

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI
FACOLTÀ DI FARMACIA
Dipartimento di Tossicologia

Dottorato di ricerca in Farmacologia delle Tossicodipendenze



Stimolazione da etanolo del sistema dopaminergico mesolimbico: ruolo dell'acetaldeide.

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. GAETANO DI CHIARA

Relatori:

Chiar.mo Prof. MARCO DIANA

Egr. Dr. PAOLO ENRICO

Tesi di Dottorato di:

Dr.ssa DONATELLA SIRCA

INDICE

ABSTRACT	» 4
1. INTRODUZIONE	» 6
1.1. Generalità sull'etanolo.....	» 6
1.2. Metabolismo dell'etanolo.....	» 7
1.2.1. Genetica del metabolismo dell'etanolo.....	» 11
1.3 Cenni sul meccanismo d'azione dell'etanolo.....	» 12
1.4 Proprietà farmacologiche.....	» 14
1.4.1. Effetti sul sistema nervoso centrale.....	» 14
1.5. Effetti tossici.....	» 14
1.5.1 Intossicazione acuta da etanolo.....	» 14
1.5.2 Intossicazione cronica da etanolo.....	» 15
1.5.3 Meccanismi di rinforzo dell'etanolo.....	» 17
1.6. Anatomia del sistema mesolimbico.....	» 23
1.7. Trattamento farmacologico per l'alcolismo.....	» 25
1.8. Generalità sull'acetaldeide.....	» 27
1.9. Effetti comportamentali dell'acetaldeide.....	» 27
1.10. L'acetaldeide negli effetti comportamentali dell'etanolo.....	» 30
1.11. Basi neurochimiche degli effetti dell'acetaldeide.....	» 31
2. SCOPO DELLA RICERCA	» 34
3.MATERIALI e METODI	» 36
3.1. Animali.....	» 36
3.2. Sostanze e trattamenti.....	» 36
3.3. Disegno sperimentale.....	» 37
3.4. Microdialisi.....	» 38
3.5. Analisi HPLC del dializzato.....	» 42
3.6. Analisi statistica.....	» 43
4.RISULTATI	» 44
4.1. Concentrazioni basali nel dializzato.....	» 44
4.2. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del <i>nucleus accumbens</i> in seguito a somministrazione di etanolo.....	» 44
4.3. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del <i>nucleus accumbens</i> in seguito a somministrazione di etanolo in ratto pre-trattati con 4-MP...»	46

4.4. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del <i>nucleus accumbens</i> in seguito a somministrazione di acetaldeide.....	» 47
4.5. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del <i>nucleus accumbens</i> in seguito a somministrazione di acetaldeide nella VTA.....	» 48
4.6. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del <i>nucleus accumbens</i> in seguito a somministrazione di acetaldeide in ratti pre-trattati con d-penicillamina.....	» 50
4.7. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del <i>nucleus accumbens</i> in seguito a somministrazione di etanolo in ratti pre-trattati con d-penicillamina.....	» 51
4.8. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del <i>nucleus accumbens</i> in seguito a somministrazione di morfina, e morfina in ratti pre-trattati con d-penicillamina.....	» 52
5.DISCUSSIONE e CONCLUSIONI.....	» 53
6.BIBLIOGRAFIA.....	» 60

ABSTRACT

L'acetaldeide (ACD) è il primo metabolita dell'etanolo (EtOH), prodotto perifericamente principalmente ad opera dell'enzima alcol deidrogenasi (ADH) e a livello del sistema centrale ad opera della catalasi. L'acetaldeide ormai è considerata come una molecola biologicamente attiva ed è stato ipotizzato che potrebbe mediare gli effetti motivazionali dell'etanolo.

In questo studio, abbiamo voluto valutare nel ratto gli effetti della somministrazione intragastrica dell'ACD e dell'EtOH sui livelli di dopamina (DA) nella shell del *nucleus accumbens* (NAcbs), struttura del sistema mesolimbico strettamente implicata nei meccanismi neurobiologici alla base degli effetti di rinforzo dell'etanolo così come di altri farmaci d'abuso. A tale scopo abbiamo utilizzato la tecnica della microdialisi nel ratto *freely moving*.

La somministrazione intragastrica di ACD (10, 20, 40 mg/kg) ed EtOH (0.5, 1, 2 g/kg) aumenta in modo dose-dipendente le concentrazioni extracellulari di DA nel NAcbs. Analogamente, la somministrazione locale di ACD (50, 75, 100 μ M in soluzione di Ringer, perfusione ad 1.5 μ l/min per 15 min) tramite dialisi inversa nell'Area Ventrale del Tegmento (VTA) innalza i livelli di DA nel NAcbs. All'opposto, il release della DA non viene invece alterato in animali pre-trattati, con con 4-metilpirazolo (4-MP), un inibitore competitivo dell'ADH, suggerendo che il metabolismo dell'EtOH ad ACD è necessario per la stimolazione del sistema mesolimbico dopaminergico. Inoltre, abbiamo osservato che il pre-trattamento con d-penicillamina, un agente sequestrante selettivo dell'ACD previene il rilascio della DA nel NAcbs sia da parte dell'ACD sia dell'EtOH, tale dato non si osserva nell'animale trattato con morfina a riprova della selettività d'azione della d-penicillamina.

I nostri dati dimostrano che l'ACD è capace di stimolare di per se l'attività del sistema dopaminergico mesolimbico, supportando l'ipotesi di un ruolo chiave dell'ACD nell'espressione delle proprietà motivazionali dell'EtOH. Inoltre, dai dati relativi all'effetto della riduzione delle concentrazioni ematiche dell'ACD è possibile ipotizzare che la modulazione della biodisponibilità di questa sostanza, diminuendo

gli effetti di rinforzo associati all'abuso di alcol, potrebbe aprire la strada allo sviluppo di terapie innovative dell'alcolismo.

1. INTRODUZIONE

1.1. Generalità sull'etanolo

L'etanolo (più comunemente chiamato alcol etilico) è una molecola organica costituita da una corta catena alifatica con due atomi di carbonio e un gruppo ossidrilico. La contemporanea presenza delle componenti sia idrossilica sia etilica conferiscono alla molecola proprietà sia idrofile sia lipofile: l'etanolo è pertanto un anfotero, caratteristica importante per la sua attività biologica. Da un punto di vista farmacologico, l'etanolo è stato da tempo classificato tra i farmaci in grado di deprimere le funzioni del sistema nervoso centrale (SNC). Sfortunatamente, diversamente dal suo potenziale d'abuso il valore terapeutico dell'etanolo è estremamente limitato ed esso infatti è oggi la sostanza d'abuso più diffusa al mondo, anche perché il suo uso è generalmente legale. L'etanolo produce nell'uomo un numero di effetti comportamentali che sono dipendenti dalla dose di etanolo somministrato. A basse dosi, le proprietà farmacologiche dell'etanolo includono effetti gastrointestinali, cardiovascolari e sul SNC. A dosi più alte effetti euforici, ansiolitici e stimolanti, che contribuiscono al suo ampio uso. A dosi tossiche, l'etanolo offusca la memoria ed il giudizio, riduce i tempi di reazione, e disinibisce comportamenti impulsivi e aggressivi. Pertanto non è sorprendente che tanti dei danni conseguenti all'abuso riflettano l'impatto dell'intossicazione da etanolo su comportamenti come ad esempio la guida.

L'uso cronico di etanolo provoca una condizione patologica chiamata alcolismo. In Italia si contano circa 50.000 nuovi alcolisti l'anno e 40.000 decessi l'anno alcol-correlati. Negli USA abuso di etanolo e alcolismo interessano circa 14 milioni di soggetti, con prevalenza maggiore negli uomini rispetto alle donne. Per quanto attiene l'uso d'alcol tra gli adolescenti ed i giovani, l'O.M.S. rileva l'abbassarsi dell'età dei primi abusi alcolici al di sotto dei 12-13 anni d'età ed una percentuale di bevitori all'età di circa diciotto anni quasi sovrapponibile a quella dell'età adulta.

In seguito a somministrazione cronica, l'etanolo produce adattamento e neurotossicità, tolleranza e dipendenza. La sindrome da astinenza (Trevisan et al.,

1998) include ansietà, insonnia, e sintomi del sistema nervoso centrale. Questi sintomi possono emergere insieme nel contesto del “*delirium tremens*” che in genere si sviluppa nelle prime settimane di sobrietà.

1.2. Metabolismo dell’etanolo

Dopo somministrazione orale l’etanolo è rapidamente assorbito per diffusione passiva per circa il 20% dallo stomaco e per l’80% dall’intestino tenue e poi distribuito nei liquidi corporei. Il tempo tra l’ultima assunzione e il picco di concentrazione ematico di solito varia tra i 30 minuti e i 90 minuti. Molti fattori modificano l’assorbimento dell’etanolo da parte dello stomaco. In generale è rapido, nel caso lo svuotamento dello stomaco sia ritardato, come per la presenza di cibo, il successivo assorbimento dell’etanolo dall’intestino sarà ritardato. La concentrazione di etanolo nel sangue dipende da vari fattori:

-concentrazione di etanolo nella bevanda ingerita

-quantità di etanolo assunta

-composizione del contenuto gastrico

-attività dell’alcol deidrogenasi gastrica (situato sulla mucosa gastrica, riduce la concentrazione di alcol che penetra nel circolo sistemico)

-velocità di assorbimento

-peso corporeo

-quantità di acqua e grasso corporeo del soggetto

La velocità di distribuzione dell’etanolo verso i tessuti è solo in parte correlata al grado di vascolarizzazione degli stessi e pertanto in organi con elevato flusso ematico, come il cervello, il fegato, i polmoni, e il rene, l’equilibrio si instaura più rapidamente.

In realtà, il 95% di alcol ingerito viene completamente metabolizzato durante il primo passaggio epatico. L’ossidazione si verifica principalmente a livello epatico (90-95%), ed in minor misura in stomaco, rene, polmoni e muscolo.

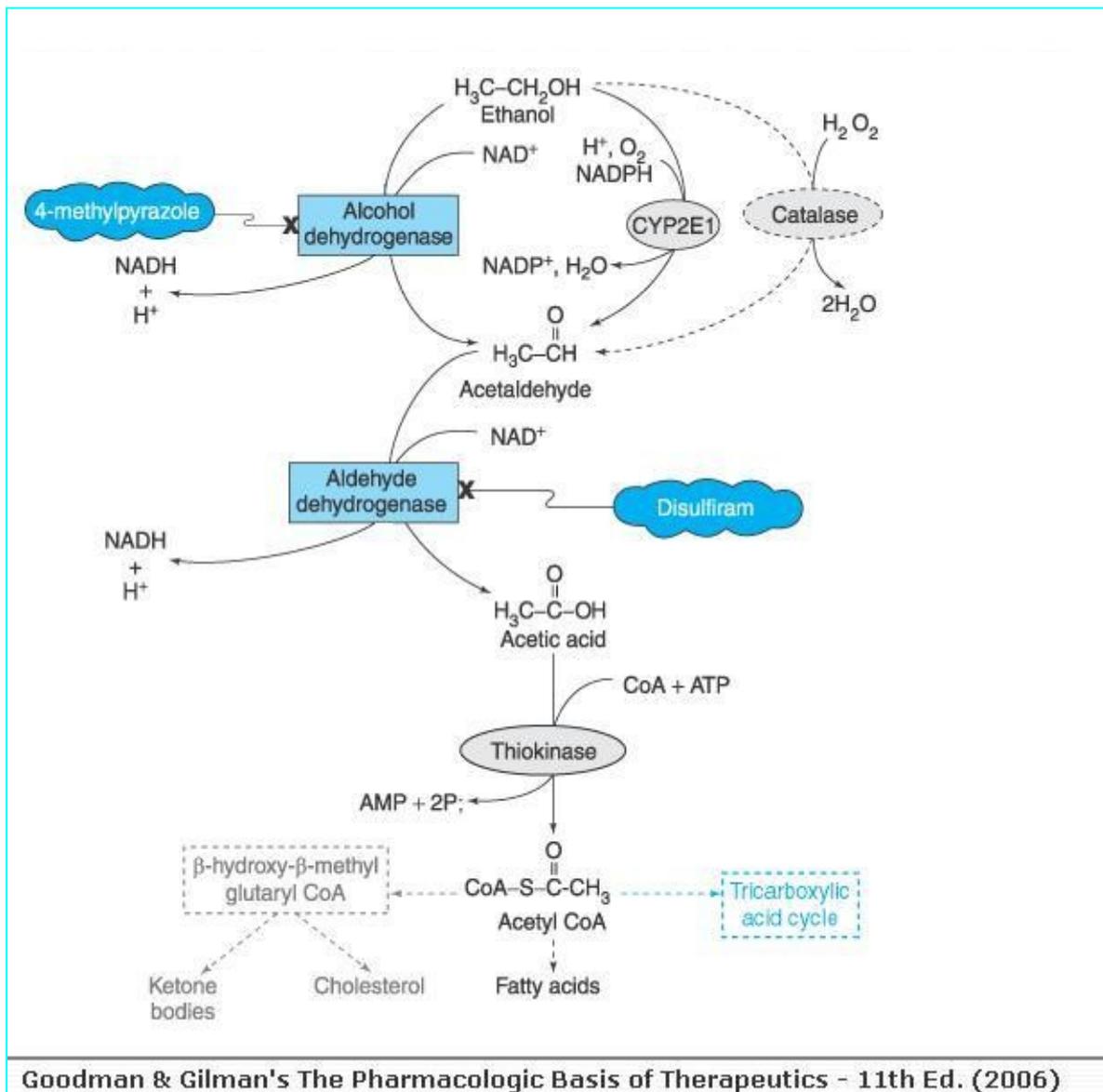


Figura 1. Metabolismo dell'etanolo

Per tutti il principale meccanismo metabolico è operato tramite enzimi deidrogenasici, più in particolare esso coinvolge l'azione sequenziale di due deidrogenasi:

- 1) alcol deidrogenasi (ADH)
- 2) aldeide deidrogenasi (ALDH)

Questo sistema, localizzato nel citosol degli epatociti, consente di metabolizzare oltre il 90% dell'alcol che arriva al fegato. La prima reazione trasforma l'alcol in acetaldeide con liberazione di idrogeno e consumo di Nicotinamide Adenin dinucleotide (NAD^+):

1.2.1.Genetica del metabolismo dell'etanolo

Il metabolismo dell'etanolo mostra un notevole grado di variabilità interindividuale ed interetnica, dovuta in parte alle varianti alleliche dei geni che codificano per l'ADH e per l'ALDH. Più in particolare l'enzima ADH è rappresentato da una proteina dimerica, le cui subunità sono codificate da una famiglia di geni localizzata sul cromosoma 4. Sono state identificate cinque classi di ADH suddivise in base alle due subunità che costituiscono l'enzima e a loro volta suddivise in sottoclassi in base agli alleli che le compongono. L'allele ADH1B è frequente in numerose razze, con la predominanza della isoforma β_1 nelle popolazioni Caucasiche ed Afro-Americane, β_2 in quelle Giapponesi e Cinesi e β_3 nel 25% delle popolazioni Afro-Americane. Entrambi i genotipi, ADH2 ed ADH3, sono coinvolti nell'aumentato rischio di sviluppare alcolismo, nelle popolazioni dove sono maggiormente rappresentati. Tali enzimi sono inoltre diversamente espressi nei vari tessuti, questo è molto importante per le conseguenze fisiologiche del metabolismo dell'alcol.

Per quanto riguarda l'enzima ALDH, esistono 9 diverse famiglie (ALDH 1-9) rappresentate a loro volta da diversi isoenzimi (Agarwal D.P., 2001) ma solo l'isoforma 1 e 2 sono coinvolte nel metabolismo dell'acetaldeide. L'ALDH1 localizzata nel citosol, è ubiquitariamente distribuita nei tessuti, compreso il cervello. Esibisce però una bassa efficienza catalitica per l'ossidazione dell'ACD. L'ALDH2 mitocondriale, è invece espressa nell'apparato gastroenterico e presenta una elevata efficienza catalitica nei confronti dell'ossidazione dell'acetaldeide.

L'unica famiglia di geni coinvolta geneticamente nell'alcolismo sembra essere la ALDH2, che è presente nell'uomo con 4 diverse varianti alleliche (Ceccanti M. et al., 2004). La variante 2, caratterizzata da una bassa attività catalitica, è presente nel 50% delle popolazioni asiatiche. Questa variante allelica sembra avere un ruolo protettivo nei confronti dell'alcolismo (Agarwal D.P. et al., 1992). Infatti avendo una bassa attività catalitica, determinerebbe l'accumulo di acetaldeide con conseguente rapida comparsa di effetti quali vampate al volto simili a quelli del farmaco antabuse, inibitore dell'ADH. Quindi in seguito ad assunzione di alcol, questi soggetti vanno

incontro ad una spontanea sintomatologia tale da scoraggiare l'ulteriore assunzione di etanolo.

1.3.Cenni sul meccanismo d'azione dell'etanolo

Per parecchi anni si è pensato che l'etanolo ed altri alcoli alifatici esercitassero la loro azione deprimente sul sistema nervoso centrale attraverso la dissoluzione nelle membrane lipidiche, e quindi modificando la funzionalità di canali ionici, e di altre proteine presenti nella membrana. Studi più recenti hanno evidenziato l'interazione dell'etanolo con specifici recettori di membrana attraverso cui esso aumenta la trasmissione inibitoria e diminuisce quella eccitatoria nel sistema nervoso centrale.

In particolare l'attenzione si è focalizzata sugli effetti dell'etanolo sulla funzionalità dei canali ionici attivati da aminoacidi di tipo eccitatorio (glutammato) e inibitorio (acido gamma aminobutirrico o GABA).

Recettori glutamatergici come target d'azione dell'etanolo

L'etanolo a basse concentrazioni agisce sugli NMDA con alta affinità, inibendo il flusso ionico attraverso tali recettori (Grant K.A. et al. 1995). L'etanolo ha invece affinità più bassa per i recettori AMPA e kainato.

Più in particolare gli effetti dell'etanolo sui recettori NMDA sono dipendenti anche dalla concentrazione della glicina e dallo stato di fosforilazione del recettore stesso. Più linee di evidenza implicano una up-regulation dei recettori NMDA come meccanismo che contribuisce alla sindrome clinica causata dall'astinenza acuta da etanolo. Inoltre la somministrazione cronica di etanolo porta ad una aumentata espressione dei recettori NMDA particolarmente nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo (Gulya K. et al., 1991), il che potrebbe contribuire a spiegare l'ipereccitabilità osservabile durante i fenomeni di astinenza.

Recettori gabaergici come target d'azione dell'etanolo

L'azione dell'etanolo sul GABA_A (Ticku e Kulkarni, 1988) sembra essere in relazione alla differente espressione delle subunità del recettore. Sono state

identificate varie isoforme della subunità γ che differiscono nella sensibilità alla proteinchinasi C (PKC) ed all'etanolo (Harris RA et al. 1995).

Cambiamenti nei livelli delle subunità dei recettori GABA_A si osservano in animali trattati cronicamente con etanolo. Coerentemente la regolazione gabaergica differisce in alcolisti rispetto ai non alcolisti. I livelli di GABA_A sono ridotti nel plasma e nell'encefalo in alcolisti detossificatisi di recente. (Behar K, 1999). Alcuni studi hanno dimostrato che l'antagonista benzodiazepinico flumazenil, potrebbe ridurre negli umani l'intossicazione da etanolo, a dosi più alte di quelle richieste per antagonizzare gli effetti delle benzodiazepine (Lheureux P, 1991) ma col vantaggio di non produrre sintomi di astinenza in pazienti dipendenti (Potokar et al. 1997).

Canali al calcio-voltaggio-dipendenti come target d'azione dell'etanolo

Sono state osservate azioni dell'etanolo anche su altri recettori e canali ionici, che potrebbero essere rilevanti per i suoi effetti centrali. Queste comprendono in modo particolare l'inibizione dei canali al calcio voltaggio dipendenti (VSCCs). Si riconoscono almeno sei tipi di VSCCs : tipo-L, tipo-N, tipo-P, tipo-Q, tipo-R e tipo T. L'etanolo blocca i canali di tipo L (Treistman et al. 1991). Vari studi dimostrano che l'effetto è presente per concentrazioni da 10 a 200 mM, peraltro in relazione alla differenza di composizione delle subunità componenti i canali.

Recettori serotoninergici come target d'azione dell'etanolo

Il recettore 5-HT₃ descritto di recente è associato all'attivazione di un canale ionico selettivo per cationi, e l'effetto della 5-HT su questo recettore è potenziato da basse concentrazioni di etanolo. Il recettore 5-HT₃ è localizzato principalmente a livello di interneuroni inibitori; il potenziamento da parte dell'etanolo degli effetti della 5-HT su questi recettore-canale potenzia quindi gli stimoli inibitori attraverso questi interneuroni.

Recettori per l'adenosina come target d'azione dell'etanolo

Un meccanismo d'azione dell'etanolo descritto di recente coinvolge l'inibizione del trasporto di adenosina (Diamond et al., 1991). Questo effetto si manifesta con un

aumento nelle concentrazioni extracellulari di adenosina che, attraverso recettori di membrana accoppiati a proteine G, può contribuire in modo acuto alla depressione neuronale indotta dall'etanolo ed a effetti generalizzati di regolazione cellulare in seguito ad esposizione cronica all'etanolo.

1.4. Proprietà farmacologiche

1.4.1. Effetti sul Sistema nervoso centrale

Pur essendo generalmente considerato una sostanza stimolante, l'etanolo è un deprimente del sistema nervoso centrale. Già a dosi moderate l'etanolo è in grado di evocare un effetto ansiolitico, un innalzamento della soglia del dolore e del freddo, una depressione dei riflessi nocicettivi e una riduzione della coordinazione motoria. Sebbene recenti evidenze dimostrano che basse concentrazioni di etanolo possano aumentare la funzionalità di alcune sinapsi eccitatorie, questa stimolazione risulta principalmente dall'inibizione di meccanismi di controllo a livello cerebrale (in particolare corticali e sottocorticali). Gli effetti deprimenti dell'alcol sono infatti i reali responsabili anche dell'effetto euforizzante e della stimolazione comportamentale (espansività, vivacità, loquacità ed aumentata libido).

1.5. Effetti tossici

1.5.1. Intossicazione acuta da etanolo

I caratteristici segni e sintomi dell'intossicazione acuta sono ben conosciuti: aumento dei tempi di reazione, diminuzione del controllo fine motorio, impulsività, disturbi dell'attenzione e deficit di memoria. Con l'aumentare delle dosi compare sedazione profonda ed infine coma, associato a depressione respiratoria talvolta fatale. Il trattamento dell'intossicazione acuta dipende dal grado di gravità della depressione del SNC e respiratoria. Si può praticare la lavanda gastrica, ma occorre prestare attenzione a prevenire aspirazione polmonare del liquido di ritorno. Poiché l'etanolo è facilmente miscibile con l'acqua si presta ad essere rimosso per emodialisi. Nella pratica l'intossicazione acuta da alcol raramente è associata al coma, e la terapia non

è richiesta, ma è sufficiente aspettare che l'etanolo ingerito venga metabolizzato dai tessuti fornendo contemporaneamente una terapia di supporto.

1.5.2. Intossicazione cronica da etanolo o alcolismo

Il Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM IV, 1994) distingue tra abuso di alcol (o uso prolungato) e dipendenza da alcol (addiction o alcolismo); la dipendenza da alcol infatti è una dizione che viene impiegata quando ci sono segni classici della farmacodipendenza, in particolare lo sviluppo di tolleranza associata o meno a reazioni da astinenza clinicamente evidenti.

La tolleranza può essere definita come perdita di risposta dopo somministrazione ripetuta di uno stesso farmaco, infatti è richiesta una dose più alta per produrre lo stesso effetto ottenuto precedentemente alla dose più bassa. Si distinguono varie forme di tolleranza.

La *tolleranza innata* si riferisce ad una sensibilità determinata geneticamente ad un farmaco ed è osservabile fin dalla prima assunzione. La tolleranza innata all'alcol può rappresentare un tratto biologico che contribuisce allo sviluppo dell'alcolismo. E' dimostrato che, figli di alcolisti hanno una ridotta sensibilità all'alcol rispetto ad altri giovani della stessa età e con eguali abitudini al consumo d'alcol (Schuckit, 1992). La sensibilità iniziale all'alcol (tolleranza innata) all'alcol varia notevolmente tra individui ed è correlata alla storia familiare di alcolismo. L'abitudine all'alcol può produrre una significativa tolleranza (tolleranza acquisita) di modo che livelli ematici estremamente alti (da 300 a 400mg/dl) possono essere riscontrati in alcolisti che non appaiono comunque visibilmente sedati. In questi casi, la dose letale non aumenta proporzionalmente alla dose sedativa, di modo che il margine di sicurezza (indice terapeutico) è diminuito. Forti consumatori di alcol non solo acquisiscono tolleranza, ma sviluppano anche forte dipendenza fisica. La *tolleranza acquisita* al contrario, non si riferisce ad una sensibilità determinata geneticamente ad un farmaco. Essa può essere suddivisa in tre tipi: farmacocinetica, farmacodinamica e tolleranza appresa comprendente una forma di tolleranza comportamentale riferita come *tolleranza condizionata*.

La tolleranza farmacocinetica si riferisce a cambiamenti nella distribuzione o nel metabolismo del farmaco dopo somministrazione ripetuta. Il meccanismo più comune è un aumento della velocità di metabolismo del farmaco.

La tolleranza farmacodinamica si riferisce a cambiamenti adattativi che si verificano generalmente nell'ambito di sistemi modificati dal farmaco, tali che la risposta ad una data concentrazione del farmaco si riduce. La tolleranza appresa si riferisce ad una riduzione negli effetti di un farmaco dovuta a meccanismi di compensazione che vengono appresi. Un tipo di tolleranza appresa viene definita tolleranza comportamentale. Un esempio specifico è l'imparare a camminare in linea retta, nonostante l'incordinazione motoria prodotta dall'intossicazione da alcol.

Un caso a parte di tolleranza comportamentale è la *tolleranza condizionata*. Essa è un meccanismo di apprendimento che si sviluppa quando riferimenti o stimoli ambientali visivi, odori o situazioni sono correlati costantemente alla somministrazione del farmaco.

Inoltre, l'alcol produce tolleranza crociata ad altri sedativi quali le benzodiazepine. Questa tolleranza si verifica negli alcolisti durante l'astinenza, ma quando l'alcolista beve, gli effetti sedativi dell'alcol si sommano a quelli di altri farmaci deprimenti. Questo è particolarmente vero per le benzodiazepine, che sono particolarmente sicure in caso di sovradosaggio se somministrate da sole, ma potenzialmente letali se ingerite in combinazione con alcol.

Per *dipendenza fisica* si intende una condizione che si sviluppa conseguentemente all'adattamento prodotto da un riequilibrio di meccanismi omeostatici in risposta all'uso ripetuto di un farmaco. Un soggetto in questo stato di adattamento o di dipendenza fisica necessita della somministrazione continua del farmaco per mantenere la propria normale funzionalità. Questo porta spesso a bere al mattino per ripristinare i livelli alcolici ematici diminuiti durante la notte. La sindrome da astinenza da alcol o *delirium tremens*, in generale, dipende dalla entità della dose giornaliera e di solito viene risolta mediante assunzione di alcol. Essa si manifesta con sintomi quali: desiderio incoercibile di alcol, tremore, irritabilità, nausea, disturbi del sonno, tachicardia, ipertensione, sudorazione, distorsioni percettive, attacchi

convulsivi, grave agitazione, confusione, allucinazioni visive, febbre, sudorazione abbondante, diarrea e midriasi.

1.5.3. Meccanismi di rinforzo nell'alcolismo.

Poiché l'alcolismo è caratterizzato dalla assunzione compulsiva ed eccessiva di alcol, la sua associazione con il concetto di rinforzo risulta assolutamente cruciale. Viene definito come rinforzo un evento che aumenta la probabilità di una risposta (Johanson 1992) ed alcune delle azioni farmacologiche che primariamente l'alcol esercita sicuramente costituiscono stimoli di rinforzo sia positivo che negativo (Allgaier C. 1992). L'ingestione di alcol risulta infatti associata ad un piacere o comunque ad un evento positivo, ad esempio il miglioramento del tono dell'umore, il che aumenta la possibilità che esso venga ulteriormente desiderato. All'opposto (o paradossalmente) anche i rinforzi negativi correlati all'abuso di alcol possono condurre un individuo ad assumerne ulteriori quantità: ad esempio in individui o contesti nei quali l'alcol viene assunto allo scopo di placare uno stato di ansia o depressione o per evitare l'insorgenza di una sindrome astinenziale. Si può ritenere che le conseguenze delle suddette proprietà di rinforzo positivo e/o negativo siano alla base della reiterazione del comportamento di ricerca dell'alcol (e quindi dell'istaurarsi della condizione di alcolismo) nonché alla base delle recidive che avvengono anche dopo lunghi periodi di astensione (relapse).

Secondariamente, stimoli o eventi di per sé neutrali possono acquisire proprietà di rinforzo quando ripetutamente associati con gli effetti di rinforzo dell'alcol (rinforzo secondario; Babbini e Gaiardi, 1992): ad esempio, quando una persona entra in un bar, nel quale usualmente consuma alcolici, può sperimentare sensazioni positive analoghe a quelle indotte dal consumo di alcool. Anche gli effetti di rinforzo secondario possono essere positivi o negativi: un esempio di effetto di rinforzo negativo condizionato può essere l'associazione di un particolare stimolo con l'insorgenza della sindrome astinenziale da alcol.

E' bene tenere presente che gli effetti rinforzo negativo sia primario che secondario debbono essere distinti dagli effetti avversivi (Anders et al., 1999) quali nausea e

vomito, che l'etanolo produce quando assunto ad alte dosi. Tratteremo ora i sistemi di neurotrasmissione coinvolti.

Effetti dell'etanolo sul sistema dopaminergico.

Come oramai ampiamente dimostrato (Brodie et al, 1990; Gessa et al 1985) l'effetto di rinforzo positivo posseduto dall'etanolo così come da molti altri farmaci d'abuso (Di Chiara) è associato alla sua azione attivatoria sulla funzione dopaminergica a livello dell'area ventrale tegmentale (*ventral tegmental area* – VTA), cui consegue un aumento della concentrazione della dopamina (DA) nelle zone di proiezione, tra cui a livello del *nucleus accumbens* (NAcb). All'esposizione cronica all'alcol conseguono numerosi processi adattativi tra cui dei processi adattativi nella funzione mesolimbica dopaminergica, consistenti principalmente in una ipofunzione della medesima, condizione questa ritenuta fondamentale per il mantenimento della condizione di dipendenza: alla base del prolungamento dell'assunzione di alcol (nonché del ripristino del comportamento di ricerca di alcol dopo un periodo astinenziale) vi sarebbe pertanto un tentativo di compensare la diminuita azione di "efficacia" dell'alcol sui livelli di dopamina. Inoltre l'interruzione brusca di una assunzione cronica conduce ad un ulteriore decremento dell'attività dopaminergica neuronale a livello della VTA (Diana et al. vedi anno), nonché dei livelli extracellulari di DA a livello del NAcb: ciò suggerisce che l'ipofunzione dopaminergica a livello mesolimbico sia di cruciale importanza per il mantenimento del comportamento di dipendenza. In altre parole, l'assunzione cronicamente protratta di alcol risulta "necessaria" al fine di compensare la diminuzione del rilascio di DA e costituirebbe inoltre la base farmacologica motivazionale che conduce alla ricerca di alcol dopo un periodo astinenziale. Recenti studi forniscono risposte sui meccanismi sottesi all'alterazione dei livelli dopaminergici, evidenziata sia durante l'assunzione prolungata che a seguito della brusca interruzione dell'assunzione stessa. Un contributo neurofarmacologico importante deriva dalla soppressione della liberazione di DA derivante da una iperattività dei canali del Ca^{++} L-type etanolo-indotta: tale soppressione è stata evidenziata in ratti resi dipendenti all'alcol in astinenza da 10 ore

nei quali l'inibizione dei suddetti canali blocca selettivamente alcuni dei segni (convulsioni, tremori, catatonìa) caratteristici della astinenza stessa (Rossetti et al, 1999). Altre alterazioni del metabolismo della DA a livello mesostriatale, che partecipano al mantenimento della condizione di dipendenza, sono un decremento della sintesi nonché un aumento della clearance della DA a livello delle sinapsi (conseguenza dell'aumento dei livelli del trasportatore della DA), alterazioni ambedue evidenziate in ratti che assumono cronicamente etanolo (Rothblat et al 2001). Il ridotto firing dei neuroni DA che si osserva in animali con storia di alcol-dipendenza (Diana et al., 1993) perdura molto al di là della sindrome astinenziale acuta: un recente studio evidenzia che la concentrazione di DA a livello del VTA permane ridotta (Bailey et al. 2000) anche a due mesi dall'interruzione. La persistenza di tale alterazione renderebbe ragione della vulnerabilità alle recidive (*relapse*), sia del protrarsi degli effetti avversi caratteristici della sindrome astinenziale. Studi clinici (Heinz et al., 1995) hanno evidenziato che una bassa percentuale di recupero della funzionalità recettoriale della DA rappresenta un fattore predittivo di recidiva all'assunzione di alcol confermando ulteriormente la rilevanza comportamentale di una persistente disregolazione del sistema dopaminergico nel determinismo dell'abuso di alcol. Da quanto sopra esposto risulta evidente il ruolo centrale del sistema dopaminergico negli effetti di rinforzo positivo esibiti dall'etanolo, ma nonostante ciò l'uso clinico di farmaci dopaminergici risulta comunque inutile. Sono comunque numerose le osservazioni che indicano il coinvolgimento di altri sistemi neurotrasmettitoriali, quali quelli oppiaceo e serotoninergico nel meccanismo di rinforzo positivo correlato all'ingestione di etanolo.

Effetti dell'etanolo sul sistema oppioidergico.

Il coinvolgimento del sistema oppioide endogeno è implicato nei meccanismi neurobiologici alla base sia dell'induzione che del mantenimento del comportamento di assunzione di alcol. Ad esempio, sperimentalmente, la distruzione di neuroni dopaminergici a livello mesolimbico, non ha mostrato influire significativamente

(Ikemoto et al., 1997) sul consumo di alcol in ratti che avevano avuto un precedente contatto con l'alcol stesso, mentre ha inibito significativamente l'acquisizione del comportamento di ingestione, suggerendo pertanto che siano differenti i meccanismi implicati nei comportamenti rispettivamente di mantenimento e di acquisizione del consumo di alcol (Fahlke et al., 1994). L'esistenza di un meccanismo addizionale di tipo oppiaceo che intervenga nel mediare il consumo di alcol è supportata da numerose osservazioni sperimentali (Herz, 1997): la somministrazione dell'antagonista non selettivo degli oppiacei naltrexone inibisce negli animali da laboratorio il comportamento operante volto all'acquisizione dell'alcol (Stromberg et al., 1998). Risultati simili sono stati osservati con la somministrazione di antagonisti selettivi dei recettori oppiacei μ e δ (Ciccocioppo et al., 2002). La soppressione dell'autosomministrazione di etanolo in ratti trattati con naloxone è accompagnata da una diminuzione del rilascio etanolo-indotto della DA a livello del NAC (Gonzales et Weis, 1998) dimostrando pertanto come il meccanismo addizionale che media l'assunzione di alcol sia comunque parzialmente riconducibile al sistema dopaminergico mesolimbico (Arnone et al., 1997). L'ipotesi di Davis e Walsh (Davis et Walsh, 1970) che la formazione a livello encefalico di alcaloidi morfino-simili derivanti dal metabolismo dell'etanolo (potesse significativamente contribuire al consumo di alcol, è rimasta controversa (Ulm et al., 1995; Hyytia et al., 2001) dato che la quantità di tetra-idro-chinolina rilevata a livello centrale è estremamente bassa. Anche l'influenza del genotipo nella risposta del sistema oppioide endogeno all'alcol (Fadda et al., 1999) è attualmente oggetto di dibattito in letteratura. In una situazione di sindrome astinenziale acuta indotta in ratti alcohol- preferring (ovvero ratti selezionati geneticamente in base alla loro propensione a bere soluzioni alcoliche) è stato osservato un aumento dell'affinità degli agonisti dei recettori μ sia a livello del NAC che del VTA (Chen et Lawrence, 2000) suggerendo l'esistenza di un meccanismo di adattamento recettoriale durante le fasi precoci dell'astinenza stessa. Più recentemente è stato osservato un aumento della densità dei recettori μ (Djouma E. et Lawrence A.J., 2002). Questi dati suggeriscono che anche il sistema oppioide, oltre al sistema dopaminergico è suscettibile di modulazione a seguito

dell'assunzione cronica di etanolo, nonché a seguito dell'insorgenza di sindrome astinenziale. A differenza degli effetti sui recettori dopaminergici, che come sopra detto divengono evidenti da 5 a 10 giorni dopo l'astinenza da alcol, l'effetto modulatorio sul sistema oppiaceo si evidenzia già nelle fasi precoci dell'astinenza.

Effetti dell'etanolo sul sistema serotoninergico.

Il ruolo del sistema serotoninergico nell'induzione e nel mantenimento del comportamento di assunzione di alcol è oggetto di studio da circa 20 anni, ovvero da quando studi preliminari indicarono che lesioni o alterazioni farmacologiche tali da indurre una deplezione dei livelli centrali di 5-HT risultavano associati, nell'animale da laboratorio, ad una diminuzione del comportamento operante volto alla assunzione di etanolo (Myers R.D. et al. 1968). In particolare l'osservazione che all'attivazione delle fibre serotoninergiche che si proiettano dal nucleo dorsale del rafe al NAC consegue l'innalzamento dei livelli extracellulari di dopamina (Yoshimoto et, McBride 1992) suggerì un ruolo della serotonina nell'attivazione del sistema dopaminergico mesolimbico. Più specificamente la perfusione locale del NAC con agonisti dei recettori 5-HT₂ (Bowers et al. 2000) e 5-HT₃ (Campbell AD et McBride 1995), incrementa i livelli di DA nel NAC stesso, suggerendo che in particolare questi due sottotipi recettoriale sono implicati nella regolazione della liberazione di DA a livello del NAC. Numerosi sono i dati sperimentali che hanno indicato come la somministrazione di antagonisti dei recettori 5-HT₃ diminuisca il consumo di alcol in numerose specie nonché modelli animali (Fadda et al., 1991). L'efficacia di tale azione sembra derivare dalle condizioni del "drinking" (ovvero del bere) gli antagonisti dei recettori 5-HT₃ risultano efficaci nel ridurre l'acquisizione ed il mantenimento del comportamento di assunzione dell'alcol in condizioni di libero accesso alla sostanza nelle 24 ore, mentre risultano relativamente inefficaci nella prevenzione del *relapse* dopo 2 settimane di interruzione dell'assunzione (Rodd-Henricks et al., 2000). Questi dati suggeriscono che nel periodo di astensione dall'alcol possono insorgere dei cambiamenti a carico dei recettori stessi cui può conseguire una alterazione della risposta agli antagonisti 5-HT₃. (Thiele et al., 2003).

L'osservazione iniziale della inibizione dell'assunzione di alcol in animali trattati con antagonisti dei recettori 5-HT₃ ha posto le basi farmacodinamiche per un più ampio studio degli effetti di un antagonista 5-HT₃ come l'ondansetron nel trattamento dell'alcolismo. Uno studio più recente (Johnson et al., 2002) nell'alcolismo ad insorgenza precoce (caratterizzato da alterazioni del sistema serotoninergico di grado più elevato rispetto all'alcolismo ad insorgenza tardiva) la tipologia maggiormente suscettibile alla terapia con ondansetron.

1.6. Anatomia del sistema mesolimbico

La trasmissione dopaminergica i cui neuroni originano nel mesencefalo è quella maggiormente coinvolta nella fisiopatologia delle sostanze d'abuso, nelle ipotesi dei deficit sensomotori, nei disturbi affettivi. I neuroni dopaminergici del mesencefalo sono suddivisi in tre gruppi, denominati A8, A9, A10, che si estendono dalla pars lateralis (A8), in direzione rostromediale verso la *pars compacta* (A9) della *substantia nigra* sino alla VTA (A10) nella parte anteriore della formazione reticolare. Le afferenze di questi gruppi cellulari sono suddivise in:

1. via dopaminergica mesolimbica
2. via dopaminergica mesocorticale
3. via dopaminergica nigro-striatale

La *via mesolimbica*, proietta dal mesencefalo (area A10) alle aree limbiche.

Il sistema limbico è costituito da alcune regioni telencefaliche e diencefaliche di sostanza grigia tra loro unite da importanti fasci di connessione. Le formazioni grigie sono: la corteccia del cingolo, il giro paraippocampale, l'ippocampo, l'amigdala, i nuclei mammillari dell'ipotalamo, i nuclei anteriori del talamo, corpo striato. I principali fasci di connessione tra queste formazioni sono: il fornice, il fascio mammillo-talamico e la stria terminale. Allo striato ventrale appartiene il *nucleus accumbens*.

La *via mesocorticale* proietta dall'area A9 e A10 del mesencefalo alla corteccia.

La *via nigrostriatale* invia fibre dalla *substantia nigra* ai gangli della base in particolare al corpo striato. In dettaglio, i neuroni contenenti dopamina possono essere suddivisi in tre tipi morfologicamente distinti tra loro:

- neuroni con assoni ultracorti (esempi nella retina)
- neuroni con assoni di lunghezza intermedia (ipotalamo mediobasale che proiettano all'eminenza mediana e all'ipofisi)
- neuroni dalle lunghe proiezioni (i cui corpi cellulari sono localizzati nella *pars compacta* della *substantia nigra* del mesencefalo e proiettano le loro terminazioni a livello del neostriato, in particolare il caudato ed il *putamen*).

Altri neuroni dalle lunghe proiezioni sono quelli che partono dall'area ventrale del tegmento (VTA) del mesencefalo e in minor misura dalla parte mediale della *substantia nigra*. Le loro fibre vanno ad innervare la corteccia limbica (media prefrontale, cingolata, entorinale) e altre strutture limbiche (setto del *nucleus accumbens*, nucleo laterale del setto, tubercolo olfattorio, complesso amigdaloido, corteccia piriforme). La VTA contiene oltre a tali neuroni dopaminergici, neuroni GABAergici che proiettano al *nucleus accumbens* ed alla corteccia.

Il *nucleus accumbens*, gioca un ruolo fondamentale nei circuiti neuronali coinvolti nella dipendenza da farmaci d'abuso. Esso contiene per il 95% una popolazione neuronale GABAergica costituita dai neuroni medi spinosi, le cui spine dendritiche contraggono sinapsi con i neuroni dopaminergici della VTA. I neuroni medi spinosi esprimono i recettori per la dopamina di tipo D1 e D2. I recettori D1 sono circoscritti ad una popolazione di neuroni che legano dinorfina e sostanza P e proiettano alla zona reticolata della *substantia nigra*, mentre i recettori di tipo D2 sono presenti in una sottopopolazione di neuroni medi che esprimono encefalina e proiettano principalmente al pallido (Wise, 2002). Tali proiezioni che, dal *nucleus accumbens* proiettano alle regioni motorie (nucleo pallido), sono responsabili dell'esecuzione motoria dei comportamenti di addiction (ovvero della dipendenza)

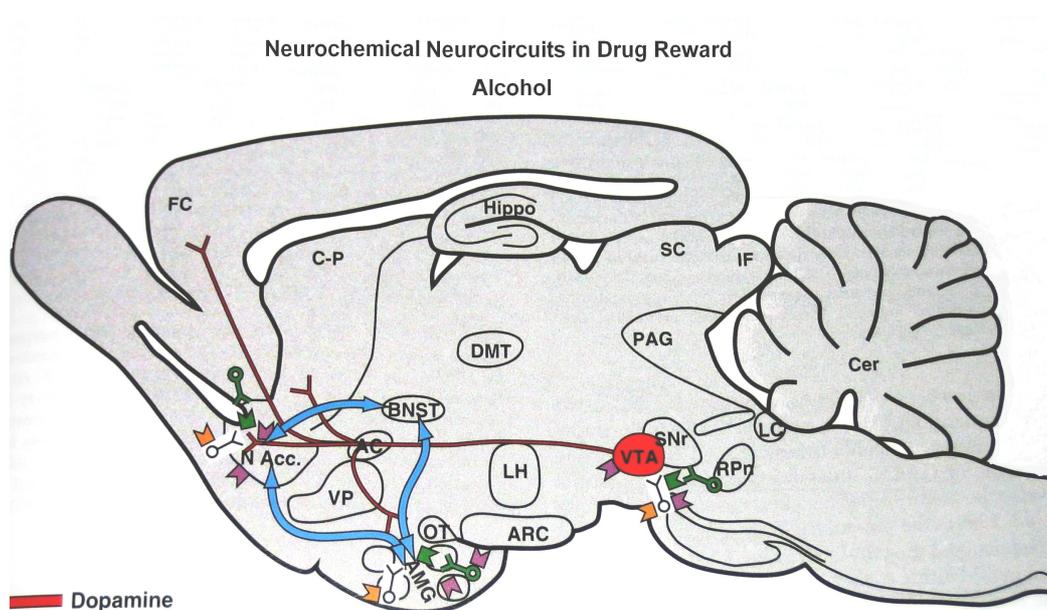


Figura 2. Circuiti neuronali coinvolti nei meccanismi di rinforzo dell'etanolo.

1.7.Trattamento farmacologico per l'alcolismo

Il trattamento dell'alcolismo, mira ad ottenere una piena riabilitazione psico-sociale del soggetto e prevede accanto all'eventuale intervento psicosociale, una farmacoterapia. In quest'ultimo caso si possono identificare varie fasi. Una fase di detossificazione, preceduta, se necessario, dal trattamento della sindrome astinenziale e seguita da terapie miranti alla prevenzione delle ricadute. Infatti, circa la metà degli alcolisti va incontro a recidiva, dopo una astensione più o meno lunga dall'assunzione di alcol (Maisto SA et al, 2000). I farmaci utilizzati nella terapia della dipendenza da alcol sono il disulfiram, il naltrexone, l'acamprosato. Farmaci ad azione sul sistema dopaminergico (tiapride, amisulpride e flupentixolo), e serotoninergico (buspirone, fluoxetina, nefazodone, ritanserina e ondansetron) sono stati e sono attualmente oggetto di studi clinici. Inoltre i farmaci stabilizzanti dell'umore (Salloum IM et al, 2005), nonché quelli ad azione sedativo-ipnotica (Kranzler HR et al, 1994), hanno dimostrato la loro efficacia in presenza di comorbidità psichiatrica.

Disulfiram

Il disulfiram inibisce in maniera irreversibile sia la forma citosolica sia mitocondriale dell'enzima aldeide deidrogenasi. Per cui questa molecola, inibendo l'aldeide deidrogenasi, causa accumulo di acetaldeide che si forma per ossidazione dell'etanolo ad opera della alcol-deidrogenasi. In presenza di disulfiram, l'assunzione di alcol è accompagnata quindi dall'insorgenza degli effetti tossici dell'aldeide acetica, assai spiacevoli ed allarmanti sul piano soggettivo (flushing al volto, cefalea pulsante, sudorazione, nausea, vomito, tachiaritmie, dispnea, ipotensione, vertigini, collasso). Pertanto l'obiettivo del trattamento con disulfiram è quello di creare una avversione all'alcol, piuttosto che quello di modularne gli effetti neuropsicofarmacologici.

Naltrexone.

Presupposto neurofarmacologico della efficacia di antagonisti oppiacei è che le endorfine contribuiscano agli effetti di rinforzo positivo dell'alcol interagendo con il sistema dopaminergico mesolimbico, come dimostrato sperimentalmente dal fatto che

alla diminuzione della auto-somministrazione di alcol sia associata una diminuzione del rilascio della dopamina (Gonzales RA et al,1998). In effetti gli studi preclinici, effettuati in differenti condizioni sperimentali, sono concordi nell'osservare che la somministrazione di antagonisti dei recettori μ come naloxone e naltrexone attenuano il consumo di alcol (Herz A, 1997; Stromberg MF et al, 1998). Studi clinici (Volpicelli JR et al,1992; O'Malley SS et al, 1992) hanno dimostrato la capacità del naltrexone di ridurre le recidive nei bevitori pesanti [*heavy drinkers* = assunzione di più di 5 unità (1unità=10g di alcol) alcoliche/die], nonché di ridurre il *craving* e la frequenza di assunzione di alcol. Sfortunatamente non tutti gli studi clinici successivamente condotti sulle recidive, hanno confermato questi risultati positivi.

Acamprosato

Gli effetti modulatori di questa molecola sulla trasmissione glutamatergica (in particolare la sua azione di depressione della trasmissione stessa nonché della attivazione dei recettori NMDA) ne spiegano ampiamente il suo impiego nella terapia dell'alcolismo. Come noto infatti, una delle basi neurofarmacologiche della dipendenza da alcol è costituita proprio dall'aumento sia del numero che della funzionalità dei recettori NMDA.

1.8.Generalità sull'acetaldeide

L'acetaldeide (aldeide acetica) è dal punto di vista chimico un aldeide, caratterizzata quindi dal gruppo funzionale $-CHO$. A temperatura ambiente è un liquido incolore, volatile, infiammabile e dall'odore pungente.

In natura l'acetaldeide si ritrova in molti cibi e bevande come fragranza volatile ed è inoltre presente nei vini durante la fermentazione alcolica. La sua concentrazione nel vino può variare, infatti in alcuni vini bianchi e sherry possono essere presenti fino a 500 mg di ACD per litro. Tracce di acetaldeide si ritrovano anche nel fumo di tabacco.

Nell'uomo, come già detto, l'acetaldeide è prodotta principalmente per azione dell'alcol deidrogenasi a livello periferico e dal sistema della catalasi a livello del sistema nervoso centrale e successivamente convertita ad acetato.

In passato l'ACD era conosciuta esclusivamente come sostanza tossica, infatti per più di 55 anni ha costituito il razionale biochimico dell'utilizzo del disulfiram, primo farmaco utilizzato nella terapia della dipendenza da alcol. Infatti il disulfiram, bloccando l'azione dell'ALDH2 epatica determina accumulo di acetaldeide a livello periferico. Tale accumulo si manifesta clinicamente con la "flushing syndrome", sintomatologia fortemente disforica caratterizzata da rossore al volto, che ha lo scopo di creare nel bevitore avversione all'alcol.

Recenti studi hanno invece identificato l'acetaldeide come una sostanza psicoattiva che induce una serie di effetti comportamentali. Si è inoltre ipotizzato che l'acetaldeide possa giocare un ruolo chiave nelle proprietà farmacologiche e comportamentali dell'etanolo e nello sviluppo dell'alcolismo (Quertemont 2005).

1.9.Effetti comportamentali dell'acetaldeide

Effetti locomotori

L'acetaldeide prodotta in periferia penetra nel cervello con difficoltà a causa della presenza dell'enzima ALDH nel microcircolo cerebrale (Zimatkin, 1991), per ovviare a tale impedimento metabolico, diversi studi hanno dimostrato che sono necessarie concentrazioni ematiche di acetaldeide molto alte (maggiori di $100\mu M$) (Tabakoff et

al.1976). Dunque, in condizioni di basse concentrazioni ematiche, l'ACD prodotta a livello periferico può non arrivare a livello centrale, mentre in seguito a somministrazione intraperitoneale di dosi più elevate (Quertemont 2004), saturando quindi il sistema enzimatico essa può invece giungere al cervello.

Gli effetti di locomozione, sono stati i primi effetti comportamentali dell'acetaldeide ad essere stati studiati (Holtzman e Schneider, 1974; Ortiz et al. 1974). L'etanolo induce aumento o diminuzione degli effetti di locomozione in relazione ad una serie di fattori come la dose utilizzato, la specie animale, fattori genetici; così anche l'acetaldeide produce aumento o diminuzione degli effetti di locomozione in relazione alle diverse condizioni sperimentali. Gli effetti di depressione dell'attività locomotoria dell'acetaldeide sono osservabili a dosi più alte di 50 mg/kg (Quertemont 2004). Tuttavia, avendo l'acetaldeide un'emivita molto breve (di soli pochi minuti), gli effetti di depressione sull'attività locomotoria scompaiono velocemente. Due recenti studi hanno invece evidenziato proprietà di stimolazione dell'attività locomotoria dell'acetaldeide quando somministrata per via intracerebroventricolare (Correa et al. 2003a; Arizzi et al., 2003).

Effetti ipnotici

L'etanolo ad alte dosi induce forte sedazione ed effetti ipnotici che sono evidenziati da una perdita del riflesso di raddrizzamento di lunga durata. In molti studi è stata misurata la perdita del riflesso di raddrizzamento a varie dosi di acetaldeide (Dudek e Fuller, 1978; Quertemont et al 2004; Tampier e Quintanilla, 2002). In ceppi di roditori non selezionati la perdita del riflesso di raddrizzamento si osserva a concentrazioni di acetaldeide non inferiori a 140 mg/kg. Tuttavia Tampier e Quintanilla (2002) hanno ottenuti buoni risultati già a dosi di 50 mg/kg in un ceppo di ratti "low drinking" selezionati per avere una significativamente bassa attività dell'ALDH mitocondriale. Comunque, rispetto all'etanolo l'acetaldeide induce solo una breve perdita del riflesso di raddrizzamento.

Effetti ansiolitici

Essendo le proprietà ansiolitiche dell'etanolo ben conosciute e dimostrate in modelli d'ansia di vari animali, sono state studiate anche gli effetti ansiolitici del suo metabolita primo. Tuttavia si può concludere che non vi sia una chiara evidenza che l'acetaldeide possieda proprietà ansiolitiche.

Effetti discriminativi

L'acetaldeide induce effetti soggettivi che sono discriminati dai roditori. Infatti, in esperimenti di *drug discrimination*, i ratti sono capaci di discriminare accuratamente somministrazioni di acetaldeide o soluzione salina (Redila et al, 2002). Vari studi (Quertemont e Grant, 2002; Quertemont, 2003) dimostrano che l'acetaldeide non è implicata negli effetti discriminativi dell'etanolo, ma che induce stimoli discriminativi di per se.

Effetti di rinforzo

Da quando è stato ipotizzato per l'acetaldeide un ruolo nell'abuso di alcol e nell'alcolismo, sono stati portati avanti numerosi studi comportamentali focalizzati sulle proprietà di rinforzo dell'acetaldeide. I primi studi mostrano che nei roditori l'acetaldeide è auto-somministrata nel sistema ventricolare cerebrale (Brown et al., 1979; Smith and Amit 1985), tuttavia l'auto-somministrazione non è limitata solo a somministrazioni cerebrali. Infatti sono stati effettuati studi di *self-administration* con somministrazioni periferiche endovenose (i.v.). Tali studi hanno inoltre rivelato che la *self-administration* da acetaldeide si instaura più facilmente che con l'etanolo (Brown et al 1979) dimostrando che l'acetaldeide ha proprietà di rinforzo maggiori rispetto al suo "parent drug" etanolo. Da recenti studi, si è visto che l'acetaldeide viene auto-somministrata anche nella VTA, regione dell'encefalo fortemente coinvolta negli effetti di rinforzo dell'etanolo (Rodd-Henricks et al. 2002).

Le proprietà di rinforzo dell'acetaldeide sono inoltre confermate da studi di *place preference*. Gli animali da esperimento mostrano infatti, una forte preferenza per il luogo nel quale l'acetaldeide è stata infusa per via intracerebroventricolare (Smith et

al, 1984) o somministrata per via intraperitoneale (Quertemont e De Witte, 2001; Quintanilla e Tampier, 2003a). Possiamo quindi dire che l'acetaldeide mostra effetti di rinforzo a prescindere dalla via di somministrazione, sistemica o centrale.

1.10. L'acetaldeide negli effetti comportamentali dell'etanolo

Poiché è stato osservato che l'acetaldeide è capace di produrre effetti comportamentali simili a quelli dell'etanolo, si è voluto indagare il ruolo dell'acetaldeide negli effetti dell'etanolo. Per fare ciò sono state utilizzate principalmente due strategie: la prima prevede un intervento sul metabolismo dell'etanolo in modo da bloccare la formazione di acetaldeide o determinarne la sua rimozione dall'organismo.

La seconda strategia indaga la relazione esistente tra la sensibilità individuale ai vari effetti dell'etanolo e i livelli di acetaldeide accumulati in seguito a somministrazione di etanolo.

Riguardo il primo punto, per studiare il ruolo dell'acetaldeide in vari effetti dell'etanolo, sono stati utilizzati inibitori dell'ALDH, per esempio la cianamide. Il primo effetto dell'inibizione dell'ALDH è un accumulo di acetaldeide a livello periferico, tuttavia si determina anche un aumento delle concentrazioni di acetaldeide a livello centrale. Infatti, questo farmaco, da una parte produce un accumulo di acetaldeide dovuto al metabolismo locale, dall'altra, costringe una ben alta concentrazione di acetaldeide ad attraversare la barriera ematoencefalica e diffondere al cervello (Jamal et al. 2003a). E' quindi difficile capire se gli effetti degli inibitori delle ALDH siano mediati da cambiamenti nelle concentrazioni dell'acetaldeide periferica o centrale. Pertanto sono stati portati avanti vari studi utilizzando l'inibitore dell'ADH, 4-metilpirazolo (4-MP) (Escarabajal e Aragon, 2002a, 2002b). Dal momento che nell'encefalo non è presente in condizioni fisiologiche ADH, gli effetti del 4-MP sono ristretti alla periferia, dove il 4-MP previene la formazione di acetaldeide. Inoltre, dopo la scoperta che l'enzima catalasi sia implicato nel metabolismo dell'etanolo nel SNC, numerosi studi hanno investigato il ruolo dell'acetaldeide nel metabolismo dell'etanolo a livello del sistema nervoso centrale

(Smith et al., 1997). Per modulare l'attività della catalasi è stato utilizzato il 3-amino-1,2,4,-triazolo (AT), inibitore specifico della stessa. I risultati mostrano che la somministrazione di AT inibisce l'effetto ipnotico (Aragon et al. 1991; Tampier et al., 1998), ipolocomotore (Aragon et al. 1989), avversivo (Aragon et al. 1985b), e letale (Aragon et al. 1991). Dati di di Correa et al (2001a) e Quertemont et al.(2003) riportano invece risultati discordanti riguardo gli effetti ipnotici e avversivi.

Inoltre, per investigare la relazione tra gli effetti comportamentali dell'etanolo e le concentrazioni plasmatiche di acetaldeide, sono stati condotti vari studi senza alcun intervento farmacologico, misurando direttamente la concentrazione di acetaldeide nel sangue e nell'encefalo o tramite l'attività degli enzimi catalasi o ALDH.

Tutti questi approcci convergono nell'attribuire all'acetaldeide un ruolo chiave negli effetti di locomozione attribuiti all'etanolo, inoltre sembra contribuire agli effetti sedativi ed ipnotici dell'etanolo. Il punto più problematico rimane definire il ruolo dell'acetaldeide negli effetti edonistici dell'alcol.

1.11.Basi neurochimiche degli effetti dell'acetaldeide

Riguardo al meccanismo d'azione col quale l'acetaldeide medi gli effetti dell'etanolo o li produca di per se, non si conosce molto. Nessuna evidenza dimostra infatti che l'acetaldeide interagisca con gli stessi recettori su cui agisce l'etanolo. Essa sembra non agire ne con il recettore per il GABA_A, ne con quello per il glutammato (Wang et al. 2000). In uno studio condotto su fette di encefali di ratti *ethanol-sensitive*, l'acetaldeide sembra essere affine soltanto per il recettore α_1 della glicina e non per GABA_A, NMDA o AMPA (Mascia et al. 2001).

Molti lavori riportano che l'acetaldeide altera il turnover catecolaminergico del SNC (Barbaccia et al., 1982). In particolare, molti recenti lavori hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo del sistema mesolimbico dopaminergico nella mediazione degli effetti di rinforzo dell'acetaldeide. Molti farmaci d'abuso infatti, incluso l'etanolo, mostrano un incremento nelle concentrazioni della dopamina in molte regioni del sistema limbico, in particolare nella *shell* del *nucleus accumbens* (Di Chiara e

Imperato, 1988; Carboni et al. 1989; Imperato e Di Chiara 1986) e questi effetti sono ascrivibili alle sue proprietà di rinforzo (Bonci et al. 2000).

In accordo con tale ipotesi, è stato dimostrato che l'acetaldeide, come l'etanolo, aumenta la frequenza di scarica dei neuroni dopaminergici della VTA (Foddai et al., 2004). Lo stesso studio dimostra che l'attività elettrofisiologia dei neuroni dopaminergici della VTA viene ridotta quando il metabolismo dell'etanolo viene bloccato farmacologicamente con l'inibitore dell'ADH 4-MP. Inoltre altri studi riportano che l'acetaldeide è auto-somministrata da ratti direttamente in VTA posteriore (Rodd-Henricks et al. 2002). Tale auto-somministrazione locale è bloccata dall'azione del farmaco quinpirolo, agonista dei recettori D₂. Tali risultati suggeriscono che le proprietà di rinforzo dell'acetaldeide siano mediate dall'attivazione dei neuroni dopaminergici della VTA.

Mentre un aumento nell'attività dopaminergica è associato agli effetti di rinforzo dell'etanolo o di altri farmaci d'abuso, all'astinenza da consumo cronico di etanolo è associata una riduzione dell'attività spontanea dei neuroni della VTA e delle concentrazioni di dopamina nel *nucleus accumbens* (Diana et al., 1993). Visti questi presupposti, si sta tentando di capire se l'acetaldeide possa giocare un importante ruolo nello stato ipodopaminergico riscontrato nell'astinenza da alcol.

Altro probabile sito d'azione studiato per l'acetaldeide è l'interazione con oppioidi endogeni. A basse concentrazioni l'acetaldeide, stimola la secrezione di β -endorfine similmente all'etanolo. L'aumento delle concentrazioni di β -endorfine da parte dell'etanolo, è inibito dall'azione della catalasi, il che farebbe pensare che l'effetto dell'etanolo sia mediato dalla sua conversione in acetaldeide. Ed inoltre, poiché le β -endorfine modulano l'attività dei neuroni dopaminergici nella VTA (Gianoulakis, 2004), l'aumento della concentrazione di tale neuropeptide potrebbe essere responsabile degli effetti stimolanti dell'acetaldeide sui neuroni dopaminergici e potrebbe mediarne i suoi effetti di rinforzo. In accordo con tale idea, alcuni studi hanno dimostrato che l'antagonista per il recettore oppioide naloxone, ed il suo agonista parziale buprenorfina riducono l'auto-somministrazione di acetaldeide. Non è noto poi, se l'acetaldeide alteri l'attività del sistema serotoninergico e colinergico,

al pari dell'etanolo. Anche riguardo al suo legame con canali al calcio voltaggio-dipendenti, ben poco si sa.

L'acetaldeide interagendo, come detto, col sistema catecolaminergico è capace di formare con i vari neurotrasmettitori, prodotti di addizione, condensazione e polimerizzazione. L'acetaldeide ha la capacità di condensare con indolamine endogene a formare alcaloidi: le tetraidro- β -carboline (THBC) e tetraidroisochinoline; e con la dopamina a formare il salsolinolo. Tali alcaloidi, in particolare il salsolinolo e la tetraidropapaverina, sembrano essere coinvolte nella eziologia dell'abuso di alcol negli effetti di rinforzo dell'etanolo (Davis e Walsh, 1970b).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Dopo molte ricerche e dati scientifici contrastanti (Dietrich,2004), l'acetaldeide è ora ampiamente riconosciuta come potenziale sostanza biologicamente attiva in grado di indurre diversi effetti sul comportamento, che vanno dalla locomozione all'ansiolisi ed all'ipnosi (Quertemont et al., 2005). Evidenze sperimentali mostrano che l'ACD può fungere da rinforzo almeno nei roditori (Rodd-Henricks et al., 2002). Ciò fa ipotizzare che questa sostanza, da sola o in sinergismo con l'etanolo, potrebbe svolgere un ruolo importante negli effetti edonistici dell'etanolo (Quertemont e Tambour, 2004). Peraltro teorie ancor più recenti considerano l'etanolo come un farmaco le cui proprietà farmacologiche sono interamente ascrivibili al suo metabolismo ad acetaldeide (Quertemont et al., 2005).

Risultati ottenuti da alcuni studi hanno mostrato che l'ACD viene auto-somministrata nel sistema ventricolare cerebrale (Brown et al., 1979) e nell'area ventrale del tegmento in ratti da esperimento (Rodd-Henricks et al., 2002). Inoltre era già stata dimostrata una *place preference* condizionata dopo infusione intracerebro-ventricolare (Smith et al., 1984) e *stimulus preference* dopo iniezione intraperitoneale di acetaldeide (Quertemont e De Witte 2001). Peraltro, la somministrazione di acetaldeide produce una attivazione comportamentale (Correa et al., 2003). A supporto di tale ipotesi, recenti dati elettrofisiologici *in vivo* (Foddai et al., 2004) ed *in vitro* (Melis et al., in press), mostrano un'aumento dell'attività dopaminergica nei neuroni della VTA. Dati comportamentali mostrano *place preference* condizionata dopo assunzione di acetaldeide per via intragastrica (Peano et al., in press). Recenti evidenze ottenute utilizzando la d-penicillamina, derivato delle penicilline, come specifico agente sequestrante l'acetaldeide, sostengono l'ipotesi che molti degli effetti comportamentali (Font et al., 2006) e di rinforzo (Font et al., 2006b) dell'etanolo, siano mediati dall'acetaldeide. Tuttavia, il meccanismo attraverso cui l'acetaldeide potrebbe prendere parte agli effetti farmacologici e di rinforzo dell'etanolo, rimane ancora largamente sconosciuto.

In virtù del cruciale ruolo che il sistema mesolimbico dopaminergico svolge negli effetti di rinforzo e motivazionali di molti farmaci d'abuso incluso l'etanolo (Di Chiara et al., 2004; Tupala e Tiihonen, 2004), abbiamo valutato l'ipotesi che l'acetaldeide possa contribuire agli effetti di rinforzo dell'etanolo tramite stimolazione dell'attività del sistema mesolimbico dopaminergico. In tale lavoro, quindi, abbiamo utilizzato la tecnica della microdialisi nel ratto *freely moving* per asserire gli effetti dell'acetaldeide, sia per se sia derivata dal metabolismo dell'etanolo, sul rilascio della dopamina nella shell del *Nucleus Accumbens*.

Inoltre, per mimare la modalità di assunzione di bevande alcoliche comunemente utilizzata dall'uomo, la somministrazione di etanolo (0.5, 1, 2 g/kg) ed acetaldeide (10, 20,40 mg/kg) è stata effettuata per via intragastrica. Poiché l'acetaldeide è in grado, come abbiamo visto, di aumentare la frequenza di scarica dei neuroni dopaminergici nella VTA e di essere auto-somministrata nella stessa area, abbiamo misurato la concentrazione della dopamina in seguito a somministrazione locale di acetaldeide per dialisi inversa (50, 75, 100 μ M) in VTA. Abbiamo studiato gli effetti dell'etanolo somministrato per via intragastrica in animali pre-trattati con 4-MP, inibitore competitivo dell'ADH, in modo da prevenire la trasformazione dell'etanolo ad acetaldeide. Per avvalorare ulteriormente tale ipotesi, in virtù del fatto che con l'inibizione dell'ADH si determina un accumulo di etanolo, è stata utilizzata la d-penicillamina, agente sequestrante selettivo, capace di ridurre i livelli di acetaldeide nel sangue senza interferire sul metabolismo dell'etanolo. Infine, per accertare la selettività della d-penicillamina nei confronti dell'acetaldeide rispetto ad altre sostanze d'abuso, una serie di esperimenti sono stati condotti somministrando morfina cloridrato per via intraperitoneale, sostanza nota per gli effetti sul sistema mesolimbico dopaminergico, e misurando le concentrazioni di dopamina nel *Nucleus Accumbens*.

3.MATERIALI E METODI

Gli studi sono stati eseguiti in conformità con la normativa italiana che disciplina la protezione degli animali utilizzati ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici (D.L. 116/92). Inoltre, gli studi sono in accordo con il “Guide for the care and use of laboratory animals” (NIH publications no.80-23, aggiornato nel 1996).

3.1. Animali

La sperimentazione è stata condotta su ratti albini maschi Wistar (*rattus norvegicus*) del peso compreso fra 280-300 g (Harlan, Italy). Gli animali sono stati stabulati in gruppi di 3-4 per gabbia e mantenuti in condizioni ambientali controllate (temperatura 22±2 °C; umidità 60-65% e con un ciclo luce/buio di 12h).

Gli animali sono stati alimentati con una dieta standard e acqua *ad libitum*.

3.2. Sostanze e trattamenti

Tutte le sostanze utilizzate negli esperimenti sono state acquistate presso la Sigma-Aldrich (*Sigma-Aldrich*, Milano, Italia). L’etanolo (96%) è stato acquistato da Zedda-Piras (*Zedda-Piras SpA*, Cagliari, Italia); la morfina cloridrato è stata acquistata da S.A.L.A.R.S. Camerata, Italia. Per le somministrazioni intragastriche (i.g.) l’etanolo e l’acetaldeide sono stati diluiti in acqua sterile e apirogena. Negli esperimenti si è utilizzato etanolo con una concentrazione finale del 20% v/v, per le diluizioni ci si è avvalsi della tabella riportata in Medicamenta (1991-1992). L’acetaldeide somministrata nell'Area Ventrale Tegmentale (VTA) è stata opportunamente diluita in Ringer e tamponata con NaOH (1N) fino a pH 7. In considerazione dell’elevata volatilità delle sostanze, le soluzioni di etanolo e acetaldeide sono state preparate poco prima degli esperimenti e conservate in frigo. La D-penicillamina (Dpn) e la morfina (HCl) sono state sciolte in acqua salina e apirogena e somministrate per via intraperitoneale (i.p.).

3.3. Disegno sperimentale

I ratti sono stati suddivisi casualmente in differenti gruppi sperimentali:

Etanolo.

- gruppo *etanolo*: a questi animali è stato somministrato l'etanolo i.g. alle dosi di 0,5, 1,0 e 2,0 g/kg;
- gruppo *etanolo* più *inibitore*: questi animali sono stati sottoposti a trattamento con 4-metil-pirazolo alla dose di 45 mg/kg i.p., e 24 ore dopo è stato somministrato loro l'etanolo alla dose di 1 g/kg i.g.

Acetaldeide.

- gruppo *acetaldeide*: a questi animali è stata somministrata l'acetaldeide i.g. alle dosi di 10, 20 e 40 mg/kg;
- gruppo *doppio probe*: a questi animali l'acetaldeide è stata somministrata localmente in VTA per dialisi inversa alle concentrazioni di 50, 75, 100 μ M.

D-penicillamina.

- gruppo *etanolo* più *D-penicillamina*: questi animali sono stati sottoposti a trattamento con D-penicillamina alla dose di 50 mg/kg i.p., un'ora dopo è stato somministrato loro l'etanolo alla dose di 1 g/kg i.g.;
- gruppo *acetaldeide* più *D-penicillamina*: questi animali sono stati sottoposti a trattamento con D-penicillamina alla dose di 50 mg/kg i.p., un'ora dopo hanno ricevuto l'acetaldeide alla dose di 20 mg/kg i.g.

Morfina.

- gruppo *controlli morfina*: questi ratti sono stati sottoposti a trattamento con morfina HCl alla dose di 2,5 mg/kg i.p.;
- gruppo *morfina* più *D-penicillamina*: questi animali sono stati sottoposti a trattamento con D-penicillamina alla dose di 50 mg/kg i.p., un'ora dopo hanno ricevuto la morfina alla dose di 2,5 mg/kg i.p.

3.4. Microdialisi

La microdialisi cerebrale è una delle tecniche di campionamento del compartimento extracellulare più utilizzate nelle neuro-scienze; viene principalmente applicata sull'animale sveglio e libero di muoversi (*freely moving*). Attualmente la microdialisi è largamente impiegata per lo studio *in vivo* della neurochimica di parecchi neurotrasmettitori, ovvero per lo studio della neurofisiologia e della neurofarmacologia dei sistemi monoaminergici, in particolare del sistema dopaminergico.

Le maggiori applicazioni cliniche della microdialisi si trovano soprattutto in terapia intensiva, neurochirurgia, ma anche in chirurgia ricostruttiva, in diabetologia e cardiocirurgia.

Generalità sulla microdialisi

Lo spazio extracellulare riveste un ruolo molto importante nell'organismo in quanto esso rappresenta un'importante stazione di passaggio di numerosi nutrienti, neurotrasmettitori, metaboliti, farmaci, tossine etc.

Per questo motivo negli ultimi decenni sono state impiegate numerose tecniche d'indagine col fine di approfondire lo studio della biochimica e della fisiologia dello spazio extracellulare. Tra le varie tecniche utilizzate si possono ricordare i sacchi dialitici di Bito, le coppette corticali, la voltammetria e le cannule push-pull. Con l'avvento della microdialisi *in vivo* si è avuta una vera e propria rivoluzione delle possibilità di studio permettendo di ampliare così le conoscenze sul distretto extracellulare dell'organismo.

Principi generali del metodo

La tecnica della microdialisi è basata sul classico principio della dialisi: tra due soluzioni di diversa concentrazione separate da una membrana semipermeabile, le sostanze chimiche spinte dal gradiente di concentrazione, diffondono verso la soluzione più diluita. Tutto ciò avviene senza che tra le soluzioni ci sia alcun contatto e nessuna variazione volumetrica.

Nel caso della microdialisi cerebrale da noi applicata, la membrana semipermeabile è rappresentata da un microtubo di 300 μ m di diametro, impiantato chirurgicamente nel parenchima cerebrale e le due soluzioni sono, rispettivamente, il liquido extracellulare ed una particolare soluzione fisiologica (soluzione di Ringer) che viene perfusa attraverso il microtubo. Le molecole sufficientemente piccole come la dopamina, tali da attraversare la membrana da dialisi, potranno diffondere dal tessuto cerebrale al Ringer (o viceversa) ed essere trasportate con il liquido in uscita. Il liquido che viene raccolto dalla sonda, detto “dializzato”, viene sottoposto ad analisi per la rilevazione e quantizzazione dei composti di interesse con HPLC-ECD.

Vantaggi e limiti della microdialisi

Pur essendo la microdialisi una tecnica invasiva ha ottenuto negli anni una larga e rapida diffusione, infatti comparata con le precedenti tecniche di campionamento del liquido extra-cellulare, essa offre diversi vantaggi tra cui:

- la possibilità di effettuare campionamenti del liquido extracellulare senza teoricamente alterarlo e, soprattutto, con minime alterazioni della competenza della barriera emato-encefalica;
- la possibilità di campionare il liquido extracellulare sull'animale *freely moving*;
- rispetto alle precedenti tecniche di campionamento *in vivo*, con la microdialisi si evita il contatto diretto tra liquido di perfusione e il tessuto circostante, prevenendo così non solo i danni meccanici dovuti al flusso (tipici delle cannule push-pull) ma anche l'eventuale inquinamento batterico e lo sviluppo di infezioni nel tessuto;
- buona risoluzione spaziale e temporale;
- la possibilità di mettere in relazione comportamento e neurochimica con una certa facilità.

D'altra parte non può essere trascurato un importante limite della microdialisi; il danno tissutale dovuto all'impianto della sonda. Infatti, così come avviene in tutte le tecniche invasive, l'impianto induce danni meccanici a carico del tessuto cerebrale. L'impianto chirurgico della sonda da dialisi innesca numerose reazioni di tipo

irritativo e infiammatorio nel tessuto circostante. Per poter effettuare gli esperimenti nelle condizioni più fisiologiche possibili, acquista molta importanza la conoscenza delle dinamiche temporali di questi fenomeni. Gli studi condotti a tale scopo sostengono che l'intervallo di tempo ideale per effettuare gli esperimenti sia tra le 16 e le 48 ore dall'inserzione del probe. Infatti in tempi minori la permeabilità della barriera emato-encefalica risulta ancora alterata, mentre già oltre le 50-60 ore i fenomeni di gliosi intorno alla fibra ne ostacolano il funzionamento.

I nostri esperimenti sono stati eseguiti "in acuto". Con questo termine si intende dire che gli esperimenti sono stati eseguiti dopo 24 ore dall'impianto della sonda da microdialisi e proseguiti, quando possibile, nei due giorni successivi.

Sonda (probe) da dialisi

Le prime sonde da dialisi descritte da Urgersted erano trasversali e permettevano di campionare bilateralmente le strutture dell'encefalo. Sfortunatamente, la procedura chirurgica necessaria per l'impianto di questo tipo di fibre arrecava molto danno alla teca cranica ed alle strutture encefaliche che ne venivano attraversate. Lo sviluppo ed il perfezionamento delle sonde a geometria verticale ha permesso di ridurre notevolmente il danno chirurgico a carico della teca cranica delle strutture cerebrali, e di ottenere una miglior risoluzione spaziale.

Nonostante queste sonde siano molto delicate e la loro costruzione risulti difficile, il loro ridotto diametro (300 μ m) ed il ridotto danno tissutale che consegue al loro impianto, ne fanno il modello attualmente più utilizzato nelle neuroscienze.

La sonda di tipo concentrico usata nei nostri esperimenti è costruita mediante l'uso di un unico tubicino da dialisi tappato a un'estremità con della colla epossidica. L'ingresso del Ringer e l'uscita del dializzato avvengono attraverso due fibre (capillari di silice fusa) di differente diametro; la fibra d'ingresso possiede un diametro minore (i.d. 40 μ M, o.d. 105 μ M, Composite Metal Services, Shipley, Bradford. UK), mentre la fibra d'uscita ha un diametro maggiore (i.d. 50 μ M o.d. 150 μ M). I due capillari vengono inseriti ed opportunamente bloccati con delle colle

epossidiche nel tubicino da dialisi. La lunghezza della membrana da dialisi è rispettivamente di 1,5 mm e di 1,0 mm per i probes nel *Nucleus Accumbens* (NAcb) e nella VTA.

Ringer di perfusione

Nell'esecuzione degli esperimenti di microdialisi tra le numerose variabili, assumono particolare rilievo la composizione ionica e la velocità di flusso del liquido di perfusione (Ringer). Se è facilmente intuibile la necessità che il Ringer di perfusione abbia una composizione il più vicina possibile a quella del fluido extracellulare, può apparire invece meno rilevante la necessità di controllare la velocità del flusso attraverso la sonda. In realtà quest'ultimo parametro è assai importante sia perché è necessario che il Ringer perfuso abbia il tempo di equilibrarsi con il fluido extracellulare, sia perché si deve considerare che la sonda da dialisi asporta molte sostanze (glucosio, nutrienti, etc.) dal tessuto encefalico. Elevate velocità di perfusione potrebbero impoverire eccessivamente il tessuto danneggiandolo.

Numerosi esperimenti indicano che la velocità di perfusione della sonda deve essere la più bassa possibile, non superiore a 1,8-2,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ nel caso di sonde concentriche.

Nei nostri esperimenti la soluzione di Ringer utilizzata aveva la seguente composizione: *KCl* 4,0 mM, *NaCl* 147,0 mM, *CaCl₂* 2,2 mM, *glucosio* 1,25 mM. La sonda da dialisi è stata perfusa con tale soluzione (sterilizzata per autoclavaggio a 120°C per 20 minuti) ad un flusso costante di 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Il tempo di campionamento è stato di 15 minuti.

Procedura di impianto della sonda da dialisi

I probes da dialisi sono stati impiantati dopo aver anestetizzato gli animali con ketamina (75 mg/kg i.p.) e medetomidina (0,5 mg/kg i.p.). Successivamente i ratti sono stati sistemati su un tavolo operatorio stereotassico Kopf per piccoli animali. Dopo adeguata disinfezione si è praticata un'incisione della cute e dei tessuti superficiali, in seguito all'asportazione del periostio ed esposizione delle ossa craniche, è stato effettuato un foro di 2 mm di diametro per l'inserzione del probe da

microdialisi. La dura madre è stata incisa con un ago ed il probe è stato lentamente inserito nell'encefalo utilizzando le seguenti coordinate: per il NAcb A/P, +2.2; M/L 1.1; D/V, 7.8 dal bregma e per la VTA posteriore A/P, -6.7, M/L, 0.7; D/V (12°), 9.6 mm dal bregma (Paxinos and Watson, 2006). Il probe è stato fissato con l'aiuto di un supporto plastico e del cemento dentale (Glasionomer CX-Plus, Ilic S.p.a., Milano, Italy). Successivamente all'operazione ai ratti è stata somministrata una soluzione glucosata tiepida (2,5 ml per via sottocutanea). Dopo di che sono stati sistemati in gabbie semisferiche di perspex con libero accesso ad acqua e cibo. Gli esperimenti di dialisi si sono eseguiti 18-20 ore dopo l'impianto del probe.

Post mortem è stato verificato il corretto posizionamento del probe da dialisi. I ratti sono stati sacrificati con *overdose* di cloralio idrato, gli encefali sono stati rimossi e conservati in soluzione di formalina al 10% fino all'analisi istologica. I dati ottenuti da ratti in cui i probe non risultavano posizionati correttamente sono stati scartati.

3.5. Analisi HPLC del dializzato

La cromatografia liquida su colonna ad elevata performance o HPLC con rivelazione amperometrica o coulometrica, rappresenta nella microdialisi cerebrale, la metodica di elezione per l'analisi del dializzato. L'HPLC consente di rilevare quantità di sostanza nell'ordine dei picogrammi in campioni di poche decine di microlitri, essa possiede però il grosso limite di non poter essere realisticamente utilizzabile per misurare rapidi cambiamenti di concentrazione dell'analita.

Nei nostri esperimenti per l'analisi del contenuto in dopamina del dializzato si è fatto uso di un'apparecchiatura HPLC con rilevazione elettrochimica di tipo coulometrico. Il sistema HPLC-ECD utilizzato è composto da un sistema di pompaggio Shimadzu ad alte prestazioni LC10ADVp, iniettore Rheodyne, colonna da cromatografia a fase inversa Supelco C18, rilevatore Coulometrico ESA II equipaggiato con una cella di lettura mod. ESA micro-dialysis 5014B e cella di guardia mod. ESA 5021.

Il rilevatore è stato collegato ad un computer tramite una scheda acquisizione dati (convertitore analogico digitale) Varian STARboard. I dati cromatografici sono

quindi stati acquisiti ed analizzati tramite il software Varian Star Chromatographic Workstation rel. 6.3 (Varian Inc.).

3.6. Analisi statistica.

Tutti i risultati sono espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di base. È stata considerata come linea di base ed espressa come 100% la media della concentrazione di DA (espressa come numero di fentomoli/15 minuti) dei primi tre campioni stabili (cioè con una variazione l'un l'altro inferiore al 10%).

I dati sono stati espressi come media \pm S.E.M. Per confrontare i dati di ogni gruppo relativi alle variazioni delle concentrazioni di DA, è stata utilizzata ANOVA ad una via, ed inoltre, quando necessario i dati sono stati sottoposti al Dunnett's *post hoc* test. Si è deciso di porre il valore del livello di significatività per $P < 0.05$.

4.RISULTATI

4.1. Concentrazioni basali nel dializzato

Le concentrazioni basali di dopamina nei dializzati prelevati dalla shell del *nucleus accumbens* per tutti gli esperimenti non differivano significativamente l'un l'altro, per cui sono stati raggruppati insieme. I valori basali di DA misurati (media +/- S.E.M.) sono stati di 56.3+/- 3.6 fmol/15min per campione.

4.2. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del *nucleus accumbens* in seguito a somministrazione di etanolo

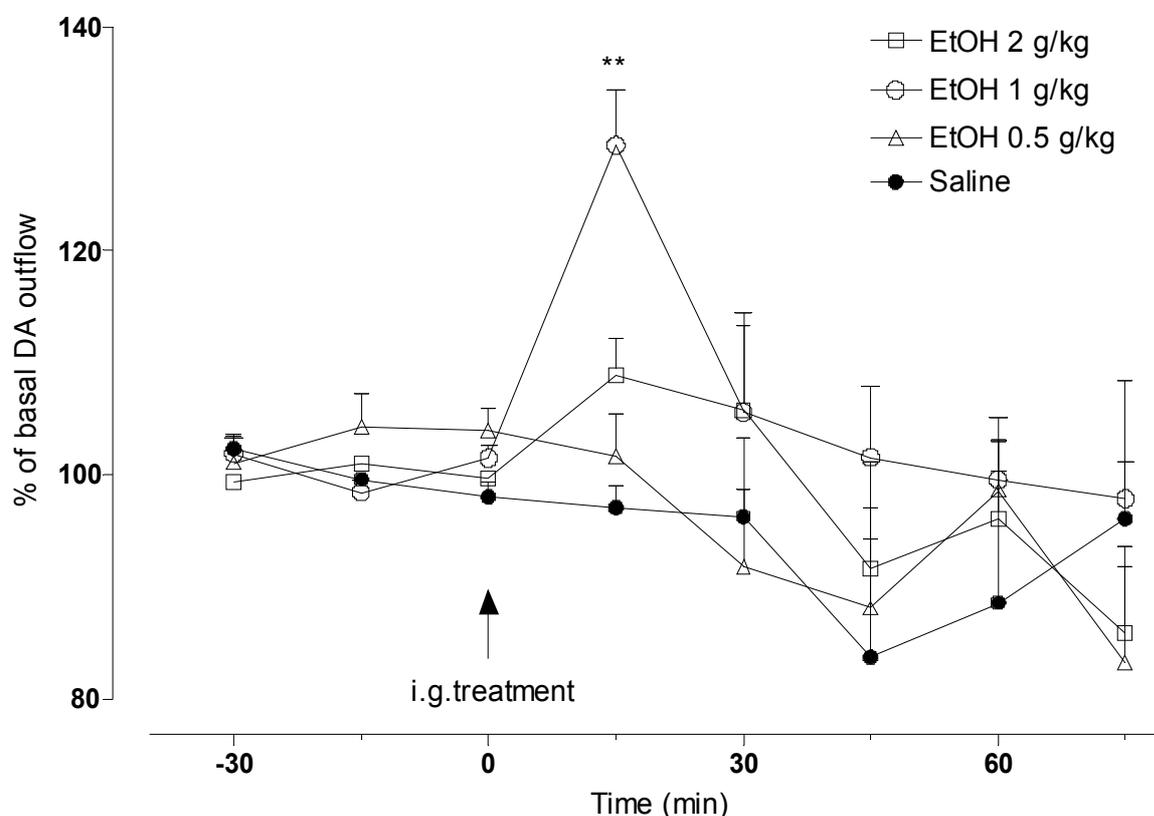


Figura 3: Effetti della somministrazione intragastrica di etanolo (EtOH; 0.5, 1, 2 g/kg) sul release della dopamina (DA) nella shell del *nucleus accumbens* (NAcbs) del ratto. I dati sono espressi come media percentuale di variazione \pm SEM rispetto ai valori della linea di base. Le differenze significative, rispetto ai valori della linea di base sono indicate da* (**:P<0.01; *: P<0.05); one-way ANOVA per misure ripetute, seguito da Dunnett's test quando necessario. La freccia indica il tempo della somministrazione intragastrica.

Gli effetti della somministrazione intragastrica di etanolo (0.5, 1.0, 2.0g/kg) sono mostrati in fig.3. La somministrazione di 1g/kg di etanolo, innalza significativamente

il rilascio di DA nel *nucleus accumbens*, mentre alla dose di 2g/kg non è evidenziabile un aumento statisticamente significativo. ([F(7,31)=2.351, P>0.05]), one-way ANOVA per misure ripetute; n=4). La dose più bassa di 0.5 g/kg di etanolo è risultata essere inefficace.

Dopo somministrazione intragastrica di etanolo alla dose di 1g/kg, il *release* della DA nella shell del NAcbs è aumentato significativamente nel primo campione sperimentale rispetto alla linea di base ([F(7,47)=5.732, P<0.0001], one-way ANOVA per misure ripetute seguito da Dunnett's post hoc test; n=6, 129.44±4.9%). I livelli extracellulari di DA si riportano ai valori di base dopo 30 minuti dal trattamento con etanolo.

4.3. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del *nucleus accumbens* in seguito a somministrazione di etanolo in ratti pre-trattati con 4-MP

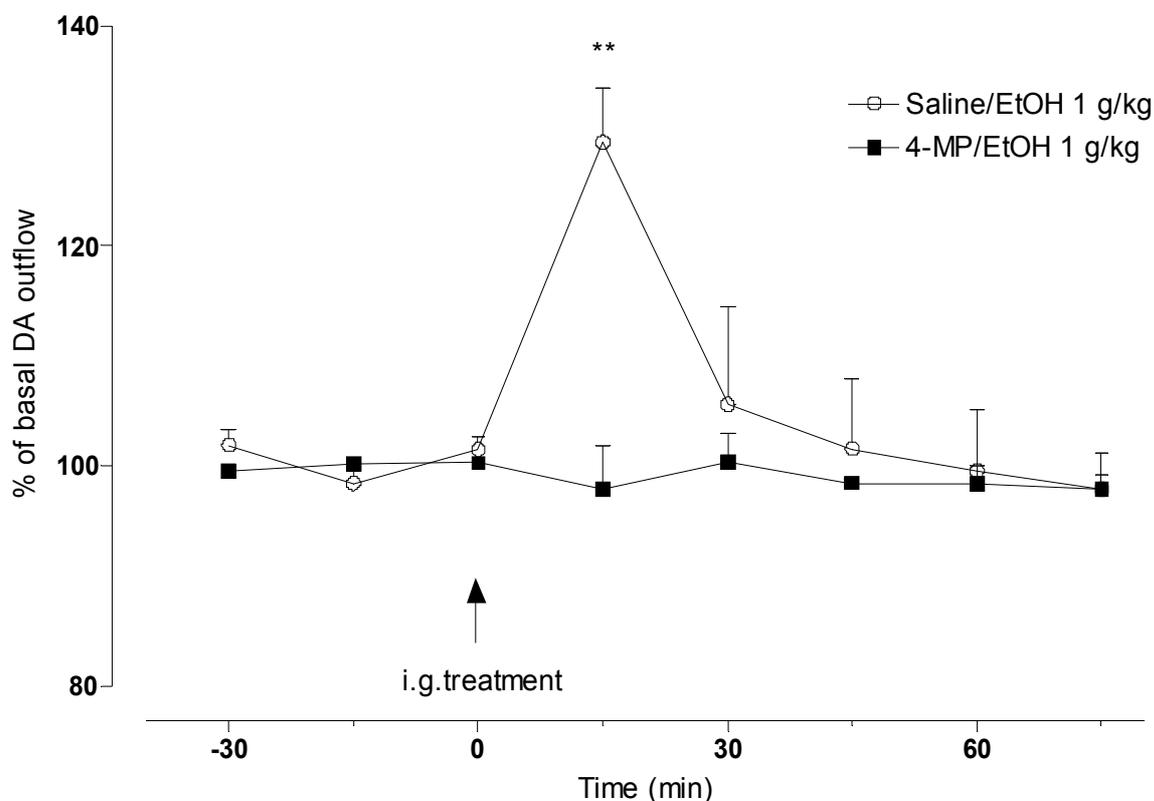


Figura 4: Effetti della somministrazione intragastrica di EtOH (1g/kg) sul release della DA nel NAcbs di ratto pre-trattato con 4-MP (45mg/kg). I dati sono espressi come media percentuale di variazione \pm SEM rispetto ai valori della linea di base. Le differenze significative, rispetto ai valori della linea di base sono indicate da* (**: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$); one-way ANOVA per misure ripetute, seguito da Dunnett's test quando necessario. La freccia indica il tempo della somministrazione intragastrica.

La fig.4 mostra come, in seguito alla somministrazione di etanolo alla dose di 1g/kg, in animali pre-trattati con 4-MP alla dose di 45mg/kg, non è misurabile alcun aumento nel rilascio di DA nel NAcbs ($[F(7,47)=1.284, P > 0.05]$).

4.4. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del *nucleus accumbens* in seguito a somministrazione di acetaldeide

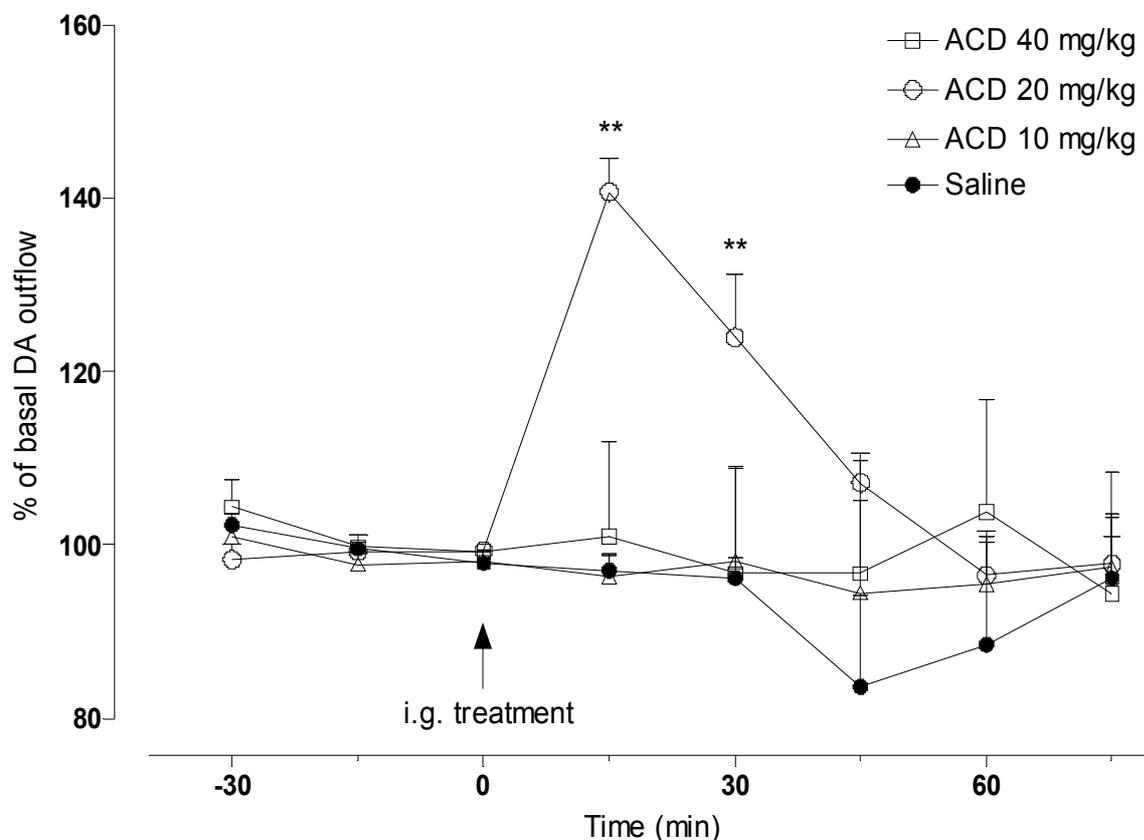


Figura 5: Effetti della somministrazione intragastrica di acetaldeide (ACD; 10, 20, 40 mg/kg) sul release della DA nel NAcbs di ratto. I dati sono espressi come media percentuale di variazione \pm SEM rispetto ai valori della linea di base. Le differenze significative, rispetto ai valori della linea di base sono indicate da* (**: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$); one-way ANOVA per misure ripetute, seguito da Dunnett's test quando necessario. La freccia indica il tempo della somministrazione intragastrica.

Gli effetti della somministrazione intragastrica di acetaldeide (10, 20, e 40 mg/kg) sono mostrati in fig.5. Delle tre dosi testate, soltanto 20 mg/kg di acetaldeide innalza significativamente i livelli della DA extracellulare nel NAcbs, mentre le dosi di 10 e 40 mg/kg non sono in grado di determinare alcun innalzamento dei livelli di DA. In particolare, dopo somministrazione di acetaldeide alla dose di 20 mg/kg, i livelli della DA nel NAcbs aumentano significativamente rispetto alla linea di base per due campioni consecutivi. ($[F(7,47)=21.399, P < 0.0001]$, one-way ANOVA per misure ripetute seguito da Dunnett's post hoc test; $n=6, 140.75 \pm 9.7\%$ dalla linea di base,

P<0.01). I livelli di DA si riportano poi ai valori basali dopo 45 minuti dalla somministrazione di ACD.

4.5. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del *nucleus accumbens* in seguito a somministrazione di acetaldeide nell'Area Ventrale del Tegmento.

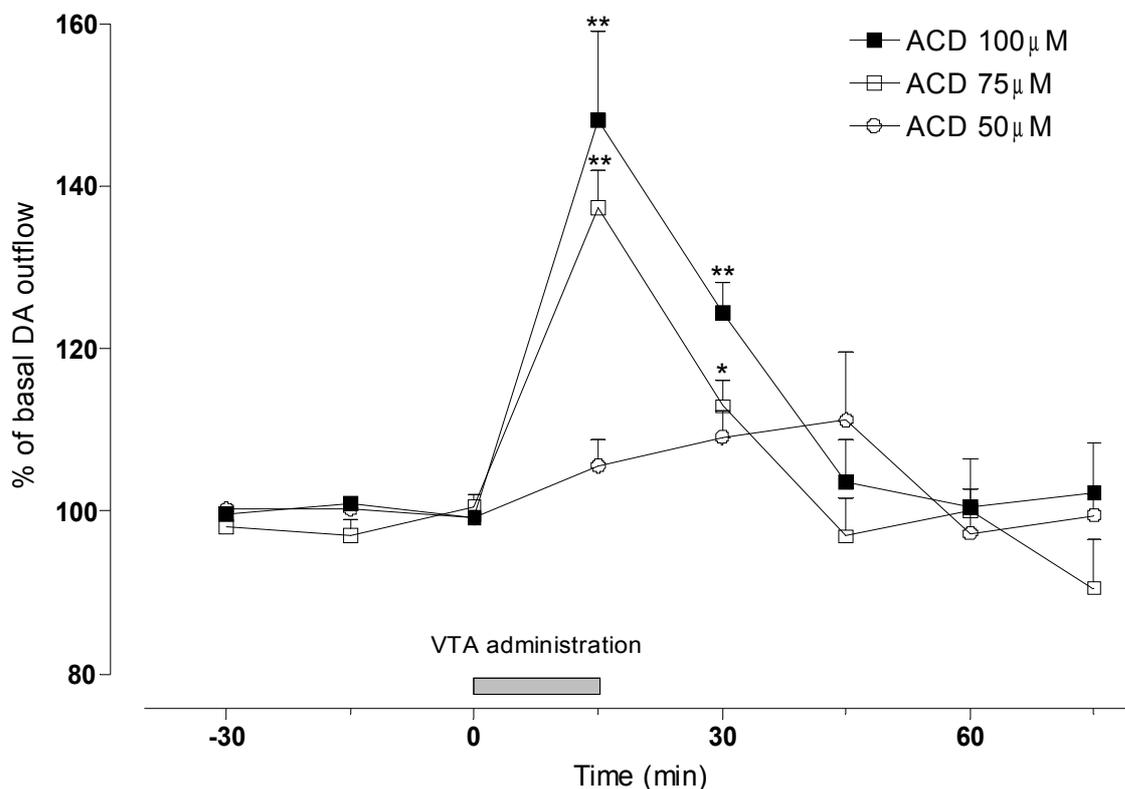


Figura 6: Effetti della somministrazione locale per dialisi inversa di ACD (50, 75, 100 μM) sul release della DA nel NAcbs di ratto. I dati sono espressi come media percentuale di variazione ± SEM rispetto ai valori della linea di base. Le differenze significative, rispetto ai valori della linea di base sono indicate da* (**:P<0.01; *: P<0.05); one-way ANOVA per misure ripetute, seguito da Dunnett's test quando necessario. La freccia indica il tempo della perfusione del farmaco.

Gli effetti della somministrazione locale per dialisi inversa di acetaldeide (ACD 50, 75, 100 μM in soluzione di Ringer, 1.5 μl/min per 15 minuti) nella VTA posteriore sono mostrati in fig.6. Quando somministrata in VTA ad alte concentrazioni (75 e 100 μM), tramite dialisi inversa, l'ACD eleva in maniera dose-dipendente i livelli di DA nel NAcbs, la dose più bassa testata 50μM è risultata essere inefficace. Più in dettaglio, la perfusione in VTA con ACD disciolta in soluzione di Ringer alla

concentrazione di 75 μM , determina un significativo aumento della concentrazione di DA nel NAcbs, nel primo campione sperimentale raccolto durante la somministrazione di ACD ($[F(7,39)=26.874, P<0.0001]$, one-way ANOVA per misure ripetute seguito da Dunnett's post hoc test; $n=5, 137.47\pm 10.1\%$ dalla linea di base, $P<0.01$). Nel campione successivo i livelli di DA iniziano a diminuire, ma rimangono ancora significativamente elevati rispetto alla linea di base ($112.95\pm 7.15\%$, $P<0.05$), per poi riportarsi ai valori basali dopo 45 minuti dalla somministrazione di ACD. Anche la per fusione di 100 μM , determina un aumento statisticamente significativo nel *release* della DA nel NAcbs ($[F(8,44)=13.090, P<0.0001]$, one-way ANOVA per misure ripetute seguito da Dunnett's post hoc test; $n=5, 148.24\pm 10.7\%$ dalla linea di base, $P<0.01$). I livelli di DA rimangono elevati anche nel campione successivo ($124.44 \pm 3.86\%$ dalla linea di base, $P<0.01$) per poi ritornare ai valori basali dopo 45 minuti dall'infusione.

4.6. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del *nucleus accumbens* in seguito a somministrazione di acetaldeide in ratti pre-trattati con d-penicillamina

Nella fig.7 sono mostrati gli effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del nucleus accumbens in seguito a somministrazione di etanolo in ratti pre-trattati con d-penicillamina. Il pre-trattamento con d-penicillamina alla concentrazione di 50 mg/kg, effettuato 1 ora prima della somministrazione intragastrica di acetaldeide, alla concentrazione di 20 mg/kg, previene il rilascio di DA nel NAcbs rispetto ai rispettivi controlli trattati con salina e ACD (20mg/kg). Tale dato è osservabile rispetto al gruppo di controllo trattato con salina somministrata 1 ora prima della somministrazione di acetaldeide 20mg/kg.

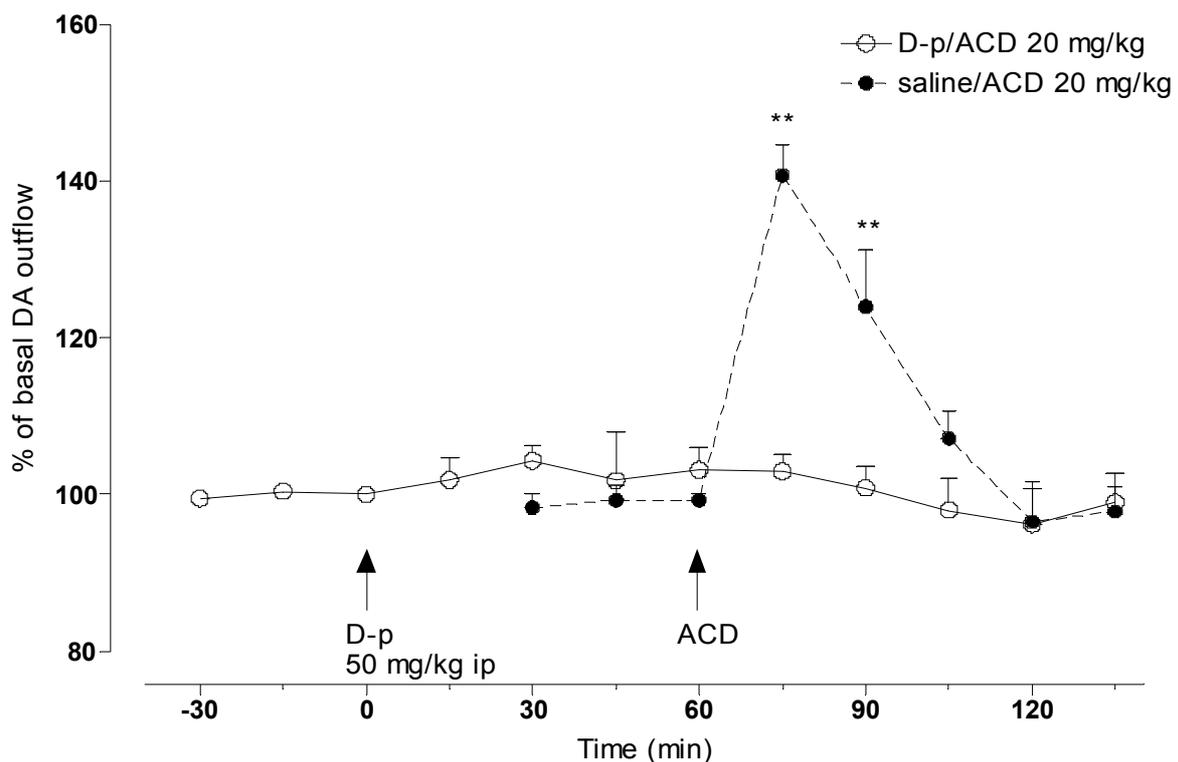


Figura 7: Effetti della somministrazione intragastrica di ACD (20mg/kg) sul release della DA nel NAcbs di ratto pre-trattato con d-penicillamina(D-P, 50mg/kg). I dati sono espressi come media percentuale di variazione \pm SEM rispetto ai valori della linea di base. Le differenze significative, rispetto ai valori della linea di base, sono indicate da* (**:P<0.01; *: P<0.05); one-way ANOVA per misure ripetute, seguito da Dunnett's test quando necessario. Le frecce indicano i tempi della somministrazioni intraperitoneale ed intragastrica.

4.7. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del *nucleus accumbens* in seguito a somministrazione di etanolo in ratti pre-trattati con d-penicillamina

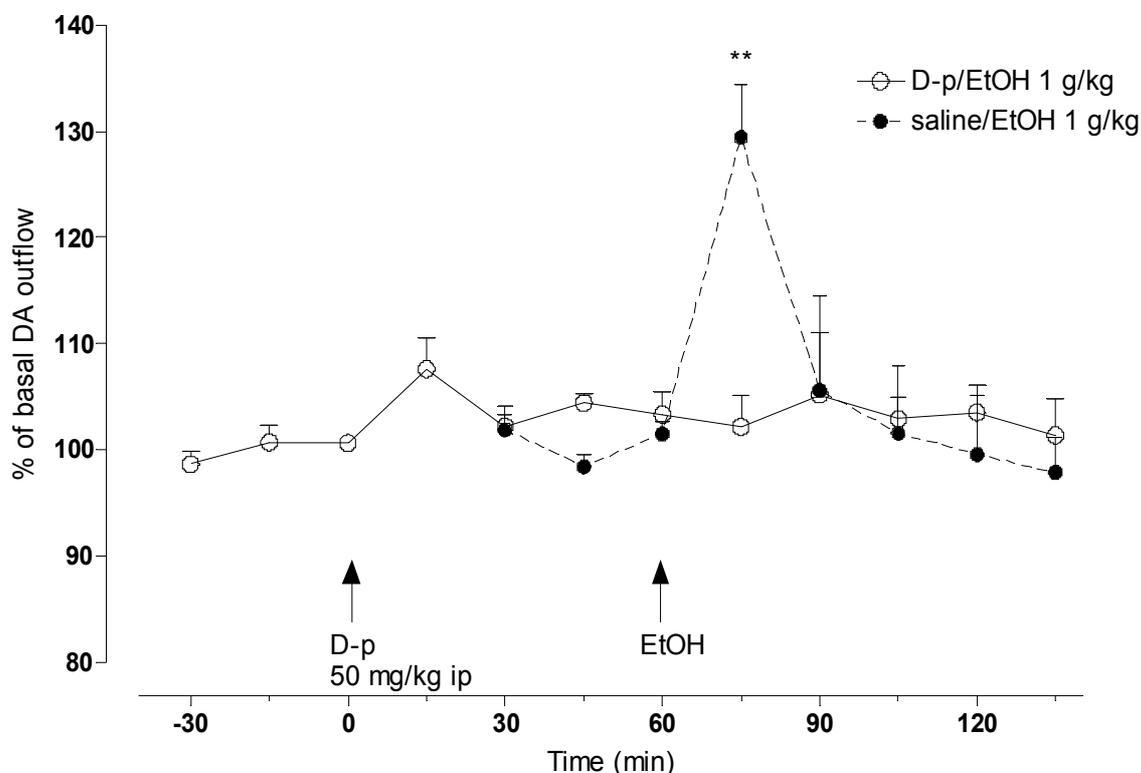


Figura 8: Effetti della somministrazione intragastrica di EtOH (1g/kg) sul release della DA nel NAcbs di ratto pre-trattato con D-P 50mg/kg). I dati sono espressi come media percentuale di variazione \pm SEM rispetto ai valori della linea di base. Le differenze significative, rispetto ai valori della linea di base, sono indicate da* (**: $P<0.01$; *: $P<0.05$); one-way ANOVA per misure ripetute, seguito da Dunnett's test quando necessario. Le frecce indicano i tempi della somministrazioni intraperitoneale ed intragastrica.

Nella fig.8 sono mostrati gli effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del nucleus accumbens in seguito a somministrazione di etanolo in ratti pre-trattati con d-penicillamina. Il pre-trattamento con d-penicillamina alla concentrazione di 50 mg/kg, effettuato 1 ora prima della somministrazione intragastrica di etanolo, alla concentrazione di 1g/kg, previene il rilascio di DA nel NAcbs ($[F(12,51)=1.142$; $P>0.05$], one-way ANOVA per misure ripetute; $n=4$). Tale dato è osservabile rispetto al gruppo di controllo trattato con salina somministrata 1 ora prima della somministrazione di etanolo 1g/kg.

4.8. Effetti della variazione dei livelli di DA nella shell del *nucleus accumbens* in seguito a somministrazione di morfina, e morfina in ratti pre-trattati con d-penicillamina

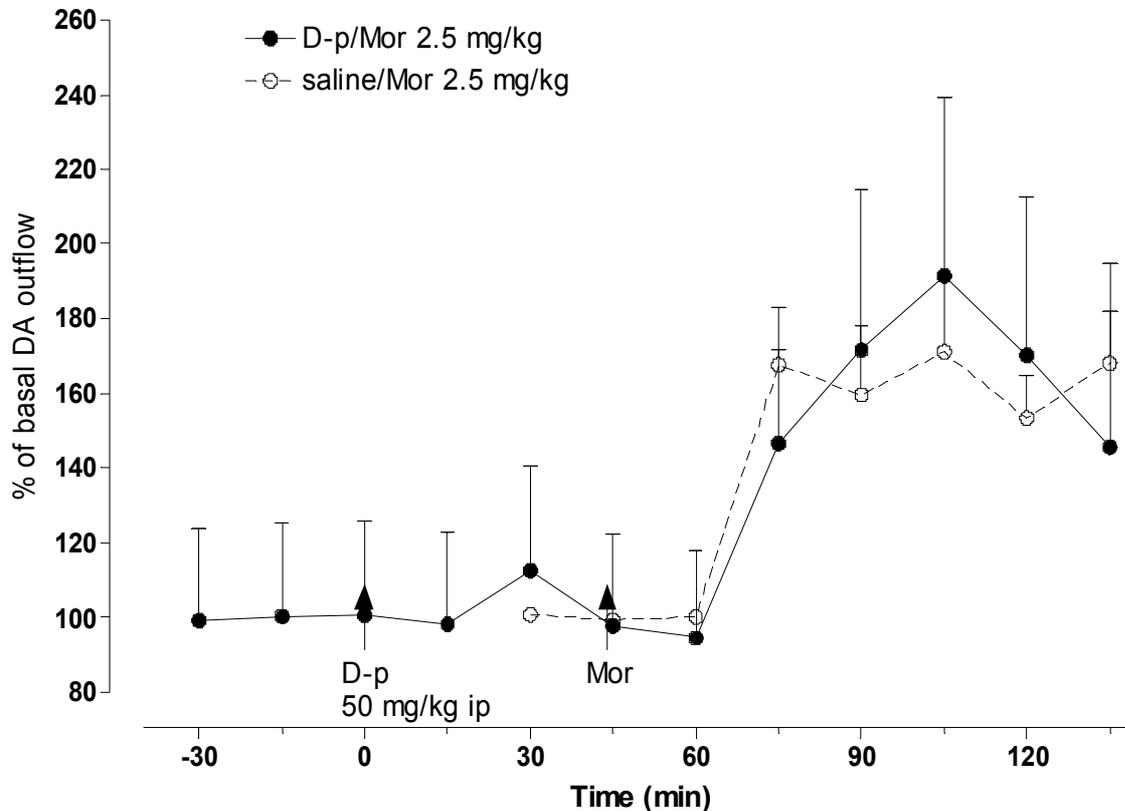


Figura 9: Effetti della somministrazione intraperitoneo di morfina (Mor (2.5mg/kg) sul release della DA nel NAcbs di ratto pre-trattato con d-penicillamina(D-P, 50mg/kg). I dati sono espressi come media percentuale di variazione \pm SEM rispetto ai valori della linea di base. Le differenze significative, rispetto ai valori della linea di base, sono indicate da* (**: $P<0.01$; *: $P<0.05$); one-way ANOVA per misure ripetute, seguito da Dunnett's test quando necessario. Le frecce indicano i tempi della somministrazioni intraperitoneali.

La fig.9 mostra l'inefficacia del pre-trattamento con d-penicillamina, alla concentrazione di 50 mg/kg effettuato 1 ora prima della somministrazione intraperitoneo di morfina cloridrato, alla concentrazione di 2.5 mg/kg. La morfina infatti, sia nel gruppo salina/morfina, sia in quello d-penicillamina morfina, è capace di innalzare in maniera statisticamente significativa i livelli di DA nella shell del NAcbs ($[F(8,35)=5.910, P<0.0001]$, one-way ANOVA per misure ripetute seguito da Dunnett's post hoc test; $n=4, 184.91\pm 19.67\%$ dalla linea di base, $P<0.01$).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel nostro studio, è stata usata la tecnica della microdialisi *in vivo* per misurare i livelli extracellulari di dopamina nella *shell* del *nucleus accumbens* nel ratto freely moving in risposta all'acetaldeide per se e derivata dal metabolismo dell'etanolo.

I nostri risultati, in considerazione della relazione tra le proprietà di rinforzo dei farmaci d'abuso e la loro capacità di aumentare le concentrazioni di dopamina nel *nucleus accumbens* (Di Chiara e Bassareo, 2007; Nestler 2005; Di Chiara 2004), supportano l'idea che l'acetaldeide possa giocare un ruolo chiave nelle proprietà di rinforzo dell'etanolo. Si è osservato infatti che somministrazioni acute di etanolo e di acetaldeide innalzano le concentrazioni della DA nella *shell* del *nucleus accumbens*. In particolare, gli effetti stimolanti dell'acetaldeide sul sistema mesolimbico dopaminergico sono evidenti in seguito a somministrazione intragastrica ed a perfusione locale nell'area ventrale del tegmento. Inoltre, tali effetti, mediati sia dall'etanolo sia dall'acetaldeide sono annullati quando i livelli ematici di acetaldeide sono ridotti per inibizione competitiva dell'ADH ad opera del 4-MP (Peano et al., in press, Sarkola et al., 2002) o in seguito al sequestro dell'acetaldeide con la dipenicillamina (Yusof et al., 2000; Nagasawa et al., 1998).

I nostri risultati mostrano che somministrazioni intragastriche di etanolo alla dose di 1g/kg inducono un significativo aumento dei livelli di DA nel NAcbs fino a 129.4% rispetto ai valori di base. Risultati simili sono riportati in letteratura sul rilascio di DA nel NAcbs di ratto in seguito a somministrazione di EtOH, sebbene tali studi utilizzino generalmente vie di somministrazioni diverse (Rada et al., 2004; Di Chiara et al., 1985; Gessa et al 1985). Nell'uomo e nei roditori, l'attivazione specifica e non contingente del sistema mesolimbico dopaminergico è una proprietà che accomuna le sostanze d'abuso (Nestler 2005; Di Chiara et al., 2004; Volkow et al., 2002), ed è strettamente messa in relazione al meccanismo che sottende le proprietà di rinforzo dell'EtOH (Tupala e Tiihonen, 2004; Di Chiara et al., 1996, Di Chiara et al., 1985). In accordo con ciò, recenti risultati (Melis et al., in press; Peano et al., in press) dimostrano che la somministrazione intragastrica di EtOH (1g/kg) induce nel ratto *place preference*, importante modello utilizzato per attestare le proprietà

motivazionali dei farmaci d'abuso. E' inoltre interessante notare che anche nell'uomo è stato osservato con l'utilizzo della tomografia ad emissione di positroni (Boileau et al., 2003) un effetto dell'EtOH sul NAcbs qualitativamente simile, in seguito a somministrazione orale di 1ml/kg di EtOH 95%. Nonostante i dati sperimentali in sostegno del ruolo cruciale del sistema dopaminergico nelle proprietà di rinforzo dell'EtOH, i farmaci dopaminergici sono risultati inefficaci nel trattamento dell'alcolismo, indicando che la dipendenza da etanolo è un fenomeno ben più complesso, che coinvolge molti altri sistemi neurotrasmettitoriali (Tambour e Quertemont, 2007).

Somministrazioni intragastriche di 0.5g/kg non determinano invece alcun effetto misurabile, mentre la somministrazione di 2g/kg di EtOH induce un incremento non significativo. Anche questi risultati sono in linea con la letteratura che descrive un effetto dell'etanolo sul release della DA nel NAcbs bifasico e dose-correlato, (Blanchard et al., 1993; Wozniak et al., 1991). Il fatto che adeguate quantità di etanolo abbiano la capacità di stimolare il sistema mesolimbico dopaminergico, sia nel ratto sia nell'uomo, è un fenomeno ben conosciuto e comunemente ascritto alle proprietà dell'etanolo di per se. Pertanto, è di particolare interesse notare nei nostri risultati che, nonostante somministrazione di dosi di etanolo (1 g/kg), capaci di determinare aumenti del *release* della DA nel NAcbs, in ratti pre-trattati con 4-MP non si osservi tale fenomeno. Il nostro dato neurochimico risulta in accordo con recenti risultati di *place preference* (Peana et al., in press; Melis et al., in press) in cui rispettivamente il pre-trattamento con 4-MP previene lo sviluppo della *place preference* in ratti a cui è stato somministrato etanolo (1 g/kg) per via intragastrica. Inoltre tale risultato è in linea con precedenti studi di elettrofisiologia (Foddai et al., 2004) in cui si è osservato che il pre-trattamento con 4-MP riduce l'attività neuronale della VTA indotta da etanolo. Inoltre, ben supporta l'ipotesi che la conversione dell'EtOH ad ACD sia un passaggio critico per osservare un aumento della trasmissione dopaminergica nel sistema mesolimbico in seguito a somministrazioni di etanolo.

Partendo da queste osservazioni, abbiamo deciso di somministrare l'acetaldeide per via intragastrica per studiarne i suoi effetti sul sistema mesolimbico dopaminergico. L'osservazione che l'acetaldeide somministrata a livello periferico possa arrivare al cervello è ancora argomento controverso (Dietrich, 2004). Tuttavia, molti studi dimostrano che l'ACD somministrata sistemicamente in quantità adeguate può saturare l'ALDH epatico ed endoteliale (Hoover e Brien, 1981; Ward et al., 1997) e attraversando la barriera ematoencefalica agire a livello centrale.

In particolare, le dosi di ACD utilizzate nei nostri esperimenti (10, 20, e 40mg/kg) sono nel range di concentrazione capace di indurre nel ratto *stimulus preference* condizionato dopo somministrazione i.p. (Quertemont e De Witte 2001) e *place preference* condizionata in seguito a somministrazione i.g. (Peana et al., 2008).

Dai nostri risultati si osserva che la somministrazione di acetaldeide (20 mg/kg) per via intragastrica innalza significativamente i livelli di DA nel NAcbs. Tale dato è di particolare interesse, soprattutto quando si consideri che gli effetti dell'etanolo (1 g/kg) sono osservabili usando una dose 50 volte più alta rispetto a quella di acetaldeide necessaria ad indurre effetti quantitativamente simili sul *release* della DA nel NAcbs. In stretta analogia ai dati relativi alla somministrazione di etanolo, le dosi più bassa e più alta di ACD (10 e 40 mg/kg rispettivamente) non sono in grado di incrementare i livelli extracellulari di DA nel NAcbs. Inoltre tale effetto bifasico e dose-dipendente, dell'ACD è coerente con i risultati descritti in letteratura per la self-administration nella VTA posteriore in ratti alcohol-preferring (Rodd-Henricks et al., 2002). Tuttavia, le nostre osservazioni risultano in contrasto con l'unico studio pubblicato condotto con la tecnica della microdialisi *in vivo*, in cui viene riportato un decremento nei livelli di DA nel *nucleus accumbens* in seguito a somministrazione di ACD (20 e 100 mg/kg) (Ward et al., 1997). Il vero motivo di tale discrepanza è ancora sconosciuto e la causa di tale divergenza potrebbe essere attribuibile alle differenti tecniche e procedure. Infatti, il differente protocollo anestesiológico, il periodo successivo alla chirurgia, la composizione della soluzione di Ringer, l'uso della *guide-cannula*, le caratteristiche fisiche del probe da dialisi e la differente via di somministrazione potrebbero influire sulla penetrazione e la distribuzione dell'ACD

nel tessuto cerebrale, spiegando in tal modo questo risultato discordante. È utile tener presente che lo studio di Ward che parla di diminuzione dei livelli di DA nel *nucleus accumbens* dopo somministrazione di ACD, è in disaccordo con tutta la letteratura simile che riporta un incremento dei livelli di DA nel NAcbs sia in seguito ad uno stimolo sia avversivo sia piacevole (Schultz, 2007; Salamone 2005; Pezze e Feldon, 2004; Horvitz, 2000). In realtà è stato suggerito che una diminuzione transitoria (inferiore a 5 minuti) di DA dovuta allo stimolo avversivo, potrebbe essere nascosta dai tempi di campionamento (15 minuti) (Di Chiara, 2002), ma un recente studio, in cui si utilizza un tempo di campionamento di solo un minuto non supporta tale ipotesi (Young, 2004). D'altro canto, è stato riportato da vari autori come le due parti del *nucleus accumbens*, *shell* e *core*, sono diversamente coinvolte nella risposta agli stimoli ambientali e spesso rispondono in maniera opposta a stimoli piacevoli o avversivi (Levita et al., 2002; Di Chiara, 2002,). Per cui, una buona spiegazione per spiegare la discrepanza di risultati relativi alla somministrazione di ACD potrebbe essere da ricercare nella eterogeneità anatomica e funzionale del *nucleus accumbens*. Coerentemente con precedenti dati *in vitro* ed *in vivo*, la somministrazione di ACD tramite dialisi inversa aumenta il rilascio di DA nel NAcbs del ratto in maniera dose-dipendente. E' qui necessario enfatizzare che tali risultati hanno un significato più qualitativo che quantitativo a causa di limitazioni intrinseche alla tecnica utilizzata. Infatti, la perfusione di ACD in specifiche aree cerebrali tramite dialisi inversa è utile per studiare effetti locali senza che il farmaco influenzi l'intero encefalo. E' importante però considerare che alcune variabili non specifiche come le caratteristiche fisiche della membrana da dialisi, e lo stato fisiologico del tessuto circostante il probe, non permettono di conoscere la concentrazione esatta di ACD somministrata ne la sua area di diffusione.

Tuttavia, i nostri dati hanno particolare rilevanza se paragonati a quelli ottenuti in seguito ad auto-somministrazione nella VTA posteriore di ratti alcohol-preferring (Rodd-Henricks et al., 2002) e ai risultati ottenuti con tecniche di elettrofisiologia *in vivo* ed *in vitro* sul firing dei neuroni dopaminergici della VTA (Melis et al., Foddai et al., 2004). I nostri risultati nel ratto freely moving, avvalorano queste osservazioni

in quanto assegnano alla DA nel NAcbs un ruolo chiave nei processi neurobiologici che coinvolgono sia l'abuso di farmaci sia agenti di rinforzo naturali.

Come riportato in letteratura l'inibizione della catalasi previene l'effetto di locomozione mediato dall'etanolo in seguito a somministrazione locale nella *substantia nigra*, ed invece aumenta quello mediato dall'ACD, mimando gli effetti dell'etanolo ed assegnando all'ACD prodotta dalla catalasi un ruolo chiave nell'attività motoria indotta dall'EtOH. (Arizzi-La France et al., 2006). Risultati simili sono stati ottenuti recentemente con la tecnica del *patch clamp*. Le proprietà stimolanti dell'EtOH sui neuroni dopaminergici della VTA sono mediate attraverso le modificazioni di due correnti ioniche: riduzione della I_A e attivazione della corrente I_h . Tali modificazioni sono prevenute da un blocco farmacologico della catalasi (Melis et al., in press).

Come precedentemente discusso, i nostri dati dimostrano che il blocco nella sintesi della ACD per azione del 4-MP sull'enzima ADH, modifica la stimolazione indotta da EtOH sul sistema dopaminergico mesolimbico. Questo risultato suggerisce che la trasformazione dell'EtOH ad ACD rappresenta lo stadio cruciale del suo metabolismo. Però a causa dell'accumulo di EtOH dovuto al blocco del suo metabolismo non si può escludere a priori la possibilità che un accumulo di EtOH conseguente al blocco dell'ADH sia in grado di interferire con la normale funzionalità del sistema dopaminergico mesolimbico.

Data la capacità della d-penicillamina di ridurre *in vivo* i livelli ematici di ACD senza interferire nel metabolismo fisiologico dell'EtOH (Serrano et al., 2007), abbiamo quindi deciso di pre-trattare gli animali con dpn prima della somministrazione di EtOH e ACD. In entrambi i casi, l'azione selettiva sull'ACD dell'agente sequestrante dpn previene l'aumento del *release* della DA nel NAcbs indotto dalle due sostanze. La specificità di tale effetto, è confermata dal risultato che il pre-trattamento con dpn non influenza la stimolazione indotta dalla morfina sul sistema dopaminergico mesolimbico (Pontieri et al., 1995). Queste osservazioni sono in accordo con precedenti dati in letteratura, in cui è riportato che la dpn è capace di prevenire la stimolazione comportamentale indotta da etanolo, di ridurre l'assunzione

volontaria nel ratto (Font et al., 2005; Font et al., 2006b) e la *place preference* condizionata nel topo (Font et al., 2006). Inoltre, il pre-trattamento con dpn previene la *place preference* condizionata indotta da EtOH e ACD somministrati per via intragastrica (Peano et al., in press). Sebbene i modelli comportamentali siano un metodo affidabile per testare le proprietà di rinforzo delle sostanze d'abuso, la mancanza di evidenze neurochimiche non permette di attribuire al sequestro dell'ACD gli effetti osservati, a causa delle altre proprietà farmacologiche della d-pen e delle loro possibili conseguenze (Spanagel et al., 2002; Felisch et al., 1998). Dai nostri dati è possibile quindi attribuire con certezza al blocco della sintesi dell'ACD per azione del 4-MP la mancanza di effetti dell'EtOH sul sistema dopaminergico mesolimbico.

In conclusione, tutto ciò supporta bene l'ipotesi che l'acetaldeide abbia un ruolo chiave nel mediare le proprietà euforizzanti e di rinforzo positivo dell'etanolo ingerito. Più in particolare, il metabolismo dell'EtOH ad ACD potrebbe essere il composto chiave per l'espressione delle proprietà di rinforzo dell'EtOH. L'effetto della somministrazione intragastrica sui livelli di DA supporta l'ipotesi che alte concentrazioni ematiche di ACD derivate dal metabolismo periferico dell'EtOH possono saturare la barriera ematoencefalica e giungere al cervello, potenziando l'azione dell'ACD ivi prodotta tramite il sistema enzimatico della catalasi. Alla luce di questi dati, si può attribuire all'ACD contenuta naturalmente nel vino e nelle altre bevande alcoliche un ruolo diverso dall'essere semplicemente una fragranza (Genovese et al. 2005). Infatti, l'ACD ingerita con le bevande alcoliche può arrivare al SNC e partecipare attivamente agli effetti motivazionali e di rinforzo dell'EtOH.

Penso che sono necessari ulteriori studi in tale direzione. In particolare, anche se dai nostri dati non si evince un meccanismo di azione, è importante dire che la variazione delle concentrazioni dell'ACD derivata dall'EtOH che può essere effettuata riducendone la sua sintesi o utilizzando l'agente sequestrante d-penicillamina, può esercitare una profonda influenza sulle proprietà euforizzanti e sullo stimolo discriminativo dell'etanolo. Tale fenomeno diminuendo gli effetti di rinforzo

associati all'abuso di alcol potrebbe in campo terapeutico aprire la strada allo sviluppo di terapie innovative dell'alcolismo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Agarwal D.P., Goedde H.W. Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism. *Pharmacogenetic* 1992; 2:48-62.
2. Agarwal D.P. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol Biol* 2001; 49:703-9.
3. Aragon C.M.G., Spivak K. and Amit Z., Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced open-field activity: evidence for brain catalase mediation of ethanol's effects, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1989; **13** :104–108.
4. Aragon C.M.G., Spivak K. and Amit Z., Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced narcosis, lethality and hypothermia in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991; **39**:55–59.
5. Arizzi M.N., Correa M., Betz A.J., Wisniecki A. and Salamone J.D., Behavioral effects of intraventricular injections of low doses of ethanol, acetaldehyde, and acetate in rats: studies with low and high rate operant schedules, *Behav. Brain Res.* 2003; 147: 203–210
6. Arizzi-LaFrance MN, Correa M, Aragon CM, Salamone JD. Motor stimulant effects of ethanol injected into the substantia nigra pars reticulata: importance of catalase-mediated metabolism and the role of acetaldehyde. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31(5):997-1008
7. Babbini M, Gaiardi M. Le proprietà di stimolo dei farmaci: la farmacologia della gratificazione e dell'avversione. In: P. Nencini il controllo farmacologico del comportamento. 1992 Ed UTET.
8. Barbaccia M.L., Bosio A., Spano S.P. and Trabucchi M., Ethanol metabolism and striatal dopamine turnover, *J. Neural. Transm.* 1982; **53** :169–177
9. Behar K, Rothman D, Peterson K, et al. Preliminary evidence of reduced cortical GABA levels in localized 1H NMR spectra of alcohol dependent and hepatic encephalopathy patients. *Am J Psychiatry* 1999; 156:952-954.
10. Blanchard BA, Steindorf S, Wang S, Glick SD. Sex differences in ethanol-induced dopamine release in nucleus accumbens and in ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17(5):968-73.
11. Boileau I, Assaad JM, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M, Diksic M, Tremblay RE, Dagher A. Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse* 2003; 49(4):226-31.
12. Bonci A., Bernardi G., Grillner P. and Mercuri N.B., The dopamine-containing neuron: maestro or simple musician in the orchestra of addiction?, *Trends Pharmacol. Sci.* 2003;**24** :172–177
13. Bowers BJ, Henry MB, Thielen RJ, McBride WJ. Serotonin 5-HT(2) receptor stimulation of dopamine release in the posterior but not anterior nucleus accumbens of the rat. *J Neurochem.* 2000;75(4):1625-33.

14. Brodie MS, Shefner SA, Dunwiddie TV. Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Res* 1990 29;508(1):65-9.
15. Brown ZW, Amit Z, Rockman. Intraventricular self-administration of acetaldehyde, but not ethanol, in naive laboratory rats. *Psychopharmacology* 1979(Berl) 64(3):271-6.
16. Campbell AD, McBride WJ. Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995; 51(4): 835-42.
17. Carboni E., Imperato A., Perezzi L. and Di Chiara G., Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats, *Neuroscience* 1989; **28**:653–661
18. Chen F, Lawrence AJ. Effect of chronic ethanol and withdrawal on the mu-opioid receptor and 5-Hydroxytryptamine(1A) receptor-stimulated binding of [(35S)]Guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate in the fawn-hooded rat brain: A quantitative autoradiography study. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 ;293(1):159-65.
19. Ceccanti M. et al. *Consensus Conference Italiana sull'alcolismo*. Ed. Scientific Press (Firenze) 1994.
20. Ciccocioppo R, Martin-Fardon R, Weiss F. Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(3):391-9
21. Correa M., Miquel M., Sanchis-Segura C. and Aragon C.M.G., Effects of chronic lead administration on ethanol-induced locomotor and brain catalase activity, *Alcohol* 1999; 19:43–49.
22. Correa M., Roig-Navarro A.F. And Aragon C.M. , Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice, *Life Sci.* 2003; **74** :2009–2021.
23. Davis VE, Walsh MJ. Alcohol, amines, and alkaloids: a possible biochemical basis for alcohol addiction. *Science*. 1970;167(920):1005-7
24. Deitrich RA. Acetaldehyde: deja vu du jour. *J Stud Alcohol*, 2004, 65(5):557-72.
25. Diamond I., Nagy L., Mochly-Rosen D., and Gordon A. The role of adenosine transport in ethanol- induced cellular tolerance and dependence. Possible biologic and genetic markers of alcoholism. *Ann.N.Y. Acad.Sci* 1991, 625:473-487.
26. Diana M., Pistis M., Carboni E., Gessa G.L. and Rossetti Z.L., Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;**90**:7966–7969
27. Di Chiara G. and Imperato A., Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; **85**:5274–5278.

28. Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 2002; 137(1-2):75-114.
29. Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 2004; 47 Suppl 1:227-41.
30. Di Chiara G, Bassareo V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7(1):69-76.
31. Dudek B.C. and Fuller J.L., Task-dependent genetic influences on behavioral response of mice (*mus musculus*) to acetaldehyde, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1978; **92**:749–758
32. Dudek B.C., Abbott M.E. and Phillips T.J. Stimulant and depressant properties of sedative-hypnotics in mice selectively bred for differential sensitivity to ethanol, *Psychopharmacology* 1984; 82: 46–51
33. Djouma E, Lawrence AJ. The effect of chronic ethanol consumption and withdrawal on mu-opioid and dopamine D(1) and D(2) receptor density in Fawn-Hooded rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(2):551-9.
34. Escarabajal M.D. and Aragon C.M., The effect of cyanamide and 4-methylpyrazole on the ethanol-induced locomotor activity in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; **72** :389–395.
35. Escarabajal M.D. And Aragon C.M., Concurrent administration of diethyldithiocarbamate and 4-methylpyrazole enhances ethanol-induced locomotor activity: the role of brain ALDH, *Psychopharmacology* 2002; **160** :339–343.
36. Fadda F, Garau B, Marchei F, Colombo G, Gessa GL. MDL 72222, a selective 5-HT₃ receptor antagonist, suppresses voluntary ethanol consumption in alcohol-preferring rats *Alcohol Alcohol* 1991;26(2):107-10.
37. Fahlke C, Hansen S, Engel JA, Hard E. Effects of ventral striatal 6-OHDA lesions or amphetamine sensitization on ethanol consumption in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;47(2):345-9.
38. Feelisch M (1998) The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358(1):113-22.
39. Foddai M, Dosia G, Spiga S, Diana M. Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29(3):530-6.
40. Font L, Miquel M, Aragon CM (2005) Prevention of ethanol-induced behavioral stimulation by D-penicillamine: a sequestration agent for acetaldehyde. *Alcohol Clin Exp Res* 29(7):1156-64.
41. Font L, Aragon CM, Miquel M. Ethanol-induced conditioned place preference, but not aversion, is blocked by treatment with D -penicillamine, an inactivation agent for acetaldehyde. *Psychopharmacology* 2006(Berl); 184(1):56-64.

42. Font L, Aragon CM, Miquel M. Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by d-penicillamine. *Behav Brain Res* 2006; 171(1):78-86.
43. Gianoulakis C., Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse, *Curr. Top. Med. Chem.* 2004; 4:39–50
44. Genovese A, Dimaggio R, Lisanti MT, Piombino P, Moio L. Aroma composition of red wines by different extraction methods and Gas Chromatography-SIM/MASS spectrometry analysis. *Ann Chim* 2005; 95(6):383-94.
45. Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 1985 25;348(1):201-3.
46. Gonzales RA, Weiss F. Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 1998; 18(24): 10663 10671.
47. Grant K.A., Lovinger D.M. Cellular and behavioral neurobiology of alcohol: receptor-mediated neuronal processes. *Clin Neurosci* 1995; 3:155-164
48. Gulya K., Grant K.A., Valverius P., Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res* 1991; 547:129-134.
49. Heinz A, Lichtenberg-Kraag B, Baum SS, Graf K, Kruger F, Dettling M, Rommelspacher H. Evidence for prolonged recovery of dopaminergic transmission after detoxification in alcoholics with poor treatment outcome. *J Neural Transm Gen.* 1995;102(2):149-57.
50. Herz A. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology* 1997;129(2):99-111
51. Holtzman S.G. and Schneider F.H., Comparison of acetaldehyde and ethanol: depression of motor activity in mice, *Life Sci.* 1974; 14:1243–1250
52. Hoover DJ, Brien JF. Acetaldehyde concentration in rat blood and brain during the calcium carbimide-ethanol interaction. *Can J Physiol Pharmacol* 1981; 59(1):65-70.
53. Horvitz JC. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 2000; 96(4):651-6.
54. Hyytia P, Kiiianmaa K. Suppression of ethanol responding by centrally administered CTOP and naltrindole in AA and Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001; 25(1):25-33.
55. Ikemoto S, McBride WJ, Murphy JM , Lumeng L, Li TK. 6-OHDA-lesions of the nucleus accumbens disrupt the acquisition but not the maintenance of ethanol consumption in the alcohol-preferring P line of rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21(6): 1042 1046.
56. Imperato A. and Di Chiara G., Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; 239:219–228.

57. Jamal M., Ameno K., Kumihashi M., Ameno S., Kubota T., Wang W. and Ijiri I., Microdialysis for the determination of acetaldehyde and ethanol concentrations in the striatum of freely moving rats, *J. Chromatogr. B* 2003; **798** :155–158
58. Johanson C.E. Modelli animali di farmacodipendenza: gli studi di autosomministrazione. In: P. Nencini il controllo farmacologico del comportamento. 1992 Ed UTET.
59. Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Zanca NA, Velazquez M. Ondansetron reduces the craving of biologically predisposed alcoholics. *Psychopharmacology* 2002;160(4):408-13.
60. Kranzler HR, Burleson JA, Del Boca FK, Babor TF, Korner P, Brown J, Bohn MJ. Buspirone treatment of anxious alcoholics. A placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry.* 1994;51(9):720-31.
61. Levita L, Dalley JW, Robbins TW. Nucleus accumbens dopamine and learned fear revisited: a review and some new findings. *Behav Brain Res* 2002; 137(1-2):115-27.
62. Lheureux P, Askenasi R. Efficacy of flumazenil in acute alcohol intoxication: double-blind placebo-controlled evaluation. *Hum Exp Toxicol* 1991; 10: 235-239
63. Maisto SA, Connors GJ, Zywiak WH. Alcohol treatment, changes in coping skills, self-efficacy, and levels of alcohol use and related problems 1 year following treatment initiation. *Psychol Addict Behav.* 2000;14(3):257-66.
64. Medicamenta (1991-1992) Vol. 1. Parte generale, pag. 814-815. Tab. 18-19. Cooperativa Farmaceutica Milanese, Milan, Italy.
65. Myers R.D., Veale W.L. Alcohol preference in the rat: reduction following depletion of brain serotonin. *Science* 1968;160:1469-1471
66. Nagasawa HT, Goon DJ, DeMaster EG. 2,5,5-Trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a D(-)-penicillamine-directed pseudometabolite of ethanol. Detoxication mechanism for acetaldehyde. *J Med Chem* 1978; 21(12):1274-9.
67. Nestler EJ Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 2005; 8(11):1445-9.
68. O'Malley SS, Jaffe AJ, Chang G, Schottenfeld RS, Meyer RE, Rounsaville B. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 1992;49(11):881-7.
69. Ortiz A., Griffiths P.J. and Littleton J.M. A comparison of the effects of chronic administration of ethanol and acetaldehyde to mice: evidence for a role of acetaldehyde in ethanol dependence *J. Pharm. Pharmacol.* 1974; 26: 249–260.
70. Paxinos G, C. W (2006) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sixth Edition ed. Elsevier Academic Press.

71. Pezze MA, Feldon J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog Neurobiol* 2004; 74(5):301-20.
72. Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. 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* 1995; 92(26):12304-8.
73. Potokar J., Coupland N., Glue P, et al., Flumazenil in alcohol withdrawal: a double-blind placebo-controlled study. *Alcohol Alcohol* 1997; 32:605-611
74. Quertemont E, De Witte P. Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 68(3):449-54.
75. Quertemont E. and Grant K.A., Role of acetaldehyde in the discriminative stimulus effects of ethanol, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2002; 26: 812–817
76. Quertemont E. Discriminative stimulus effects of ethanol with a conditioned taste aversion procedure: lack of acetaldehyde substitution, *Behav. Pharmacol.* 2003; 14: 343–350.
77. Quertemont E., Tambour S., Bernaerts P., Zimatkin S.M. and Tirelli E., Behavioral characterization of acetaldehyde in C57BL/6J mice: locomotor, hypnotic, anxiolytic and amnesic effects, *Psychopharmacology* 2004; **177**: 84–92.
78. Quertemont E, Eriksson CJ, Zimatkin SM, Pronko PS, Diana M, Pisano M, Rodd ZA, Bell RR, Ward RJ. Is ethanol a pro-drug? Acetaldehyde contribution to brain ethanol effects. *Alcohol Clin Exp Res*; 2005;29(8):1514-21.
79. Quertemont E, Grant KA, Correa M, Arizzi MN, Salamone JD, Tambour S, Aragon CM, McBride WJ, Rodd ZA, Goldstein A, Zaffaroni A, Li TK, Pisano M, Diana M The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29(2):221-34.
80. Quertemont E, Tambour S, Tirelli E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol* 2005;75(4):247-74.
81. Rada P, Johnson DF, Lewis MJ, Hoebel BG. In alcohol-treated rats, naloxone decreases extracellular dopamine and increases acetylcholine in the nucleus accumbens: evidence of opioid withdrawal. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 79(4):599-605.
82. Redila V.A., Smith B.R. and Amit Z. The effects of aminotriazole and acetaldehyde on an ethanol drug discrimination with a conditioned taste aversion procedure, *Alcohol* 2000; 21: 279–285.
83. Redila V.A., Aliatas E., Smith B.R. and Amit Z., Effects of ethanol on an acetaldehyde drug discrimination with a conditioned taste aversion procedure, *Alcohol* 2002; **28** :103–109.
84. Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Edmundson VE, Dagon CL, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. Effects of 5-HT(3) receptor antagonists on daily alcohol intake under

- acquisition, maintenance, and relapse conditions in alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol*. 2000; 21(1):73-85.
85. Rodd-Henricks ZA, Melendez RI, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Li TK (2002) The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72(1-2):55-64.
86. Rossetti ZL, Isola D, De Vry J, Fadda F. Effects of nimodipine on extracellular dopamine levels in the rat nucleus accumbens in ethanol withdrawal. *Neuropharmacology* 1999 ;38(9):1361-9.
87. Rothblat DS, Rubin E, Schneider JS. Effects of chronic alcohol ingestion on the mesostriatal dopamine system in the rat. *Neurosci Lett*. 2001; 300(2):63-6.
88. Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM (2005) Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5(1):34-41.
89. Salloum IM, Cornelius JR, Daley DC, Kirisci L, Himmelhoch JM, Thase ME. Efficacy of valproate maintenance in patients with bipolar disorder and alcoholism: a double-blind placebo-controlled study. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62(1):37-45.
90. Sarkola T, Iles MR, Kohlenberg-Mueller K, Eriksson CJ. Ethanol, acetaldehyde, acetate, and lactate levels after alcohol intake in white men and women: effect of 4-methylpyrazole. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26(2):239-45.
91. Schuckit M.A. Advances in understanding the vulnerability to alcoholism. In, *Addictive States*. Raven press, New York, 1992,pp 93-108
92. Schultz W. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* 2007; 30(5):203-10.
93. Serrano E, Pozo OJ, Beltran J, Hernandez F, Font L, Miquel M, Aragon CM . Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of (4S,2RS)-2,5,5-trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a stable adduct formed between D-(-)-penicillamine and acetaldehyde (main biological metabolite of ethanol), in plasma, liver and brain rat tissues. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21(7):1221-9.
94. Smith B.R., Amit Z. and Splawinsky J., Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde, *Alcohol* 1984; 1:193–195.
95. Smith B.R. and Amit Z., The role of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the regulation of ethanol and acetaldehyde self-administration, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1985; 9: 759–763.
96. Spanagel R, Siegmund S, Cowen M, Schroff KC, Schumann G, Fiserova M, Sillaber I, Wellek S, Singer M, Putzke J (2002) The neuronal nitric oxide synthase gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol. *J Neurosci* 22(19):8676-83.

97. Stromberg MF, Volpicelli JR, O'Brien CP. Effects of naltrexone administered repeatedly across 30 or 60 days on ethanol consumption using a limited access procedure in the rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998 22(9):2186-91
98. Tabakoff B, Anderson R.A. and Ritzmann R.F., Brain acetaldehyde after ethanol administration, *Biochem. Pharmacol.* 1976, 25: 1305–1309.
99. Tambour S, Quertemont E. Preclinical and clinical pharmacology of alcohol dependence. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007; 21(1):9-28.
100. Tampier L. and Quintanilla M.E., Effects of acetaldehyde on acute tolerance and ethanol consumption in drinker and non drinker rats *J. Stud. Alcohol.* 2002; 63: 257–262.
101. Tampier L., Quintanilla M.E., Letelier C. and Mardones J., Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on narcosis time and lethality of ethanol in UchA rats, *Alcohol* 1998; 5:5–8.
102. Ticku M.K. and Kulkarni S.K., Molecular interactions of ethanol with GABAergic system and potential of RO15-4513 as an ethanol antagonist. *Pharmacol Biochem Behaviour*, 1988 .
103. Treistman S.N., Bayley H., Lemos J.R. Wang X.M., Nordman J.J., and Grant A.J. Effects of ethanol on calcium channels, potassium channel, and vasopressin release. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 1991, 625:249-263.
104. Trevisan L., Boutros N., Petrakis I. et al.; Complications of alcohol withdrawal: pathophysiological insights. *Alcohol Health Res World* 1998; 22:61-66
105. Tupala E, Tiihonen J. Dopamine and alcoholism: neurobiological basis of ethanol abuse. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28(8):1221-47.
106. Ulm RR, Volpicelli JR, Volpicelli LA. Opiates and alcohol self-administration in animals. *J Clin Psychiatry.* 1995; 56 Suppl 7:5-14
107. Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida M, O'Brien CP. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence *Arch Gen Psychiatry.* 1992;49(11):876-80.
108. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. Role of dopamine in drug reinforcement and addiction in humans: results from imaging studies. *Behav Pharmacol* 2002;13(5-6):355-66.
109. Wang J.Y., Wang J.Y., Wang Y. and Wang J.K., A comparison between acute exposures to ethanol and acetaldehyde on neurotoxicity, nitric oxide production and NMDA-induced excitotoxicity in primary cultures of cortical neurons, *Chin. J. Physiol.* 2000; 43:131–138.
110. Ward RJ, Colantuoni C, Dahchour A, Quertemont E, De Witte P. Acetaldehyde-induced changes in monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 1997; 36(2):225-32.
111. Wise R.A. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 2002; vol. 36: 229-240

112. Young AM. Increased extracellular dopamine in nucleus accumbens in response to unconditioned and conditioned aversive stimuli: studies using 1 min microdialysis in rats. *J Neurosci Methods* 2004; 138(1-2):57-63.
113. Wozniak KM, Pert A, Mele A, Linnoila M (1991) Focal application of alcohols elevates extracellular dopamine in rat brain: a microdialysis study. *Brain Res* 540(1-2):31-40.
114. Yoshimoto K, McBride WJ. Regulation of nucleus accumbens dopamine release by the dorsal raphe nucleus in the rat. *Neurochem Res.* 1992; 17(5): 401-7.
115. Yusof M, Neal R, Aykin N, Ercal N. High performance liquid chromatography analysis of D-penicillamine by derivatization with N-(1-pyrenyl)maleimide (NPM). *Biomed Chromatogr* 2000; 14(8):535-40.
116. Zimatkin S.M., Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS, *J. Neurochem.* 1991; 56:1–11