'ANOVA a due vie condotta sulla base di questi dati mette in evidenza un effetto statisticamente significativo di pretrattamento [ $F(3,24)=26$ ,  $p<0.000001$ ], di *nose-pokes* per sessione [ $F(1,24)=72$ ,  $p<0.000001$ ] e una significativa interazione tra il pretrattamento e il numero dei *nose-pokes* durante ogni sessione [ $F(3,24)=30$ ,  $p=0.000001$ ].

Gli esperimenti hanno messo in evidenza che entrambe le dosi di ALA (62.5 75 mg/kg), 30 minuti prima di ogni sessione di *reinstatement*, sono state in grado di ridurre la risposta all'*operandum* precedentemente associato all'etanolo, nonostante si siano mantenuti gli stimoli ambientali condizionati e contingenti alla consegna di etanolo. Inoltre, il ALA alla dose di 75 mg/kg ha ridotto la discriminazione tra i *nose-pokes* attivi ed inattivi rispetto al pretrattamento con soluzione salina (ALA 0 mg/kg), ma nessun trattamento ha indotto variazioni nel numero dei *nose-pokes* inattivi nelle varie fasi, indicando l'assenza di effetti comportamentali aspecifici. L'ALA, alla dose di 75 mg/kg, riduce il numero di *nose-pokes* attivi e tende a ridurre anche gli inattivi. Questo effetto potrebbe essere dovuto ad un effetto non specifico.



**Fig. 20** La figura mostra la media ( $\pm$  SEM) del numero di nose-pokes durante le sessioni in estinzione e in ricaduta (reinstatement) di un comportamento di ricerca dell'etanolo (10%) dopo pretrattamento con ALA (0, 62.5 and 75 mg/kg). Tutti i valori rappresentano la media per 6 ratti.

\* indica una differenza significativa delle risposte sul nose-poke attivo tra ALA o ALA 0 rispetto ai valori in estinzione.

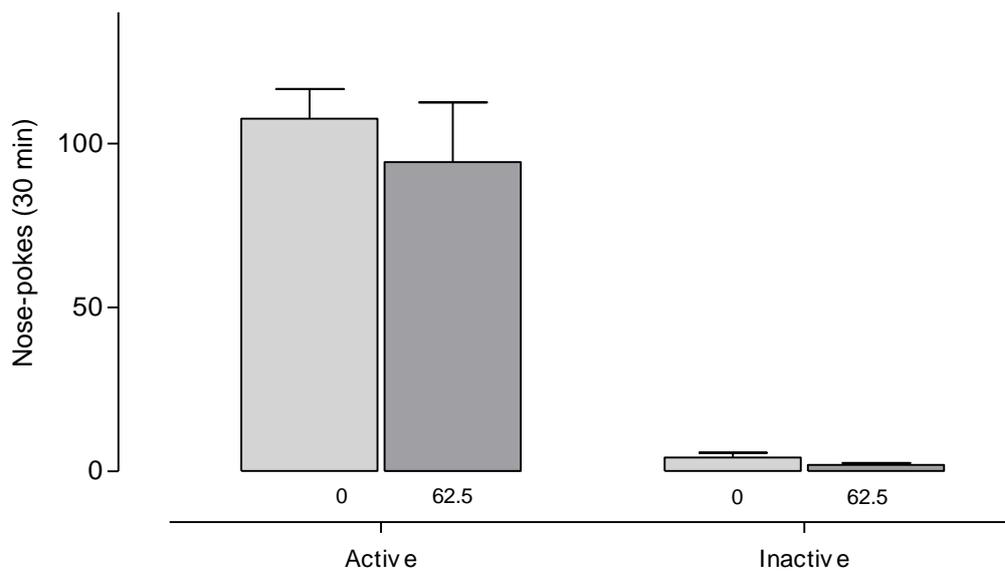
# indica una differenza significativa nelle risposte sul nose-poke attivo tra i valori con ALA (62.5 e 75 mg/kg) e quelli con ALA 0.

° indica una significativa discriminazione tra i nose-pokes (ANOVA a due vie per misure ripetute e Tukey post hoc test;  $p < 0.05$ ).

### Effetto dell'ALA sul mantenimento di un comportamento di auto-somministrazione orale per la saccarina

Per l'analisi degli effetti dell'ALA alla dose di 62.5 mg/kg sulla self administration di saccarina, son state comparate le medie dei *nose-pokes* attivi e inattivi del giorno precedente l'inizio dei trattamenti, contro il giorno del trattamento con ALA.

L'ALA non ha modificato ne il numero di *nose-pokes* attivi, ne la discriminazione tra *nose-pokes* attivi ed inattivi (Fig.21). L'ANOVA a due vie per misure ripetute non ha mostrato un significativo effetto di pretrattamento [ $F(1,14)=0,55$ ,  $p=0,47$ ], e nemmeno una significativa interazione pretrattamento x *nose-pokes* [ $F(1,14)=0,31$ ,  $p=0,59$ ], ma ha mostrato un significativo effetto dei *nose-pokes* durante la sessione [ $F(1,14)=0,31$ ,  $p=0,59$ ]. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i *nose-pokes* inattivi relativi ai vari pretrattamenti (Fig. 21).



**Fig. 21.** La figura mostra la media ( $\pm$  SEM) del numero di nose-pokes durante il mantenimento nella auto-somministrazione orale di saccarina (0.05%) in seguito a pretrattamento con ALA (0 e 62.5 mg/kg). # indica la significativa discriminazione dei nose-pokes. (ANOVA a due vie per misure ripetute e Tukey post hoc test;  $p < 0.05$ ).

## Discussione

I risultati di questo lavoro indicano che l'acetaldeide, inducendo lo sviluppo di un comportamento di auto-somministrazione orale, potrebbe effettivamente essere un potenziale agente rinforzante, e svolgere un ruolo negli effetti rinforzanti dell'etanolo.

Sono tanti i possibili meccanismi con cui l'acetaldeide agirebbe da rinforzante: a) mediante la stimolazione del sistema mesolimbico dopaminergico; b) tramite l'acetaldeide stessa che può esercitare il suo potenziale effetto rinforzante attraverso le beta carboline e/o le tetraidroisochinolone, prodotti di condensazione che si formano a partire dalle ammine biogene, presenti nell'organismo, sia durante il consumo di alcol che di fumo di tabacco.

Abbiamo osservato che i ratti si autosomministrano per via orale l'acetaldeide e che L-cisteina riduce questo comportamento operante. In generale questi risultati potrebbero suggerire che l'acetaldeide produca effetti rinforzanti propri.

A sostegno di questa interpretazione abbiamo osservato che i ratti acquisiscono e mantengono un comportamento di auto-somministrazione orale discriminando tra il *nose poke* attivo e inattivo. I ratti si autosomministrano l'acetaldeide mostrando un comportamento di estinzione quando la somministrazione viene interrotta e un graduale *reinstatement* all'*operandum* quando l'acetaldeide viene ripresentata. Il pretrattamento con la L-Cisteina, riduce la fase di acquisizione, di mantenimento e l'effetto da deprivazione per la *self administration* orale per l'acetaldeide, senza interferire con i *nose pokes* inattivi, suggerendo l'assenza di meccanismi non specifici

Inoltre abbiamo esaminato la *self administration* orale per l'acetaldeide con il protocollo di rinforzo PR in questo esperimento non si è vista una differenza significativa tra il *break-point* per l'acetaldeide e quello dell'etanolo nonostante la concentrazione dell'acetaldeide utilizzata fosse 50 volte inferiore rispetto a quella dell'etanolo. Inoltre la stessa dose di L-Cisteina ha ridotto sia il *break point* per l'acetaldeide che per l'etanolo nelle stesse condizioni sperimentali. Questo da-

to potrebbe significare che la L-cisteina induce una riduzione del *break point* dell'acetaldeide e dell'etanolo a causa di uno specifico effetto sull'acetaldeide.

Per determinare se la L-cisteina possa produrre una generale riduzione della motivazione verso il comportamento operante della *self administration*, è stata testata nei confronti della saccarina sulle fasi di acquisizione, mantenimento e sull'effetto da deprivazione. Le dosi di L-cisteina efficaci nei confronti dell'acetaldeide non si sono dimostrate efficaci verso la saccarina in ogni fase dei test, questi dati ci permettono di escludere effetti comportamentali non specifici

La capacità della L-cisteina di influire sull'auto somministrazione dell'acetaldeide può coinvolgere in vari meccanismi. Vari studi ipotizzano che la L-cisteina agisca similmente alla Cisteinilglicina, primo metabolita del glutatione, e alla D-penicillamina come agente sequestrante l'acetaldeide, tuttavia questo tipo di meccanismo d'azione, scoperto in vitro (Kera et al., 1985a; Nagasawa et al., 1984) non è stato confermato in vivo poiché non si è riscontrata diminuzione dei livelli ematici di acetaldeide in seguito al trattamento con L-cisteina (Peana et al., 2008; 2012).

L-cisteina possiede proprietà antiossidanti; infatti, quale precursore del glutatione (Soghier e Brion, 2006) agisce direttamente come *radical scavenger* (Shackebaei et al., Suleiman, 2005). Inoltre la L-cisteina costituisce un substrato naturale per la sintesi di acido solfidrico (H<sub>2</sub>S), il quale è stato da poco riconosciuto come possibile neurotrasmettitore gassoso, questa sostanza viene prodotta endogenamente e grazie alle sue piccole dimensioni molecolari è in grado di permeare le membrane, influenzando le funzioni cellulari senza necessità di recettori di membrana (Wang, 2003).

Ancora, la L-cisteina potrebbe agire direttamente ricostituendo il tono glutamatergico alterato. Gli aminoacidi contenenti atomi di zolfo come l'acido L-cisteico e l'acido sulfenico, metaboliti della L-cisteina (Harman et al., 1984), interagiscono con il gruppo I dei recettori mGluR presinaptici, specificatamente con il sottotipo mGluR5 che media una modulazione positiva sul rilascio sinaptico di glutammato (Croucher et al. 2001). Inoltre gli aminoacidi contenenti zolfo so-

no analoghi del L-Glu o del L-aspartato (Thompson e Kilpatrick, 1996). La neurotrasmissione glutammatergica e i suoi cambiamenti neuroadattativi sono stati proposti come importanti meccanismi molecolari alla base delle *craving* e *relapse* (Cornish e Kalivas, 2000). In particolare Tsai e Coyle (2008) sostengono che la condizione iperglutammatergica possa mediare almeno in parte il comportamento di ricaduta nell'alcolismo. Studi preclinici hanno dimostrato che la N-acetil cisteina, pro farmaco della L-cisteina, potrebbe effettivamente bloccare il comportamento compulsivo di ricerca (Baker et al., 2003a; Madayag et al., 2007; Zhaou e Kalivas, 2008) inibendo il ripristino indotto dall'eroina e determinando una riduzione duratura del comportamento di ricerca associato a *cues* (Zhou et al., 2009; Zhou e Kalivas, 2008). La N-acetil cisteina potrebbe produrre questi cambiamenti inducendo un ripristino del tono glutammatergico post sinaptico mGluR (Madayag et al., 2007; Moussawi et al., 2009; 2011; Zhou e Kalivas, 2008).

Infatti, lo scambiatore cisteina-glutammato subisce *down regulation* dopo esposizione cronica alla cocaina, che si traduce in una riduzione dei livelli extra cellulari di glutammato nell'*accumbens* (Madayag et al., 2007; Moussawi et al., 2009; 2011) e, coerentemente con queste recenti evidenze, è stato attualmente associato ad un ampio spettro di funzioni cerebrali e alla tossicodipendenza (Bridges et al., 2012).

La seconda parte di questi studi ha mostrato il coinvolgimento del sistema degli oppioidi endogeni negli effetti di rinforzo dell'acetaldeide e quindi dell'etanolo. Gli esperimenti attuali dimostrano, infatti, che è richiesta l'attivazione dei recettori degli oppioidi per mantenere l'auto somministrazione per via orale di acetaldeide.

Il naltrexone e la naloxonazina hanno ridotto l'auto somministrazione di acetaldeide nella fase di mantenimento senza interferire con il numero dei *nose-poke* inattivi, escludendo pertanto un effetto comportamentale non specifico. Inoltre, il naltrexone alle dosi di 0,4 e 0,8 mg/kg ha ridotto l'effetto da deprivazione in seguito all'estinzione da acetaldeide, così come anche il *break point*. Il valore medio del *break point* uguale a  $9,48 \pm 0,66$  corrisponde ad un *intake* di acetaldeide di  $5,84 \pm 0,37$  mg/kg che è decisamente inferiore rispetto alla quantità di acetaldeide assunta durante

una regolare seduta di training che è di circa 23 mg/kg, questo permette di escludere la sazietà dell'animale come possibile causa di cessazione dell'autosomministrazione per l'acetaldeide. È importante sottolineare che abbiamo osservato simili *break point* per l'acetaldeide durante i ripetuti test di *baseline* prima della valutazione dell'effetto del naltrexone. Ciò indica che i risultati del *progressive ratio* sono rimasti stabili nel tempo, non risentendo dell'influenza di fattori associati alle ripetute somministrazioni di naltrexone. La scoperta che il naltrexone in questa fase dell'autosomministrazione di acetaldeide è in grado di ridurre le prestazioni dell'animale rafforza l'idea del coinvolgimento del sistema oppioidergico. Inoltre, il naltrexone non ha modificato il numero di *nose-pokes* inattivi rispetto allo stesso gruppo pretrattato con soluzione salina suggerendo perciò che il naltrexone riduce il *break point* durante il *progressive ratio* a causa di un effetto specifico legato alle proprietà rinforzanti dell'acetaldeide. È interessante notare che il valore del *break point* è simile a quello riportato per l'etanolo da altri laboratori (Economidou et al., 2006; Faccidomo et al., 2009; Besheer et al., 2008; Cippitelli et al., 2007).

Le dosi di naltrexone utilizzate nel presente studio hanno dimostrato una più marcata affinità per i recettori  $\mu$  piuttosto che per i recettori  $\delta$ , (Williams et al. 2001). Mhatre e Holloway (2003) hanno riportato che il naltrexone a basse dosi (fino a 1 mg/kg) è selettivo per i recettori  $\mu$ , mentre a dosi più elevate può coinvolgere anche i recettori  $\delta$ . Per questo motivo, abbiamo studiato il ruolo di uno specifico antagonista del recettore  $\mu_1$ , la naloxonazina. Nelle nostre condizioni sperimentali abbiamo utilizzato la naloxonazina alle dosi di 10 e 15 mg/kg dimostrando di bloccare selettivamente i recettori  $\mu_1$  senza influenzare l'attività di altri sottotipi recettoriali (Dhawan et al., 1996). La scelta di somministrare la naloxonazina a 5 e 24 ore è stata presa sulla base delle proprietà farmacodinamiche di questo composto, infatti questo antagonista mostra un iniziale blocco reversibile non selettivo che solo dopo alcune ore diviene irreversibile e selettivo per i recettori  $\mu_1$ , ma per periodi non superiori alle 24 ore. È interessante notare che entrambi gli antagonisti non hanno ridotto il comportamento operante per l'ottenimento della saccarina, il che suggerisce un effetto specifico per l'acetaldeide. In accordo con questa osservazione è inoltre emer-

so che sia il naltrexone che la naloxonazina non hanno modificato il numero dei *nose-pokes* inattivi rispetto a quello effettuato dal gruppo di animali pretrattati con soluzione salina (controllo), il che conferma l'assenza di effetti comportamentali non specifici. Effettivamente, una riduzione dell'attività locomotoria potrebbe produrre una riduzione del comportamento operante, che potrebbe essere alla base del decremento dell'auto somministrazione orale.

Il meccanismo con cui gli antagonisti oppioidergici inibiscono il comportamento di ricerca per l'acetaldeide non è del tutto chiaro.

Vari lavori scientifici sostengono che il meccanismo d'azione con cui gli antagonisti oppioidergici riducono le proprietà rinforzanti dell'etanolo sia dovuto ad un'interferenza con l'attivazione del sistema dopaminergico (Acquas et al., 1993; Benjamin et al., 1993; Di Chiara et al., 1996; Gonzales and Weiss, 1998). La compromissione delle proprietà motivazionali dell'etanolo per opera degli antagonisti oppioidergici potrebbe essere dovuta ad una interazione tra il sistema dopaminergico e il sistema oppioidergico (Di Chiara et al., 1996). Varie linee di ricerca supportano questa ipotesi, la prima sostiene che l'esposizione a stimoli contestuali associati a farmaci possa incrementare il rilascio di dopamina nel *nucleus accumbens* (Weiss et al., 1993; 2000; Katner and Weiss, 1999), un'altra teoria sostiene che i recettori per gli oppioidi  $\mu_1$  esercitano un controllo tonico modulatore sui neuroni dopaminergici mesolimbici che proiettano dalla VTA al *nucleus accumbens*, e che la stimolazione di questi recettori facilita la trasmissione lungo questa via (Devine et al., 1993; Di Chiara e North, 1992). È importante considerare che l'acetaldeide somministrata come tale o ottenuta dal metabolismo dell'etanolo aumenta il *firing* dei neuroni dopaminergici nella VTA (Diana et al., 2008; Foddai et al., 2004) e stimola la trasmissione dopaminergica nel *nucleus accumbens* (Melis et al., 2007; Enrico et al., 2009; Sirca et al., 2011). Nel complesso questi dati appaiono in accordo con le prime osservazioni fatte da Myers e colleghi, in cui hanno dimostrato che, i ratti indotti ad auto somministrarsi l'acetaldeide (Myers et al., 1982) riducevano il loro comportamento operante per l'acetaldeide quando venivano pretrattati con la buprenorfina e/o il naloxone (Myers et al., 1984). I nostri risultati appaiono in linea con l'idea

che gli antagonisti dei recettori oppioidergici riducono l'assunzione di etanolo (Froehlich et al., 1990; Hubbell et al., 1986; Hyytiä e Sinclair 1993; Samson e Doyle 1985; Weiss et al., 1990), e diminuiscono nell'uomo la ricaduta all'assunzione di alcol (Naranjo e Sellers, 1989; O'Malley et al., 1992; Sellers et al., 1992; Volpicelli et al., 1992).

Nella terza parte di questo lavoro, per la prima volta abbiamo studiato il ruolo delle catalasi cerebrali sulla *self administration* di etanolo. Abbiamo osservato che inibendo la loro attività si assiste ad una riduzione delle proprietà motivazionali dell'etanolo. In particolare, abbiamo visto che la somministrazione periferica di ALA, ha ridotto la *self administration* orale di etanolo durante la fase di mantenimento, senza modificare il numero di *nose-pokes* inattivi effettuati. Questa osservazione ci permette di escludere che alla base della riduzione della *self administration*, indotta dal ALA, ci sia un meccanismo non specifico.

Abbiamo inoltre scoperto che l'ALA ha ridotto il *break point* studiato in esperimenti di auto-somministrazione di etanolo. In particolare sia la dose di 62.5 mg/kg che quella di 75 mg/kg, sono state efficaci sul mantenimento e sul *break point*. In questo studio il *break point* per l'etanolo è stato di  $13.0 \pm 0.85$ , che corrisponde ad un *intake* di etanolo di  $0.34 \pm 0.03$  mg/kg, la quantità di etanolo ingerita risulta essere decisamente inferiore rispetto alla quantità ingerita durante una normale sessione di training, approssimativamente pari a 1.44 g/kg, questo ci permette di escludere la sazietà come possibile meccanismo di cessazione della risposta.

Cosa ancora più importante, i *break points* per l'etanolo si sono mantenuti costanti durante i vari tests per la *baseline* sia prima che dopo la somministrazione del ALA. Ciò indica che la prestazione durante il progressive ratio (PR) si è mantenuta stabile nel tempo e non è stata influenzata dai ripetuti esperimenti comportamentali o da elementi collegati alle ripetute somministrazioni del farmaco. Il *break point* è considerato come una misura dell'efficacia rinforzante del farmaco (Markou et al., 1993; Richardson and Roberts, 1996). La scoperta che l'ALA sia in grado di ridurre il *break point* indica un coinvolgimento del sistema catalasi-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in questa fase dell'auto-somministrazione di etanolo. Inoltre, l'ALA non modifica l'esplorazione del nose-poke inattivo

durante il *progressive ratio* (PR) rispetto al gruppo che ha ricevuto soluzione salina (controlli), suggerendo che la riduzione del *break point* indotta dall'ALA sia dovuta ad uno specifico effetto sul rinforzo indotto dall'etanolo. È da sottolineare che il valore del *break point* è assolutamente in linea con i nostri precedenti risultati (Pena et al., 2012) e da altri laboratori (Economidou et al., 2006; Faccidomo et al., 2009; Besheer et al., 2008; Cipitelli et al., 2007).

L'ALA non ha modificato il comportamento operante per la saccarina, suggerendo che gli effetti da noi riportati sono specifici per l'etanolo. In accordo con queste osservazioni l'ALA non ha modificato il numero di *nose-pokes* inattivi rispetto alla salina, indicando di nuovo, una mancanza di un non specifico indebolimento comportamentale. Infatti, un deficit motorio probabilmente avrebbe potuto determinare una riduzione della risposta, che si sarebbe potuta manifestare come riduzione dei valori di risposta nella *self-administration*.

Il meccanismo mediante il quale l'ALA inibisce la risposta comportamentale nei confronti dell'etanolo potrebbe coinvolgere l'attività antiossidante e anti radicali liberi, l'ALA infatti potenzia l'attività del glutatone ed elimina le specie reattive dell'ossigeno *per se*. Alcuni studiosi hanno recentemente mostrato che la somministrazione di ALA, potrebbe specificamente ridurre gli effetti comportamentali dell'etanolo attraverso modificazione dell'attività metabolica del sistema enzimatico catalasi-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Questi dati sono congruenti con vari lavori precedentemente ottenuti con manipolazioni della catalasi-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Correa et al., 1999; Escarabajal et al., 2000; Manrique et al., 2006). Diversi studi considerano il sistema enzimatico catalasi-H<sub>2</sub>O la via metabolica responsabile della produzione di acetaldeide nel sistema nervoso centrale, mentre a livello periferico l'acetaldeide viene prodotta dalla aldeide deidrogenasi (ADH) gastrica ed epatica. In base a queste evidenze, negli ultimi vent'anni, ha preso piede la teoria che l'acetaldeide derivante dal metabolismo dell'etanolo, abbia un ruolo in alcuni degli effetti osservati dopo la somministrazione di etanolo. Il nostro gruppo di ricerca da anni si occupa dello studio dell'acetaldeide, abbiamo visto come l'acetaldeide regoli le proprietà motivazionali dell'etanolo e possieda proprietà rinforzanti proprie (Pena et al., 2008; 2009; 2010a; 2010b; Spina et al., 2010). In conclusione, questi risul-

tati suggeriscono il possibile coinvolgimento della catalasi-H<sub>2</sub>O cerebrale nella *self-administration* per l'etanolo e quindi negli effetti motivazionali dell'etanolo.

## **Conclusione**

Per quanto non sia chiaro il meccanismo con cui l'acetaldeide agisce, nel complesso, questi studi supportano il ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'etanolo e individuano nell'acetaldeide un possibile 'bersaglio' farmacologico nella terapia dell'alcolismo. Dagli esperimenti sull'ALA emerge inoltre, che la possibile modulazione farmacologica dell'ossidazione metabolica dell'etanolo in acetaldeide, a livello centrale, possa influire negativamente sull'espressione delle proprietà motivazionali e gratificanti dell'etanolo. Questi ultimi esperimenti indicano un nuovo bersaglio potenzialmente sfruttabile nella terapia dell'alcolismo.

## Bibliografia

- Acquas, E., Meloni, M. and Di Chiara, G. (1993) 'Blockade of delta-opioid receptors in the nucleus accumbens prevents ethanol-induced stimulation of dopamine release' in *Eur J Pharmacol*, Netherlands: 239-41.
- Amit, Z., Brown, Z. W. and Rockman, G. E. (1977) 'Possible involvement of acetaldehyde, norepinephrine and their tetrahydroisoquinoline derivatives in the regulation of ethanol self-administration', *Drug Alcohol Depend*, 2(5-6), 495-500.
- Aragon, C. M. and Amit, Z. (1992) 'The effect of 3-amino-1,2,4-triazole on voluntary ethanol consumption: evidence for brain catalase involvement in the mechanism of action', *Neuropharmacology*, 31(7), 709-12.
- Aragon, C. M. and Amit, Z. (1993) 'Differences in ethanol-induced behaviors in normal and acatalasemic mice: systematic examination using a biobehavioral approach' in *Pharmacol Biochem Behav*, United States: 547-54.
- Aragon, C. M., Pesold, C. N. and Amit, Z. (1992a) 'Ethanol-induced motor activity in normal and acatalasemic mice', *Alcohol*, 9(3), 207-11.
- Aragon, C. M., Rogan, F. and Amit, Z. (1992b) 'Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system', *Biochem Pharmacol*, 44(1), 93-8.
- Aragon, C. M., Spivak, K. and Amit, Z. (1989) 'Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced open-field activity: evidence for brain catalase mediation of ethanol's effects', *Alcohol Clin Exp Res*, 13(1), 104-8.
- Aragon, C. M., Spivak, K. and Amit, Z. (1991) 'Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced narcosis, lethality and hypothermia in rats', *Pharmacol Biochem Behav*, 39(1), 55-9.
- Arias, C., Molina, J. C. and Spear, N. E. (2010) 'Differential role of mu, delta and kappa opioid

- receptors in ethanol-mediated locomotor activation and ethanol intake in preweanling rats', *Physiol Behav*, 99(3), 348-54.
- Arnold, J. M. and Roberts, D. C. (1997) 'A critique of fixed and progressive ratio schedules used to examine the neural substrates of drug reinforcement', *Pharmacol Biochem Behav*, 57(3), 441-7.
- Baker, C. I., Behrmann, M. and Olson, C. R. (2002) 'Impact of learning on representation of parts and wholes in monkey inferotemporal cortex', *Nat Neurosci*, 5(11), 1210-6.
- Baker, D. A., McFarland, K., Lake, R. W., Shen, H., Toda, S. and Kalivas, P. W. (2003) 'N-acetyl cysteine-induced blockade of cocaine-induced reinstatement', *Ann N Y Acad Sci*, 1003, 349-51.
- Barbaccia, M. L., Bosio, A., Spano, P. F. and Trabucchi, M. (1982) 'Ethanol metabolism and striatal dopamine turnover', *J Neural Transm*, 53(2-3), 169-77.
- Benjamin, D., Grant, E. R. and Pohorecky, L. A. (1993) 'Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats', *Brain Res*, 621(1), 137-40.
- Besheer, J., Schroeder, J. P., Stevenson, R. A. and Hodge, C. W. (2008) 'Ethanol-induced alterations of c-Fos immunoreactivity in specific limbic brain regions following ethanol discrimination training', *Brain Res*, 1232, 124-31.
- Bilska, A., Dubiel, M., Sokołowska-Jezewicz, M., Lorenc-Koci, E. and Włodek, L. (2007) 'Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain', *Neuroscience*, 146(4), 1758-71.
- Bridges, R. J., Natale, N. R. and Patel, S. A. (2012) 'System xc<sup>-</sup> cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS', *Br J Pharmacol*, 165(1), 20-34.
- Brown, Z. W., Amit, Z. and Rockman, G. E. (1979) 'Intraventricular self-administration of acetaldehyde, but not ethanol, in naive laboratory rats', *Psychopharmacology (Berl)*, 64(3),

271-6.

- Brown, Z. W., Amit, Z., Smith, B. R., Sutherland, E. A. and Selvaggi, N. (1983) 'Alcohol-induced euphoria enhanced by disulfiram and calcium carbimide', *Alcohol Clin Exp Res*, 7(3), 276-8.
- Carboni, E., Imperato, A., Perezzi, L. and Di Chiara, G. (1989) 'Amphetamine, cocaine, phenylcyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats', *Neuroscience*, 28(3), 653-61.
- Carnicella, S., Kharazia, V., Jeanblanc, J., Janak, P. H. and Ron, D. (2008) 'GDNF is a fast-acting potent inhibitor of alcohol consumption and relapse', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(23), 8114-9.
- CARPENTER, R. K. and MacLEOD, L. D. (1952) 'The effects of ethyl alcohol and acetaldehyde on maze behaviour and motor co-ordination in rats', *J Ment Sci*, 98(410), 167-73.
- Chen, Y. and Swanson, R. A. (2003) 'The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures', *J Neurochem*, 84(6), 1332-9.
- Chevens, I. C. (1953) 'Antabuse addiction', *Br Med J*, 1(4825), 1450-1.
- Ciccocioppo, R., Martin-Fardon, R. and Weiss, F. (2002) 'Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats', *Neuropsychopharmacology*, 27(3), 391-9.
- Cippitelli, A., Bilbao, A., Gorriti, M. A., Navarro, M., Massi, M., Piomelli, D., Ciccocioppo, R. and Rodríguez de Fonseca, F. (2007) 'The anandamide transport inhibitor AM404 reduces ethanol self-administration', *Eur J Neurosci*, 26(2), 476-86.
- Cohen, G., Sinet, P. M. and Heikkila, R. (1980) 'Ethanol oxidation by rat brain in vivo', *Alcohol Clin Exp Res*, 4(4), 366-70.
- Cornish, J. L. and Kalivas, P. W. (2000) 'Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction', *J Neurosci*, 20(15), RC89.
- Correa, M., Arizzi, M. N., Betz, A., Mingote, S. and Salamone, J. D. (2003) 'Locomotor stimu-

- lant effects of intraventricular injections of low doses of ethanol in rats: acute and repeated administration', *Psychopharmacology (Berl)*, 170(4), 368-75.
- Correa, M., Manrique, H. M., Font, L., Escrig, M. A. and Aragon, C. M. (2008) 'Reduction in the anxiolytic effects of ethanol by centrally formed acetaldehyde: the role of catalase inhibitors and acetaldehyde-sequestering agents', *Psychopharmacology (Berl)*, 200(4), 455-64.
- Correa, M., Miquel, M. and Aragon, C. M. (2000) 'Lead acetate potentiates brain catalase activity and enhances ethanol-induced locomotion in mice', *Pharmacol Biochem Behav*, 66(1), 137-42.
- Correa, M., Miquel, M., Sanchis-Segura, C. and Aragon, C. M. (1999a) 'Acute lead acetate administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: the role of brain catalase', *Alcohol Clin Exp Res*, 23(5), 799-805.
- Correa, M., Miquel, M., Sanchis-Segura, C. and Aragon, C. M. (1999b) 'Effects of chronic lead administration on ethanol-induced locomotor and brain catalase activity', *Alcohol*, 19(1), 43-9.
- Correa, M., Salamone, J. D., Segovia, K. N., Pardo, M., Longoni, R., Spina, L., Peana, A. T., Vinci, S. and Acquas, E. (2012) 'Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent', *Neurosci Biobehav Rev*, 36(1), 404-30.
- Crews, F. T., Morrow, A. L., Criswell, H. and Breese, G. (1996) 'Effects of ethanol on ion channels', *Int Rev Neurobiol*, 39, 283-367.
- Croucher, M. J., Thomas, L. S., Ahmadi, H., Lawrence, V. and Harris, J. R. (2001) 'Endogenous sulphur-containing amino acids: potent agonists at presynaptic metabotropic glutamate autoreceptors in the rat central nervous system', *Br J Pharmacol*, 133(6), 815-24.
- Davis, V. E. and Walsh, M. J. (1970) 'Alcohol addiction and tetrahydropapaveroline', *Science*, 169(3950), 1105-6.
- Deitrich, R. A. (1987) 'Specificity of the action of ethanol in the central nervous system: behavioral effects', *Alcohol Alcohol Suppl*, 1, 133-8.

- Deitrich, R. A. (2004a) 'Acetaldehyde: déjà vu du jour', *J Stud Alcohol*, 65(5), 557-72.
- Deitrich, R. A. (2004b) 'Acetaldehyde: déjà vu du jour', *J Stud Alcohol*, 65(5), 557-72.
- Deitrich, R., Zimatkin, S. and Pronko, S. (2006) 'Oxidation of ethanol in the brain and its consequences', *Alcohol Res Health*, 29(4), 266-73.
- Deng, C., Li, K. Y., Zhou, C. and Ye, J. H. (2009) 'Ethanol enhances glutamate transmission by retrograde dopamine signaling in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from the ventral tegmental area', *Neuropsychopharmacology*, 34(5), 1233-44.
- Deng, X. S. and Deitrich, R. A. (2008) 'Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction', *Curr Drug Abuse Rev*, 1(1), 3-8.
- Devine, D. P., Leone, P. and Wise, R. A. (1993) 'Mesolimbic dopamine neurotransmission is increased by administration of mu-opioid receptor antagonists', *Eur J Pharmacol*, 243(1), 55-64.
- Dhawan, B. N., Cesselin, F., Raghbir, R., Reisine, T., Bradley, P. B., Portoghese, P. S. and Hamon, M. (1996) 'International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors', *Pharmacol Rev*, 48(4), 567-92.
- Di Chiara, G. (1997) 'Alcohol and dopamine', *Alcohol Health Res World*, 21(2), 108-14.
- Di Chiara, G. and Imperato, A. (1988) 'Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(14), 5274-8.
- Di Chiara, G. and North, R. A. (1992) 'Neurobiology of opiate abuse', *Trends Pharmacol Sci*, 13(5), 185-93.
- Di Chiara, G., Tanda, G. and Carboni, E. (1996) 'Estimation of in-vivo neurotransmitter release by brain microdialysis: the issue of validity', *Behav Pharmacol*, 7(7), 640-657.
- Diana, M., Peana, A. T., Sirca, D., Lintas, A., Melis, M. and Enrico, P. (2008a) 'Crucial role of acetaldehyde in alcohol activation of the mesolimbic dopamine system', *Ann N Y Acad Sci*, 1139, 307-17.

- Economidou, D., Fedeli, A., Fardon, R. M., Weiss, F., Massi, M. and Ciccocioppo, R. (2006) 'Effect of novel nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor ligands on ethanol drinking in alcohol-preferring msP rats', *Peptides*, 27(12), 3299-306.
- Enrico, P., Sirca, D., Mereu, M., Peana, A. T., Lintas, A., Golosio, A. and Diana, M. (2009) 'Acetaldehyde sequestering prevents ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine transmission', *Drug Alcohol Depend*, 100(3), 265-71.
- Ericson, M., Haythornthwaite, A. R., Yeh, P. W. and Yeh, H. H. (2003) 'Brain-derived neurotrophic factor mitigates chronic ethanol-induced attenuation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured cerebellar granule cells', *J Neurosci Res*, 73(5), 722-30.
- Eriksson, C. J. and Peachey, J. E. (1980) 'Lack of difference in blood acetaldehyde of alcoholics and controls after ethanol ingestion', *Pharmacol Biochem Behav*, 13 Suppl 1, 101-5.
- Eriksson, C. J. and Sippel, H. W. (1977) 'The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation-I. The distribution of acetaldehyde in liver, brain, blood and breath', *Biochem Pharmacol*, 26(3), 241-7.
- Eriksson, C. J., Sippel, H. W. and Forsander, O. A. (1977) 'The determination of acetaldehyde in biological samples by head-space gas chromatography', *Anal Biochem*, 80(1), 116-24.
- Escarabajal, D., Miquel, M. and Aragon, C. M. (2000) 'A psychopharmacological study of the relationship between brain catalase activity and ethanol-induced locomotor activity in mice', *J Stud Alcohol*, 61(4), 493-8.
- Eysseric, H., Gonthier, B., Soubeyran, A., Bessard, G., Saxod, R. and Barret, L. (1997) 'Characterization of the production of acetaldehyde by astrocytes in culture after ethanol exposure', *Alcohol Clin Exp Res*, 21(6), 1018-23.
- Faccidomo, S., Besheer, J., Stanford, P. C. and Hodge, C. W. (2009) 'Increased operant responding for ethanol in male C57BL/6J mice: specific regulation by the ERK1/2, but not JNK, MAP kinase pathway', *Psychopharmacology (Berl)*, 204(1), 135-47.

- Fadda, F. and Rossetti, Z. L. (1998) 'Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration' in *Prog Neurobiol*, England: 385-431.
- Foddai, M., Dosia, G., Spiga, S. and Diana, M. (2004) 'Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA', *Neuropsychopharmacology*, 29(3), 530-6.
- Font, L., Aragon, C. M. and Miquel, M. (2006a) 'Ethanol-induced conditioned place preference, but not aversion, is blocked by treatment with D -penicillamine, an inactivation agent for acetaldehyde', *Psychopharmacology (Berl)*, 184(1), 56-64.
- Font, L., Aragon, C. M. and Miquel, M. (2006b) 'Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by d-penicillamine', *Behav Brain Res*, 171(1), 78-86.
- Froehlich, J. C., Harts, J., Lumeng, L. and Li, T. K. (1990) 'Naloxone attenuates voluntary ethanol intake in rats selectively bred for high ethanol preference', *Pharmacol Biochem Behav*, 35(2), 385-90.
- Galter, D., Buervenich, S., Carmine, A., Anvret, M. and Olson, L. (2003) 'ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia', *Neurobiol Dis*, 14(3), 637-47.
- Gianoulakis, C. (2004) 'Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse', *Curr Top Med Chem*, 4(1), 39-50.
- Gill, K., Menez, J. F., Lucas, D. and Deitrich, R. A. (1992) 'Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue', *Alcohol Clin Exp Res*, 16(5), 910-5.
- Gonzales, R. A. and Weiss, F. (1998) 'Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens', *J Neurosci*, 18(24), 10663-71.
- Gray, K. M., Watson, N. L., Carpenter, M. J. and Larowe, S. D. (2010) 'N-acetylcysteine (NAC) in young marijuana users: an open-label pilot study', *Am J Addict*, 19(2), 187-9.
- Griffith, O. W. and Mulcahy, R. T. (1999) 'The enzymes of glutathione synthesis: gamma-

- glutamylcysteine synthetase', *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 73, 209-67, xii.
- Griffiths, R., Bigelow, G. and Liebson, I. (1974) 'Suppression of ethanol self-administration in alcoholics by contingent time-out from social interactions', *Behav Res Ther*, 12(4), 327-34.
- Hamby-Mason, R., Chen, J. J., Schenker, S., Perez, A. and Henderson, G. I. (1997a) 'Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain', *Alcohol Clin Exp Res*, 21(6), 1063-72.
- Harman, L. S., Mottley, C. and Mason, R. P. (1984) 'Free radical metabolites of L-cysteine oxidation', *J Biol Chem*, 259(9), 5606-11.
- Hipólito, L., Sánchez, M. J., Polache, A. and Granero, L. (2007) 'Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update', *Curr Drug Metab*, 8(7), 716-27.
- Hubbell, C. L., Czirr, S. A., Hunter, G. A., Beaman, C. M., LeCann, N. C. and Reid, L. D. (1986) 'Consumption of ethanol solution is potentiated by morphine and attenuated by naloxone persistently across repeated daily administrations', *Alcohol*, 3(1), 39-54.
- Hunt, W. A. (1996a) 'Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain--a review' in *Alcohol*, United States: 147-51.
- Hyytiä, P. and Sinclair, J. D. (1993) 'Responding for oral ethanol after naloxone treatment by alcohol-preferring AA rats', *Alcohol Clin Exp Res*, 17(3), 631-6.
- Ibba, F., Vinci, S., Spiga, S., Peana, A. T., Assaretti, A. R., Spina, L., Longoni, R. and Acquas, E. (2009) 'Ethanol-induced extracellular signal regulated kinase: role of dopamine D1 receptors', *Alcohol Clin Exp Res*, 33(5), 858-67.
- Imperato, A. and Di Chiara, G. (1986) 'Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol', *J Pharmacol Exp Ther*, 239(1), 219-28.
- Isse, T., Matsuno, K., Oyama, T., Kitagawa, K. and Kawamoto, T. (2005) 'Aldehyde dehydrogenase 2 gene targeting mouse lacking enzyme activity shows high acetaldehyde level in blood, brain, and liver after ethanol gavages', *Alcohol Clin Exp Res*, 29(11), 1959-64.

- Jamal, M., Ameno, K., Uekita, I., Kumihashi, M., Wang, W. and Ijiri, I. (2007) 'Catalase mediates acetaldehyde formation in the striatum of free-moving rats', *Neurotoxicology*, 28(6), 1245-8.
- Katner, S. N. and Weiss, F. (1999) 'Ethanol-associated olfactory stimuli reinstate ethanol-seeking behavior after extinction and modify extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens', *Alcohol Clin Exp Res*, 23(11), 1751-60.
- Kera, Y., Kiriya, T. and Komura, S. (1985) 'Conjugation of acetaldehyde with cysteinylglycine, the first metabolite in glutathione breakdown by gamma-glutamyltranspeptidase', *Agents Actions*, 17(1), 48-52.
- Kiianmaa, K. (1978) 'Decreased intoxicating effect of ethanol in rats after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of ascending dopamine pathways', *Pharmacol Biochem Behav*, 9(3), 391-3.
- LaRowe, S. D., Myrick, H., Hedden, S., Mardikian, P., Saladin, M., McRae, A., Brady, K., Kalivas, P. W. and Malcolm, R. (2007) 'Is cocaine desire reduced by N-acetylcysteine?', *Am J Psychiatry*, 164(7), 1115-7.
- Lê, A. D., Poulos, C. X., Harding, S., Watchus, J., Juzysch, W. and Shaham, Y. (1999) 'Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress', *Neuropsychopharmacology*, 21(3), 435-44.
- Ledesma, J. C. and Aragon, C. M. (2012) ' $\alpha$ -Lipoic acid, a scavenging agent for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduces ethanol-stimulated locomotion in mice', *Psychopharmacology (Berl)*, 219(1), 171-80.
- Lieber, C. S. (2004) 'The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role', *Drug Metab Rev*, 36(3-4), 511-29.
- Maccioni, P., Pes, D., Fantini, N., Carai, M. A., Gessa, G. L. and Colombo, G. (2008) 'gamma-Hydroxybutyric acid (GHB) suppresses alcohol's motivational properties in alcohol-preferring rats', *Alcohol*, 42(2), 107-13.

- Madayag, A., Lobner, D., Kau, K. S., Mantsch, J. R., Abdulhameed, O., Hearing, M., Grier, M. D. and Baker, D. A. (2007) 'Repeated N-acetylcysteine administration alters plasticity-dependent effects of cocaine', *J Neurosci*, 27(51), 13968-76.
- Manrique, H. M., Miquel, M. and Aragon, C. M. (2006) 'Acute administration of 3-nitropropionic acid, a reactive oxygen species generator, boosts ethanol-induced locomotor stimulation. New support for the role of brain catalase in the behavioural effects of ethanol', *Neuropharmacology*, 51(7-8), 1137-45.
- Mardones, J., Segovia, N., Alcaïno, F. And Hederra, A. (1954) 'Effect of synthetic thioctic or alpha lipoic acid on the voluntary alcohol intake of rats', *Science*, 119(3099), 735-6.
- Markou, A., Weiss, F., Gold, L. H., Caine, S. B., Schulteis, G. and Koob, G. F. (1993) 'Animal models of drug craving', *Psychopharmacology (Berl)*, 112(2-3), 163-82.
- Mascia, M. P., Maiya, R., Borghese, C. M., Lobo, I. A., Hara, K., Yamakura, T., Gong, D. H. and Beckstead, M. J. (2001) 'Does acetaldehyde mediate ethanol action in the central nervous system?', *Alcohol Clin Exp Res*, 25(11), 1570-5.
- McBean, G. J. and Flynn, J. (2001) 'Molecular mechanisms of cystine transport', *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 6), 717-22.
- McBride, W. J., Li, T. K., Deitrich, R. A., Zimatkin, S., Smith, B. R. and Rodd-Henricks, Z. A. (2002a) 'Involvement of acetaldehyde in alcohol addiction', *Alcohol Clin Exp Res*, 26(1), 114-9.
- McBride, W. J., Li, T. K., Deitrich, R. A., Zimatkin, S., Smith, B. R. and Rodd-Henricks, Z. A. (2002b) 'Involvement of acetaldehyde in alcohol addiction', *Alcohol Clin Exp Res*, 26(1), 114-9.
- Melis, M., Enrico, P., Peana, A. T. and Diana, M. (2007) 'Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system', *Eur J Neurosci*, 26(10), 2824-33.
- Mhatre, M. and Holloway, F. (2003) 'Micro1-opioid antagonist naloxonazine alters ethanol discrimination and consumption', *Alcohol*, 29(2), 109-16.

- Miksys, S. and Tyndale, R. F. (2004) 'The unique regulation of brain cytochrome P450 2 (CYP2) family enzymes by drugs and genetics', *Drug Metab Rev*, 36(2), 313-33.
- Miyake, T. (1993) 'Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages.', *J* 41(
- Montoliu, C., Sancho-Tello, M., Azorin, I., Burgal, M., Vallés, S., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (1995) 'Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes', *J Neurochem*, 65(6), 2561-70.
- Moran, M. M., McFarland, K., Melendez, R. I., Kalivas, P. W. and Seamans, J. K. (2005) 'Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking', *J Neurosci*, 25(27), 6389-93.
- Moreno, S., Mugnaini, E. and Cerù, M. P. (1995) 'Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat', *J Histochem Cytochem*, 43(12), 1253-67.
- Moussawi, K., Pacchioni, A., Moran, M., Olive, M. F., Gass, J. T., Lavin, A. and Kalivas, P. W. (2009) 'N-Acetylcysteine reverses cocaine-induced metaplasticity', *Nat Neurosci*, 12(2), 182-9.
- Moussawi, K., Zhou, W., Shen, H., Reichel, C. M., See, R. E., Carr, D. B. and Kalivas, P. W. (2011) 'Reversing cocaine-induced synaptic potentiation provides enduring protection from relapse', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(1), 385-90.
- Mulholland, P. J., Carpenter-Hyland, E. P., Hearing, M. C., Becker, H. C., Woodward, J. J. and Chandler, L. J. (2008) 'Glutamate transporters regulate extrasynaptic NMDA receptor modulation of Kv2.1 potassium channels', *J Neurosci*, 28(35), 8801-9.
- Myers, W. D., Ng, K. T. and Singer, G. (1982) 'Intravenous self-administration of acetaldehyde in the rat as a function of schedule, food deprivation and photoperiod', *Pharmacol Biochem Behav*, 17(4), 807-11.
- Myers, W. D., Ng, K. T. and Singer, G. (1984) 'Effects of naloxone and buprenorphine on intravenous acetaldehyde self-injection in rats', *Physiol Behav*, 33(3), 449-55.

- Myers, W., Ng, K. and Singer, G. (1984) 'Ethanol preference in rats with a prior history of acetaldehyde self-administration', *Experientia*, 40(9), 1008-10.
- Nagasawa, H. T., Elberling, J. A. and DeMaster, E. G. (1980) 'Structural requirements for the sequestration of metabolically generated acetaldehyde', *J Med Chem*, 23(2), 140-3.
- Naranjo, C. A. and Sellers, E. M. (1989) 'Serotonin uptake inhibitors attenuate ethanol intake in problem drinkers', *Recent Dev Alcohol*, 7, 255-66.
- Nestler, E. J. and Aghajanian, G. K. (1997a) 'Molecular and cellular basis of addiction', *Science*, 278(5335), 58-63.
- Nestler, E. J. and Aghajanian, G. K. (1997b) 'Molecular and cellular basis of addiction', *Science*, 278(5335), 58-63.
- O'Malley, S. S., Jaffe, A. J., Chang, G., Schottenfeld, R. S., Meyer, R. E. and Rounsaville, B. (1992) 'Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study', *Arch Gen Psychiatry*, 49(11), 881-7.
- Packer, L., Witt, E. H. and Tritschler, H. J. (1995) 'alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant', *Free Radic Biol Med*, 19(2), 227-50.
- Pastor, R. and Aragon, C. M. (2006) 'The role of opioid receptor subtypes in the development of behavioral sensitization to ethanol', *Neuropsychopharmacology*, 31(7), 1489-99.
- Pastor, R., Sanchis-Segura, C. and Aragon, C. M. (2002) 'Ethanol-stimulated behaviour in mice is modulated by brain catalase activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rate of production', *Psychopharmacology (Berl)*, 165(1), 51-9.
- Peana, A. T., Assaretti, A. R., Muggironi, G., Enrico, P. and Diana, M. (2009) 'Reduction of ethanol-derived acetaldehyde induced motivational properties by L-cysteine', *Alcohol Clin Exp Res*, 33(1), 43-8.
- Peana, A. T., Enrico, P., Assaretti, A. R., Pulighe, E., Muggironi, G., Nieddu, M., Piga, A., Lintas, A. and Diana, M. (2008) 'Key role of ethanol-derived acetaldehyde in the motivational properties induced by intragastric ethanol: a conditioned place preference study in

- the rat', *Alcohol Clin Exp Res*, 32(2), 249-58.
- Peana, A. T., Giugliano, V., Rosas, M., Sabariego, M. and Acquas, E. (2013) 'Effects of L-cysteine on reinstatement of ethanol-seeking behavior and on reinstatement-elicited extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the rat nucleus accumbens shell', *Alcohol Clin Exp Res*, 37 Suppl 1, E329-37.
- Peana, A. T., Muggironi, G. and Diana, M. (2010b) 'Acetaldehyde-reinforcing effects: a study on oral self-administration behavior', *Front Psychiatry*, 1, 23.
- Peana, A. T., Muggironi, G., Calvisi, G., Enrico, P., Mereu, M., Nieddu, M., Boatto, G. and Diana, M. (2010a) 'l-Cysteine reduces oral ethanol self-administration and reinstatement of ethanol-drinking behavior in rats', *Pharmacol Biochem Behav*, 94(3), 431-7.
- Peana, A. T., Muggironi, G., Fois, G. R., Zinellu, M., Sirca, D. and Diana, M. (2012) 'Effect of (L)-cysteine on acetaldehyde self-administration', *Alcohol*, 46(5), 489-97.
- Peana, A. T., Muggironi, G., Fois, G. R., Zinellu, M., Vinci, S. and Acquas, E. (2011) 'Effect of opioid receptor blockade on acetaldehyde self-administration and ERK phosphorylation in the rat nucleus accumbens', *Alcohol*, 45(8), 773-83.
- Petersen, D. R. and Tabakoff, B. (1979) 'Characterization of brain acetaldehyde oxidizing systems in the mouse', *Drug Alcohol Depend*, 4(1-2), 137-44.
- Pikkarainen, P. H., Salaspuro, M. P. and Lieber, C. S. (1979) 'A method for the determination of "free" acetaldehyde in plasma', *Alcohol Clin Exp Res*, 3(3), 259-61.
- Pirlich, M., Kiok, K., Sandig, G., Lochs, H. and Grune, T. (2002) 'Alpha-lipoic acid prevents ethanol-induced protein oxidation in mouse hippocampal HT22 cells', *Neurosci Lett*, 328(2), 93-6.
- Quertemont, E. and De Witte, P. (2001) 'Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections', *Pharmacol Biochem Behav*, 68(3), 449-54.
- Quertemont, E. and Grant, K. A. (2002) 'Role of acetaldehyde in the discriminative stimulus effects of ethanol', *Alcohol Clin Exp Res*, 26(6), 812-7.

- Quertemont, E. and Tambour, S. (2004) 'Is ethanol a pro-drug? The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol' in *Trends Pharmacol Sci*, England: 130-4.
- Quertemont, E., Eriksson, C. J., Zimatkin, S. M., Pronko, P. S., Diana, M., Pisano, M., Rodd, Z. A., Bell, R. R. and Ward, R. J. (2005a) 'Is ethanol a pro-drug? Acetaldehyde contribution to brain ethanol effects', *Alcohol Clin Exp Res*, 29(8), 1514-21.
- Quertemont, E., Grant, K. A., Correa, M., Arizzi, M. N., Salamone, J. D., Tambour, S., Aragon, C. M., McBride, W. J., Rodd, Z. A., Goldstein, A., Zaffaroni, A., Li, T. K., Pisano, M. and Diana, M. (2005b) 'The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol' in *Alcohol Clin Exp Res*, United States: 221-34.
- Quertemont, E., Tambour, S. and Tirelli, E. (2005c) 'The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies' in *Prog Neurobiol*, England: 247-74.
- Raskin, N. H. (1975) 'Editorial: Alcoholism or acetaldehydism?', *N Engl J Med*, 292(8), 422-3.
- Reddy, B. V., Boyadjieva, N. and Sarkar, D. K. (1995) 'Effect of ethanol, propanol, butanol, and catalase enzyme blockers on beta-endorphin secretion from primary cultures of hypothalamic neurons: evidence for a mediatory role of acetaldehyde in ethanol stimulation of beta-endorphin release', *Alcohol Clin Exp Res*, 19(2), 339-44.
- Richardson, N. R. and Roberts, D. C. (1996) 'Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy', *J Neurosci Methods*, 66(1), 1-11.
- Rodd-Henricks, Z. A., Bell, R. L., Kuc, K. A., Murphy, J. M., McBride, W. J., Lumeng, L. and Li, T. K. (2002a) 'Effects of ethanol exposure on subsequent acquisition and extinction of ethanol self-administration and expression of alcohol-seeking behavior in adult alcohol-preferring (P) rats: II. Adult exposure', *Alcohol Clin Exp Res*, 26(11), 1642-52.
- Rodd-Henricks, Z. A., Melendez, R. I., Zaffaroni, A., Goldstein, A., McBride, W. J. and Li, T. K. (2002b) 'The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area

- of alcohol-preferring rats', *Pharmacol Biochem Behav*, 72(1-2), 55-64.
- Salaspuro, V. (2007) 'Pharmacological treatments and strategies for reducing oral and intestinal acetaldehyde', *Novartis Found Symp*, 285, 145-53; discussion 153-7, 198-9.
- Salaspuro, V. J., Hietala, J. M., Marvola, M. L. and Salaspuro, M. P. (2006) 'Eliminating carcinogenic acetaldehyde by cysteine from saliva during smoking', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(1), 146-9.
- Salaspuro, V., Hietala, J., Kaihovaara, P., Pihlajarinne, L., Marvola, M. and Salaspuro, M. (2002) 'Removal of acetaldehyde from saliva by a slow-release buccal tablet of L-cysteine', *Int J Cancer*, 97(3), 361-4.
- Samson, H. H. and Doyle, T. F. (1985) 'Oral ethanol self-administration in the rat: effect of naloxone', *Pharmacol Biochem Behav*, 22(1), 91-9.
- Sánchez-Catalán, M. J., Hipólito, L., Guerri, C., Granero, L. and Polache, A. (2008) 'Distribution and differential induction of CYP2E1 by ethanol and acetone in the mesocorticolimbic system of rat', *Alcohol Alcohol*, 43(4), 401-7.
- Sanchis-Segura, C., Miquel, M., Correa, M. and Aragon, C. M. (1999) 'The catalase inhibitor sodium azide reduces ethanol-induced locomotor activity', *Alcohol*, 19(1), 37-42.
- Sato, H., Tamba, M., Okuno, S., Sato, K., Keino-Masu, K., Masu, M. and Bannai, S. (2002) 'Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain', *J Neurosci*, 22(18), 8028-33.
- Schmaal, L., Berk, L., Hulstijn, K. P., Cousijn, J., Wiers, R. W. and van den Brink, W. (2011) 'Efficacy of N-acetylcysteine in the treatment of nicotine dependence: a double-blind placebo-controlled pilot study', *Eur Addict Res*, 17(4), 211-6.
- Sellers, E. M., Higgins, G. A. and Sobell, M. B. (1992) '5-HT and alcohol abuse', *Trends Pharmacol Sci*, 13(2), 69-75.
- Shackebaei, D., King, N., Shukla, B. and Suleiman, M. S. (2005) 'Mechanisms underlying the cardioprotective effect of L-cysteine', *Mol Cell Biochem*, 277(1-2), 27-31.

- Shih, A. Y. and Murphy, T. H. (2001) 'xCT cystine transporter expression in HEK293 cells: pharmacology and localization', *Biochem Biophys Res Commun*, 282(5), 1132-7.
- Shirpoor, A., Minassian, S., Salami, S., Khadem-Ansari, M. H. and Yeghiazaryan, M. (2008) 'Alpha--lipoic acid decreases DNA damage and oxidative stress induced by alcohol in the developing hippocampus and cerebellum of rat', *Cell Physiol Biochem*, 22(5-6), 769-76.
- Sippel, H. W. (1974) 'The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism', *J Neurochem*, 23(2), 451-2.
- Sirca, D., Enrico, P., Mereu, M., Peana, A. T. and Diana, M. (2011) 'L-cysteine prevents ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine transmission', *Alcohol Clin Exp Res*, 35(5), 862-9.
- Smith, B. R., Amit, Z. and Splawinsky, J. (1984) 'Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde', *Alcohol*, 1(3), 193-5.
- Soghier, L. M. and Brion, L. P. (2006) 'Cysteine, cystine or N-acetylcysteine supplementation in parenterally fed neonates', *Cochrane Database Syst Rev*, (4), CD004869.
- Spina, L., Longoni, R., Vinci, S., Ibba, F., Peana, A. T., Muggironi, G., Spiga, S. and Acquas, E. (2010) 'Role of dopamine D1 receptors and extracellular signal regulated kinase in the motivational properties of acetaldehyde as assessed by place preference conditioning', *Alcohol Clin Exp Res*, 34(4), 607-16.
- Sprince, H., Parker, C. M., Smith, G. G. and Gonzales, L. J. (1974) 'Protection against acetaldehyde toxicity in the rat by L-cysteine, thiamin and L-2-methylthiazolidine-4-carboxylic acid', *Agents Actions*, 4(2), 125-30.
- Suh, J. J., Pettinati, H. M., Kampman, K. M. and O'Brien, C. P. (2006) 'The status of disulfiram: a half of a century later', *J Clin Psychopharmacol*, 26(3), 290-302.
- Suzuki, Y. J., Tsuchiya, M. and Packer, L. (1992) 'Lipoate prevents glucose-induced protein modifications', *Free Radic Res Commun*, 17(3), 211-7.
- Tabakoff, B., Anderson, R. A. and Ritzmann, R. F. (1976) 'Brain acetaldehyde after ethanol

- administration', *Biochem Pharmacol*, 25(11), 1305-9.
- Takahashi, Y. and Kubo, T. (1997) 'Excitatory synaptic transmission in the rat medial vestibular nucleus', *Acta Otolaryngol Suppl*, 528, 56-8.
- Takayama, S. and Uyeno, E. T. (1985) 'Intravenous self-administration of ethanol and acetaldehyde by rats', *Yakubutsu Seishin Kodo*, 5(4), 329-34.
- Thompson, G. A. and Kilpatrick, I. C. (1996) 'The neurotransmitter candidature of sulphur-containing excitatory amino acids in the mammalian central nervous system', *Pharmacol Ther*, 72(1), 25-36.
- Tindberg, N. and Ingelman-Sundberg, M. (1996) 'Expression, catalytic activity, and inducibility of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the rat central nervous system', *J Neurochem*, 67(5), 2066-73.
- Tsai, G., Stauch, B. L., Vornov, J. J., Deshpande, J. K. and Coyle, J. T. (1990) 'Selective release of N-acetylaspartylglutamate from rat optic nerve terminals in vivo', *Brain Res*, 518(1-2), 313-6.
- Vaglini, F., Pardini, C., Viaggi, C., Bartoli, C., Dinucci, D. and Corsini, G. U. (2004) 'Involvement of cytochrome P450 2E1 in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease', *J Neurochem*, 91(2), 285-98.
- Volpicelli, J. R., Alterman, A. I., Hayashida, M. and O'Brien, C. P. (1992) 'Naltrexone in the treatment of alcohol dependence', *Arch Gen Psychiatry*, 49(11), 876-80.
- VV, A. 'Medicamenta',
- Wang, H., Tamba, M., Kimata, M., Sakamoto, K., Bannai, S. and Sato, H. (2003) 'Expression of the activity of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)(-), by xCT and rBAT', *Biochem Biophys Res Commun*, 305(3), 611-8.
- Wang, J., Lanfranco, M. F., Gibb, S. L., Yowell, Q. V., Carnicella, S. and Ron, D. (2010) 'Long-lasting adaptations of the NR2B-containing NMDA receptors in the dorsomedial striatum

- play a crucial role in alcohol consumption and relapse', *J Neurosci*, 30(30), 10187-98.
- Weiss, F., Lorang, M. T., Bloom, F. E. and Koob, G. F. (1993) 'Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants', *J Pharmacol Exp Ther*, 267(1), 250-8.
- Weiss, F., Maldonado-Vlaar, C. S., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Smith, D. L. and Ben-Shahar, O. (2000) 'Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8), 4321-6.
- Weiss, F., Mitchiner, M., Bloom, F. E. and Koob, G. F. (1990) 'Free-choice responding for ethanol versus water in alcohol preferring (P) and unselected Wistar rats is differentially modified by naloxone, bromocriptine, and methysergide', *Psychopharmacology (Berl)*, 101(2), 178-86.
- Williams, K. L., Kane, E. C. and Woods, J. H. (2001) 'Interaction of morphine and naltrexone on oral ethanol self-administration in rhesus monkeys', *Behav Pharmacol*, 12(5), 325-33.
- Xi, Z. X., Ramamoorthy, S., Baker, D. A., Shen, H., Samuvel, D. J. and Kalivas, P. W. (2002) 'Modulation of group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine', *J Pharmacol Exp Ther*, 303(2), 608-15.
- Xiao, C., Shao, X. M., Olive, M. F., Griffin, W. C., Li, K. Y., Krnjević, K., Zhou, C. and Ye, J. H. (2009) 'Ethanol facilitates glutamatergic transmission to dopamine neurons in the ventral tegmental area', *Neuropsychopharmacology*, 34(2), 307-18.
- Zhou, W., Zhang, F., Liu, H., Tang, S., Lai, M., Zhu, H. and Kalivas, P. W. (2009a) 'Effects of training and withdrawal periods on heroin seeking induced by conditioned cue in an animal model of relapse', *Psychopharmacology (Berl)*, 203(4), 677-84.
- Zhou, W., Zhang, F., Liu, H., Tang, S., Lai, M., Zhu, H. and Kalivas, P. W. (2009b) 'Effects of training and withdrawal periods on heroin seeking induced by conditioned cue in an animal model of relapse', *Psychopharmacology (Berl)*, 203(4), 677-84.

Zimatkin, S. M. (1991) 'Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS', *J Neurochem*, 56(1), 1-11.

Zimatkin, S. M. and Buben, A. L. (2007) 'Ethanol oxidation in the living brain', *Alcohol Alcohol*, 42(6), 529-32.

Zimatkin, S. M. and Lindros, K. O. (1996) 'Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects', *Alcohol Alcohol*, 31(2), 167-74.