



Università degli Studi di Cagliari

SCUOLA DI DOTTORATO IN TOSSICOLOGIA

Farmacologia e Farmacoterapia delle Tossicodipendenze

Ciclo XXIII

**Risposta dopaminergica nella shell e nel core del nucleo
accumbens e nella corteccia prefrontale in seguito a
diverse modalità di assunzione di cibo**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/14

Presentata da: Dott. Paolo Musio
Coordinatore Dottorato: Prof. Gaetano Di Chiara
Tutor: Prof. Gaetano Di Chiara
Dott.ssa Valentina Bassareo

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

INDICE

Introduzione	pag	2
❖ La gratificazione naturale		2
❖ Considerazioni anatomico funzionali		10
❖ Disturbi del comportamento alimentare		15
❖ Neuroendocrinologia dei disturbi del comportamento alimentare		17
❖ Neuropeptidi		21
❖ Il sistema dopaminergico		22
Materiali e metodi		30
❖ Animali		30
❖ La microdialisi cerebrale		31
❖ Preparazione delle sonde da microdialisi		31
❖ Preparazione della cannula per somministrazione orale		33
❖ Sessione chirurgica		35
❖ Sostanze utilizzate		38
❖ Protocollo consumo cronico di cioccolato		42
❖ Procedura analitico sperimentale		42
❖ Valutazione del comportamento		44
❖ Self administration: sostanze utilizzate		47
❖ Protocollo di auto somministrazione		48
❖ Microdialisi e self administration		49
❖ Istologia		53
❖ Statistica		55
Scopo della ricerca		56
Risultati		60
Discussione		101
Bibliografia		111

INTRODUZIONE

La gratificazione naturale

L'assunzione di cibo, così come il comportamento predatorio, sessuale e materno sono atti essenziali per la sopravvivenza dell'individuo e della specie ed innescano una complessa sequenza di risposte comportamentali sempre rivolte a prolungare il contatto con gli stimoli gratificanti (stimoli appetitivi) e ad evitare gli stimoli con caratteristiche spiacevoli o dolorose (stimoli avversivi). La selezione naturale infatti, ha dotato il cervello degli organismi superiori di centri sensibili agli stimoli correlati alla sopravvivenza e capaci, in seguito al contatto con essi, di dar luogo ad una risposta emozionale positiva.

Tutti questi comportamenti sono considerati stimoli gratificanti e si comportano come dei **rinforzi positivi** che causano nell'individuo il così detto **comportamento motivato**. Questa proprietà provoca una continua ricerca dello stimolo, da parte dell'individuo, di un nuovo contatto con lo stimolo, per usufruire dei suoi effetti gratificanti, avvertiti come sensazione di euforia ed appagamento. Per cui l'uomo viene attirato dallo stimolo, lo ricerca, lo trova, lo consuma e finalmente si sente appagato.

Il comportamento motivato è molto complesso e ciascuno di noi lo utilizza quotidianamente per le varie scelte senza avere la consapevolezza di farlo.

In generale si possono individuare tre fasi:

- **fase incentiva**, detta anche anticipatoria, in cui l'individuo è attratto dallo stimolo e lo raggiunge.
- **fase consumatoria**, nella quale l'individuo entra in diretto contatto con lo stimolo e lo consuma.
- **fase post-consumatoria**, caratterizzata dalla soddisfazione o sazietà post-consumatoria.

Nella fase incentiva abbiamo l'eccitazione dell'aspettativa prodotta attraverso modalità sensoriali distali (vista, udito, olfatto), mentre nella fase consumatoria le modalità sensoriali cambiano ed entrano in gioco sensazioni prossimali (tatto, gusto, etc.) e viscerali e possiamo parlare di edonia consumatoria.

Durante le prime due fasi, definite **ergotropiche**, caratterizzate da un aumentato stato di allerta e da un aumento dell'attività motoria, si ha anche un'attivazione del sistema simpatico e del catabolismo. Queste due fasi possono essere mimate dai farmaci d'abuso psicostimolanti. Diversamente, nella fase postconsumatoria, detta anche **trofotropica**, si ha attivazione del parasimpatico, rilascio d'insulina, anabolismo e sedazione, cui fa spesso

seguito il sonno ristoratore. Questa fase può essere mimata dai farmaci analgesici narcotici come la morfina.

Il comportamento motivato è sostenuto dagli stimoli gratificanti naturali attraverso due principali proprietà: quelle incentive (*Bindra, 1968; Bolles, 1975*) e quelle funzionali.

Le proprietà incentive sono essenziali per attivare il comportamento di un individuo alla ricerca e al contatto con lo stimolo e sono, ad esempio per il cibo, l'odore, la forma e il gusto.

Le proprietà funzionali sono essenziali per la loro efficacia in termini biologici e fisiologici e sono, sempre per il cibo, le proprietà caloriche e metaboliche.

Il cibo, come tutti gli stimoli gratificanti naturali necessari per la prosecuzione della specie e per la vita del singolo individuo, è dotato di proprietà di *rinforzo*, cioè di quelle caratteristiche positive che permettono al soggetto di avvicinarsi ad esso e di consumarlo, traendone beneficio. E' noto infatti, da studi riportati in letteratura, che il cibo determina una stimolazione della trasmissione dopaminergica (DAergica) preferenzialmente nel sistema mesolimbico (*Wilson e coll., 1995; Bassareo e Di Chiara, 1997 a e 1999; Wise, 2006; Liang e coll., 2006; Aragona e coll., 2008*).

In particolare il consumo di un cibo dal gusto particolarmente gradevole in ratti alimentati ad libitum con cibo standard, induce un aumento

immediato della dopamina (DA) extracellulare nella shell e nel core del nucleo accumbens (NAc) e nella corteccia prefrontale (PFCX), mentre una precedente esposizione a quello stesso cibo (2h o 24h prima) determina l'inibizione selettiva dell'incremento della DA nella shell (habituation), ma continua a stimolare la trasmissione DAergica nel core del NAc e nella PFCX (*Bassareo e Di Chiara, 1997; Gambarana e coll., 2003; Rada e coll., 2005; Danielli e coll., 2009*). Possiamo quindi affermare che nella shell dopo la pre-esposizione allo stimolo si instaura una modificazione di tipo adattativo nella liberazione di DA (riduzione della risposta ad uno stimolo) che viene chiamata “**Abitudine**”, dall'inglese **Habituation** (*Kupferman 1985*). Anche un singolo consumo di cibo è sufficiente perché si manifesti il fenomeno dell'habituation, e occorrono poi 5 giorni per avere il recupero della risposta iniziale (*Bassareo e Di Chiara, 1997*). Da questi dati si deduce che solo un cibo dal gusto piacevole e nuovo (ratti naive) o relativamente nuovo (ratti pre-esposti almeno 5 giorni prima allo stimolo) è in grado di attivare la trasmissione DAergica nella shell del NAc.

Nel core e nella PFCX, invece, non si verifica questo tipo di risposta adattativa agli stimoli piacevoli.

Eseguendo gli esperimenti su animali lievemente affamati, è risultato che uno stato di necessità come la fame riduce il fenomeno dell'habituation. Questo risultato spiega il perché alcuni autori non hanno messo in evidenza

il fenomeno dell'habituation in seguito a somministrazioni ripetute di cibo (Wilson e coll., 1995). Inoltre il fenomeno è gusto-specifico, infatti il consumo di un cibo salato (Fonzies) non induce l'habituation in seguito al consumo di un cibo dolce (cioccolato) e viceversa (Bassareo e Di Chiara, 1999b).

Secondo alcuni autori (Berridge, 1996; Berridge e Robinson 1998; Di Chiara, 2005; Di Chiara e Bassareo, 2007) la stimolazione della trasmissione DAergica, che si osserva in seguito al consumo di un cibo appetitoso, non è la causa delle proprietà edoniche (piacevoli) del cibo. Infatti, se così fosse, si dovrebbe osservare sempre un aumento di DA nella shell ogni volta che l'animale assapora quel gusto. Invece durante il secondo consumo dello stesso cibo ad esempio a 2h dal primo, pur osservando da parte dell'animale una elevata motivazione (bassissimo tempo di latenza e una quantità superiore di cibo mangiato), non si registra alcuna stimolazione del rilascio di DA nella shell. Questo indica che l'aumento di DA che si osserva durante il primo consumo di cibo non è la causa ma una conseguenza delle proprietà edoniche del cibo stesso.

La DA rilasciata nella shell del NAc in seguito al contatto con uno stimolo gratificante in realtà, potrebbe svolgere un ruolo di facilitazione durante l'apprendimento associativo mediante il quale l'individuo associa una serie di stimoli neutri agli effetti piacevoli dello stimolo gratificante. In particolare, nel caso del cibo il soggetto associa al suo gusto e ai suoi effetti

calorici e metabolici ad esempio il colore, il profumo della pietanza, la situazione di contorno nella quale ha consumato il pasto.

Le associazioni degli stimoli neutri allo stimolo primario gratificante possono avvenire con diverse modalità: mediante un meccanismo di apprendimento pavloviano, ma anche in seguito a condizionamento operante.

- **Condizionamento pavloviano**

Secondo la teoria dell'*incentive learning* l'apprendimento associativo avviene in seguito a condizionamento classico o pavloviano, chiamato così dal suo scopritore, il russo Ivan Pavlov. Egli dimostrò che se alcuni eventi casuali, come il suono di un campanello (stimolo condizionato CS), precedono regolarmente un evento biologicamente importante per l'animale, come la comparsa di cibo (stimolo non condizionato US), il campanello diventa un segnale del cibo, per cui l'animale inizia a salivare e si appresta a mangiare ogni volta che il campanello suona.

Il comportamento dell'animale diventa così una “risposta condizionata” al suono del campanello. In termini pavloviani, l'associazione di uno stimolo condizionato CS (campanello) ad uno stimolo incondizionato US (cibo) genera l'apprendimento, che dipende anche dal numero e dalla frequenza di associazione degli stimoli. Se, tuttavia, al suono del campanello non viene più associato il cibo, l'animale smette di rispondere ad esso. In questo caso si parla di “estinzione” della risposta, ovvero

l'animale estingue l'associazione tra US e CS. L'associazione tra lo CS e lo US, fa sì che lo CS diventi una sorta di segnale anticipatorio per lo US. Se ad una luce si fa seguire la presentazione di un cibo, dopo alcune sessioni di allenamento, l'animale risponderà alla luce come se questa predicesse il sapore del cibo, infatti la luce da sola produce nel ratto la risposta non condizionata (salivazione).

Il grado di condizionamento che si ottiene in seguito a varie sessioni di condizionamento, dipende da quanto lo stimolo incondizionato US è nuovo e inaspettato, e dal fatto che questo non sia mai stato associato allo stimolo condizionato CS, allora in questo caso l'apprendimento è massimo. Quando lo US sarà meno inaspettato e il ratto inizierà ad associarlo al CS il grado di apprendimento diminuirà fino a che, lo US sarà prevedibile dal ratto e il grado di apprendimento diventerà zero.

- **Condizionamento operante**

Il condizionamento operante consiste invece nell'insegnare all'animale un determinato comportamento per avere una ricompensa. L'animale imparerà presto a compiere il lavoro insegnato per autosomministrarsi lo stimolo gratificante. Le sessioni di autosomministrazione di cibo avvengono mediante l'impiego di gabbie acusticamente isolate (Coulburn Instruments, Allentown, NJ USA) dotate di due fori (nose pokes) provviste di fotocellule, rese attive dall'inserimento del muso dell'animale nel foro, e posizionati a due cm circa dal pavimento della gabbia. Tra i due fori è

presente una “mangiatoia” collegata alla pompa di rilascio del cibo, nella quale lo stesso viene erogato. Generalmente quando si vuole ottenere l’autosomministrazione di cibo è preferibile utilizzare animali affamati.

In principio l’animale infilerà il muso nel nose poke in maniera occasionale, poi, se a questo suo comportamento si farà seguire la presentazione del cibo (quindi una ricompensa), ecco che azionerà il nose poke più frequentemente per ottenerlo. Il ratto ha quindi imparato che compiendo quel gesto ottiene qualcosa di cui in quel momento ha forte necessità (perché affamato). Se lo stesso ratto affamato verrà rimesso nella stessa gabbia ripresenterà lo stesso comportamento. Ovviamente il ratto imparerà e ripeterà quel comportamento solo se le condizioni risulteranno favorevoli.

Considerazioni anatomico funzionali

Il sistema mesolimbico che utilizza la DA come neurotrasmettitore è uno dei circuiti neurochimici che riveste un ruolo di primaria importanza nella gratificazione naturale (*Koob, 1992; Di Chiara, 2002*).

Studi di microdialisi cerebrale nel ratto confermano questa attivazione durante la fase preparatoria del comportamento indotto dagli stimoli gratificanti naturali (*Phillips e coll., 1991*), ma evidenziano un'attivazione anche durante quella consumatoria (*Pfaus e coll., 1990; Radhakishun e coll., 1988*). Sembrerebbe quindi che la stimolazione della trasmissione DA sia legata soprattutto alle proprietà incentive dello stimolo che intervengono sia nella fase preparatoria che in quella consumatoria.

La trasmissione DA mesolimbica, ed in particolare quella del NAc svolge un ruolo importante nella gratificazione naturale (*Bassareo e Di Chiara, 1997; 1999a; 1999b*).

A questo proposito è necessario ricordare che il NAc è una struttura eterogenea dal punto di vista anatomico e funzionale, e rappresenta l'area cui vengono inviate il maggior numero di terminazioni dai neuroni dopaminergici che originano nell'area ventrale del tegumento del mesencefalo, e può essere suddiviso in due sottoporzioni molto diverse tra loro:

- un compartimento ventro-mediale, la “**shell**”, con funzioni prettamente limbiche (integrazione delle emozioni e della motivazione) e viene

considerata un'estensione dell'amigdala (*Heimer e coll.,1991; Heimer e coll.,1997; Jongen-Relo e coll.,1994*)

- un compartimento dorso-laterale, il “**core**” che è considerato la continuazione del caudato putamen e sarebbe deputato all'espressione motoria dei comportamenti motivati (*Stolerman, 1992; Alheid e Heimer, 1988; Zaham e Brog, 1992; Groenewegen e Russchen, 1989; Voorn e coll., 1989; Heimer e coll., 1991; Heimer e coll.,1997*).

Le vie neuronali implicate nella gratificazione sono:

- il sistema dopaminergico
- il sistema oppioide
- il sistema gabaergico

Le sostanze d'abuso (“droghe”), possono essere considerate come surrogati degli stimoli gratificanti naturali. Infatti, tali sostanze hanno proprietà rinforzanti e motivazionali, che attivano comportamenti compulsivi di tipo appetitivo. Molte droghe inducono, come gli stimoli gratificanti naturali, un aumento del tono DAergico mesolimbico, con effetti attivanti i comportamenti d'approccio e consumo. La ricerca delle droghe dipende, più che per gli stimoli naturali, dall'apprendimento incentivo, cioè dalla capacità delle droghe d'abuso d'indurre l'acquisizione di incentivi secondari, che risulta essere in stretta relazione alle capacità

d'aumentare direttamente il tono DAergico mesolimbico. Gli oppiacei e l'etanolo sembrano mimare più completamente tanto gli aspetti incentivanti quanto quelli consumatori dei rinforzi naturali, per la loro capacità di stimolare il tono DAergico, ma anche d'attivare il sistema di gratificazione endopeptidergico.

La maggior parte delle droghe d'abuso, quando somministrate sistematicamente in animali da esperimento, aumenta i livelli di DA nel NAc. Questa azione acuta caratteristica delle droghe d'abuso sul sistema mesolimbico DAergico è stata considerata contribuire significativamente alle proprietà di rinforzo positivo di queste sostanze ed ha suggerito che la VTA ed il NAc rappresentano strutture neuronali coinvolte in un comune meccanismo di ricompensa. Le droghe d'abuso hanno anche profondi e complessi effetti sulle funzioni cerebrali, dopo assunzione in cronico. Numerose evidenze scientifiche confermano che l'uso prolungato d'oppioidi e psicostimolanti aumenta il bisogno compulsivo (craving) di assumere droghe (*Di Chiara 1995; 1998*). Inoltre, l'esposizione ripetuta a queste sostanze d'abuso induce fenomeni d'adattamento neurale, che sono alla base dei fenomeni di tolleranza, dipendenza ed astinenza. Anche queste azioni, dopo assunzione cronica di droghe, sembrano essere mediate, almeno in parte, dal sistema DAergico mesolimbico e, in particolare, dalla via VTA-NAc (*Clarke e Parker, 1995*).

E' ormai assodato che l'esposizione a sostanze d'abuso causa incrementi ripetuti della DA extracellulare nel NAc (*Di Chiara e Imperato, 1988; Hernandez e Hoebel, 1988; Wise e coll., 1995 a e b*). L'assunzione cronica di tali sostanze, avviene in maniera ciclica (*Koob e Le Moal, 1997*); e questa ciclicità presenta almeno quattro componenti interconnesse funzionalmente ed in sequenza, che inducono e mantengono nel tempo la condizione di dipendenza:

- Il ***craving***, inteso come bisogno compulsivo di assumere sostanze con proprietà gratificanti in virtù della gratificazione connessa al consumo di tali sostanze;
- la fase d'***assunzione*** della sostanza d'abuso, con tutti gli effetti gratificanti caratteristici indotti in acuto dalla sostanza stessa;
- l'***ansia anticipatoria*** connessa alla fine dell'effetto gratificante indotto dalla sostanza, ma anche alle preoccupazioni ed aspettative negative per il timore dell'insorgere della successiva fase astinenziale;
- la fase d'***astinenza***, con i tipici sintomi di malessere, specifici per la sostanza d'abuso, associati ad aspetti emotivi di tipo depressivo, quali: anedonia, apatia, disforia ed irritabilità.

La fase astinenziale, con le sue caratteristiche motivazionali avverse, induce rapidamente alla successiva fase d'appetizione compulsiva, e quindi al craving per la sostanza d'abuso. Durante la crisi d'astinenza si verificano cambiamenti neurochimici nei sistemi emozionali e motivazionali.

Esempi di questi eventi neuro-chimici, adattivi ed omeostatici, possono essere:

❖ la riduzione del tono DAergico e serotoninergico nel NAc durante la fase d'astinenza, così come è stato dimostrato mediante esperimenti di microdialisi in vivo; (*Parsons e coll., 1995; Weiss e coll., 1992; Acquas e Di Chiara, 1992*);

❖ l'aumento della sensibilità dei recettori per gli oppiacei e dei relativi meccanismi di trasduzione del segnale nel NAc, durante l'astinenza da oppiacei; (*Stilnus e coll., 1990*);

❖ la riduzione del tono GABAergico con aumento della trasmissione glutammatergica durante l'astinenza da etanolo; (*Roberts e coll., 1996; Fitzgerald e Nestler , 1995*);

❖ le differenti variazioni regionali di sensibilità recettoriale nicotinic. (*Dani e Heinemans, 1996*).

Questi cambiamenti neurochimici sono alla base di alcuni cambiamenti molecolari che sono stati proposti come causa della dipendenza; questi stessi processi, insieme, sono alla base della comorbidità tra l'abuso di droghe e il consumo compulsivo di cibo che si osserva negli individui bulimici.

Il coinvolgimento accertato dei sistemi DAergici nel meccanismo di rinforzo, fa supporre che alterazioni del sistema DAergico siano alla base dei disturbi alimentari come la fame compulsiva e la bulimia nervosa. Il

cibo non è, normalmente, una sostanza d'abuso, ma in alcune condizioni patologiche può diventarlo, spingendo l'individuo (o il ratto nei modelli animali) ad assumerlo in maniera compulsiva, e a diventare dipendente dal suo consumo.

Disturbi del comportamento alimentare (DCA)

Il peso corporeo e le problematiche legate all'alimentazione hanno da sempre attratto l'attenzione del personale medico-sanitario.

L'alimentazione è un bisogno primordiale e lo stesso amore materno è sostenuto e mediato dalla funzione nutrice. Con l'alimentazione inizia, per il neonato, un processo di apprendimento che comprende molte funzioni tra le quali l'educazione del desiderio. Il desiderio di cibo quindi è uno stimolo vitale, autoregolato, quanto il sentirsi belli e desiderati.

I bisogni che inducono il consumo di grandi quantità di cibo, o la quasi totale astensione, possono trovare spiegazione in una mancata soddisfazione di esigenze diverse tra le quali il sentirsi accettati, approvati e sicuri (*Leonini, 1982*).

I Disturbi del Comportamento Alimentare comprendono un insieme di patologie caratterizzate da alterazioni di tipo psicologico nel rapporto con il cibo. Le principali sindromi sono:

- l'Anoressia Nervosa (AN)
- la Bulimia Nervosa (BN)

- Disturbi del Comportamento Alimentare Non Altrimenti Specificato.

I disturbi del comportamento alimentare si associano ad alterazioni della sfera endocrina, molto studiate da sempre in quanto si è cercato di capire se queste ultime potessero essere una causa o una concausa delle problematiche alimentari, oppure soltanto una conseguenza. L'amenorrea, l'ipercorticismismo e l'ipotiroidismo, oltre ad alterazioni nella secrezione dell'ormone della crescita (GH) e dell'ormone antidiuretico (ADH) sono di comune riscontro nei soggetti anoressici e bulimici.

L'obesità non compare nella classificazione dei disturbi del comportamento alimentare; tuttavia tra i Disturbi non Altrimenti Specificati viene identificato il "Disturbo dell'Alimentazione Incontrollata o Abbuffata Compulsiva" (Binge Eating Disorder, BED), che sarebbe alla base di una percentuale variabile delle forme di obesità. I soggetti che, pur alimentandosi in modo compulsivo, non tendono a mettere in atto meccanismi di compensazione. Il sito anatomico-funzionale da cui originano la maggior parte delle alterazioni neuro-endocrine evidenti nei soggetti affetti da alterazioni del comportamento alimentare o dediti all'abuso di droghe, è da ricercare nel sistema ipotalamo ipofisario, anche se, talvolta, sono direttamente interessate le ghiandole endocrine stesse. L'ipotalamo rappresenta non solo il punto di incontro tra il SNC ed il sistema endocrino, ma regola molte altre funzioni biologiche tra cui l'assunzione di nutrienti, di liquidi ed il sonno.

La sua funzione si esplica tanto attraverso i classici neurotrasmettitori (adrenalina, dopamina, noradrenalina, serotonina) che tramite neuropeptidi a produzione centrale e periferica.

Neuroendocrinologia dei disturbi del comportamento alimentare

I sistemi neurali deputati alla complessa attività regolatoria del comportamento alimentare sono integrati a livello ipotalamico mediale, in particolare dai nuclei paraventricolari (PVN) e dai nuclei ventromediali (VMN). Tali nuclei svolgono un'articolata funzione d'integrazione delle afferenze periferiche, provenienti dall'apparato digerente, con prevalente mediazione neuroendocrina, ma anche da altre aree cerebrali, con prevalente neurotrasmissione aminergica e neuromodulazione peptidergica (*Jimerson e coll., 1983*). L'attività di questi centri è sottoposta ad influenze di vario tipo che contribuiscono a determinare il senso di sazietà:

- la distensione gastrica che viene trasmessa attraverso il nervo vago
- Cck (colecistochinina), ormone polipeptidico con effetti sia sul tratto gastrointestinale, sia a livello del SNC.
- somatostatina (tetradecapeptide ciclico)
- ormoni pancreatici (insulina e glucagone)
- calcitonina.

Esiste quindi tutta una serie di sensori periferici in grado di inviare i propri dati verso l'encefalo in modo che i centri ipotalamici deputati a ricevere tali messaggi possano elaborare una risposta efficace.

Una volta giunti a livello centrale, i segnali provenienti dalla periferia vengono elaborati ed integrati mediante l'attività di alcune sostanze neurotrasmettitoriali che presiedono alla regolazione centrale dell'appetito.

Possono essere classificate in tre gruppi:

1. monoamine
2. neuropeptidi
3. neurotrasmettitori non peptidici

Del primo gruppo ricordiamo la **noradrenalina**, la **serotonina** e la **dopamina**. La noradrenalina è in grado di stimolare l'assunzione selettiva di carboidrati ed aumentare la quantità di alimenti introdotti con il pasto. Tale azione si svolge attraverso la mediazione dei recettori α_2 adrenergici localizzati nel nucleo PV dell'ipotalamo e viene attivata dalla mancanza di cibo e dallo stress. Al contrario, riduce l'appetito quando somministrato a livello del nucleo laterale (azione mediata dai recettori β adrenergici). Inoltre, svolge un'azione di contro-regolazione dell'ormone ipotalamico che regola la secrezione dell'ACTH (CRH) il quale, riveste un ruolo primario nella regolazione centrale dell'appetito. Infatti i primi farmaci in grado di ridurre l'assunzione di cibo, quali le sostanze amfetamino simili, agivano attraverso un'alterazione della disponibilità di noradrenalina.

La Serotonina è un'altra amina che riveste un ruolo di primaria importanza nella regolazione dell'appetito nell'uomo. Infatti, al contrario della Noradrenalina, essa induce un senso di sazietà, soprattutto nei riguardi dei carboidrati, piuttosto che inibire il senso della fame. Tale azione che si svolge a livello del nucleo PV dell'ipotalamo, determina una riduzione sia della quantità di cibo ingerita in ciascun pasto che della durata di questo. Recentemente la ricerca farmaceutica ha reso disponibile tutta una serie di farmaci in grado di interferire con la sintesi e biodisponibilità di tale amina. Fra le varie sostanze ottenute, quelle che inibiscono il reuptake della serotonina (es. Fluoxetina) sembrano essere le più promettenti nel trattamento di alcune sindromi in cui siano alterati i normali meccanismi di regolazione dell'assunzione di cibo.

Per quanto riguarda la DA, il suo ruolo è fondamentale nell'equilibrio delle vie della soddisfazione e del drive. Molti autori concordano nel ritenere che tale sostanza stimoli l'assunzione di cibo, soprattutto di proteine, attraverso un'azione sull'ipotalamo laterale, mediata dai peptidi oppioidi. La DA svolge un ruolo fondamentale nei circuiti mesolimbici implicati nel controllo della funzione edonica. L'assunzione di cibo determina rilascio di DA nei siti cerebrali già descritti e coinvolti nel fenomeno del "reward" (ricompensa). La somministrazione di farmaci agonisti DA stimola il comportamento alimentare a bassi dosaggi, mentre lo riduce ad alti dosaggi. Il trattamento con neurolettici, antagonisti dei

recettori DA, provoca iperfagia e incremento ponderale. Una riduzione del numero di recettori D2, geneticamente determinata, si associa a ridotti effetti gratificanti mediati dal sistema DA e si associa ad obesità, in presenza di cofattori ambientali. I soggetti con BN con alta frequenza di “bingeing behavior” mostrano ridotti livelli di DA cerebrale.

Neuropeptidi

Peptidi oppioidi: sono ubiquitari, derivati da un precursore comune che è la pro-opio-melanocortina, con attività di modulazione del dolore e di vari sistemi endocrini. Vengono liberati in grandi quantità in seguito a situazioni di stress sia fisico che psichico. Stimolano il consumo di cibo anche aumentando il turn-over della Serotonina; in particolare pare che la Dinorfina e le beta-endorfine siano le più attive in tal senso. La somministrazione di antagonisti recettoriali degli oppioidi, quali il naloxone ed il naltrexone, determina la riduzione dell'assunzione del cibo, soprattutto dei grassi, modificando la durata e le dimensioni del pasto ed alterando il senso del gusto (l'uso di queste sostanze antagoniste nei disturbi alimentari è però sconsigliato perchè sviluppano rapida tolleranza). La produzione di Dinorfina, potrebbe causare le cosiddette crisi bulimiche caratteristiche di alcune anoressiche, mentre l'aumento delle beta endorfine produrrebbe una marcata lipolisi in grado di spiegare la sproporzione fra esagerata perdita di peso e riduzione dell'alimentazione propria di tali soggetti.

Il Neuropeptide Y: è localizzato in diverse zone cerebrali. La sua azione è simile a quella delle catecolamine e si svolge prevalentemente a livello ipotalamico. Sembra essere il più potente agente naturale isolato finora in grado di stimolare l'assunzione di cibo, specie i carboidrati. Ciò avviene in maniera diretta, senza la mediazione della norepinefrina, con un sito

d'azione a livello dell'ipotalamo anteriore e del nucleo PV. Nell'animale, la somministrazione ripetuta di questo composto ha determinato una massiccia iperfagia ed una notevole distensione gastrica.

Il CRH: è in grado di ridurre l'assunzione di cibo e di attenuare l'iperfagia determinata da norepinefrina, dinorfina e neuropeptide Y, agendo a livello del nucleo PV. Viene anche ritenuto responsabile dell'effetto inibitorio sull'alimentazione svolto dal nucleo PV, tant'è vero che sembra probabile un suo coinvolgimento nella patogenesi dell'anoressia nervosa.

Il sistema dopaminergico

La dopamina (3,4-diidrossifenilettilammina) è oggi uno dei principali neurotrasmettitori della trasmissione catecolaminergica. Alla fine degli anni '50 si giunse all'ipotesi che anche la DA potesse svolgere il ruolo di neurotrasmettitore indipendentemente dalla sua funzione di precursore della adrenalina e nor-adrenalina (*Carlsson e coll., 1957*). Furono presto identificati neuroni specifici contenenti come neurotrasmettitore primario la DA a livello: extrapiramidale, limbico e ipotalamo-ipofisario (*Clementi e coll., 1997*).

Il punto di partenza per la sintesi delle catecolamine è rappresentato dagli amminoacidi essenziali fenilalanina e tirosina, che derivano dalle proteine presenti nella dieta. La fenilalanina ad opera dell'enzima

fenilalanina idrossilasi subisce un'idrossilazione in posizione para nell'anello benzenico dando origine alla tirosina. Sulla tirosina agisce l'enzima tirosina idrossilasi che determina idrossilazione dell'anello fenolico in posizione meta dando origine alla Dopa (diidrossifenilalanina). A questo punto avviene una decarbossilazione mediata dall'enzima dopa decarbossilasi che porta alla formazione della dopamina. La dopamina viene convertita a sua volta in noradrenalina ad opera di una β -idrossilasi; infine l'azione di una feniletanolamina N-metil transferasi porta all'inserimento di una funzione metilica nella struttura della noradrenalina con formazione di adrenalina.

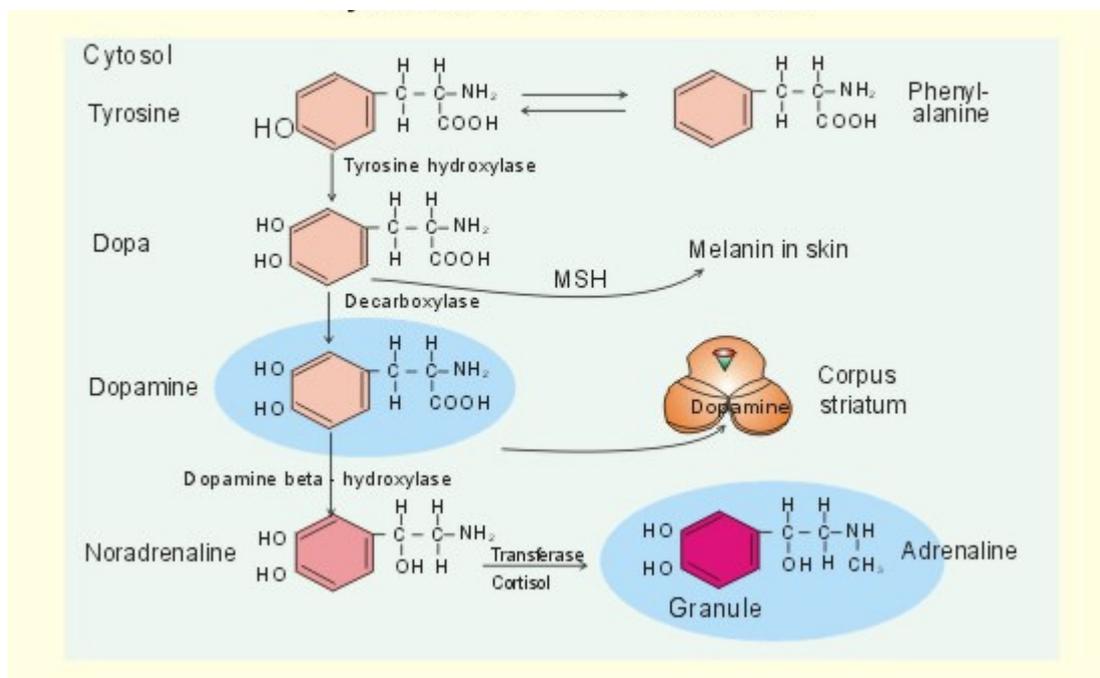


Figura 1: Sintesi delle catecolamine

Nella terminazione nervosa la DA viene immagazzinata all'interno di vescicole sinaptiche e, in misura minore, si trova libera nel citoplasma. La DA viene liberata nello spazio sinaptico attraverso un meccanismo di esocitosi, processo che viene scatenato dalla depolarizzazione della membrana presinaptica con conseguente entrata di calcio. La DA si lega ai suoi recettori metabotropi, associati a proteine G, che sono divisi nella famiglia dei D1 e dei D2. Alla prima appartengono i D2 e i D5 mentre alla seconda i D2, D3 e D4. Le due famiglie differiscono per il meccanismo di trasduzione del segnale: i D1 stimolano l'adenilato ciclasi con produzione di cAMP e aumentando l'attività della Fosfolipasi C, mentre i D2 inibiscono l'adenilato ciclasi, attivando l'efflusso di potassio e inibiscono l'influsso di calcio. Il segnale dopaminergico viene abolito attraverso due meccanismi principali: ricaptazione e catabolismo. Inoltre la DA agendo sui recettori D2 presinaptici (noti anche come autorecettori) esercita un controllo di tipo inibitorio sulla liberazione della stessa DA. Circa l'80% della DA liberata nello spazio sinaptico viene ricaptata attraverso specifici trasportatori di membrana localizzati a livello presinaptico. Il catabolismo prevede due principali vie di degradazione: una deaminazione ossidativa operata dalle monoamine-ossidasi (MAO) e una O-metilazione ad opera delle catecol-ossi-metiltransferasi (COMT). Il prodotto finale del catabolismo operato dalle MAO e dalle COMT è l'acido omovanillico.

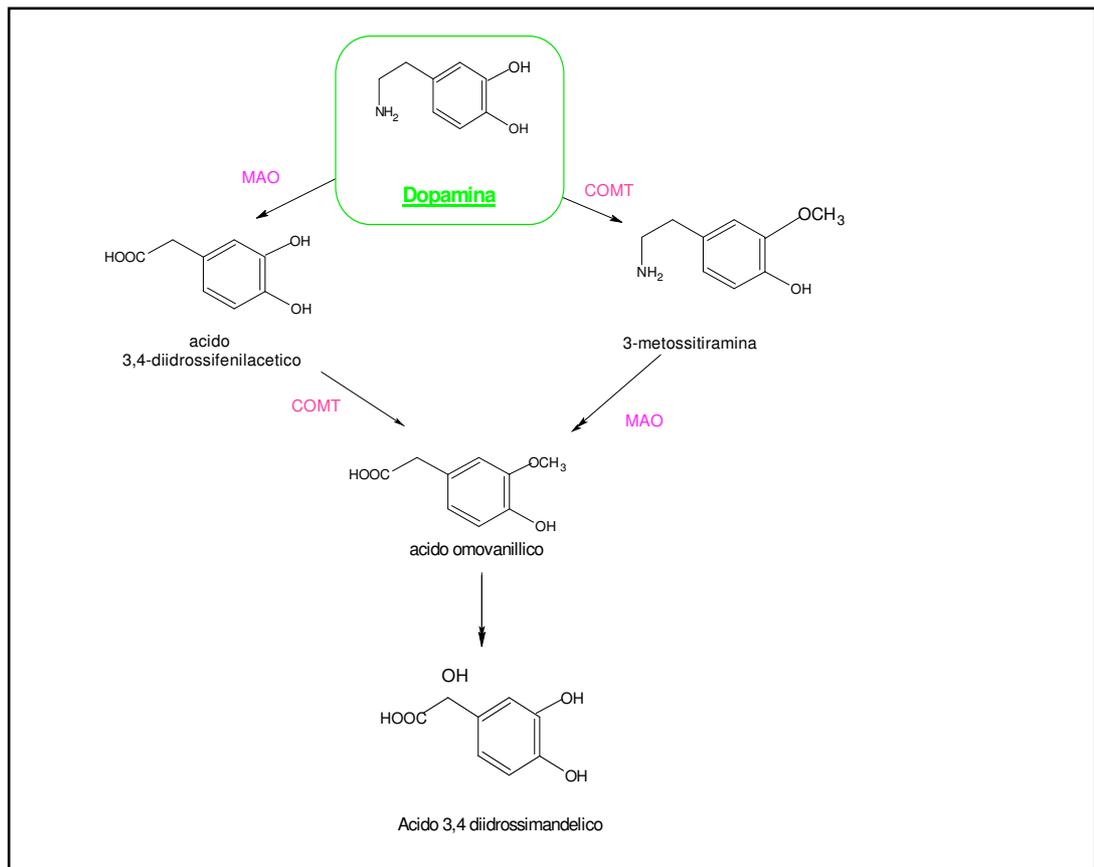


Figura 2: catabolismo della DA

Possiamo distinguere il sistema dopaminergico in funzione della lunghezza delle fibre che lo costituiscono in:

- ❖ Sistema di proiezione breve
- ❖ Sistema di proiezione lungo

Sistema dopaminergico breve: i neuroni DA presentano il corpo cellulare nell'ipotalamo e i loro brevi assoni vengono proiettati all'eminenza mediana dove la DA viene liberata e tramite il circolo ipotalamo ipofisario giunge all'ipofisi anteriore regolando la secrezione ormonale.

Sistema dopaminergico lungo: si suddivide in mesostriatale, mesolimbico, mesocorticale. I neuroni DA presentano il corpo cellulare nel mesencefalo e in particolare alcuni sono localizzati nella pars compatta della SN dell'area ventrale del tegmento (VTA) e sono indicati come A9; mentre i neuroni della pars ventrale del tegmento sono indicati come A10.

La maggior parte dei neuroni A9 confluisce nella parte somato- motoria dello striato (gangli della base) ossia striato dorsale, che è implicato nell'apprendimento e nell'esecuzione dei movimenti complessi che comportano una pianificazione motoria, con formazione del sistema mesostriatale. Una degenerazione dei neuroni a questo livello comporta l'insorgenza del morbo di Parkinson con la comparsa di tutta la sintomatologia caratteristica: rigidità, acinesia, tremori. La maggior parte dei neuroni A10 invece confluisce nella parte latero basale dello striato (striato ventrale) in prossimità di aree limbiche quali NAc, nuclei olfattori, amigdala e ippocampo. Si tratta di aree fondamentalmente coinvolte nelle risposte emotive e nel comportamento motivazionale formando quello che va sotto il nome di sistema mesolimbico. Tale sistema integra le emozioni con il comportamento, tramite le motivazioni che spingono un individuo ad assumere un comportamento chiamato appunto comportamento motivato. In generale se lo stimolo è gratificante l'individuo agisce in modo da prolungarlo, se invece è avversivo esso agirà in modo da allontanarlo.

Infine lunghe proiezioni che dal mesencefalo terminano nel proencefalo in particolare nella corteccia prefrontale (PFCX) formano il cosiddetto sistema mesocorticale. Tale sistema svolge diverse e importanti funzioni quali: regolazione dell'attività di aree sottocorticali, influenza l'espressione del movimento ed è importante per focalizzare l'attenzione del soggetto verso stimoli motivazionali che hanno valenza sia negativa che positiva. Ancora è coinvolto nella regolazione del comportamento emozionale e affettivo. Tale sistema ha una notevole influenza sul tono dell'umore e sull'attenzione, rendendo l'individuo attivo verso l'ambiente esterno, ed è inoltre coinvolto nella regolazione dei processi di gratificazione e di apprendimento incentivo.

La trasmissione DA mesolimbica, ed in particolare quella del NAc svolge un ruolo importante nella gratificazione naturale e nella gratificazione indotta artificialmente tramite la somministrazione di farmaci d'abuso.

A questo proposito è necessario ricordare che il NAc non è una struttura omogenea ma è suddiviso in due sottoporzioni molto diverse tra loro sia da un punto di vista anatomico che funzionale: uno è un compartimento ventro-mediale, la “**shell**”, con funzioni prettamente limbiche (integrazione delle emozioni e della motivazione); l'altro è un compartimento dorso-laterale, il “**core**” che è considerato la continuazione del caudato putamen e che quindi ha funzioni extrapiramidali (*Stolerman, 1992; Alheid e Heimer,*

1988; Zahm e Brog, 1992; Groenewegen e Russchen, 1989; Voorn e coll., 1989; Heimer e coll., 1991). Infine è stato individuato un compartimento anteriore, il “polo rostrale” con caratteristiche comuni alle altre due porzioni (Zahm e Brog, 1992).

La DA esplica differenti azioni nei due compartimenti del NAc nell’ambito delle manifestazioni del comportamento motivato; infatti, il suo aumento nella shell sarebbe importante per gli effetti correlati all’apprendimento associativo dello stimolo gratificante, mentre la sua stimolazione nel core, sarebbe necessaria per promuovere il comportamento motorio di approccio allo stimolo stesso

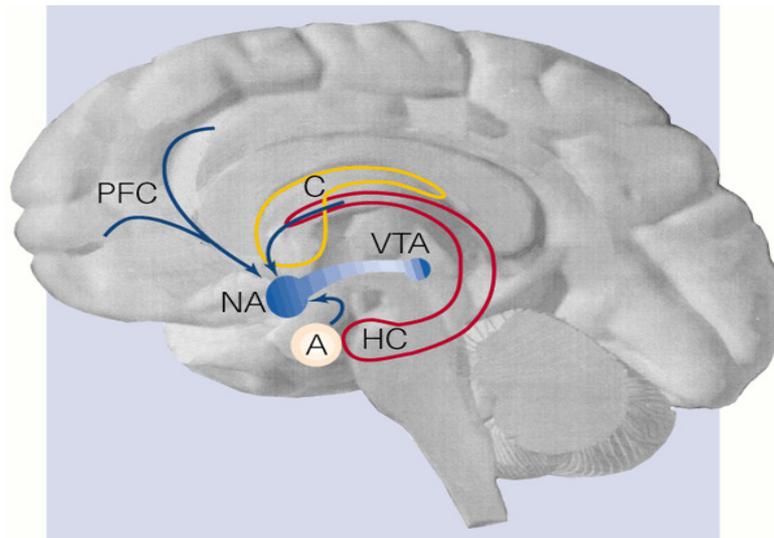


Figura 3: Origine del sistema DA mesolimbico. Proiezioni dall'area tegmentale ventrale (VTA) al Nac. Amigdala (A) Ippocampo (HC), corteccia prefrontale (PFC), Caudato (C).

MATERIALI E METODI

Animali

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando ratti maschi “Sprague-Dawley”, forniti dalla ditta Harlan Italy (S. Pietro al Natisone Udine, Italia), del peso di 200- 250 grammi.

I ratti sono stati stabulati in gruppi di sei, in gabbie in plexiglas, per almeno una settimana prima dell’inizio delle diverse pratiche sperimentali, in condizioni standard di temperatura (23° C) ed umidità (60%), con acqua e cibo *ad libitum*, e con un ciclo artificiale luce-buio alternato di 12 ore (luce dalle 8:00 AM alle 8:00 PM).

Dopo le sessioni di chirurgia gli animali sono stati stabulati singolarmente, nelle medesime condizioni ambientali sopra riportate.

Durante la convalescenza (15 giorni) i ratti sono stati manipolati due volte al giorno. Durante la prima settimana di convalescenza, i ratti sono stati trattati giornalmente con 1ml/Kg. di gentamicina solfato (40mg/ml), come profilassi antibiotica.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti secondo quanto approvato dalla *Society for Neuroscience* nel Gennaio del 1995 e secondo le direttive per la cura e l’uso degli animali da esperimento sancite nel 1992 dalla Comunità Economica Europea (86/609; D.L.: 27.01.1992, N° 116).

La Microdialisi cerebrale

La microdialisi cerebrale è una tecnica che ci consente di monitorare in vivo il livello di neurotrasmettitori presenti nel compartimento extracellulare. Questo viene reso possibile grazie all'inserimento di apposite fibre da dialisi (probes) nel cervello dell'animale da esperimento al fine di campionare il liquido extracellulare cerebrale che viene analizzato mediante specifiche tecniche analitiche. Si possono così ottenere informazioni sui livelli di neurotrasmettitori in condizioni fisiologiche e in seguito a stimoli di qualsivoglia natura. La fibra da dialisi permette il passaggio di composti a basso peso molecolare compatibili con la porosità della membrana costituente la fibra (cut-off di membrana), che diffondono secondo il loro gradiente di concentrazione dal fluido extracellulare cerebrale alla soluzione di perfusione (Ringer) che fluisce attraverso la fibra ad un flusso costante. I campioni così ottenuti sono relativamente puliti, non necessitano di alcuna preventiva purificazione e possono essere direttamente analizzati mediante HPLC.

Preparazione delle sonde da microdialisi

Le sonde per la microdialisi cerebrale vengono realizzate utilizzando una sottile fibra da dialisi composta da un copolimero acrilico di sodio-metallil-solfonato (AN 69 HOSPAL, diametro esterno 310 μm , diametro interno 220 μm) secondo il metodo descritto da *Lecca e coll., 2006 a e b*.

All'interno della fibra da dialisi viene inserito un mandrino di tungsteno (Clark Instruments UK, diametro 200 μm) con temporanea funzione di sostegno. L'estremità libera della fibra viene chiusa con una goccia di colla epossidica che per capillarità penetra nella fibra per circa 1 mm. Dopo almeno 24 h il tappo di colla formatosi viene tagliato alle dimensioni di 0.5 mm e poi levigato fino a che non assume una forma conica utile ad evitare un possibile danneggiamento tissutale.

A questo punto vengono preparati due capillari di silice fusa (Polymicrotechnologies Inc. Phoenix, Arizona, USA; diametro esterno 140 μm , diametro interno 50 μm), uno con la punta a becco di flauto e uno con la punta privata del rivestimento. Le due siliche così preparate vengono inserite negli appositi aghetti (ago 22G per iniezioni ipodermiche) della lunghezza di 1.2 cm, presenti nel Push-pull connector (plastic one, Roanoke, VA USA). Il becco di flauto costituirà l'ingresso per la soluzione di ringer che perforerà la fibra da dialisi mentre l'altra andrà a costituire l'uscita del dializzato.

Le due siliche vengono fissate con una goccia di colla epossidica agli aghi del push pull connector e poi inserite all'interno della membrana Hospal provvista di tappo di colla levigato. Il giorno dell'esperimento la fibra così ottenuta viene attentamente inserita con accuratezza nella cannula guida.

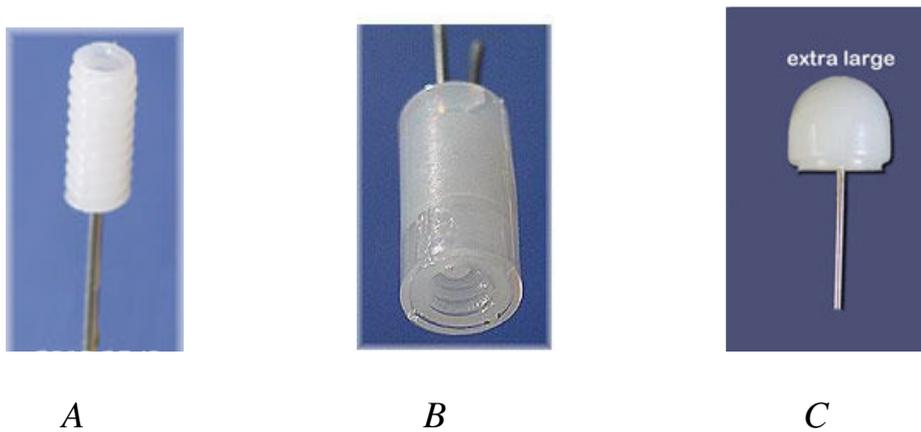


Figura 4: A cannula guida; B push-pull; C dummy cannula.

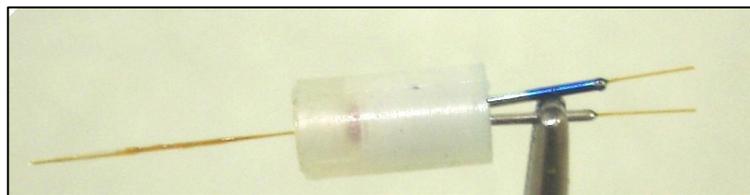


Figura 5: fibra da dialisi

Preparazione della cannula per somministrazione orale

Durante gli esperimenti la somministrazione del cibo è stata effettuata per via orale mediante dei cateteri per la somministrazione orale. La cannula orale viene impiantata nell'animale il giorno dell'inserimento della cannula guida, quindi previa anestesia. Viene inserita nella cavità orale dell'animale, all'altezza del primo molare e passa tra la teca cranica e il muscolo masticatore, fuoriuscendo dalla pelle a livello dell' orecchio, dove viene fissato utilizzando un pezzo di plastica rigido di forma cilindrica che

viene riempito di colla ciano acrilica. Questa tecnica è più semplice e meno invasiva di quella precedentemente da noi descritta (*Bassareo e coll., 2003*).

La cannula è costituita essenzialmente da un tubicino flessibile di polietilene della lunghezza di circa 4 cm (Polyethylene tubing, Clay Adams Brand Ca, Sparks, MD) il cui diametro interno è di 0,86mm e il diametro esterno di 1,52mm e da un aghetto metallico. Questo tubicino di polietilene presenta un'estremità allargata, appiattita e forata con una funzione di ancoraggio infatti impedisce la risalita della cannula dopo l'inserimento; nell'altra estremità libera viene inserito un ago metallico della lunghezza di circa 2,5 Cm (ago 22G per iniezioni ipodermiche). La parte dell'ago che viene inserita nel P.E. viene levigata mentre quella dell'estremità opposta è appuntita per facilitare il passaggio della cannula tra la teca cranica e il muscolo masticatore del ratto.

L'impianto della cannula orale è reso necessario in quanto durante l'esperimento l'animale può così ricevere il cibo improvvisamente e inaspettatamente (1ml) ed è libero di non deglutire la sostanza se il sapore non gli è gradevole. Inoltre ci permette di effettuare le osservazioni del comportamento manifestato dall'animale durante l'infusione orale secondo quanto riportato da *Grill e Norgren (1978)*.

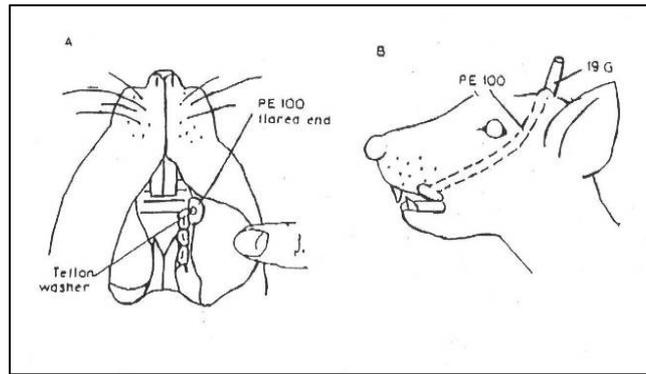


Figura 6: *Inserimento della cannula per somministrazione orale e sua localizzazione.*

Sessione chirurgica

Dopo essere stati anestetizzati con una dose di 400 mg/kg di cloralio idrato i ratti vengono inseriti nello stereotassico e con l'ausilio dell'atlante Paxinos e Watson (1998) si procede all'impianto della cannula guida 10 giorni prima del training e 17 o 21 giorni prima dell'esperimento, cui seguirà l'inserimento della sonda dializzante vera e propria nella cannula guida poco prima dell'esperimento di microdialisi. Le coordinate per la cannula guida sono: per la PFCX A 3.7, L 0.8 dal bregma, V -2.0 dalla dura madre; per la Shell A 2.0, L 1.0 dal bregma, V -3.6 dalla dura madre; per il Core A 1.4, L 1.7 dal bregma, V -3,4 dalla dura madre.

	A	L	v.cannula guida	v.fibra da dialisi
shell	2.0	1.0	-3.6	-7.6
core	1.4	1.7	-3.4	-7.4
pfcx	3.7	0.8	-2.0	-5.0

Figura 7: coordinate per l'impianto delle cannula cronica

Dopo aver sistemato l'animale ed aver esposto la teca cranica si procede praticando un piccolo foro nella corrispondente zona di impianto e si perfora delicatamente la dura madre. Dopo di che si abbassa lentamente la cannula guida all'interno del cervello fino a raggiungere la verticalità predefinita. La cannula viene poi fissata alla teca cranica dell'animale mediante un cemento dentale vetro-ionomerico (Glass Ionomer Cement, Shofu Inc., Japan). L'animale al termine dell'intervento chirurgico viene trasferito in una gabbia con cibo e acqua a libitum.

Nel tempo che intercorre dall'impianto all'esperimento di microdialisi la cannula guida viene sigillata da una dummy cannula che viene avvitata

sulla cannula cronica allo scopo di evitare che all'interno delle cannule guida penetrino delle impurezze.

Ogni giorno gli animali vengono manipolati e la dummy cannula viene svitata e riavvitata.

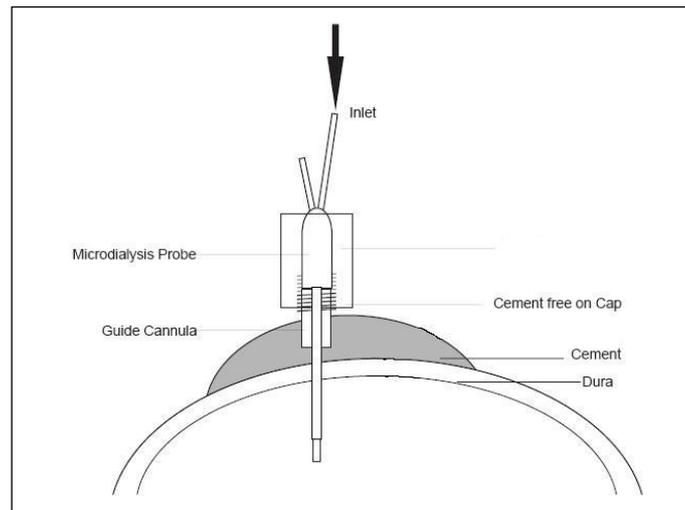


Figura 8: Schematizzazione della cannula cronica impiantata nell'encefalo del ratto.

Sostanze utilizzate

1. CIOCCOLATO (*Theobroma cacao* L.)



La pianta di cacao è un piccolo albero sempreverde originario delle regioni tropicali dell'America, in particolare dell'Amazzonia. Le coltivazioni sono diffuse in Messico, America Centrale e Latina, Africa. La pianta del cacao è un albero con radici molto profonde che raggiunge un'altezza di 6-8 metri e deve crescere al riparo dalla luce diretta e da sbalzi di temperatura: infatti viene circondato da alberi ad alto fusto che creano zone ombrose. Ha fiori verdi o rossi; i frutti sono bacche ovali lunghe fino a 15 cm, contenenti una quarantina di semi disposti sempre in cinque file. Dai semi si ottiene il burro di cacao per l'utilizzo alimentare e dalle bucce di scarto si ottengono estratti titolati per l'utilizzo a scopo fitoterapico. Gli

effetti farmacologici della pianta sono attribuiti alla presenza di alcaloidi purinici, teobromina (0.4-1.2%) e caffeina (0.02%), ai polifenoli, tannini e amine biogene (fenetilamina, triptamina, serotonina).

Il nome scientifico *Theobroma cacao* fa riferimento a *theobroma*, una voce greca che significava 'nutrimento degli Dei', e al nome dato alla pianta dagli Aztechi: *cacahuàtl*. Il rinnovato interesse per il cacao si è spostato dal ruolo puramente alimentare-edonistico a quello funzionale, sotto forma di preparazione fitoterapica, grazie alla presenza di alcuni costituenti attivi del fitocomplesso. I semi di cacao sono una fonte naturale di teobromina e di caffeina, alcaloidi appartenenti ad una particolare classe di stimolanti attivi a livello del sistema nervoso, le metilxantine. Esse hanno un effetto positivo sulla concentrazione mentale, sulla prontezza psicofisica, sul tono muscolare e sul tessuto adiposo con effetto lipolitico. Dati sperimentali farmacologici indicano che le metilxantine agiscono come antagonisti dei recettori dell'adenosina. In passato si pensava che la caffeina potesse essere annoverata tra le sostanze d'abuso per la sua capacità di dare dipendenza. Alcuni studi pubblicati in letteratura hanno confermato tale ipotesi, mentre altri studi la hanno smentita. Da questi emerge che la caffeina non condivide la proprietà comune a tutti i farmaci d'abuso di stimolare la DA preferenzialmente nella shell del NAc e per questo non può essere considerata una sostanza d'abuso.

Come la frutta, la verdura e il tè, i semi di cacao sono però anche una ricca fonte di flavonoidi che giocano un importante effetto preventivo nelle malattie coronariche. La frazione flavonoidica prevalente nel cacao è rappresentata da flavan-3-oli e da oligomeri proantocianidinici: essi neutralizzano i radicali liberi interrompendo il processo a cascata della abnorme aggregazione delle piastrine responsabile della formazione di trombi nei vasi sanguigni; inoltre, tali sostanze aumenterebbero la presenza di ossido di azoto che promuove la vasodilatazione dei vasi (*Fisher e coll, 2003; Grassi e coll, 2005*). In ulteriori studi è stato dimostrato un miglioramento della circolazione arteriosa dopo il consumo di cioccolato fondente, ricco di flavonoidi rispetto al cioccolato bianco che invece ne risulta privo. (*Hermann e coll. 2006; Flammer e coll. 2007*). Attività principali: stimolante, tonico nervino, antiossidante, antiradicalico, energizzante.

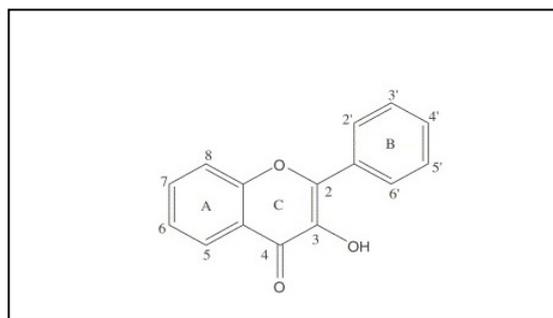


Figura 9: *Struttura generale dei flavonoidi*

Durante i nostri esperimenti abbiamo utilizzato il Nesquik Syrup (Nestlé, Austria) e lo abbiamo diluito con acqua di rubinetto in rapporto di 1:3. La

composizione del cioccolato (Nesquik) è: Saccarosio 13.87 g/l, polvere di cacao 10%, Fruttosio 0.27 g/l, Destrosio 2.15 g/l, regolatore di acidità acido citrico, sale, conservante (sorbato di potassio), aroma.



Figura 10: confezione del Nesquik.

2. SOLUZIONE ZUCCHERINA

Come soluzione di controllo da somministrare agli animali al posto del cioccolato abbiamo utilizzato una soluzione zuccherina contenente le stesse concentrazioni di glucosio, saccarosio e fruttosio contenute presenti nella soluzione di cioccolato.

Gli animali hanno ricevuto la soluzione zuccherina (ad libitum) per due settimane dalle 8.00 pm alle 8.00 am (eccetto i weekends).

Protocollo di consumo cronico di cioccolato e della soluzione di controllo

Una volta terminato l'intervento chirurgico i ratti vengono trasferiti (singolarmente) in una gabbia dove sono liberi di muoversi, con cibo e acqua ad libitum. Durante i primi sette giorni l'animale si adatta alla sua nuova gabbia e si riprende completamente dall'intervento chirurgico. Nei 14 giorni successivi si procede seguendo il protocollo di esposizione cronica al cibo e manipolando i ratti in modo tale che possano abituarsi alla presenza dell'operatore. L'esposizione al cioccolato viene effettuata dalle 8.00 pm alle 8.00 am. L'animale viene posto nella condizione di scegliere tra acqua e cioccolato (ad libitum) oppure tra acqua e soluzione zuccherina nel caso di ratti di controllo. Il primo giorno risulta essere diffidente nei confronti di questo nuovo cibo, ma già dal secondo giorno si osserva un maggior consumo dello stesso .

I ratti vengono esposti al cioccolato o alla soluzione zuccherina (ratti di controllo) fino a 24 ore prima dell'esperimento, quindi trasferiti nelle semisfere con acqua e cibo a libitum.

Procedura analitico-sperimentale

Il giorno dell'esperimento l'acqua e il cibo vengono rimossi e viene inserita la fibra da dialisi nella cannula guida un'ora prima di iniziare a campionare la DA.

L'ingresso della fibra da dialisi viene collegato tramite un tubicino in P.E ad una pompa da microinfusione attraverso cui viene sospinta all'interno della sonda una soluzione di Ringer ad un flusso costante di 1µl/min. La soluzione di Ringer che viene utilizzata è costituita da ioni Sodio, Potassio, Calcio e Cloro nelle seguenti concentrazioni: NaCl 147 mM, CaCl₂ 2,2 mM, KCl 4 mM. I neurotrasmettitori passeranno dallo spazio extracellulare in cui sono più concentrati all'interno della fibra in cui invece la loro concentrazione è minore..

Per quantificare la DA, ogni 10 minuti vengono raccolti 10 µl di dializzato che vengono iniettati, attraverso una siringa, in un HPLC, un cromatografo liquido ad alta pressione, dotato di una colonna cromatografia a fase inversa (Supelcosil Lc-18-DB, 15cm, 5µm, Supelco) e di un detector coulometrico (ESA, Coulochem II, Bedford MA, USA) con cella analitica ad alta sensibilità (mod. 5014 B ESA).

Il primo elettrodo del detector viene posizionato a +125 mV (ossidazione), mentre il secondo a -175mV (riduzione).

La fase mobile di questo sistema è un tampone contenente NaH₂PO₄ 50 mM, octilisolfoato di sodio 2,4 mM, EDTA 5 mM, metanolo 16%, Na₂HPO₄ 5 mM e pH 5.5, che viene mantenuto, tramite pompa Jasco PU 1580, ad un flusso costante di 1 ml/min.

In queste condizioni la sensibilità del metodo per la determinazione della DA è di 5 fmoli per campione.

Durante l'esperimento una volta ottenuti dei valori basali di DA stabili il cibo viene somministrato al ratto attraverso la cannula orale. Si inserisce l'ago di una siringa contenente 1ml di cioccolato o olio di mais all'estremità della cannula e lentamente ma in modo continuo si procede con la somministrazione per os. (flusso \cong 0.2 al minuto). Contemporaneamente si osserva il comportamento del ratto. In queste condizioni l'animale può anche decidere di non bere la soluzione.

Valutazione del comportamento

La reazione al gusto viene utilizzata per valutare l'impatto edonico dei gusti, quantificando le reazioni comportamentali ricavate dalla infusione intraorale delle soluzioni (*Grill and Norgren, 1978*).

Durante la somministrazione del cioccolato, il giorno dell'esperimento, sono state osservate le reazioni comportamentali del ratto che sono state così catalogate:

Reazioni Edoniche: protrusione laterale della lingua (lateral tongue protrusion), protrusione ritmica della lingua (rhythmic tongue protrusion), leccarsi le zampe (paw licks).

Reazioni Avversive: sbadigli (gapes), sfregamento del mento sulle pareti della semisfera (chin rubs), pulizia del muso (face washing), scuotimento delle zampe (forelimb flais), allungamento delle zampe come in segno di allontanare qualcosa (paw tread), movimento (locomotion).

Reazioni Neutre: movimenti ritmici della bocca (rhythmic mouth movements) e ingestione passiva della soluzione (passive drip of the solution) (Berridge, 2000).

Lateral and rhythmic tongue protrusion, gapes, chin rubs, forelimb flais and paw tread sono valutati come singoli eventi e viene loro assegnato un singolo punto; agli altri eventi, invece, viene assegnato un punto nel caso in cui la durata sia compresa tra 1 e 5 secondi, mentre vengono attribuiti due punti nel caso in cui la durata è superiore ai 5 secondi.

I nostri ratti hanno mostrato esclusivamente reazioni edoniche.

HEDONIC REACTIONS

(anterior tongue protrusion, lateral tongue protrusion, Paw licks)



AVERSIVE REACTIONS

(gapes, chin rubs, face washing, forelimb flails)



Figura 12: reazioni comportamentali nel ratto

SELF ADMINISTRATION

Sostanze utilizzate

Per l'autosomministrazione è stato usato un cibo costituito da pellets di saccarosio puro, del peso standard di 45 mg (Test Diet, 1050 Progress Drive Richmond, IN 47374).

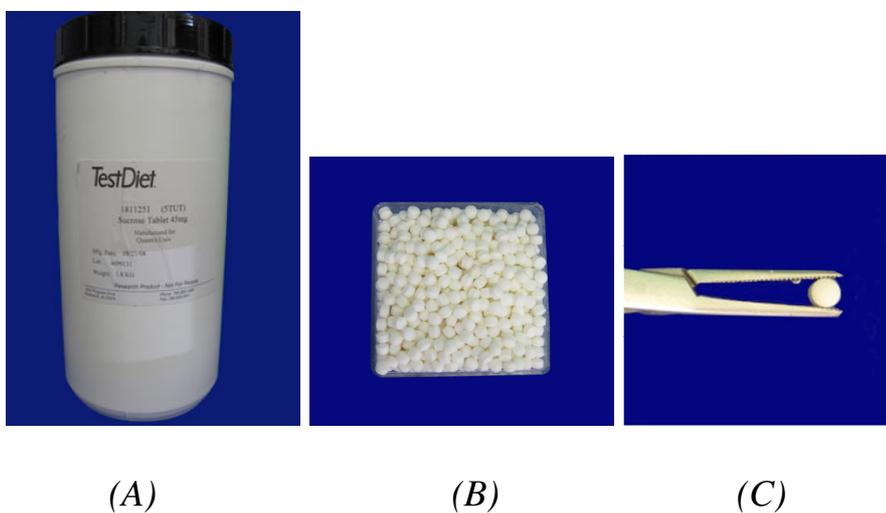


Figura 13: (A) Confezione di saccarosio puro (Test Diet, 1050 Progress Drive Richmond, IN 47374). (B) pellets di saccarosio. (C) Singola pellet di saccarosio del peso di 45 mg.

Protocollo di autosomministrazione di saccarosio: Training

Le sessioni di autosomministrazione del saccarosio avvengono mediante l'impiego di gabbie acusticamente isolate (Coulburn Instruments, Allentown, NJ USA) dotate di due fori (nose pokes) provviste di fotocellule, rese attive dall'inserimento del muso dell'animale nel foro, e posizionati a due cm circa dal pavimento della gabbia. Tra i due fori è presente una "mangiatoia" collegata alla pompa di rilascio dei pellets, nella quale viene erogato il pellet. I due nose pokes hanno diverse illuminazioni e diverse funzioni: il nose poke illuminato con luce giallo-verde è definito ATTIVO, poiché la sua attivazione determinata mediante il comportamento di nose poking del ratto, causa l'attivazione della pompa e la caduta di un singolo pellets di zucchero nella mangiatoia, e il consumo di questo da parte del ratto. Il nose poke illuminato dalla luce rossa è definito INATTIVO in quanto non esercita alcuna azione nel sistema di attivazione della pompa.

La sessione di un'ora di autosomministrazione è costantemente monitorata da un sistema computerizzato (Graphic State 2 software, collbourn instrument, PA, USA). Gli animali vengono sottoposti una volta al giorno per 2 settimane, esclusi i fine settimana, alle sessioni di autosomministrazione di 1h.

Durante la sessione il ratto viene sottoposto alle cues uditive, un suono della durata di 10 secondi, e in contemporanea alla cues visiva, luce verde-

gialla che si accende per 10 secondi all'interno del nose poke attivo. Il nose-pokes inattivo è invece caratterizzato da una luce rossa che il ratto non percepisce. Solo in seguito all'inserimento del muso all'interno del nose poke attivo permette l'attivazione di una fotocellula che provoca la caduta nella mangiatoia del singolo pellet di zucchero (Test Diet, 1050 Progress Drive Richmond, IN 47374) che viene quindi consumato molto rapidamente dal ratto.

Tramite l'allenamento il ratto impara ad associare il suono e l'accensione del nose-poke al consumo di zucchero (stimolo primario).

Microdialisi e self administration

Gli esperimenti di microdialisi tramite l'utilizzo delle gabbie per S.A. sono condotti per ogni ratto in tre sessioni consecutive di tre giorni, una per giorno. Gli animali sono stati trasportati dalle loro gabbie alla gabbia della S.A. e al termine di ogni esperimento sono stati nuovamente stabulati singolarmente sempre nella medesima gabbia.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti alle 9:00 AM.

I sessione: Durante il primo giorno dell'esperimento l'animale è stato inserito nella gabbia per la self – administration, la stessa utilizzata durante i 10 giorni di training. Sono stati prelevati i campioni di dializzato dalla shell e dal core ogni 5 min fino all'ottenimento di un valore stabile di DA basale. I campioni di soli 5 min si sono resi necessari al fine di monitorare

in maniera più efficace le modificazioni di DA dopo i vari stimoli a cui l'animale viene sottoposto. Una volta che i valori della DA basale sono diventati stabili è stata fatta partire la sessione di autosomministrazione di saccarosio, esattamente come accade nel training.

II sessione: Lo scopo di questa sessione di esperimento è stato quello di valutare la risposta della trasmissione DAergica in seguito alla presentazione dei soli stimoli uditivo e visivo, in pratica quegli stimoli secondari che durante il training vengono associati allo stimolo primario.

Il ratto viene sottoposto al tono e all'accensione del nose poke, ma ad essi non segue la ricompensa del pellet, che non cade nella mangiatoia per essere consumato dal ratto, ma viene raccolto in una provetta collegata alla pompa di infusione dei pellets di zucchero. L'animale non associa più lo stimolo uditivo e lo stimolo visivo al consumo di zucchero.

III sessione: Durante il terzo ed ultimo giorno i nostri animali hanno ricevuto in maniera non contingente da parte dell'operatore, tramite la mangiatoia presente nella gabbia per la S.A., le pellets di saccarosio (80 pellets che equivale alla media di pellets che gli animali si autosomministrano durante gli ultimi giorni del training).

In questo modo è stato possibile valutare le modificazioni della DA in seguito al solo consumo dello stimolo primario (zucchero).



Figura 14. Fotografia rappresentante gabbia per Self Administration.

Prima dell'inserimento in ciascuna gabbia per la S.A., ai ratti è stata svitata la dummy-cannula per l'inserimento manuale delle fibre da microdialisi nella shell e nel core del NAc. Successivamente i ratti sono stati inseriti in ciascuna gabbia per la S.A. (che rimarrà la medesima durante i tre giorni di esperimento) e immediatamente collegati ad una pompa da infusione per microdialisi (CMA/100 Carnegie Medicine, MA, USA) equipaggiata con siringhe Hamilton per microdialisi contenenti la soluzione di Ringer. Le siringhe sono connesse tramite un tubo di polietilene (P.E-50, Portex Ltd, Kent, UK) ad uno swivel a due vie (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) montato su un sostegno mobile situato sopra la gabbia per la SA.

Il Ringer di perfusione verrà pompato all'interno della fibra per la microdialisi nel cervello del ratto, e raccoglierà i neurotrasmettitori presenti nelle aree cerebrali dell'animale in cui la fibra è localizzata. Il Ringer così arricchito dei neurotrasmettitori viene prelevato dalla porzione di uscita della fibra.

Il Ringer utilizzato per questi esperimenti ha la stessa composizione di quello descritto in precedenza e viene pompato anche in questo caso ad un flusso costante di $1 \mu\text{l}/\text{min}$.

I campioni di dializzato sono stati raccolti in diversi momenti dell'esperimento:

- Prima della fase di SA sono stati calcolati i livelli basali di neurotrasmettitore, calcolati come media degli ultimi tre campioni consecutivi che non differiscono per più del 10%.
- Durante la SA: per quantificare la DA, durante la sessione di SA vengono raccolti ogni 5 minuti 5 μ l di dializzato ed iniettati in HPLC dopo averli portati a 10 μ l con l'aggiunta del Ringer.

Ogni campione di dializzato viene iniettato in un cromatografo liquido ad alta pressione descritto in precedenza. Per queste analisi il primo elettrodo del detector viene posizionato a +125 mV (ossidazione), mentre il secondo a -175 mV (riduzione).

Tutte le restanti condizioni cromatografiche sono le medesime.

Istologia

Alla fine dell'esperimento gli animali vengono anestetizzati con una soluzione satura di cloralio idrato e sacrificati. Una volta prelevato il cervello, questo viene trasferito all'interno di un vial contenente una soluzione di formaldeide al 4%. Dopo almeno 5 giorni si procede a sezionare il cervello in sezioni coronali di spessore pari a 100 μ m utilizzando un vibratomo.

Tutto questo necessario per verificare che la fibra sia stata posizionata correttamente nei nuclei che si fosse inteso studiare; infatti osservando al microscopio le fettine di tessuto si può individuare la traccia lasciata dalla

fibra e servendosi dell'atlante *Paxinos e Watson (1998)* si possono riconoscere le diverse aree cerebrali. Se la fibra non è posizionata correttamente nell'area in esame i dati ottenuti non vengono presi in considerazione.

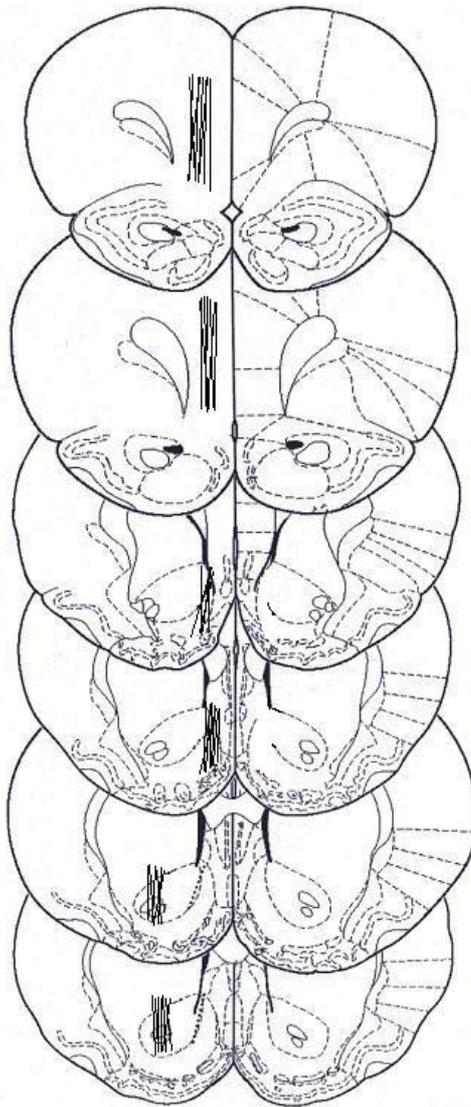


Figura 15: Rappresentazione schematica, tratta dall'atlante *Paxinos e Watson*, delle aree cerebrali nelle quali sono state inserite le sonde per la microdialisi

Statistica

L'analisi statistica è stata compiuta attraverso elaborazione computerizzata utilizzando il programma “statistica per windows”. I dati sono stati analizzati mediante l'ANOVA a due o tre vie a seconda degli esperimenti.

I trattamenti che mostravano variazioni significative sono stati sottoposti al “post hoc Tuckey's test”; come valore statisticamente significativo è stato preso $p < 0.05$.

I valori basali erano le medie dei tre campioni consecutivi che non differivano tra loro per più del 10%.

SCOPO DELLA RICERCA

Come è ben noto dalla letteratura, il cibo, considerato uno stimolo gratificante naturale, promuove, in seguito al suo consumo, l'aumento del rilascio di DA nelle aree limbiche. In particolare, diversi studi riportano che cibi altamente appetibili come il Nesquik, i Fonzies o il cioccolato determinano un incremento della trasmissione DAminergica in entrambe le strutture del NAc: la shell ed il core, con una maggior risposta da parte della shell, (*Wilson e coll., 1995; Gambarana e coll., 2003; Sahr e coll., 2008*) e nella PFCX (*Bassareo e Di Chiara, 1997; 1999a e b*). Negli studi di Bassareo e Di Chiara e di Gambarana e coll., è stato messo in evidenza che, mentre la DA nella PFCX e nel core continua ad essere stimolata anche dopo un secondo consumo dello stesso cibo a 2 o 24 h di distanza dal primo, nella shell del NAc invece la trasmissione DAergica non viene stimolata. In questo caso è stato osservato quindi quello che viene definito fenomeno dell'abitudine (traduzione del più noto termine inglese *habituation*), meccanismo di risposta adattativa della DA allo stimolo.

E' stato ipotizzato che la DA rilasciata nella shell del NAc faciliti l'apprendimento associativo tra lo stimolo primario (cibo o farmaco) e gli stimoli secondari associati ad esso (*Di Chiara, 1998*). Tale apprendimento è di fondamentale importanza perché l'individuo memorizzi le proprietà gratificanti dello stimolo in modo da poterle riconoscere in futuro e far

scatenare così il comportamento motivato attraverso il quale si ricerca lo stimolo, lo si avvicina e lo si consuma sentendosi finalmente appagato. Gli stimoli gratificanti naturali attraggono l'individuo, ma una volta consumati non lo rendono bramoso e compulsivo, almeno in condizioni fisiologiche. Questo atteggiamento si osserva invece nell'individuo tossicodipendente che assume un comportamento di continua ricerca della sostanza d'abuso e la cui esistenza è volta completamente al procacciamento della "droga".

Anche i farmaci d'abuso, qualunque sia il loro meccanismo d'azione, stimolano preferenzialmente la liberazione di DA nella shell del NAc, sia che vengano somministrate dall'operatore (*Pontieri e coll., 1995; 1996; Tanda e coll., 1997; Cadoni e coll., 2005; Cadoni e Di Chiara, 2007; Cheer e coll., 2007*), sia che siano autosomministrati dall'animale (*Lecca e coll., 2006 a e b; Schramm-Sapyta e coll., 2006; Lecca e coll., 2007*).

Si potrebbe ipotizzare che la continua stimolazione della DA nella shell in seguito a somministrazioni ripetute di sostanze d'abuso possa essere la causa di un apprendimento associativo patologico attraverso il quale gli stimoli secondari vengono associati agli effetti gratificanti del farmaco in modo esagerato. L'individuo in questo modo rimarrà legato in modo patologico agli stimoli secondari associati all'effetto gratificante della sostanza d'abuso. Secondo questa ipotesi tale meccanismo di stimolazione disadattativa della DA nella shell potrebbe essere uno dei meccanismi che spiegano il fenomeno della tossicodipendenza.

Il fatto che invece il cibo stimoli la DA in quest'area in modo adattativo può spiegare perché da esso non si diventi dipendenti. Questa affermazione però è vera in condizioni normali, ossia quando l'individuo ha un normale rapporto col cibo. In condizioni patologiche, come ad es. nel binge eating disorder o nella bulimia nervosa, si può supporre che la stimolazione della trasmissione DAergica possa non presentare più il meccanismo di risposta adattativo. Infatti diversi studi eseguiti su animali affamati riportano che, in seguito ad abbuffate di una soluzione di saccarosio essi diventano dipendenti (*Hajnal e Norgren, 2002; Avena e coll., 2005, 2006 e 2007; Rada e coll., 2005 e 2006*). Probabilmente negli animali che consumano continuamente lo stesso cibo si ha un'abolizione del fenomeno dell'habituation e quindi una risposta della trasmissione DAergica nella shell del NAc molto simile a quella evocata dalle continue somministrazioni di farmaci d'abuso.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di studiare se il consumo cronico (per una o due settimane) di cioccolato, cibo particolarmente appetibile per i ratti, fosse in grado di modificare il fenomeno dell'abitudine che si manifesta in condizioni normali in seguito al consumo di cioccolato nella trasmissione DAergica nella shell.

È stata inoltre studiata la risposta DAergica nel core del NAc e nella PFCX. Unitamente al monitoraggio della DA in queste 3 aree sono state

effettuate le osservazioni delle reazioni che i ratti mostravano durante l'infusione del cioccolato (taste reactivity).

Il nostro studio è stato effettuato su animali non affamati.

Inoltre, data la presenza in letteratura di alcune discrepanze riguardanti il coinvolgimento della shell e del core del NAc nella risposta agli stimoli condizionati al consumo del cibo a seconda che il condizionamento fosse di tipo associativo o di tipo operante, abbiamo voluto studiare le modificazioni della DA nel sistema mesolimbico durante la self-administration di pellets di saccarosio. Durante la SA gli animali vengono infatti sottoposti a stimoli uditivi e visivi che associati all'erogazione del cibo diventano stimoli condizionati ad esso.

Lo scopo della nostra ricerca è quello di chiarire il ruolo giocato dalla DA nella shell e nel core del NAc nella risposta agli stimoli condizionati al cibo.

RISULTATI

Livelli basali di DA

I valori basali della DA (espressi come media delle fmoli \pm EMS) nei campioni di dializzato di 10 minuti risultarono i seguenti: shell 52 ± 6 , core 55 ± 5 , PFCX 12 ± 2 .

Modificazioni della trasmissione DA nella shell e nel core del NAc e nella PFCX di ratti sottoposti al consumo cronico di cioccolato per 1 settimana, in risposta all'infusione intraorale di 1 ml dello stesso effettuata per 3 giorni consecutivi.

SHELL

La figura mostra la valutazione, attribuita mediante un punteggio, delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato. L'ANOVA a una via non ha mostrato differenze significative tra diversi giorni ($F_{2,5}=3.12$; $p=0,13$).

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nella shell del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,5}=7,0$; $p=0.035$) e del fattore tempo ($F_{5,25}=6,68$; $p=0.0004$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{10,25}=2,99$; $p=0,013$).

Il test di Tukey ha mostrato un maggior incremento del rilascio di DA durante il primo giorno rispetto al secondo e al terzo.

CORE

La figura mostra la valutazione, attribuita mediante un punteggio, delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato.

L'ANOVA a una via non ha mostrato differenze significative tra i diversi giorni ($F_{2,6}=5.27$; $p=0,16$).

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nel core del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore tempo ($F_{12,24}=74,02$; $p=0.00001$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{24,24}=2,13$; $p=0,03$).

Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA durante tutte le somministrazioni di cioccolato. Ha mostrato inoltre che l'aumento durante la prima e la terza somministrazione era maggiore rispetto alla seconda e che quello durante la terza era maggiore dell'incremento ottenuto durante il primo consumo.

PFCX

La figura mostra le reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato. L'ANOVA a una via non ha mostrato differenze significative tra i diversi giorni ($F_{2,6}=6.5$; $P=0.44$).

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nella PFCX.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore tempo ($F_{6,30}=24,92$; $p=0.001$) ed una significativa interazione giorno x tempo ($F_{12,30}=19,13$; $p=0.003$).

Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA durante tutte le somministrazioni di cioccolato, maggiore però durante la prima e la seconda.

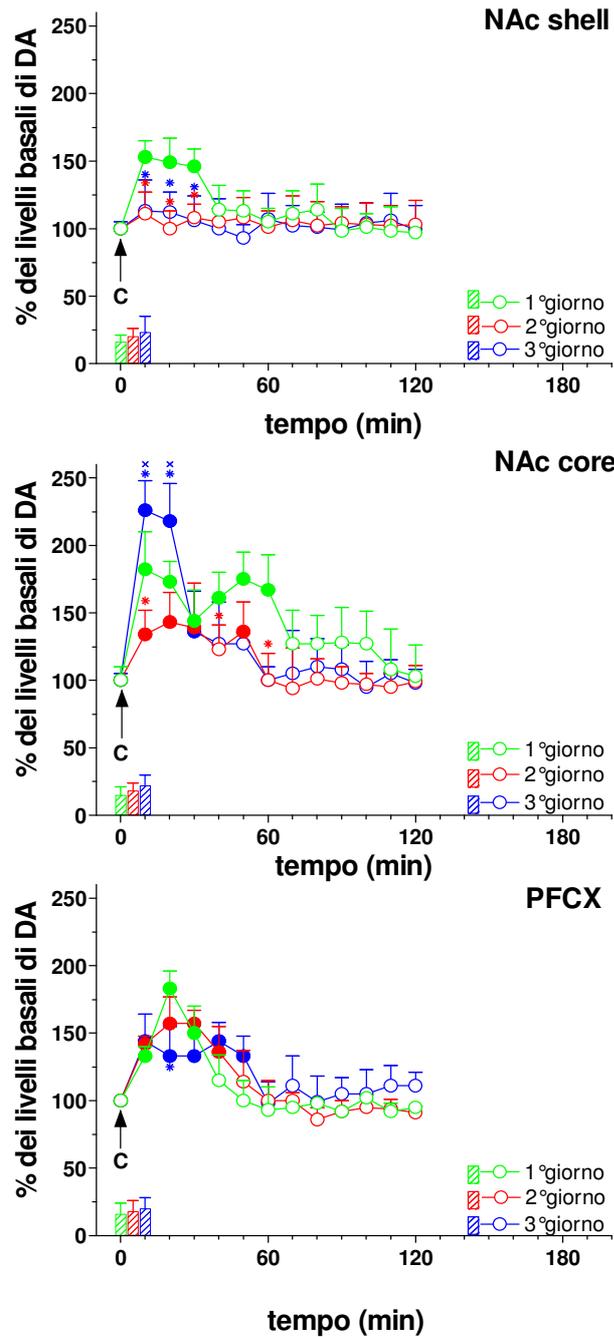


Figura 16

Effetto dell'infusione intraorale di una soluzione di cioccolato sulla trasmissione DA nella Shell e Core del NAc e nella PFCX in ratti allenati per una settimana.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti. Simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *: $p < 0.05$ rispetto al primo giorno; x : $p < 0.05$ rispetto al secondo giorno.

Risposta della DA extracellulare nella shell e nel core del NAc e nella PFCX di ratti di controllo sottoposti al consumo cronico per 1 settimana di una soluzione zuccherina, dopo infusione intraorale di 1 ml di cioccolato, monitorata per 3 giorni consecutivi.

SHELL

La figura mostra la valutazione, attribuita mediante un punteggio, delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato nel gruppo di animali di controllo che ha consumato cronicamente una soluzione zuccherina al posto del cioccolato. L'ANOVA a una via ha mostrato una differenza significativa tra i diversi giorni ($F_{2,6}=9.85$; $p=0,013$). Le reazioni edoniche erano più pronunciate durante il secondo ed il terzo giorno.

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nella shell del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,6}=17,5$; $p=0.003$), del fattore tempo ($F_{3,18}=9,33$; $p=0.0006$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{6,18}=4,83$; $p=0,004$).

Il test di Tukey ha mostrato un maggior incremento del rilascio di DA durante il primo giorno rispetto al secondo e al terzo.

CORE

La figura mostra la valutazione, attribuita mediante un punteggio, delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato. L'ANOVA a una via non ha mostrato differenze significative tra i diversi giorni ($F_{2,3}=0.67$; $p=0,6$).

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nel core del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,3}=86,04$; $p=0.011$), del fattore tempo ($F_{12,24}=9,36$; $p=0.000002$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{24,24}=3,3$; $p=0,002$).

Il post hoc test ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA durante il secondo ed il terzo giorno.

PFCX

La figura mostra le reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato. L'ANOVA a una via non ha mostrato differenze significative tra i diversi giorni ($F_{2,3}=1.2$; $p=0,09$).

Nell'figura è riportato l'effetto dell'infusione orale di cioccolato sulla liberazione di DA nella PFCX.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore tempo ($F_{6,30}=62,69$; $p=0.00001$) ed una significativa interazione giorno x tempo ($F_{12,30}=17,57$; $p=0.00001$).

Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA durante tutte le somministrazioni di cioccolato.

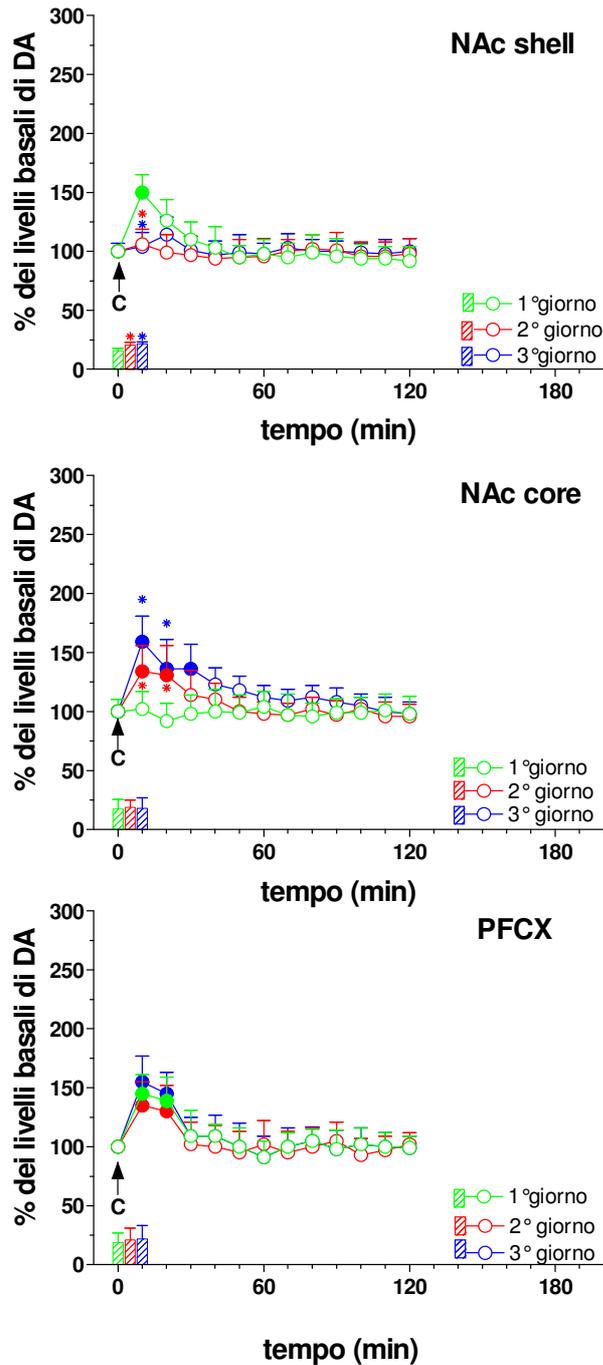


Figura 17

Effetto dell'infusione intraorale di una soluzione di cioccolato sulla trasmissione DA nella Shell e Core del NAc e nella PFCX in ratti di controllo.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti. Simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *: $p < 0.05$ rispetto al primo giorno.

Modificazioni della trasmissione DA nella shell e nel core del NAc e nella PFCX di ratti sottoposti al consumo cronico di cioccolato per 2 settimane, in seguito all'infusione intraorale di 1 ml dello stesso effettuata per 3 giorni consecutivi.

SHELL

Nella figura sono riportate le reazioni edoniche registrate durante la somministrazione intraorale di cioccolato. L'ANOVA a una via non ha mostrato differenze significative tra diversi giorni ($F_{2,6}=0.8$; $p=0.49$).

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nella shell del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore tempo ($F_{6,36}=25,00$; $p=0.000001$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{12,36}=4,11$; $p=0,0005$).

Il post hoc test ha mostrato un maggior incremento del rilascio di DA durante il secondo giorno rispetto al primo e al terzo.

CORE

La figura mostra la valutazione delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato. L'ANOVA a una via ha mostrato differenze significative tra i diversi giorni ($F_{2,6}=9.5$; $p=0.014$). Il Tukey test ha evidenziato che le reazioni edoniche mostrate dai ratti il primo giorno sono minori di quelle osservate il secondo giorno.

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sulla liberazione di DA nel core del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,6}=7,2$; $p=0.025$), del fattore tempo ($F_{8,48}=28,17$; $p=0.00001$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{16,48}=12,07$; $p=0,00001$).

Il post hoc test ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA durante tutte le somministrazioni di cioccolato. Ha mostrato inoltre che la stimolazione ottenuta in seguito alla seconda ed alla terza somministrazione era maggiore rispetto alla prima durante i primi campioni, ma che agli 80 min dal primo consumo l'incremento ottenuto era maggiore rispetto al secondo e al terzo.

PFCX

La figura mostra le reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato. L'ANOVA a una via ha mostrato una differenza significativa tra i gruppi ($F_{2,6}=7.39$; $p=0.024$). L'analisi post hoc ha mostrato che le reazioni durante il secondo giorno erano più pronunciate rispetto a quelle mostrate durante il primo e il terzo giorno.

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nella PFCX.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore tempo ($F_{6,36}=28,78$; $p=0.00001$) ed una significativa interazione giorno x tempo ($F_{12,36}=4,63$; $p=0.0002$).

Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA durante tutte le somministrazioni di cioccolato, maggiore però durante la terza.

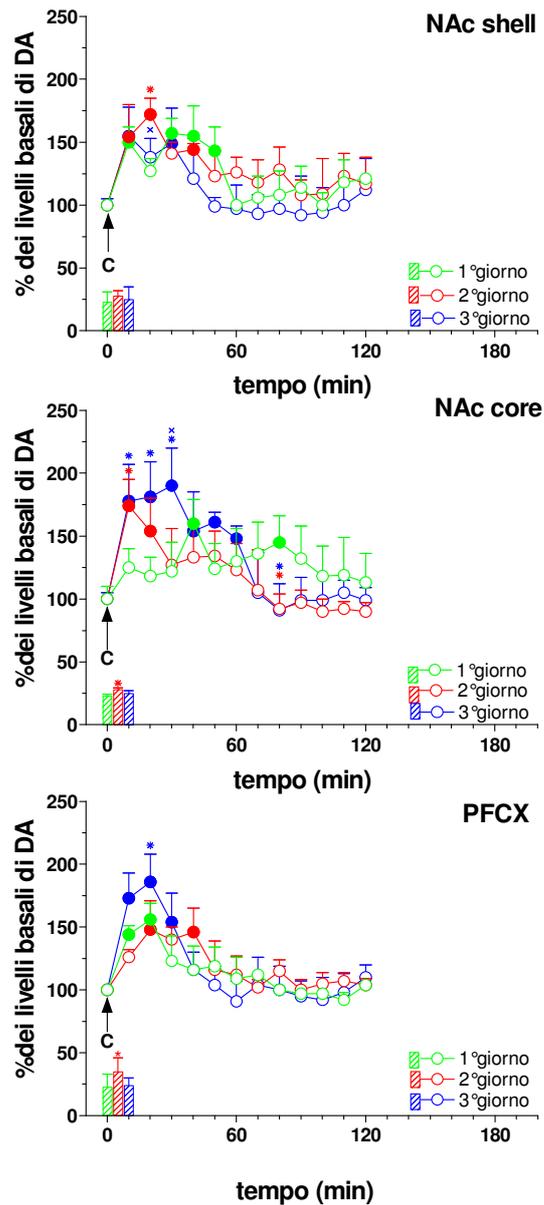


Figura 18

Effetto dell'infusione intraorale di una soluzione di cioccolato sulla trasmissione DA nella Shell e Core del NAc e nella PFCX in ratti allenati per due settimane.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti. Simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *: $p < 0.05$ rispetto al primo giorno; x : $p < 0.05$ rispetto al secondo giorno

Risposta della DA extracellulare nella shell e nel core del NAc e nella PFCX di ratti di controllo sottoposti al consumo cronico per 2 settimane di una soluzione zuccherina, dopo infusione intraorale di 1 ml di cioccolato, monitorata per 3 giorni consecutivi.

SHELL

La figura mostra la valutazione, attribuita mediante un punteggio, delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato. L'ANOVA a una via ha mostrato differenze significative tra diversi giorni ($F_{2,6}=0.35$; $p=0,018$). L'analisi post hoc ha mostrato che le reazioni durante il terzo giorno erano più pronunciate rispetto a quelle mostrate durante il secondo giorno.

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nella shell del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,6}=38,05$; $p=0.0004$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{10,30}=10,68$; $p=0,000001$).

Il test di Tukey ha mostrato un maggior incremento del rilascio di DA durante il primo giorno rispetto al secondo e al terzo.

CORE

La figura mostra la valutazione, attribuita mediante un punteggio, delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato.

L'ANOVA a una via ha mostrato differenze significative tra i diversi giorni ($F_{2,6}=10.78$; $p=0,01$). L'analisi post hoc ha mostrato che le reazioni durante il primo giorno erano più pronunciate rispetto a quelle mostrate durante il secondo e il terzo giorno.

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nel core del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,6}=7,9$; $p=0.02$), del fattore tempo ($F_{4,24}=26,67$; $p=0.00001$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{8,24}=10,14$; $p=0,000004$).

Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA durante tutte le somministrazioni di cioccolato. Ha mostrato inoltre che l'aumento durante la seconda e la terza somministrazione era maggiore rispetto alla prima.

PFCX

La figura mostra le reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di cioccolato. L'ANOVA a una via non ha mostrato una differenza significativa tra i gruppi ($F_{2,6}=1.0$; $P=0.42$).

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di cioccolato sul rilascio di DA extracellulare nella PFCX.

L'ANOVA a due vie ha mostrato effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,5}=17,10$; $p=0.006$), un effetto significativo del fattore tempo

($F_{7,35}=24,02$; $p=0.000001$) ed una significativa interazione giorno x tempo ($F_{14,35}=4,29$; $p=0.0002$).

Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA durante tutte le somministrazioni di cioccolato, maggiore però durante la prima.

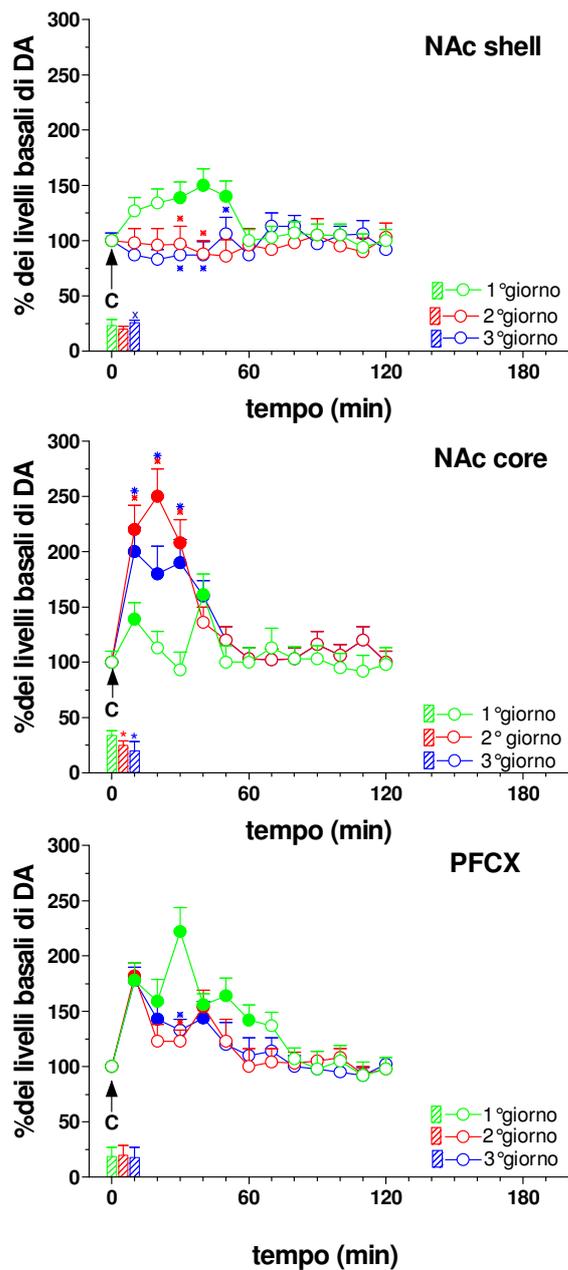


Figura 19

Effetto dell'infusione intraorale di una soluzione di cioccolato sulla trasmissione DA nella Shell e Core del NAc e nella PFCX in ratti di controllo.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti. Simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *: $p < 0.05$ rispetto al primo giorno; x : $p < 0.05$ rispetto al secondo giorno

Effetto della infusione intraorale di 1ml di una soluzione zuccherina sulla DA extracellulare nella shell del NAc in ratti naive e in ratti sottoposti al consumo cronico della stessa per 2 settimane e valutato durante 3 giorni consecutivi.

Ratti naive

La figura mostra la valutazione delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale della soluzione zuccherina. L'ANOVA a una via ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,8}=15.51$; $p=0,0018$). L'analisi post-hoc ha mostrato un maggior numero di reazioni edoniche nei ratti a cui è stata somministrata la soluzione zuccherina per la seconda e la terza volta.

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale della zuccherina sul rilascio di DA extracellulare nella shell del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore giorno ($F_{2,8}=4.6$; $p=0.046$). L'analisi post hoc non ha però messo in evidenza differenze tra i giorni.

Ratti sottoposti al consumo cronico di soluzione zuccherina per 2 settimane.

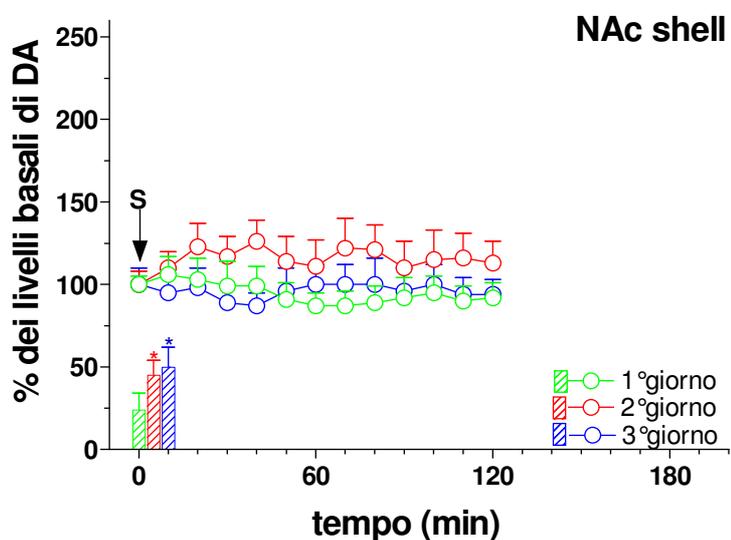
La figura mostra la valutazione delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale della soluzione zuccherina. L'ANOVA a una via ha

mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,6}=177.8$; $p=0,000005$). L'analisi post-hoc ha mostrato un maggior numero di reazioni edoniche nei ratti a cui è stata somministrata la soluzione zuccherina per la terza volta rispetto alle reazioni mostrate durante la prima e ha evidenziato che le reazioni manifestate durante la seconda erano maggiori di quelle mostrate durante la prima e la terza volta.

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di soluzione zuccherina sul rilascio di DA.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore tempo ($F_{4,24}=4.7$; $p=0.006$). Il test di Tukey però non ha mostrato differenze significative tra diversi giorni.

Soluzione zuccherina in ratti naive



Soluzione zuccherina dopo 2 settimane di pre-esposizione

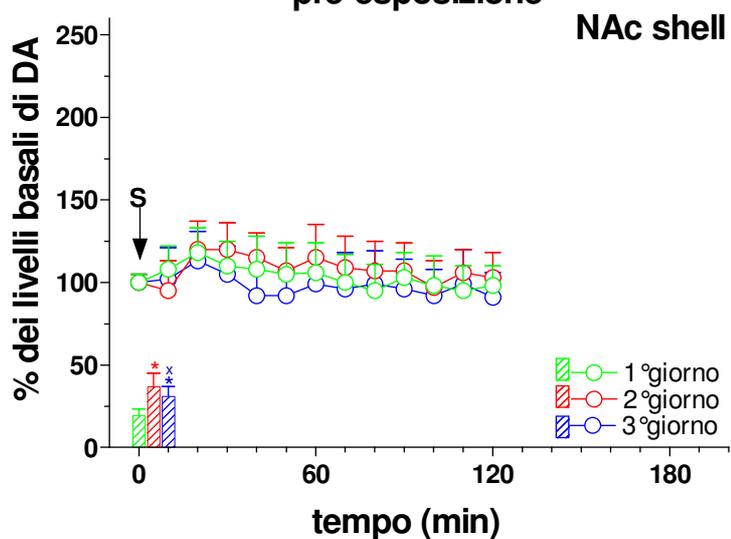


Figura 20

Effetto dell'infusione orale di soluzione zuccherina sulla DA nella Shell del NAc di ratti naive e di ratti allenati a bere la stessa soluzione per 2 settimane.

Nella figura sono riportate le manifestazioni edoniche durante l'infusione della soluzione zuccherina.

I risultati sono espressi come media \pm EMS. Il simbolo pieno, $p < 0.05$ rispetto al valore basale; *, $p < 0.05$ rispetto al 1° giorno; x, $p < 0.05$ rispetto al 2° giorno.

Risposta della trasmissione DA nel core del NAc al consumo di 1ml di una soluzione zuccherina sulla DA extracellulare in ratti naive e in ratti sottoposti al consumo cronico della stessa per 2 settimane e valutato durante 3 giorni consecutivi.

Ratti naive

La figura mostra la valutazione delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale della soluzione zuccherina. L'ANOVA a una via ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,6}=21.54$; $p=0,0018$). L'analisi post-hoc ha mostrato un maggior numero di reazioni edoniche nei ratti a cui è stata somministrata la soluzione zuccherina per la seconda e la terza volta.

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di soluzione zuccherina sul rilascio di DA extracellulare nella shell del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,6}=33.3$; $p=0.0006$), del fattore tempo ($F_{10,60}=74,77$; $p=0.000001$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{20,60}=46,19$; $p=0,000001$).

Il test di Tukey ha mostrato un aumento di DA durante la somministrazione di soluzione zuccherina durante il secondo e il terzo giorno, maggiore però durante il terzo giorno.

Ratti sottoposti al consumo cronico di soluzione zuccherina per 2 settimane

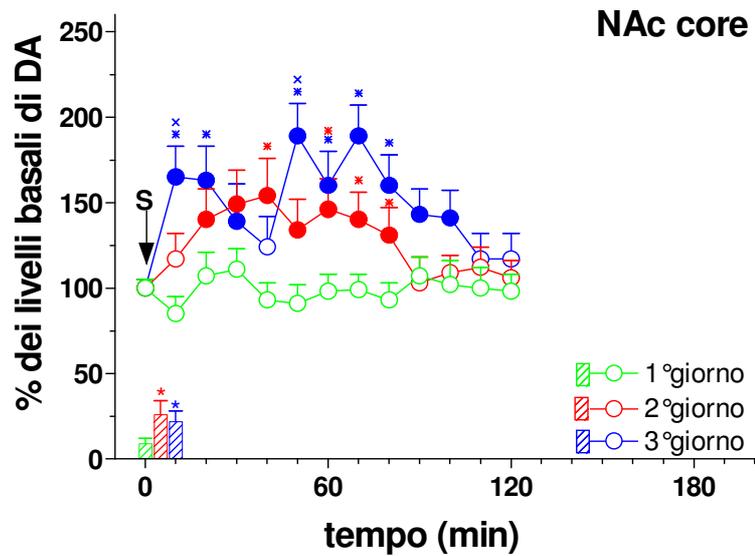
La figura mostra la valutazione delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale di soluzione zuccherina. L'ANOVA a una via ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,6}=5.48$; $p=0,044$). L'analisi post-hoc non ha confermato le differenze tra i gruppi.

La figura mostra anche l'effetto dell'infusione intraorale di zuccherina sul rilascio di DA extracellulare nel core del NAc.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore giorno ($F_{2,6}=8.47$; $p=0.0018$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{8,24}=4.01$; $p=0,004$).

Il test di Tukey ha mostrato un aumento significativo della DA solo durante la somministrazione di soluzione zuccherina al secondo giorno.

Soluzione zuccherina in ratti naive



Soluzione zuccherina dopo 2 settimane di pre-esposizione

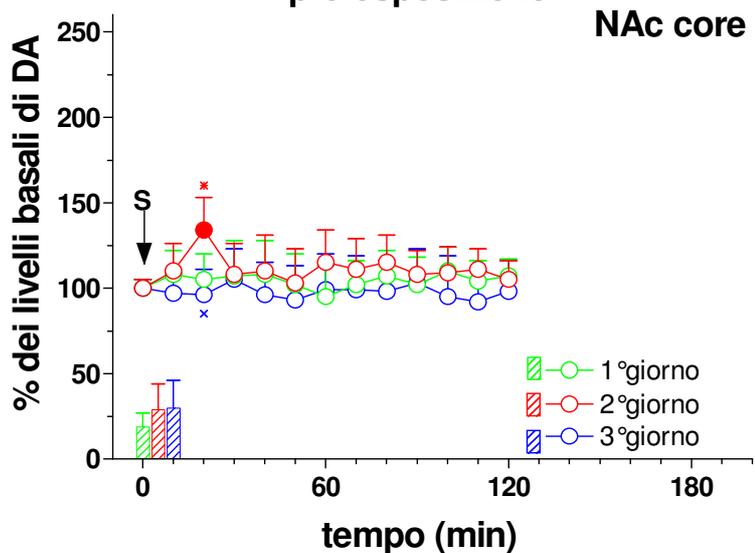


Figura 21

Effetto dell'infusione orale di soluzione zuccherina sulla DA nel Core del NAc di ratti naive e di ratti allenati a bere la stessa soluzione per 2 settimane.

Nella figura sono riportate le manifestazioni edoniche durante l'infusione della soluzione zuccherina.

I risultati sono espressi come media \pm EMS. Il simbolo pieno, $p < 0.05$ rispetto al valore basale; *, $p < 0.05$ rispetto al 1° giorno; x, $p < 0.05$ rispetto al 2° giorno.

Effetto della infusione intraorale di 1ml di una soluzione zuccherina sulla DA extracellulare nella PFCX in ratti naive e in ratti sottoposti al consumo cronico della stessa per 2 settimane e valutato durante 3 giorni consecutivi.

Ratti naive.

La figura mostra la valutazione delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale della soluzione zuccherina. L'ANOVA a una via non ha mostrato alcun effetto significativo ($F_{2,6}=2.94$; $p=0.13$).

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale della zuccherina sul rilascio di DA extracellulare nella PFCX.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore tempo ($F_{8,48}= 141.88$; $p=0.000001$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{16,48}= 17.19$; $p=0.000001$). Il test di Tukey ha mostrato un potenziamento della trasmissione DAergica durante tutte le somministrazioni senza confermare alcuna differenza tra i gruppi.

Ratti sottoposti al consumo cronico di soluzione zuccherina per 2 settimane.

La figura mostra la valutazione delle reazioni edoniche registrate durante l'infusione orale della soluzione zuccherina. L'ANOVA a una via non ha mostrato un effetto significativo ($F_{2,6}=3.54$; $p=0.096$).

La figura mostra anche l'effetto della somministrazione orale di soluzione zuccherina sul rilascio di DA extracellulare nella PFCX.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del fattore tempo ($F_{4,24}=39,13$; $p=0.000001$) e una significativa interazione giorno/tempo ($F_{8,24}=5,32$; $p=0,0006$).

Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA durante la prima e la seconda somministrazione di soluzione zuccherina.

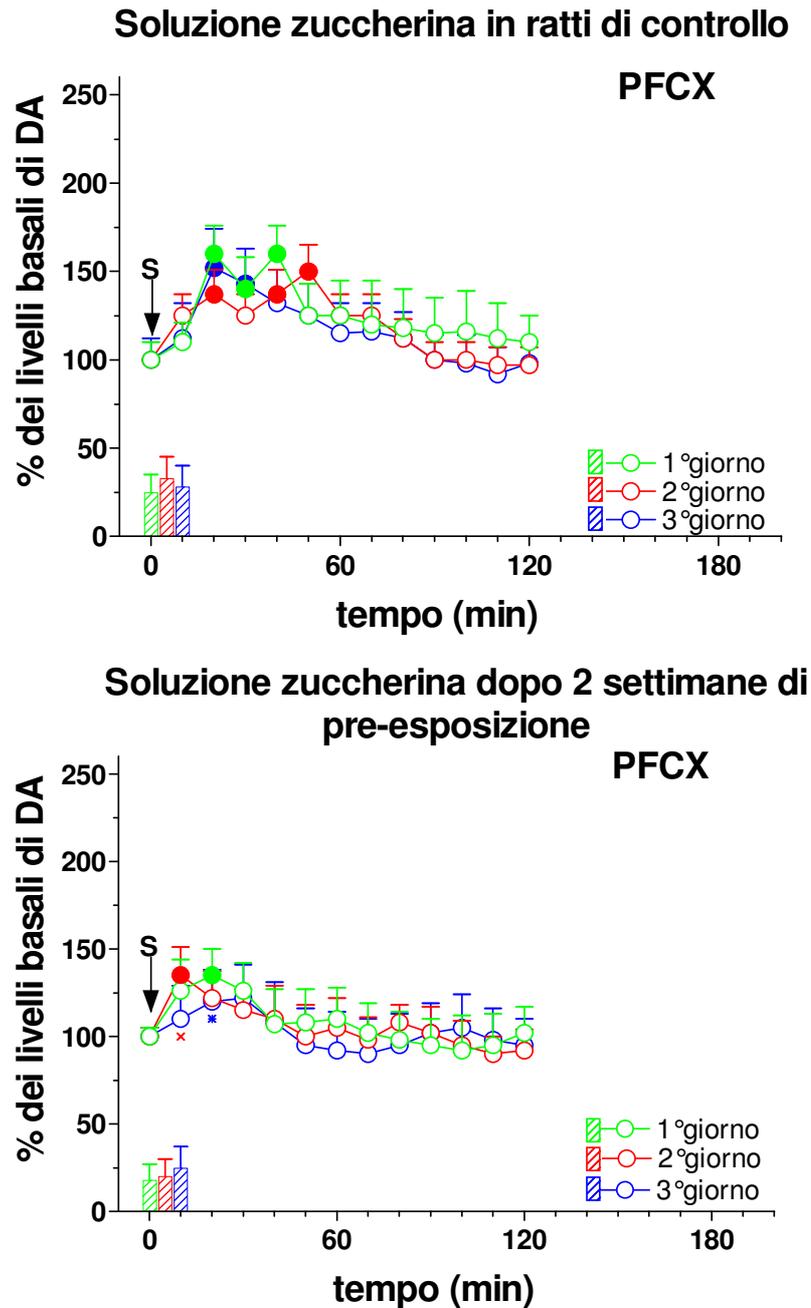


Figura 22

Effetto dell'infusione orale di soluzione zuccherina sulla DA nella PFCX di ratti di controllo e di ratti allenati a bere la stessa soluzione per 2 settimane.

Nella figura sono riportate le manifestazioni edoniche durante l'infusione della soluzione zuccherina.

I risultati sono espressi come media \pm EMS. Il simbolo pieno, $p < 0.05$ rispetto al valore basale; *, $p < 0.05$ rispetto al 1° giorno; x, $p < 0.05$ rispetto al 2° giorno.

Livelli basali di DA.

I valori basali della DA (espressi come media delle fmoli \pm EMS) nei campioni di dializzato di 5 minuti risultarono i seguenti: shell 25 ± 2 , core 23 ± 2 .

Nose pokes attivi e inattivi eseguiti durante il training per la Self Administration di pellets di saccarosio con un protocollo FR 1.

La figura 23 mostra come al procedere dell'allenamento gli animali mostrano acquisire un comportamento operante in quanto il numero dei nose pokes attivi aumenta nel tempo fino a raggiungere un *plateau*. Inoltre si evince che i nose poke attivi sono in numero maggiore rispetto a quelli inattivi. L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore acquisition ($F_{\text{nose pokes } 1,38} = 48145,7$; $p=0.000001$), giorni ($F_{\text{giorni } 9,342} = 4517,9$; $p=0.000001$) e una significativa interazione acquisition/giorni ($F_{\text{n.p.*g}} = 9.324$; $p=0.000001$).

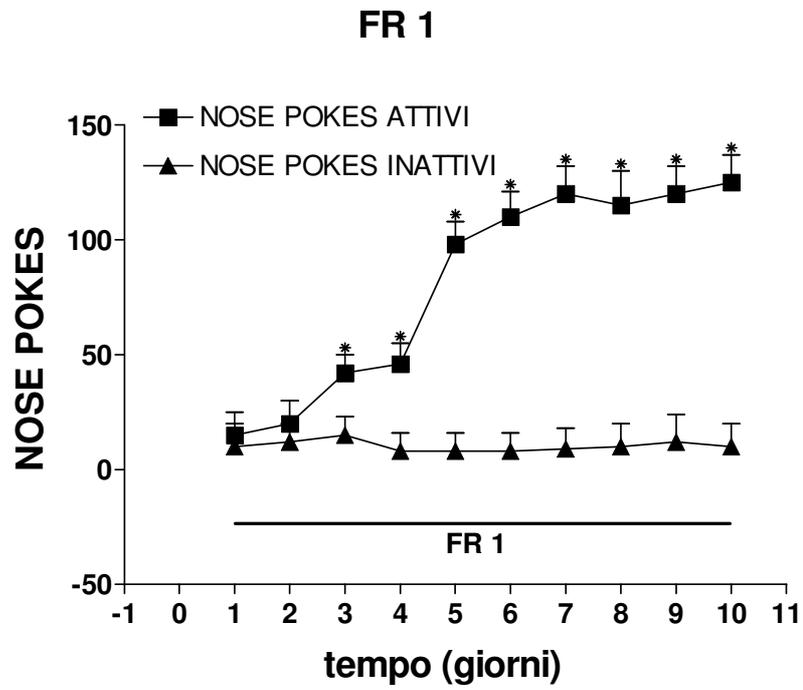


Figura 23

Risposte cumulative (nose pokes) durante le 2 settimane di training con protocollo FR1.

I risultati sono espressi come media \pm EMS.

*, $p < 0.05$ rispetto ai nose pokes inattivi.

Risposta della trasmissione DA nella shell e nel core del NAc durante la Self Administration di pellets di saccarosio. FR 1

Nella figura 24 sono riportate le curve della risposta della DA nella shell e nel core del NAc durante un paradigma di auto-somministrazione di pellets di saccarosio.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore area ($F_{1,13}=5.15$; $p=0.04$), tempo ($F_{6,78}=4.08$; $p=0.001$) e una significativa interazione area/tempo ($F_{6,78}=2.77$; $p=0.017$). Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA nella shell.

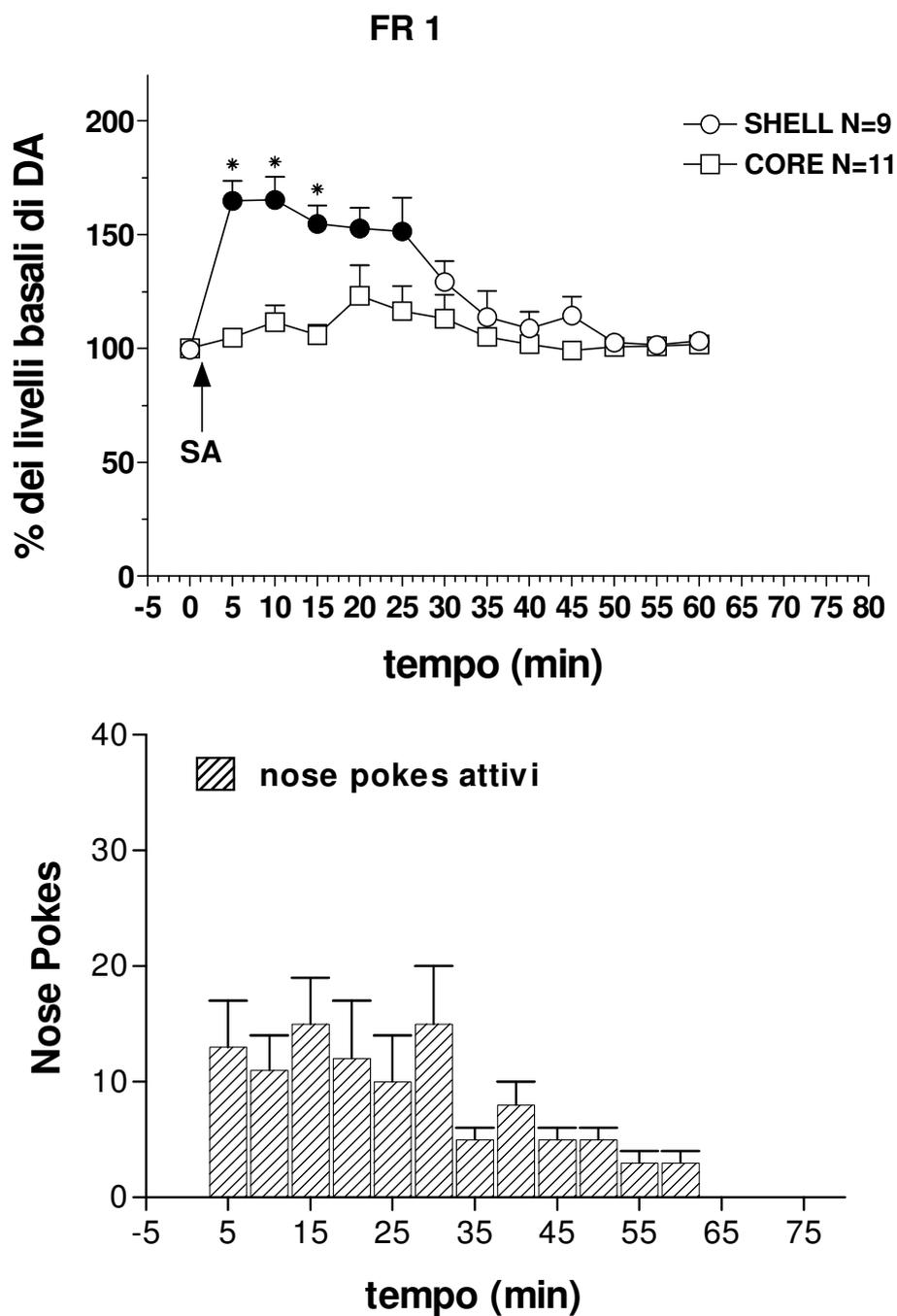


Figura 24

Andamento del rilascio di DA nella shell (cerchi) e nel core (quadrati) del NAc e nose poking attivi (grafico a barre) durante la Self Administration di saccarosio.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti. Simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *: $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nel core.

Andamento della DA extracellulare nella shell e nel core del NAc durante la presentazione degli stimoli condizionati associati alla erogazione delle pellets saccarosio.

La figura 25 mostra la risposta della trasmissione DAergica nella shell e nel core del NAc durante la presentazione degli stimoli condizionati uditivo (tono) e visivo (luce) associati alla somministrazione di pellets di saccarosio.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore area ($F_{1,7}=7.16$; $p=0.032$), tempo ($F_{6,42}=9.38$; $p=0.000002$) e una significativa interazioni area/tempo ($F_{6,42}=10.45$; $p=0.000001$). Il post-hoc test ha mostrato una stimolazione della DA nella shell.

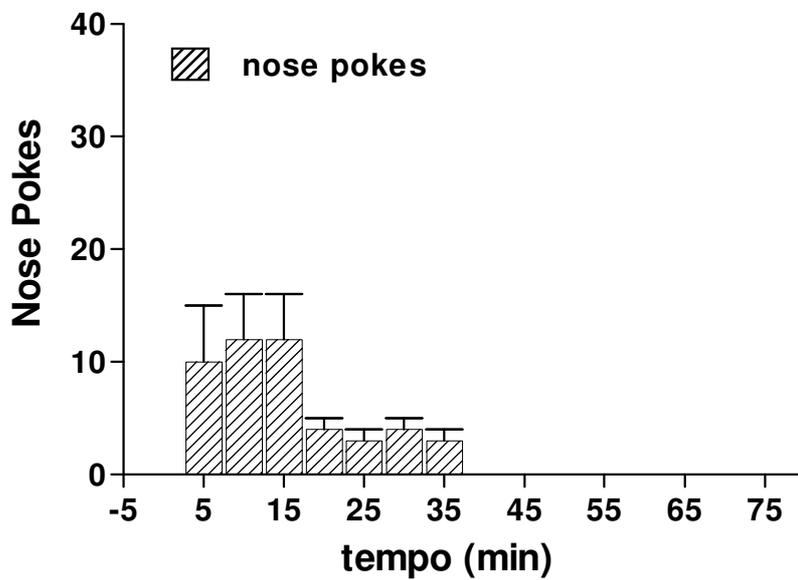
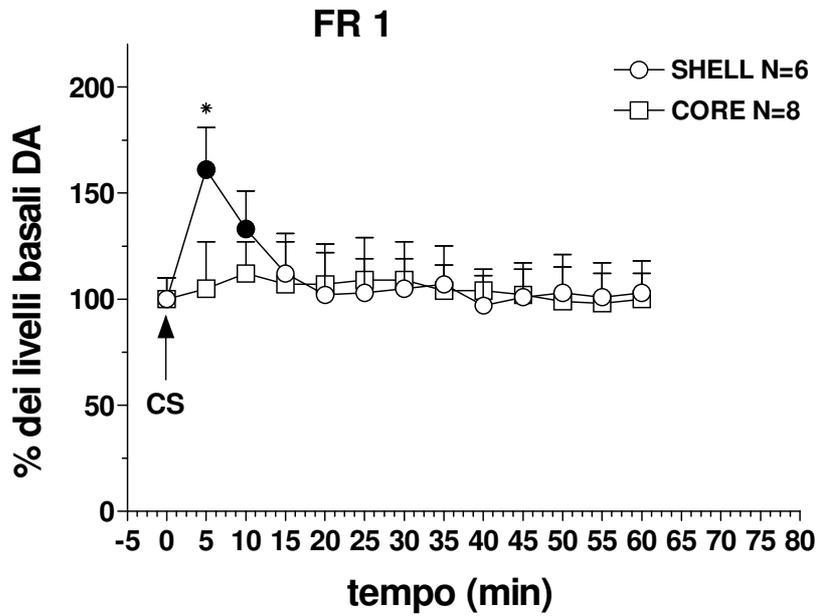


Figura 25

Risposta della DA nella shell (cerchi) e nel core (quadrati) del NAc durante la presentazione degli stimoli condizionati associati alla erogazione del saccarosio.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti. Simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *: $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nel core.

Andamento del rilascio di DA nella shell e nel core del NAc durante l'erogazione non contingente delle pellets di saccarosio.

Nella figura 26 sono riportate le curve della risposta della DA nella shell e nel core del NAc durante la somministrazione non contingente, ossia da parte dell'operatore, di pellets di saccarosio.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore area ($F_{1,13}=6.28$; $p=0.026$), tempo ($F_{6,78}=14.07$; $p=0.000001$) e una significativa interazioni area/tempo ($F_{6,78}=4.23$; $p=0.001$). Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA sia nella shell che nel core del NAc.

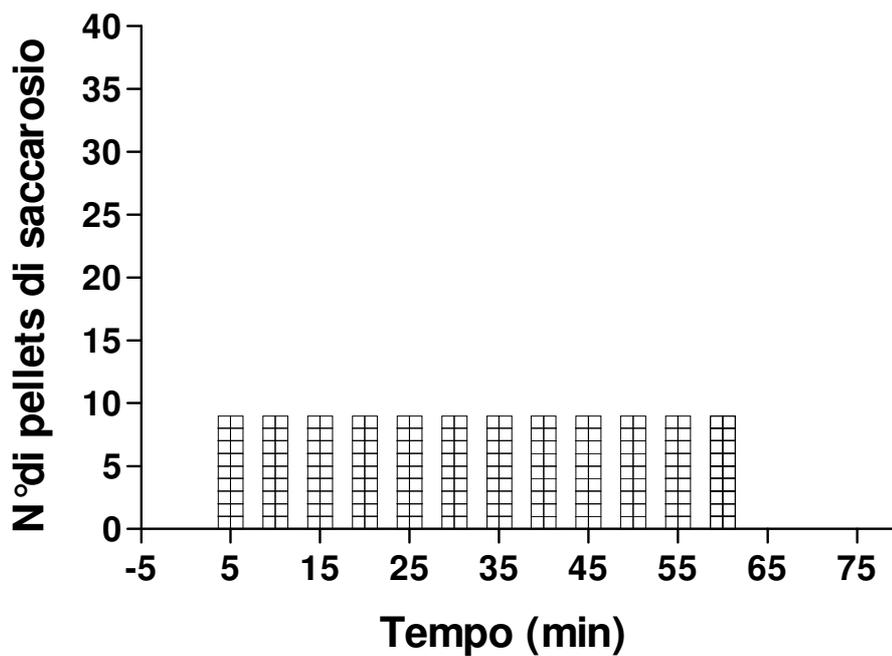
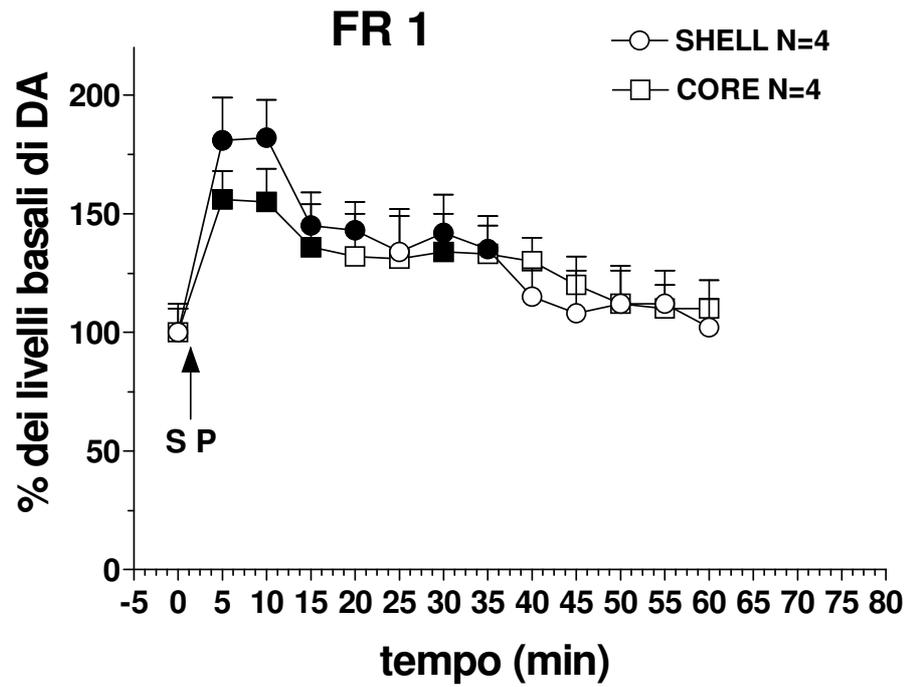


Figura 26

Andamento del rilascio di DA nella shell (cerchi) e nel core (quadrati) del NAc durante l'erogazione non contingente del saccarosio.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti. Simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto ai valori basali.

Nose pokes attivi e inattivi eseguiti durante il training per la Self Administration di pellets di saccarosio con un protocollo FR 5.

La figura 27 mostra come al procedere dell'allenamento, gli animali acquisiscono un comportamento operante in quanto il numero dei nose pokes attivi aumenta progressivamente nel tempo fino a raggiungere un *plateau*. Inoltre si evince che i nose poke attivi siano in numero maggiore rispetto a quelli inattivi. L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore acquisition ($F_{\text{nose pokes } 1,38} = 310722,8; p=0.000001$), giorni ($F_{\text{giorni } 9,342} = 24943,1; p=0.000001$) e una significativa interazione acquisition/giorni ($F_{\text{n.p.*g}} = 23807,7; p=0.000001$).

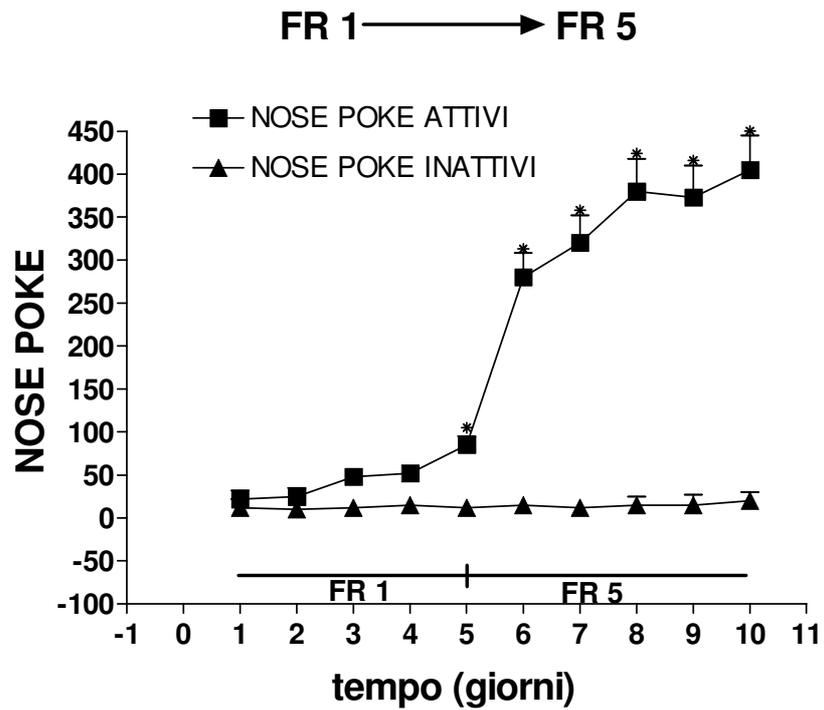


Figura 27

Risposte cumulative (nose pokes) durante le 2 settimane di training con protocollo FR5.

I risultati sono espressi come media \pm EMS.

*, $p < 0.05$ rispetto ai nose pokes inattivi.

Risposta della trasmissione DA nella shell e nel core del NAc durante la Self Administration di pellets di saccarosio. FR 5.

Nella figura 28 sono riportate le curve della risposta della DA nella shell e nel core del NAc durante un paradigma di auto-somministrazione di pellets di saccarosio.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per il fattore area ($F_{1,8}=88.29$; $p=0.000013$), tempo ($F_{12,96}=26.34$; $p=0.000001$) e una significativa interazione area/tempo ($F_{12,96}=24.19$; $p=0.00001$). Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA nella shell ma non nel core del NAc.

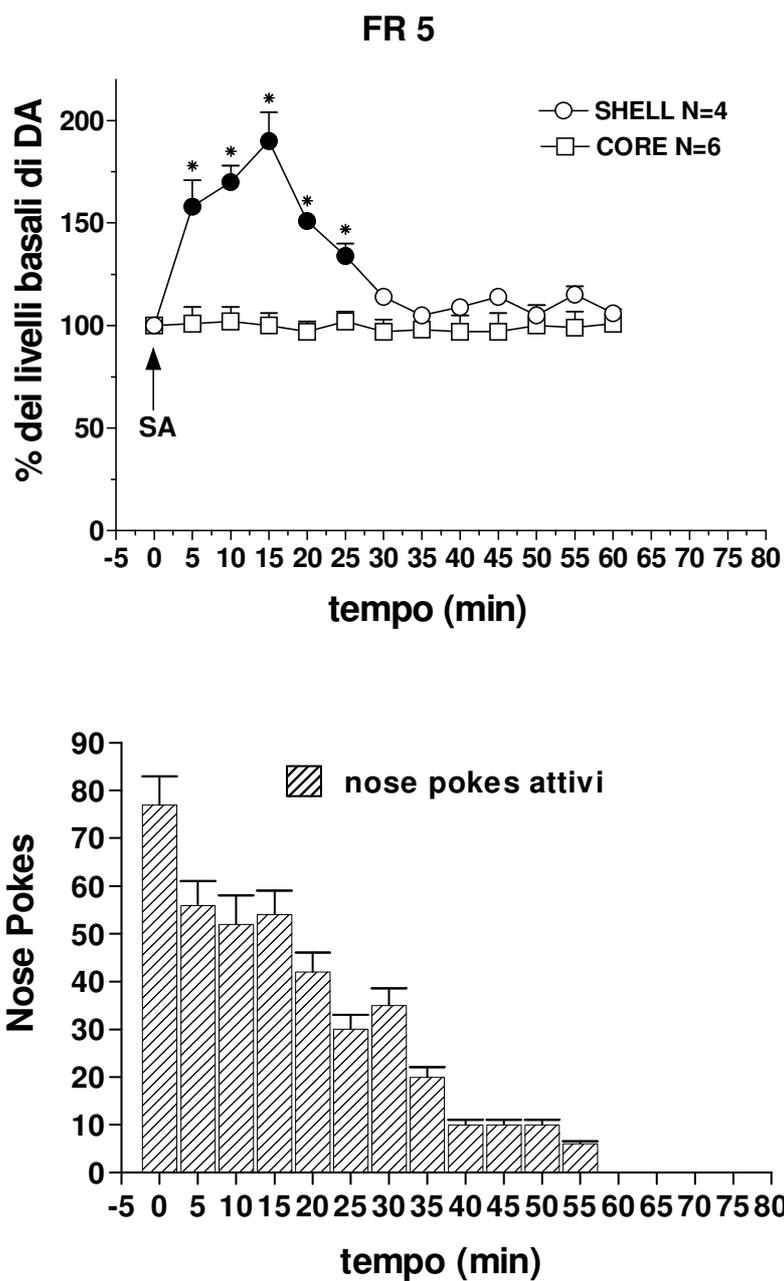


Figura 28

Modificazioni del rilascio di DA nella shell (cerchi) e nel core (quadrati) del NAc e nose poking attivi (grafico a barre) durante la Self Administration di saccarosio.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti. Simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto ai valori basali; *: $p < 0.05$ rispetto ai valori ottenuti nel core.

Andamento della DA extracellulare nella shell e nel core del NAc durante la presentazione degli stimoli condizionati associati alla erogazione delle pellets saccarosio.

La figura 29 mostra la risposta della trasmissione DAergica nella shell e nel core del NAc durante la presentazione degli stimoli condizionati uditivo (tono) e visivo (luce) associati alla somministrazione di pellets di saccarosio.

L'ANOVA a due vie non ha mostrato alcun effetto significativo per il fattore area ($F_{1,8}=0.010$; $p=0.92$), tempo ($F_{12,96}=1.20$; $p=0.29$), nè una significativa interazione area/tempo ($F_{12,96}=0.18$; $p=0.99$).

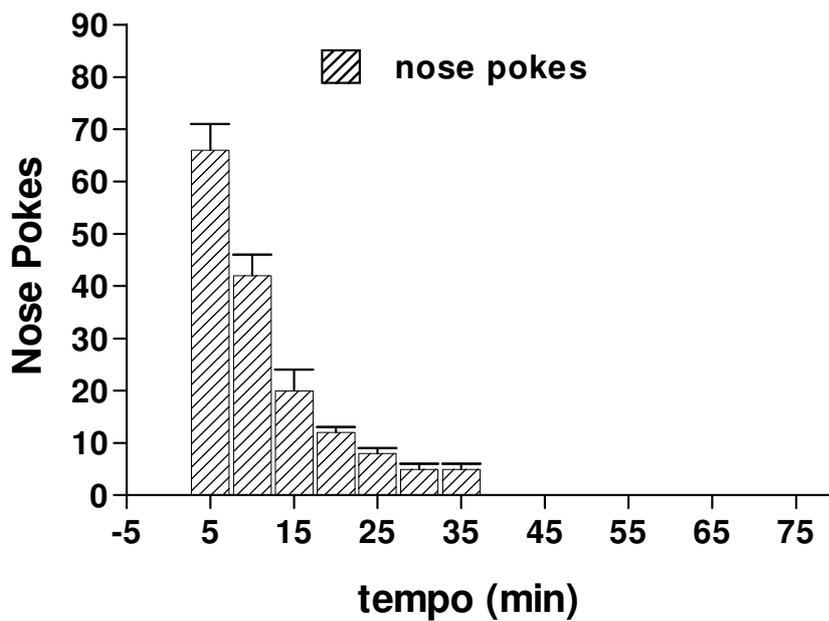
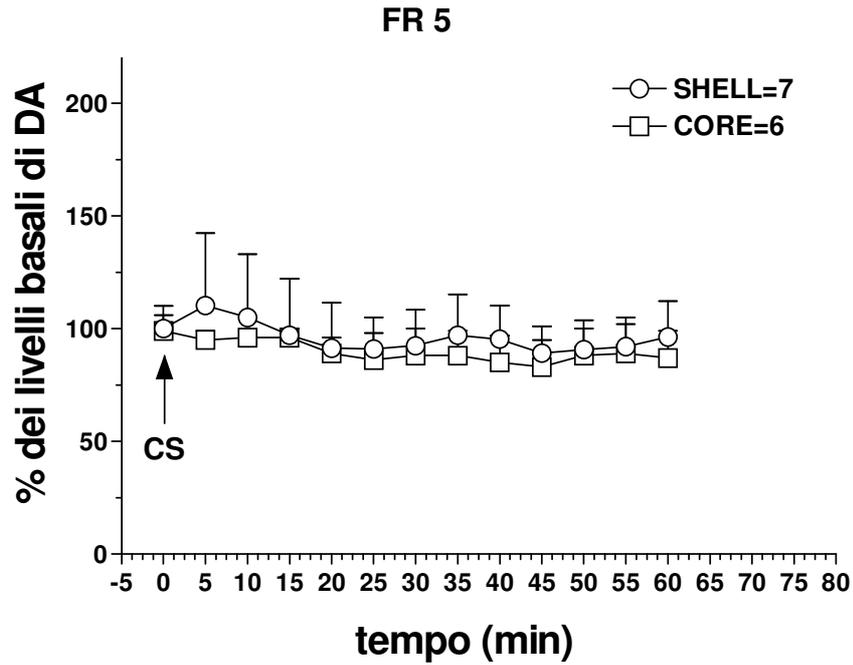


Figura 29

Andamento del rilascio di DA nella shell (cerchi) e nel core (quadrati) del NAc durante la presentazione degli stimoli condizionati associati alla erogazione del saccarosio. (FR5)

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti.

Andamento del rilascio di DA nella shell e nel core del NAc durante l'erogazione non contingente delle pellets di saccarosio.

Nella figura 30 sono riportate le curve della risposta della DA nella shell e nel core del NAc durante la somministrazione non contingente, ossia da parte dell'operatore, di pellets di saccarosio.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo solo per il fattore tempo ($F_{12,84}=4.34$; $p=0.000024$) mentre non ha mostrato un effetto significativo per il fattore area ($F_{1,7}=0.04$; $p=0.83$), nè una significativa interazioni area/tempo ($F_{12,84}=0.30$; $p=0.99$). Il test di Tukey ha mostrato un incremento significativo del rilascio di DA sia nella shell che nel core del NAc.

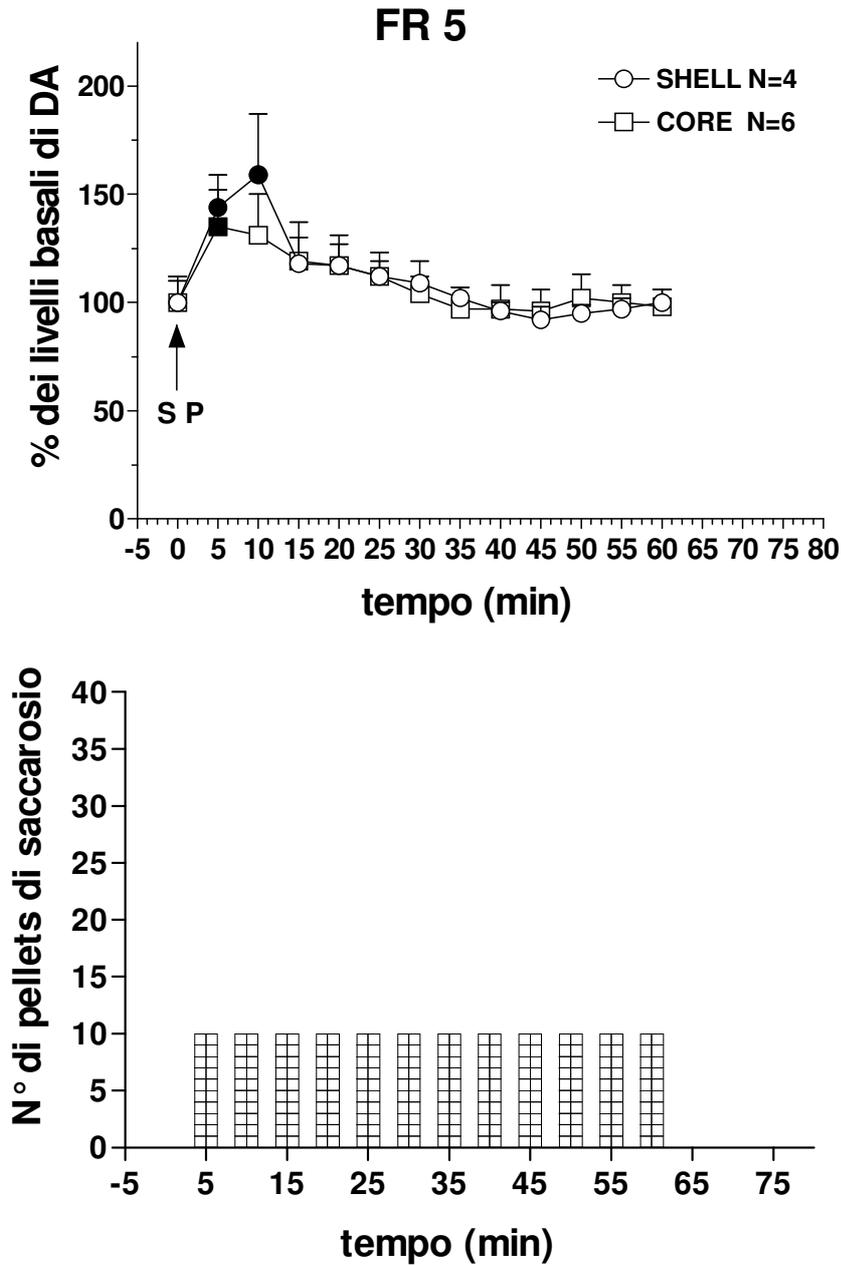


Figura 30

Andamento del rilascio di DA nella shell (cerchi) e nel core (quadrati) del NAc durante l'erogazione non contingente del saccarosio.

I risultati sono espressi come media \pm EMS dei risultati ottenuti in almeno quattro ratti. Simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto ai valori basali.

DISCUSSIONE

Uno dei risultati più importanti emersi dal nostro studio è stata la scoperta che in seguito al consumo cronico di cioccolato il meccanismo adattativo della risposta DAergica nella shell del NAc in risposta allo stesso cibo non si manifesti più.

Durante gli esperimenti gli animali, forniti di acqua e cibo ad libitum, sono stati sottoposti durante il periodo notturno (12h al giorno) al consumo cronico di una soluzione di cioccolato che è stato scelto per le sue caratteristiche gratificanti (*Bassareo e coll., 2003; Maccioni e coll., 2008*).

La ripetuta infusione intraorale di 1 ml di cioccolato per 3 giorni consecutivi in animali sottoposti al suo consumo per 2 settimane, ha provocato un continuo aumento della DA nella shell del NAc. Non è stato quindi osservato il fenomeno dell'abitudine nella risposta della trasmissione DAergica. Inoltre, in accordo con studi precedentemente pubblicati (*Bassareo e Di Chiara 1997, 1999b*), non è stata osservata l'abitudine nella risposta della DA nella PFCX, mentre nel core del NAc è stato ottenuto un suo potenziamento.

Nei ratti sottoposti al consumo cronico dello stesso cibo per 1 sola settimana e nei ratti di controllo si presenta invece il fenomeno dell'abitudine.

L'infusione della soluzione zuccherina sia nei ratti naive che in quelli pre-esposti alla stessa soluzione per 2 settimane, non ha determinato alcun aumento di DA nella shell, ma ha stimolato la trasmissione DAergica nel core e in parte anche nella PFCX. Questo dato conferma che per poter attivare la trasmissione DAergica nella shell lo stimolo gustativo deve essere particolarmente saliente e nuovo. Il gusto della soluzione zuccherina non ha evidentemente queste caratteristiche.

Lo studio è stato intrapreso per cercare di fare chiarezza sul ruolo del neurotrasmettitore DA nella gratificazione; infatti è ben noto che il consumo di un cibo dal gusto particolarmente gradevole per l'animale da laboratorio, nuovo o relativamente nuovo, potenzia la trasmissione DAergica nella shell (*Wilson e coll., 1995; Bassareo e Di Chiara, 1997; Gambarana e coll., 2003; Sahr e coll., 2008*) e nel core del NAc e nella PFCX (*Bassareo e Di Chiara 1997; 1999a; 1999b; Gambarana e coll., 2003*). Il successivo consumo dello stesso cibo dopo 2 h o 24 h non dà luogo ad un aumento della DA nella shell, mentre potenzia la risposta nel core e continua a stimolare la DA nella PFCX (*Bassareo e Di Chiara 1997; Bassareo e coll., 2003*). La mancanza di un aumento di DA nella shell, fenomeno chiamato abitudine (*habituation*) è una caratteristica di quest'area.

E' importante sottolineare che la mancata risposta della DA nella shell ad uno stimolo gustativo piacevole non corrisponde ad una diminuzione

della motivazione o della percezione dell'effetto gratificante (*Di Chiara 1999*). Infatti, come riportato in letteratura, durante i consumi di cibo successivi al primo, gli animali mostrano un comportamento motivato molto più pronunciato (*Bassareo e Di Chiara, 1997; 1999a, 1999b; Bassareo e coll., 2003*). Possiamo dedurre che la DA rilasciata nella shell in seguito al contatto con uno stimolo gratificante non sia quindi la causa dell'edonia (*Berridge e Robinson, 1998; Di Chiara, 1999*) e che il suo ruolo, in accordo con la "incentive learning theory" (*Di Chiara 1998; 1999; 2002*), sia quello di facilitare l'apprendimento associativo. Questo apprendimento si instaura ogni volta che l'individuo viene in contatto con un nuovo stimolo. Durante questa nuova situazione si associano gli effetti dello stimolo primario (per es il piacere che esso dà, se si tratta di uno stimolo gratificante) agli stimoli neutri che di per sé non hanno una valenza motivazionale, ma di cui in questo contesto si fa esperienza contemporaneamente. In seguito alla associazione essi diventano stimoli secondari e sono in grado, di per sé, di evocare la stessa risposta evocata dallo stimolo primario.

Si ipotizza che durante l'associazione si abbia un potenziamento della trasmissione DAergica nella shell del NAc che facilita questo processo. Una volta appresa l'informazione, non è necessario che ogni volta si instauri un nuovo apprendimento e allora la DA nella shell non aumenta più e non facilita più l'apprendimento associativo. Studi compiuti nei nostri

laboratori utilizzando il cibo come stimolo gratificante naturale, indicano che solo quando sarà trascorso diverso tempo la DA aumenterà nuovamente al contatto con il cibo precedentemente consumato (*Bassareo e coll., 1997*).

Gli stimoli gratificanti naturali condividono la proprietà di stimolare la trasmissione DAergica nella shell nel NAc con i farmaci d'abuso, che sono stati definiti "surrogati dei gratificanti naturali" (*Di Chiara e coll., 1993*). Ma il tipo di stimolazione che le sostanze d'abuso esercitano è di tipo non adattativo, ossia in seguito a ripetute somministrazioni dello stesso farmaco, fornito dall'operatore o autoiniettato dall'animale, si ottiene un continuo aumento di DA nella shell (*Pontieri e coll., 1995; 1996; Tanda e coll., 1997; Cadoni e coll., 2005; Cadoni e Di Chiara, 2007; Cheer e coll., 2007; Lecca e coll., 2006 a e b; Schramm-Sapyta e coll., 2006; Lecca e coll., 2007*). Si ipotizza che questo processo causi un'associazione esagerata tra gli effetti gratificanti del farmaco d'abuso e gli stimoli neutri associati al farmaco stesso. Questo porterebbe l'individuo ad attribuire un'eccessiva valenza motivazionale agli stimoli condizionati o al contesto che predice la disponibilità del farmaco d'abuso. Si pensa infatti che la tossicodipendenza sia l'espressione di un eccessivo controllo sul comportamento esercitato dagli stimoli associati all'uso della "droga" e che sia il risultato di un apprendimento incentivo patologico che si manifesta in seguito al ripetuto rilascio di DA nella shell (*Di Chiara, 1999*). Ciò

potrebbe spiegare il perché l'individuo sviluppa dipendenza in seguito all'esperienza col farmaco d'abuso, ma non in seguito al consumo di un buon cibo.

In letteratura sono stati pubblicati diversi studi eseguiti su animali affamati nei quali è stato osservato che, in seguito ad abbuffate di una soluzione di saccarosio essi diventano dipendenti e successive e ripetute somministrazioni della stessa soluzione provocano un continuo rilascio di DA nella shell del NAc come accade nel caso di una sostanza d'abuso (*Hajnal e Norgren, 2002; Avena e coll., 2005, 2006 e 2007; Rada e coll., 2005 e 2006*). I modelli animali riportati in questi lavori sono dei modelli di bulimia nervosa ed effettivamente l'individuo affetto da disturbi alimentari come la bulimia nervosa stessa o il binge eating disorder ha nei confronti del cibo un comportamento compulsivo molto simile al comportamento che il tossicodipendente ha verso la sostanza da cui dipende.

I nostri risultati confermano questi dati anche in ratti non affamati ed in seguito ad una esposizione cronica per almeno 2 settimane.

Possiamo concludere che la ripetuta esposizione dello stesso cibo appetitoso abolisce il fenomeno dell'abitudine nella risposta della DA nella shell del NAc, rendendo forse gli individui più vulnerabili alla dipendenza dal cibo.

Considerando inoltre che gli stimoli condizionati sono di fondamentale importanza nel sostenimento del comportamento motivato al cibo, abbiamo

pensato di approfondire gli studi sull'apprendimento cercando di far luce sulla risposta DAergica del NAc agli stimoli condizionati. Da studi precedentemente compiuti nei nostri laboratori è emerso che gli stimoli condizionati al cibo mediante l'utilizzo di un paradigma pavloviano determinavano un potenziamento della trasmissione DAergica nel core ma non nella shell del NAc (*Bassareo e Di Chiara, 1997; 1999 a e b*), mentre, viceversa, gli stimoli associati ai farmaci d'abuso erano capaci di stimolare la DA nella shell ma non nel core (*Bassareo e coll., 2007; 2010*). Altri studi riportano invece dei dati contrastanti, in quanto gli autori osservano una stimolazione della DA nel core del NAc in seguito alla presentazione di stimoli condizionati ai farmaci, mediante però un paradigma di tipo strumentale (*Ito e coll., 2000; Phillips e coll., 2003; Roitman e coll., 2004*). Tali discrepanze potevano essere spiegate con le differenti modalità di protocolli sperimentali utilizzati (paradigma di apprendimento pavloviano verso paradigma di apprendimento strumentale, micro dialisi verso voltametria). Ben poco era invece stato pubblicato invece sulla risposta agli stimoli condizionati al cibo attraverso un condizionamento strumentale. Abbiamo quindi deciso di sottoporre i nostri animali alla autosomministrazione di pellets di saccarosio e di studiare le risposte della DA nella shell e nel core del NAc nelle varie fasi del comportamento. Durante il protocollo di autosomministrazione il ratto impara ad associare degli stimoli neutri, come un suono o una luce, ad un lavoro che deve

compiere per ottenere la ricompensa. Alla fine dell'apprendimento strumentale l'animale esegue quindi un comportamento operante finalizzato ad ottenere le pellets di saccarosio. Studiare le modificazioni della DA durante la fase di auto somministrazione, poi durante la sola presentazione degli stimoli condizionati ed infine durante la somministrazione non contingente del saccarosio ci avrebbe permesso di valutare con maggior chiarezza il ruolo del NAc nelle varie fasi del comportamento motivato e quindi nell'apprendimento.

Durante la sessione di auto somministrazione di pellets di saccarosio, sia utilizzando una schedula con FR1 che una con FR5, abbiamo osservato un incremento della DA nella shell del NAc molto elevato e prolungato nel tempo. Nel core del NAc invece non abbiamo registrato alcun aumento significativo.

Un importante risultato emerso dal nostro studio è che la presentazione delle cues associate alla auto somministrazione di saccarosio determinano un aumento della DA nella shell solo quando si utilizza una schedula con protocollo FR1 ma non quando si utilizza il protocollo FR5. Possiamo ipotizzare che la trasmissione DAergica nella shell venga stimolata solo quando gli stimoli condizionati sono direttamente associati allo stimolo gratificante, come nel caso della schedula di auto somministrazione con protocollo FR1, nel quale alle cues secondarie segue un unico comportamento di nose poking che determina l'erogazione di una pellet di

saccarosio. Utilizzando un protocollo di auto somministrazione FR5 le cues secondarie non sono in grado di potenziare la trasmissione DAergica nella shell in quanto probabilmente non vengono direttamente associate al reward. Infatti con questo protocollo per poter ottenere la somministrazione di una singola pellet di saccarosio il ratto deve effettuare 5 nose pokes, ma nelle nostre condizioni sperimentali, in seguito ad una attenta osservazione del comportamento, appare chiaro che l'animale si aspetta di ricevere la ricompensa ad ogni comportamento di nose poking. Possiamo ipotizzare che in questo caso l'aspettativa dell'animale venga delusa e che questo impedisca alle cues associate al saccarosio di potenziare la DA nella shell. Nel core del NAc non abbiamo osservato alcun aumento della DA né utilizzando il protocollo FR1 né quello FR5.

I dati della risposta della trasmissione DAergica agli stimoli condizionati al cibo con paradigma strumentale risultano in contrasto con quanto osservato nei nostri studi precedenti nei quali invece era stato utilizzato un paradigma pavloviano (*Bassareo e Di Chiara, 1997; 1999 a e b*) e fanno luce sulle discrepanze presenti in letteratura (*Ito e coll., 2000; Duvachelle e coll., 2000; Roitman e coll., 2004; Carelli e coll., 2000*).

Possiamo quindi concludere che la trasmissione DAergica nel NAc viene stimolata con modalità diverse a seconda del tipo di protocollo di condizionamento sperimentale utilizzato, in accordo con quanto asserito nei

precedenti lavori già pubblicati (*Bassareo e coll., 2007*) e in stampa (*Bassareo e coll., 2010*).

Quando le pellets di saccarosio vengono erogate dall'operatore in maniera non contingente e quindi inaspettata per l'animale, si verifica un aumento di DA sia nella shell che nel core del NAc. Abbiamo osservato che quando il consumo del saccarosio avviene immediatamente dopo la presentazione degli stimoli condizionati, cioè durante la fase di auto somministrazione, determina un aumento della DA nella shell di maggiore entità e prolungato nel tempo, rispetto a quanto accade durante la terza sessione in cui gli animali consumano il saccarosio somministrato in modo non contingente dall'operatore. Abbiamo ipotizzato che quando l'animale si autosomministra il cibo il suo stato di eccitazione (arousal) sia maggiore. Esso infatti si trova in uno stato di aspettativa, in quella fase del comportamento motivato che viene definita anticipatoria nella quale tutti i sensi sono allertati. In questa condizione appare plausibile che il sistema DAergico nella shell del NAc risponda con un aumento di DA maggiore rispetto a quanto accade nella fase di somministrazione passiva di cibo, nella quale l'animale non ha uno stato di allerta così pronunciato. Il mancato aumento della DA nel core durante la fase di auto somministrazione sarebbe in accordo coi risultati ottenuti da Schultz (*2007 a e b*), il quale afferma che un cibo appetibile è in grado di stimolare la trasmissione DAergica solo quando è inaspettato. In realtà nei suoi studi

Schultz non analizza la liberazione di DA nel core del NAc, ma, attraverso tecniche di elettrofisiologia, monitora l'attività dei neuroni DAergici nella SN pars compacta. Questa struttura come ben noto invia delle terminazioni al caudato putamen che fa parte del sistema extrapiramidale. Se si pensa che il core rappresenta la porzione più extrapiramidale del NAc il suo dato troverebbe conferma nei nostri studi. Inoltre, sempre in accordo con la teoria di Schultz, durante il consumo non contingente del saccarosio, quando quindi lo stimolo è inaspettato, si registra un aumento delle DA nel core.

Il nostro studio conferma il ruolo chiave giocato dalla trasmissione Dergica nella shell del NAc nella risposta al cibo e la sua importanza anche nell'apprendimento di tipo strumentale.

BIBLIOGRAFIA

- Acquas E., Di Chiara G. (1992) *Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence*. J Neurochem.; 58(5): 1620-5.
- Alheid, G. F., Heimer, L. (1988). *New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata*. Neuroscience 27, 1-39.
- Aragona, B. J., Cleaveland, N. A., Stuber, G. D., Day, J. J., Carelli, R. M., and Wightman, R. M. (2008) *Preferential enhancement of dopamine transmission within the nucleus accumbens shell by cocaine is due to a direct increase in phasic dopamine release events*. Neurosci. 28(35): 8821-8831.
- Avena, N.M., Long, K., Hoebel, B.G. (2005). *Sugar-dependent rats show enhanced responding for sugar after abstinence: evidence of a sugar deprivation effect*. Physiol Behav 84(3): 359-362.
- Avena, N.M., Rada, P., Moise, N., Hoebel, B.G., (2006). *Sucrose sham feeding on a binge schedule releases accumbens dopamine repeatedly and eliminates the acetylcholine satiety response*. Neuroscience 139, 813-820.
- Avena, N.M., Rada, P., Bartley G., Hoebel. (2007). *Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews.
- Bassareo, V., Di Chiara, G. (1997) *Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal*

and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. Journal of Neuroscience 17, 851-861.

- Bassareo, V. & Di Chiara, G. (1999 a) *Differential responsiveness of DA transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments.* Neuroscience 89, 637-641 (a).
- Bassareo, V. & Di Chiara, G. (1999 b) *Modulation of feeling-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state.* European Journal of Neuroscience 11, 4389-4397 (b).
- Bassareo, V. De Luca, M.A., Aresu, M., Aste, A., Ariu, T., Di Chiara, G. (2003) *Differential adaptive properties of accumbens shell dopamine responses to ethanol as a drug and as a motivational stimulus.* European Journal of Neuroscience, 17, 1465-1472.
- Bassareo, V., De Luca, M.A. e Di Chiara, G. (2007) *Differential impact of pavlovian drug conditioned stimuli on in vivo dopamine transmission in the rat accumbens shell and core and in the prefrontal cortex.* Psychopharmacology (Berl), 191(3): 689-703.
- Bassareo, V., Musio, P., Di Chiara, G. (2010) *Reciprocal responsiveness of nucleus accumbens shell and core dopamine to food- and drug conditioned stimuli.* Psychopharmacology (Berl), In press.
- Berridge, K.C. (1996) *Food reward: brain substrates of wanting and liking.* Neurosci Biobehav Rev 20:1-25.

- Berridge, K.C., Robinson, T.E.(1998) *What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience* Brain Research Reviews 28, 309–369.
- Berridge, K.C., (2000) *Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns*. Neurosci. Biobehav., Rev 24. 173-198.
- Bindra, D. (1968) *Neuropsychological interpretation of the effects of drive and incentive-motivation on general activity and instrumental behavior*. Psychol Rev 75:1–22.
- Bolles R.C. (1975) Theory of motivation. Harper and Row, New York,.
- Cadoni, C., Solinas, M., Pisanu, A., Zernig, G., Acquas. E., Di Chiara, G. (2005) *Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core*. Brain Res.;1055(1-2):143.
- Cadoni, C., Di Chiara, G., (2007) *Differences in dopamine responsiveness to drugs of abuse in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats*. J Neurochem.;103(2):487-99.
- Carelli RM, Ljames SG and Crumling AJ (2000) *Evidence that separated neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus "natural" (water and food) reward*. J Neurosci. 20 (11): 4255-4266.
- Carlsson A, Lindqvist M, Madnusson T (1957) «3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as reserpine antagonists». Nature 180 (4596): 1200. PMID 13483658.

- Cheer, J.F., Wassum, K.M., Sombers, L.A., Heien, M.L., Ariansen, J.L., Aragona B.J., Phillips, P.E., Wightman, R.M. (2007) *Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation*. J Neurosci. 27(4):791-5.
- Clarke, S.N., Parker, L.A. (1995) *Morphine-induced modification of quinine palatability: effects of multiple morphine-quinine trials*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 51: 505-508.
- Clementi, F., Fumagalli, G. (1997) *Farmacologia generale e molecolare: il meccanismo d'azione dei farmaci*. UTET seconda edizione.
- Dani, J.A., Heinemann S. (1996) *Molecular and cellular aspects of nicotine abuse*. Neuron.;16(5):905-8. Review. No abstract available.
- Danielli, B., Scheggi, S., Grappi, S., Marchese, G., De Montis, M.G., Tagliamonte, A., Gambarana, C. (2009) *Modifications in DARPP-32 phosphorylation pattern after repeated palatable food consumption undergo rapid habituation in the nucleus accumbens shell of non-food-deprived rats*. J Neurochem. 112(2):531-41.
- Di Chiara G. (1995) *The role of dopamine in drug abuse viewed from the prospective of its role in motivation*. Drug and Alcohol Dependence. 38: 95-137.
- Di Chiara, G. (1998) *A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use*. J Psychopharmacol 12(1): 54-67.
- Di Chiara, G., (1999) *Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder*. Eur J Pharmacol. 30; 375 (1-3): 13-30.

- Di Chiara, G., (2002) *Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction*. Behav Brain Res 2; 137(1-2): 75-114.
- Di Chiara, G. (2005) *Dopamine in disturbance of food and drug motivated behavior: A case of Homology?* Physiology & behavior 86; (9-10).
- Di Chiara, G., Imperato, A. (1988) *Opposite effects of the K-opiate agonists on dopaminergic-release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats*. J. Pharmacol. Exp. Res. 244, 1067-1080.
- Di Chiara, G., Acquas, E., Tanda, G., Cadoni, C. (1993) *Drugs of abuse: biochemical surrogates of specific aspects of natural reward?* Biochem Soc Symp.59:65-81.
- Di Chiara, G. Bassareo, V. (2007) *Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do*. Curr Opin Pharmacol.;7(1):69-76.
- Duvauchelle, C.L., Ikegami, A., Castaneda, E. (2000) *Conditioned increases in behavioural activity and accumbens dopamine levels produced by intravenous cocaine*. Behav.Neurosci 114 (6): 1156-1166.
- Fisher, N.D., Hughes, M., Gerhard-Herman, M. Hollenberg, N.K. (2003) *Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans*. J Hypertens.;21(12):2281-6.
- Fitzgerald LW, Nestler EJ. (1995) *Molecular and cellular adaptations in signal transduction pathways following ethanol exposure*. Clin Neurosci.3(3):165-73.

- Flammer AJ, Hermann F, Sudano I, Spieker L, Hermann M, Cooper KA, Serafini M, Lüscher TF, Ruschitzka F, Noll G, Corti R. (2007). *Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity.* Circulation;116(21):2360-2.
- Gambarana, C, Masi, F, Leggio, B, Grappi, S, Nanni, G, Scheggi, S, De Montis, MG, Tagliamone, A (2003) *Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas.* Neurosci 121 (1): 179-87.
- Grassi, D., Necozione, S., Lippi, C., Croce, G., Valeri, L., Pasqualetti, P., Desideri, G., Blumberg, J.B., Ferri, C. (2005). *Cocoa Reduces Blood Pressure and Insulin Resistance and Improves Endothelium-Dependent Vasodilation in Hypertensives.* Hypertension.
- Grill, H.J. e Norgren, R. (1978) *The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats.* Brain Res. 143: 263-279.
- Groenewegen, H.J. e Russchen, F.T. (1984). *Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic structures: a tracing and immunohistochemical study in the cat.* J. Comp. Neurol. 223, 347-367.
- Hajnal, A., Norgren, R., (2002). *Repeated access to sucrose augments dopamine turnover in the nucleus accumbens.* Neuroreport 13, 2213–2216.
- Heimer, L., Zaham, D. S., Churcill, L., Kalivas, P. W., e Wohltmann C. (1991). *Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat.* Neuroscience 41, 89-125.

- Heimer, L., Alheid, G.F., de Olmos, J.S., Groenewegwn, H.J., Haber, S.N., Harlan, R.E., Zahm, D.S. (1997) *The accumbens: beyond the core-shell dichotomy*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 9(3): 354-381.
- Hernandez, L., & Hoebel, B. G. (1988). *Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis*. Life Sci 42, 1705–1712.
- Hermann, F., Spieker, L.E., Ruschitzka, F., Sudano, I., Hermann, M., Binggeli, C., Lüscher, T.F., Riesen, W., Noll, G., Corti R. (2006) *Dark chocolate improves endothelial and platelet function*. Heart.; 92(1): 119–120.
- Jimerson, D.C., Wolfe, B.E., Brotman, A.W., Metzger, E.D. (1983) *Medications in the treatment of eating disorders*. Psychiatric Clinic of North America; 19 (4): 739.
- Jongen-Rêlo, A.L., Voorn, P., Groenewegen, H.J. (1994) *Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat*. Eur J Neurosci. 6(8): 1255-64.
- Koob, G.F. (1992) *Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways*. Trends Pharmacol Sci. 1992 May; 13(5): 177-84. Review.
- Koob, G.F., Le Moal, M. (1997) *Drug Abuse: hedonic homeostatic dysregulation*. Science, 278, 52- 58.
- Kupfermann, I. (1985) *Learning and Memory*. In: Principles of neural science (Kandel ER, ed), pp 997–1008. Amsterdam: Elsevier.

- Ito R, Dalley JV, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ (2000) *Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats.* J Neurosci 20: 7489-7495.
- Lecca, D., Cacciapaglia, F., Valentini, V., Di Chiara, G. (2006 a) *Monitoring extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens shell and core during acquisition and maintenance of intravenous WIN 55,212-2 self administration.* Psychopharmacology 188: 63-74.
- Lecca, D, Cacciapaglia, F, Valentini, V, Gronli, J, Spiga, S, Di Chiara, G.(2006 b) *Preferential increase of extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens shell as compared to that in the core during acquisition and maintenance of intravenous nicotine self-administration.* Psychopharmacology (Berl). 2006 Mar; 184(3-4): 435-46.
- Lecca, D., Valentini, V., Cacciapaglia, F, Acquas, E, Di Chiara, G., (2007) *Reciprocal effects of response contingent and noncontingent intravenous heroin on in vivo nucleus accumbens shell versus core dopamine in the rat: a repeated sampling microdialysis study.* Psychopharmacology (Berl).; 194(1): 103-16.
- Leonini, L., (1982) *Consumi:desideri, simboli, sostegni: Rassegna Italiana di Sociologia, n 2, pp. 251-269.*
- Liang, N.C., Hajnal, A., Norgren, R. (2006) *Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.;291(5):R1236-9. Epub.
- Maccioni, P., Pes, D., Carai, M.A., Gessa, G.L., Colombo, G. (2008) *Suppression by the cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant, of*

the reinforcing and motivational properties of a chocolate-flavoured beverage in rats. Behav Pharmacol; 19(3): 197-209.

- Parsons, L.H., Koob, G.F., Weiss, F.(1995) *Serotonin dysfunction in the nucleus accumbens of rats during withdrawal after unlimited access to intravenous cocaine.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 274, 1182-1191.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed. Academic, New York.
- Pfaus, J.G., Damsma, G., Nomikos, G.G., Wenkstern, D.G., Blaha, C.D., Phillips, A.G., Fibiger, H.C. (1990) *Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat.* Brain Res. Oct 22; 530(2): 345-8.
- Phillips, A.G., Pfaus, J.G., Blaha, C.D. (1991) *Dopamine and motivated behaviour: insights provided by in vivo analysis.* In: *The mesolimbic dopamine system: from motivation to action.* (Willner P, Scheel-Kruger J, eds), pp 199-224. Chichester, UK: Wiley.
- Phillips, A.G., Ahn, S., Howland, J.G. (2003). *Amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior.* Neurosci Biobehav Rev. Oct;27(6):543-54. Review.
- Pontieri, F.E., Tanda, G. e Di Chiara, G. (1995) *Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens.* Proc Natl Acad Sci USA 92, 12304-12308.
- Pontieri F.E., Tanda G., Orzi F., Di Chiara G. (1996) *Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs.* Nature, 382, 255-257.

- Rada, P., Avena, N.M., Hoebel, B.G., (2005). *Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell*. Neuroscience 134, 737-744.
- Rada, P., Colasante, C., Skirzewski, M., Hernandez, L., Hoebel, B., (2006). *Behavioral depression in the swim test causes a biphasic, long-lasting change in accumbens acetylcholine release, with partial compensation by acetylcholinesterase and muscarinic-1 receptors*. Neuroscience 141, 67-76.
- Radhakishun, F.S., Van Ree, J.M., Westerink, H.B.C. (1988) *Scheduled eating increases dopamine release in the nucleus accumbens of food-deprived rats as assessed with on-line brain microdialysis*. Neurosci Lett 85:351–356.
- Roberts, A.J., Cole, M., Koob, G.F. (1996). *Intra-amygdala muscimol decreases operant ethanol self-administration in dependent rats*. Alcohol Clin. Exp. Res. 20, 1289-1298.
- Roitman MF, Stuber GD, Phillips PEM, Wightman RM and Carelli RM (2004) *Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking*. J Neurosci. 24 (6): 1265-1271.
- Sahr, AE, Sindelar, DK, Alexander-Chacko, JT, Eastwood, BJ, Mitch, CH, Statnick, MA. (2008) *Activation of mesolimbic dopamine neurons during novel and daily limited access to palatable food is blocked by the opioid antagonist LY255582*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.; 295(2): R463-71.
- Schramm-Sapyta, N.L., Olsen, C.M., Winder, D.G. (2006). *Cocaine self-administration reduces excitatory responses in the mouse nucleus accumbens shell*. Neuropsychopharmacology.;31(7):1444-51.

- Schultz, W. (2007a) *Multiple dopamine functions at different time courses*. *Annu Rev Neurosci.*;30:259-88.
- Schultz, W. (2007b) *Behavioral dopamine signals*. *Trends Neurosci.*;30(5):203-10.
- Stinus, L., Le Moal, M., Koob, G.F. (1990) *Nucleus accumbens and amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal*. *Neuroscience.*;37(3):767-73.
- Stolerman, I.P. (1992). *Drugs of abuse: behavioural principles, methods and terms*. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 170-176.
- Tanda G., Pontieri F.E., Frau R., Di Chiara G. (1997) *Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common μ_1 opioid receptor mechanism*. *Science*, 276, 2048-2050123:127-130.
- Voorn, P., Gerfen, C. R., Groenewegen, H.J. (1989). *Compartmental organization of the ventral striatum of the rat: immunohistochemical distribution of enkephalin, substance P, dopamine, and calcium-binding protein*. *J Comp Neurol.* 289(2):189-201.
- Weiss F., Paulus M.P., Lorang M.T., Koob G.F. (1992) *Increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens by cocaine are inversely related to basal levels: effects of acute and repeated administration*. *J Neurosci* 12(11): 4372–4380.
- Wilson C, Nomikos G.C., Collu M., Fibiger H.C. (1995) *Dopaminergic correlates of motivated behavior: importance of drive* *J. Neurosc.* 15: 5169-5178.

- Wise, R. A., Leone, P., Rivest, R., Leeb, K. (1995a) *Elevations of nucleus accumbens dopamine and DOPAC levels during intravenous heroin self-administration*. *Synapse*. 1995 Oct; 21(2): 140-8.
- Wise, R.A., Newton, P., Leeb, K., Burnette, B., Pocock, D., Justice, J.B., Jr. (1995b) *Fluctuations in nucleus accumbens dopamine concentration during intravenous cocaine self-administration in rats*. *Psychopharmacology (Berl)*.; 120(1): 10-20.
- Wise, R. A. (2006) The parsing of food reward *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: 1234-1235.
- Zaham D S e Brog J S (1992). On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* 50, 751-767.