



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI

Facoltà di Farmacia

Dipartimento di Tossicologia

Dottorato di Ricerca in:

Farmacologia delle Tossicodipendenze

Settore Scientifico-Disciplinare: AREA 05 BIO/14

Coordinatore del Dottorato: Prof. Gaetano Di Chiara

Sensibilizzazione alla caffeina e
sensibilizzazione crociata all'amfetamina:
influenza della suscettibilità
individuale agli effetti della caffeina

Supervisore:

Prof.ssa Micaela Morelli

Tesi di Dottorato di:

Dr. Nicola Simola

XIX Ciclo
2003-2006

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Caratteristiche Farmacologiche e Tossicologiche della caffeina

3

CAPITOLO 2: ADENOSINA E RECETTORI ADENOSINERGICI

2.1 L'adenosina 9

2.2 I recettori per l'adenosina 11

2.3 Localizzazione cerebrale dei recettori per l'adenosina 14

CAPITOLO 3: INTERAZIONI ADENOSINA-DOPAMINA

E MECCANISMO DI AZIONE DELLA CAFFEINA

**3.1 Interazione tra recettori A_{2A} e recettori dopaminergici
nei gangli della base 17**

3.2 Meccanismi molecolari di azione della caffeina 20

CAPITOLO 4: POTENZIALE D'ABUSO DELLA CAFFEINA

ED INTERAZIONE TRA CAFFEINA E FARMACI D'ABUSO

**4.1 Definizione di farmacodipendenza e neuroanatomia
del fenomeno 25**

4.2 La caffeina è un farmaco d'abuso? 27

4.3 Interazioni tra caffeina e farmaci d'abuso 31

CAPITOLO 5: LA SENSIBILIZZAZIONE AGLI EFFETTI DEI

FARMACI

5.1 Definizione di sensibilizzazione e sue caratteristiche 34

CAPITOLO 6: SCOPO DELLA RICERCA	37
CAPITOLO 7: MATERIALI E METODI	
7.1 Animali	38
7.2 Misurazione dell'attività motoria e del comportamento stereotipato	38
7.3 Procedura sperimentale	40
7.4 Farmaci	41
7.5 Statistica	42
CAPITOLO 8: RISULTATI	
8.1 Effetto della somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina nella fase di induzione	44
8.2 Effetto della somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina sul comportamento motorio stimolato dal veicolo nella fase di espressione	46
8.3 Effetto della somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina sull'attivazione comportamentale stimolata dall'amfetamina nella fase di espressione	48
8.4 Effetto della suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina e dell'intensità della sensibilizzazione alla caffeina sulla stimolazione motoria indotta dall'amfetamina nella fase di espressione	50
CAPITOLO 9. DISCUSSIONE	54
BIBLIOGRAFIA	59

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Caratteristiche Farmacologiche e Tossicologiche della caffeina

La caffeina (1,3,7-trimetilxantina) è un alcaloide naturale derivato dalla xantina ed è contenuta in varie specie vegetali, tra cui le piante del genere *Coffea*, la pianta del the (*Thea Sinensis*), la pianta del cacao (*Theobroma Cacao*), le piante della cola (*Cola Spp.*), il guaranà (*Paulinnia cupana*) ed il matè (*Ilex paraguariensis*).

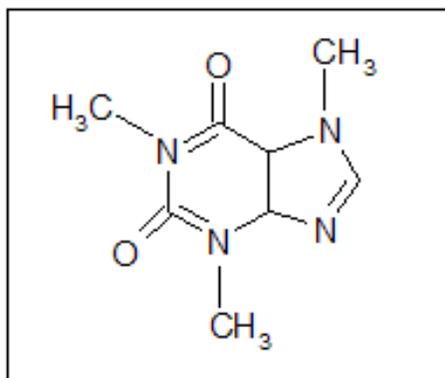


Fig. 1 Struttura chimica della caffeina e frutti di *Coffea arabica*

La caffeina è assunta comunemente attraverso differenti preparazioni di caffè o, soprattutto tra la popolazione giovane, attraverso bevande a base di cola. Inoltre, le modalità di assunzione della caffeina variano in base ai costumi del consumatore, in quanto nel Mondo Occidentale la sostanza è assunta principalmente attraverso il caffè e le bibite a base di cola, mentre in Africa la noce di cola consumata allo stato fresco ed il the rappresentano la principale fonte di caffeina.

La tabella seguente riporta una stima approssimativa del contenuto di caffeina in alcune bevande di largo consumo.

Table 2. Caffeine in Beverages (in 8 oz servings) (64)	
Beverage	Caffeine Content per Serving (range in milligrams)
Chocolate Milk	2 - 7
Cocoa beverage	3 - 22
Cola	
regular	20 - 40
caffeine free	0
Coffee	
brewed, drip method	65 - 120
instant	60 - 85
decaffeinated	2 - 4
Tea	
brewed, major U.S. brands	20 - 90
brewed, imported brands	25 - 110
instant	24 - 31
iced tea	9 - 50

Tab. 1 Contenuto medio di caffeina (in mg) in alcune bevande

La caffeina è bene assorbita per via orale e livelli significativi della sostanza si rinvencono nel plasma nei 30 minuti successivi alla sua assunzione, mentre il picco plasmatico si raggiunge dopo due ore dall'inizio dell'assorbimento, che si completa nell'arco di 90 minuti (Blanchard and Sawers, 1983). La caffeina ha un volume apparente di distribuzione (Vd) di circa 1.06 l/kg (Lelo et al., 1986), il che implica una sua ripartizione uniforme in tutta l'acqua corporea, tanto che la caffeina, dopo assorbimento completo, si ritrova in concentrazioni simili in tutti i distretti dell'organismo, compreso l'encefalo. La caffeina, inoltre, è in grado di attraversare liberamente la placenta e di pervenire al feto, nonché di accumularsi nel latte materno (Oo et al., 1995).

La caffeina subisce un esteso metabolismo epatico di primo passaggio, come dimostrato dal fatto che solamente il 10% del farmaco perviene ai reni senza aver subito modificazioni (Butler et al., 1989).

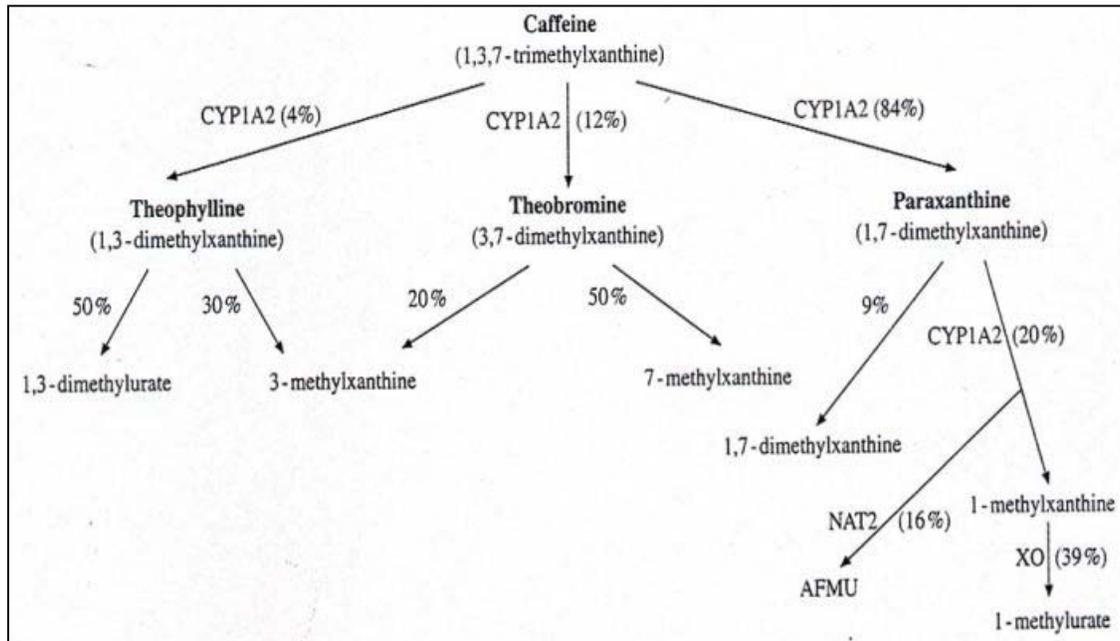


Fig. 2 Vie metaboliche della caffeina. La caffeina è convertita principalmente in teofillina, teobromina e paraxantina le quali subiscono a loro volta un'ulteriore trasformazione enzimatica per formare derivati monometilati della xantina o derivati dell'acido urico.

L'emivita plasmatica della caffeina è di circa 3-5 ore con valori variabili a seconda del soggetto considerato. Un elevato valore di emivita plasmatica è, infatti, riscontrabile nei bambini (Pons et al., 1988), verosimilmente a causa dello sviluppo incompleto degli enzimi metabolici epatici, e nelle donne in stato di gravidanza, dove esiste un equilibrio di distribuzione con il feto (Khanna and Somani, 1984). Al contrario, l'emivita plasmatica della caffeina è ridotta nei fumatori, poiché i prodotti di combustione del tabacco inducono gli enzimi epatici che metabolizzano le xantine (Zevin and Benowitz, 1999).

La caffeina è assunta principalmente in virtù delle sue proprietà psicostimolanti ed è indubbiamente la sostanza psicoattiva più consumata a livello mondiale. Gli effetti centrali della caffeina comprendono aumentata vigilanza, incremento della velocità di ideazione e dell'eloquio, diminuzione del senso di fatica e riduzione del sonno (Nehlig et al., 1992; Smith, 2002; Lorist and Tops, 2003). L'assunzione di caffeina può, inoltre, consentire uno sforzo intellettuale intenso e sostenuto per un lungo periodo, non accompagnato da compromissione delle abilità motorie (Lieberman et al., 2002). Tuttavia, la caffeina non sembra in grado di facilitare l'esecuzione di compiti che richiedono abilità fine e coordinazione muscolare (Gillingham et al., 2004). Gli effetti psicostimolanti della caffeina sono evidenti anche a basse dosi, mentre dosi crescenti possono indurre agitazione, ansia, insonnia e tremore fino, in caso di tossicità acuta, alle convulsioni refrattarie ai farmaci antiepilettici. (Smith, 2002; Kaufman and Sachdeo, 2003; Broderick and Benjamin, 2004; Morgan and Sethi, 2005).

Oltre al SNC, numerosi altri organi sono sensibili agli effetti delle xantine e della caffeina. Il muscolo liscio, soprattutto quello bronchiale, in cui sia stata preventivamente provocata costrizione va incontro a rilassamento in seguito a somministrazione di caffeina o teofillina (Watanabe et al., 1992; Banner and Page, 1995).

A livello del sistema cardiovascolare la caffeina e le altre xantine esercitano effetti che possono dipendere sia da un'azione diretta sul miocardio o sui vasi, sia da meccanismi neuromorali (Umemura et al., 2006). L'assunzione di modeste dosi di caffeina, sebbene generalmente ben tollerata, può causare leggeri aumenti di pressione, forse dovuti ad un aumento nel turnover della noradrenalina (Sung et al., 1990) mentre non è stata dimostrata in modo certo la capacità della caffeina di indurre aritmie cardiache in soggetti

che presentino difetti della conduzione atrio-ventricolare o foci ectopici (Frost and Vestergaard, 2005). La caffeina è in grado di migliorare la capacità di lavoro muscolare e la contrattilità del diaframma (Golgeli et al., 1995), un'azione che può risultare utile in caso di disturbi respiratori. Infine, le xantine presentano effetti diuretici dovuti ad un'azione a livello del tubulo renale (Gouyon and Guingard, 1987).

La dose letale di caffeina per un individuo di circa 70 kg di peso è compresa tra i 5 ed i 10 grammi e l'intossicazione mortale da caffeina è stata osservata molto raramente (Mrvos et al., 1989): per queste ragioni la sostanza è ritenuta relativamente sicura. Tuttavia, l'assunzione di dosi elevate di caffeina (500-1000 mg) può dare luogo alla sindrome definita come caffeinismo (Mackay and Rollins, 1989), comprendente sintomi centrali (ansia, insonnia, agitazione) e periferici (tachicardia, ipertensione, disturbi gastrointestinali). Inoltre, la caffeina sembra essere in grado di favorire l'insorgenza di attacchi di panico in soggetti predisposti (Bourin et al., 1995)

Dosi molto elevate di caffeina potrebbero potenzialmente indurre alterazioni dei cromosomi, in virtù delle somiglianze strutturali esistenti tra la caffeina e le basi puriniche del DNA (D'Ambrosio, 1994).

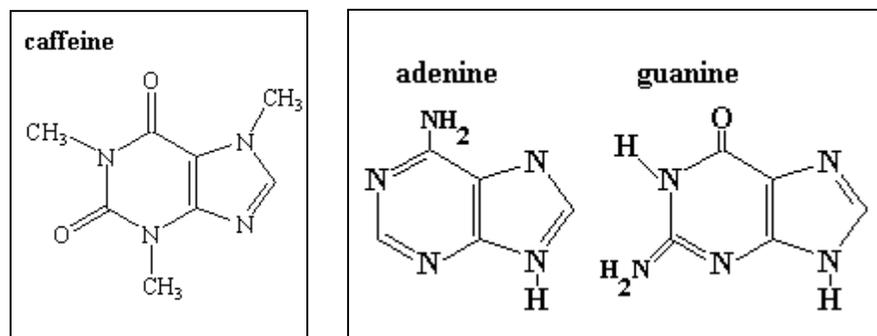


Fig. 4 Analogie strutturali tra la caffeina e le basi puriniche del DNA adenina e guanina

I dati sperimentali su questi effetti sono controversi, ma non è comunque possibile concludere che il consumo di dosi elevate di caffeina durante la gravidanza sia privo di rischi per il genoma del feto. L'assunzione di caffeina rappresenta un potenziale fattore di rischio anche durante l'allattamento poiché la sostanza è in grado di pervenire al latte materno potendo così influenzare il normale sviluppo neurologico del neonato (Yazdani et al., 2004).

La scoperta che la caffeina, alle dosi assunte con la dieta, si comporta da antagonista competitivo per i recettori adenosinergici del sottotipo A_1 ed A_{2A} (Fredholm et al., 1999) ha contribuito notevolmente alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base degli effetti fisiologici della sostanza. In particolare, studi effettuati su animali transgenici hanno dimostrato come il sottotipo recettoriale A_{2A} sia quello maggiormente coinvolto negli effetti della caffeina (Ledent et al., 1997; El Yacoubi et al., 2000, Huang et al., 2005). Il ruolo cardine svolto dal recettore A_{2A} nell'espressione degli effetti della caffeina è di notevole importanza per la comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base delle azioni della sostanza nonché per chiarire in che modo l'assunzione di caffeina possa influenzare gli effetti di altri farmaci (Cauli and Morelli, 2005).

CAPITOLO 2

ADENOSINA E RECETTORI ADENOSINERGICI

2.1 L'adenosina

L'adenosina (ADO) è un nucleoside endogeno costituito dalla base purinica adenina legata mediante un legame N9-C1 allo zucchero ribosio. L'ADO è presente, nei mammiferi, a livello intra- ed extracellulare in numerosi tessuti dove prende parte a svariate funzioni fisiologiche (Ribeiro et al., 2002).

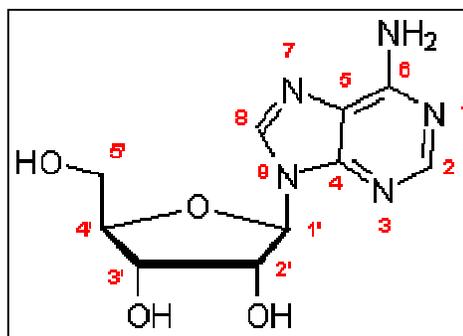


Fig. 5 Struttura chimica dell'adenosina.

La formazione dell'ADO dipende essenzialmente dal metabolismo dell'adenosin-trifosfato (ATP). A livello intracellulare, l'ADO è formata per idrolisi dell'adenosin-monofosfato (AMP) per mezzo dell'enzima 5'nucleotidasi o, alternativamente ed in concentrazioni minori, attraverso l'idrolisi della S-adenosilomocisteina (SAH) per mezzo di una specifica idrolasi (Latini and Pedata, 2001). I livelli extracellulari di ADO, invece, sembrano essere regolati dal rilascio di ADO intracellulare e dalla degradazione di nucleotidi adeninici presenti nello spazio extracellulare. L'equilibrio fra le concentrazioni di ADO ai due lati

della membrana cellulare è mantenuto per mezzo di un trasportatore bidirezionale di nucleosidi (Latini and Pedata, 2001).

L'eliminazione dell'ADO extracellulare è principalmente mediata dalla sua ricaptazione attraverso la membrana cellulare, seguita dalla fosforilazione ad AMP ad opera della adenosina kinasi o dalla deamminazione ad inosina ad opera dell'adenosina deamminasi.

Una via catabolica alternativa è rappresentata da una reazione reversibile catalizzata dalla SAH-idrolasi che porta alla formazione di SAH a partire da ADO e L-omocisteina (Latini and Pedata, 2001).

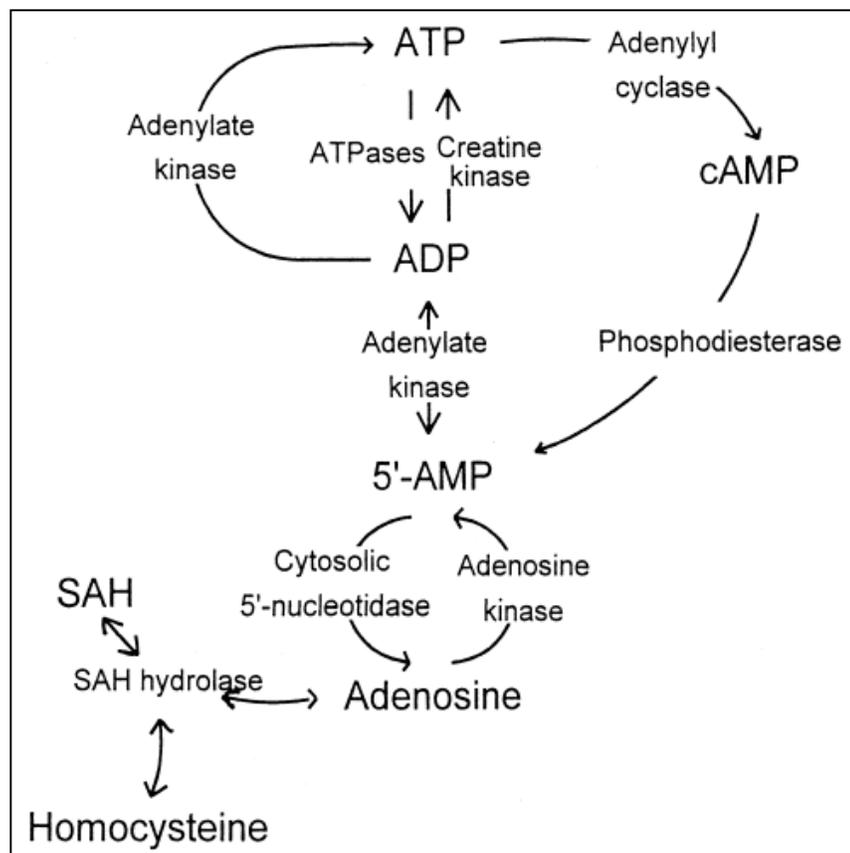


Fig. 6 Ciclo di formazione e di degradazione dell'adenosina

Nel SNC l'ADO è liberata dai neuroni e dalle cellule della glia come risultato della loro attività metabolica (Latini and Pedata, 2001). I livelli extracellulari di ADO nel SNC sono, in condizioni fisiologiche, nell'ordine delle nanomoli (30-300 nm), sebbene queste concentrazioni possano aumentare anche di cento volte in risposta alla diminuzione dei livelli di ossigeno cerebrale che si possono verificare in situazioni quali l'ipossia e l'ischemia (Fenton and Dobson, 1987). L'ADO agisce a livello pre- e postsinaptico comportandosi come un neuromodulatore in grado di regolare il rilascio di neurotrasmettitori e il funzionamento neuronale (Cunha, 2001).

2.2 I recettori per l'adenosina

La trasmissione purinergica coinvolge tutta la famiglia dei derivati purinici dell'ATP, ovvero ATP, ADP, AMP ed ADO. I vari mediatori impiegano recettori differenti e classificabili in due famiglie distinte: recettori P1, sensibili all'ADO, e recettori P2, sensibili ad ATP ed ADP.

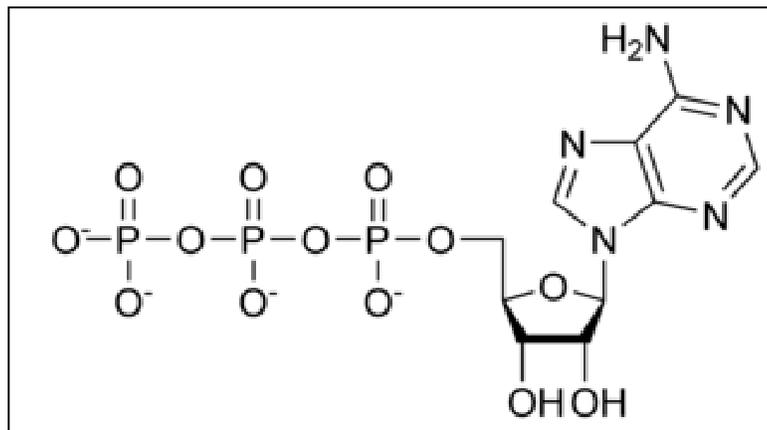


Fig. 7 Struttura chimica dell'ATP dalla cui degradazione per rimozione progressiva dei gruppi PO_4^{2-} derivano tutti i mediatori impiegati nella trasmissione purinergica.

Al momento sono stati caratterizzati quattro sottotipi di recettori P1 definiti come A₁, A_{2A}, A_{2B} ed A₃ (Fredholm et al., 1994). I recettori A_{2B} ed A₃ presentano un'affinità ridotta per l'ADO e si pensa che siano stimolati solamente durante condizioni patologiche in cui si osserva un incremento dei livelli extracellulari di ADO (Fredholm et al., 2001; von Lubitz et al., 1994). Al contrario, i recettori A₁ ed A_{2A} mostrano un'elevata affinità per l'ADO e sono attivati da concentrazioni fisiologiche del nucleoside, essendo quindi i sottotipi recettoriali principalmente coinvolti nei suoi effetti (Dunwiddie and Masino, 2001). I diversi sottotipi recettoriali P1 si differenziano tra loro per l'affinità ad analoghi non idrolizzabili dell'adenosina ottenuti modificando la purina o lo zucchero presenti nella sua struttura, in questo modo si possono ottenere agonisti od antagonisti selettivi per quasi tutti i sottotipi noti.

I recettori adenosinergici sono tutti accoppiati alla adenilato ciclastasi (AC), laddove l'attivazione dei recettori A₁ ed A₃ la inibisce, mentre quella dei recettori A_{2A} ed A_{2B} la stimola. Inoltre, il legame degli agonisti ai recettori A₁ ed A₃ stimola la fosfolipasi C (PLC) e, nel caso dei recettori A₁, inibisce le conduttanze per il Ca²⁺ e stimola quelle per il K⁺.

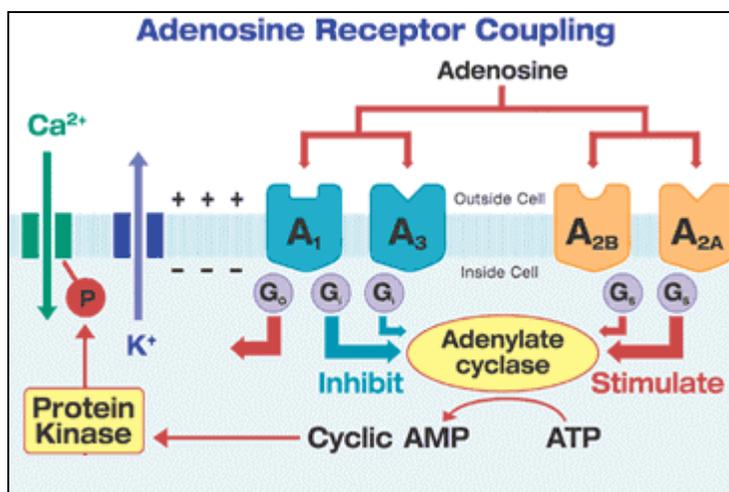


Fig. 8 Accoppiamento dei vari sottotipi recettoriali adenosinergici all'AC. I recettori A₁ ed A₃ inibiscono AC mentre i recettori A_{2A} ed A_{2B} stimolano AC.

In quanto accoppiati a proteine G, i recettori adenosinergici presentano la caratteristica struttura composta da sette domini transmembrana, con segmento amminotermiale extracellulare e segmento carbossiterminale intracellulare. Gli agonisti, probabilmente, legano i recettori a livello dei segmenti TM2, TM3 e TM7, come indirettamente dimostrato dall'elevato grado di conservazione di tali domini in tutti i sottotipi finora scoperti (Cattabeni and Abbraccio, 1999).

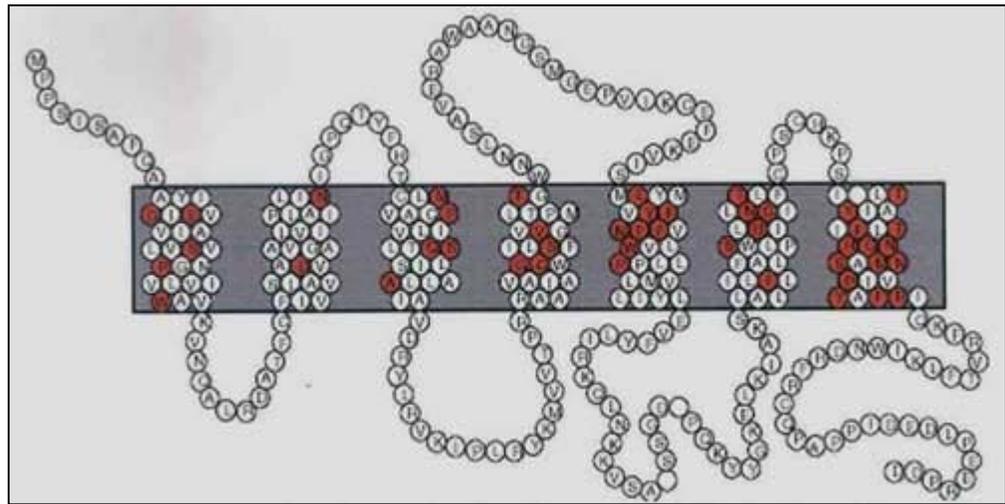


Fig. 9 Struttura generale dei recettori accoppiati a proteine G. La figura evidenzia la presenza dei 7 domini transmembrana

I recettori P1 hanno una distribuzione varia, ma spesso sovrapponibile, nei diversi tessuti ed in numerose cellule è stata dimostrata una colocalizzazione tra differenti sottotipi di recettore adenosinergico. In particolare la coespressione di recettori A_1 ed A_{2A} è stata descritta in cellule della muscolatura liscia e striata, cellule del mesangio, cellule del glomerulo renale, astrociti e neuroni piramidali (Dixon et al., 1996; Lynge and Hellsten, 2000, Alloisio et al., 2004; Rebola et al., 2005a). Il differente accoppiamento dei singoli sottotipi recettoriali all'AC si traduce quindi in una complessa regolazione della funzionalità cellulare da parte dell'adenosina.

2.3 Localizzazione cerebrale dei recettori per l'adenosina

I recettori adenosinergici presentano una distribuzione cerebrale molto diffusa ma sono riscontrabili differenze significative nella localizzazione dei diversi sottotipi recettoriali.

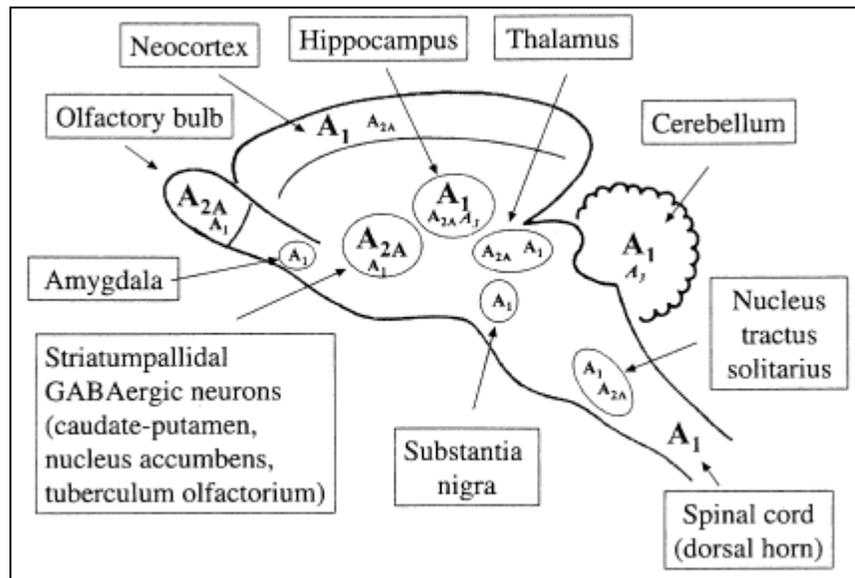


Fig. 10 Distribuzione dei recettori adenosinergici A₁ ed A_{2A} a livello cerebrale

I recettori A₁ sono espressi in quasi tutte le aree cerebrali ed i livelli massimi si osservano in ippocampo, corteccia (cerebrale e cerebellare) e nuclei del talamo mentre livelli moderati rispetto a queste strutture sono presenti nel corpo striato e nel nucleus accumbens (Svenningsson et al., 1997a). I recettori A₁ sono situati principalmente a livello presinaptico dove la loro stimolazione inibisce il rilascio di neurotrasmettitori (Fredholm and Dunwiddie, 1988)

I recettori A_{2A} sono selettivamente espressi nelle regioni cerebrali che presentano un elevato contenuto di dopamina (Svenningsson et al., 1997b). La localizzazione dei

recettori A_{2A} è stata inizialmente dimostrata in maniera indiretta attraverso studi su omogenati provenienti da aree dopaminergiche che hanno mostrato una stimolazione dell'AC per opera dell'ADO (Fredholm, 1977). Successivamente, studi di binding e di immunostochimica, che hanno impiegato anticorpi specifici, hanno dimostrato la massiccia presenza di recettori A_{2A} nelle regioni cerebrali aventi un elevato contenuto di dopamina (Rosin et al., 1998). Alcuni studi, inoltre, hanno mostrato la presenza di recettori A_{2A} in differenti aree del cervello, come ad esempio la corteccia cerebrale, l'ippocampo o i neuroni colinergici (Gubitz et al., 1996; Rebola et al., 2005b; Tebano et al., 2005).

Particolarmente interessante è l'elevato grado di espressione dei recettori A_1 ed A_{2A} nei gangli della base, un insieme di nuclei sottocorticali (corpo striato, globo pallido, nucleo subtalamico e sostanza nera) aventi un ruolo fondamentale nell'esecuzione dei movimenti e nell'acquisizione di programmi motori semplici (Hauber, 1998). I gangli della base, ricevono afferenze glutamatergiche da corteccia cerebrale e talamo mentre i neuroni in uscita dai gangli della base, che hanno origine nel corpo striato, sono di tipo gabaergico. Tali neuroni sono ulteriormente distinti in striato-nigrali e striato-pallidali secondo i nuclei di terminazione.

La distribuzione dei recettori adenosinergici nei gangli della base mostra alcune similitudini ma anche importanti differenze giacché sono state dimostrate sia la colocalizzazione neuronale dei recettori A_1 ed A_{2A} che una specifica segregazione dei due sottotipi recettoriali. La coespressione dei recettori A_1 ed A_{2A} è stata dimostrata sia sugli interneuroni colinergici che sulle terminazioni glutamatergiche striatali (Preston et al., 2000; Rodrigues et al., 2005). Al contrario, lo studio dei neuroni striatali di proiezione ha

evidenziato come i recettori A_1 siano espressi dai neuroni striato-nigrali, mentre i recettori A_{2A} siano localizzati sui neuroni striato-pallidali (Schiffmann et al., 1993; Ferré et al. 1997, 1999).

La modulazione della funzionalità dei gangli della base da parte dei recettori adenosinergici è alla base degli effetti della caffeina, che si comporta come un antagonista competitivo verso questi recettori (Fredholm et al., 1999; Fisone et al., 2004). In particolare, è interessante approfondire l'interazione esistente tra recettori A_{2A} e recettori dopaminergici a livello dei gangli della base, poiché è stato dimostrato come il sistema dopaminergico sia criticamente coinvolto nell'espressione degli effetti della caffeina (Garrett and Holtzman, 1994; Garrett and Griffiths, 1997; Cauli and Morelli, 2005).

CAPITOLO 3
INTERAZIONI ADENOSINA-DOPAMINA E MECCANISMO
DI AZIONE DELLA CAFFEINA

3.1 Interazione tra recettori A_{2A} e recettori dopaminergici nei gangli della base

Solide evidenze sperimentali indicano come i recettori adenosinergici del sottitipo A_{2A} interagiscano in maniera molto estesa con i recettori dopaminergici a livello dei gangli della base.

I recettori A_{2A} ed i recettori D₂ sono colocalizzati a livello della membrana dei neuroni gabaergici striatopallidali ed è ampiamente dimostrato come la stimolazione dei recettori A_{2A} eserciti un'azione facilitatoria sulla funzionalità dei neuroni striatopallidali anche grazie ad una riduzione dell'attività dei recettori D₂ (Hettinger et al., 2001; Hillion et al., 2001). La prima evidenza sperimentale di questa interazione è stata ottenuta in membrane striatali di ratto in cui è stato osservato come l'attivazione dei recettori A_{2A} fosse associata ad una diminuzione dell'affinità dei recettori D₂ verso la dopamina verosimilmente a causa della formazione di complessi eterodimerici tra i due recettori (Ferrè et al., 1991; Fuxe et al., 2005).

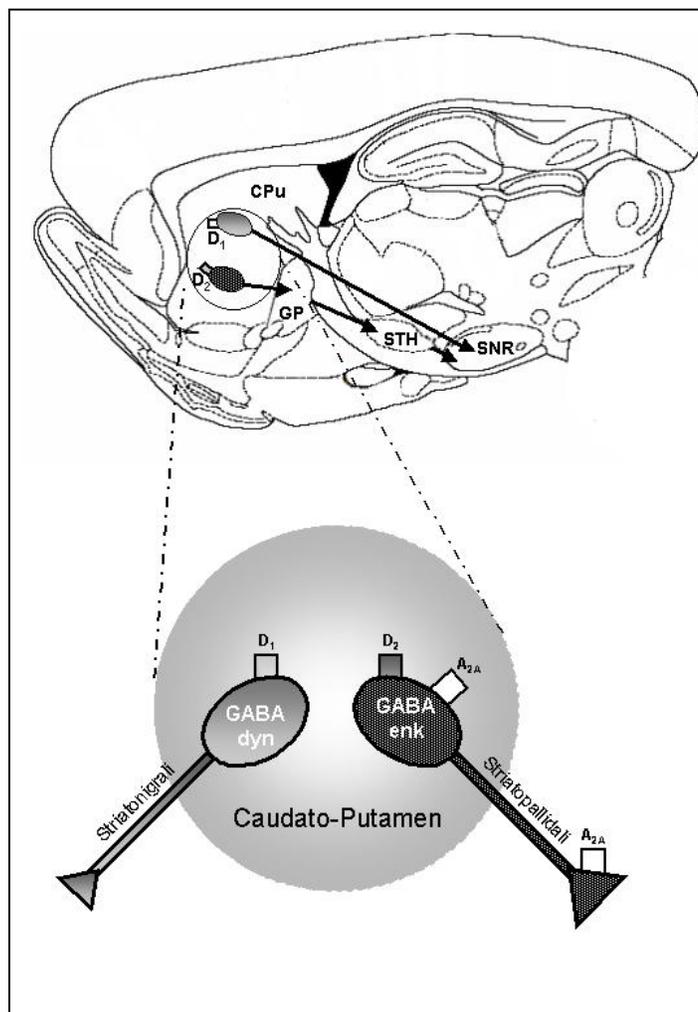


Fig. 11 Localizzazione selettiva dei recettori adenosinergici A_{2A} sul corpo e sulle terminazioni dei neuroni striatopallidali nei gangli della base.

La forte interazione antagonista esistente tra i recettori A_{2A} ed i recettori D_2 si manifesta anche a livello dei secondi messaggeri poiché la stimolazione dei recettori D_2 inibisce l'AC, mentre quella dei recettori A_{2A} la stimola (Kull et al., 2000). Ciò si traduce un'opposta regolazione dell'attività della proteina chinasi dipendente da AMP ciclico (PKA) che regola lo stato di attivazione di numerosi recettori, canali ionici, fosfodiesterasi e fosfoproteine. Inoltre, è stato dimostrato come l'attivazione dei recettori A_{2A} sia in grado di inibire le risposte Ca^{2+} dipendenti mediate dal recettore D_2 (Yiang et

al., 1995). Infine, le interazioni funzionali esistenti tra recettori A_{2A} e D_2 comportano una complessa modulazione dell'attività di alcuni importanti mediatori del segnale intracellulare come la fosfoproteina regolata dalla dopamina e dal cAMP (DARPP-32) e la fosfoproteina regolata dal cAMP (CREB) che controllano la trascrizione proteica e l'espressione genica, e di conseguenza la funzionalità neuronale (Kull et al., 2000; Svenningsson et al., 2000).

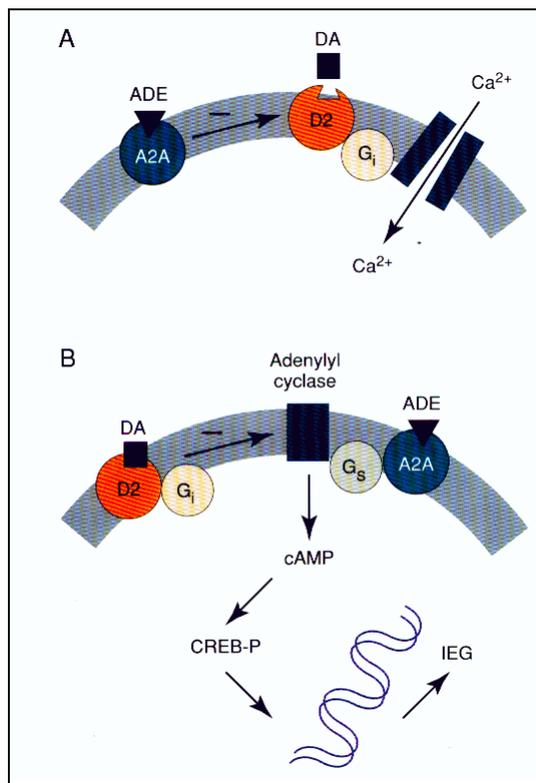


Fig. 12 Interazioni tra recettori A_{2A} e recettori D_2 a livello molecolare (A) ed a livello dei secondi messaggeri (B). I due sottotipi recettoriali esercitano un'attività regolatoria opposta sull'AC che è inibita dai D_2 e stimolata dagli A_{2A} .

In aggiunta alle interazioni esistenti con i recettori D_2 , è stato dimostrato come i recettori A_{2A} siano in grado di influenzare il funzionamento dei recettori D_1 . A questo riguardo è stato osservato come la somministrazione di antagonisti per il recettore A_{2A} sia in grado di potenziare gli effetti comportamentali e neurochimici prodotti dalla stimolazione del recettore D_1 nel ratto (Pinna et al., 1996; Pollack and Fink, 1996). Dal momento che i recettori A_{2A} ed i recettori D_1 sono localizzati su popolazioni neuronali differenti

(Schiffmann and Vanderhaeghen, 1993), è verosimile che l'interazione tra questi recettori avvenga attraverso le fibre collaterali dello striato o attraverso circuiti che comprendono le proiezioni subtalamico-nigro-cortico-striatali. A questo proposito, studi recenti effettuati nei nostri laboratori hanno evidenziato come il globo pallido sia un'area importante nelle interazioni tra recettori A_{2A} e recettori D_1 (Simola et al., 2006a, Simola et al., osservazioni non pubblicate).

I precedenti risultati suggeriscono quindi come l'antagonismo dei recettori A_{2A} si traduca in una facilitazione della funzionalità del sistema dopaminergico. Le estese interazioni fra recettori A_{2A} e recettori dopaminergici D_1 e D_2 sono di estrema importanza per comprendere gli effetti della caffeina sia a breve che a lungo termine (Simola et al., 2006b) nonché le interazioni esistenti tra caffeina e farmaci agenti sul sistema dopaminergico, tra cui alcuni farmaci d'abuso.

3.2 Meccanismi molecolari di azione della caffeina

Numerosi studi suggeriscono che le proprietà psicostimolanti esercitate dalla caffeina assunta a scopo voluttuario siano principalmente mediate dal blocco dei recettori per l'adenosina, in particolare per quelli del sottotipo A_{2A} (Ledent et al., 1997; Fredholm et al., 1999; El Yacoubi et al., 2000; Fisone et al., 2004), sebbene anche il recettore A_1 appaia coinvolto (Antoniou et al., 2005; Kuzmin et al., 2005). Nonostante sia stato dimostrato che la caffeina possa influenzare il turnover del calcio e bloccare le fosfodiesterasi, tali fenomeni si verificano solamente a dosi molto superiori a quelle

ottenibili con l'assunzione della sostanza a scopo voluttuario ed appare perciò improbabile un loro coinvolgimento negli effetti psicostimolanti della caffeina (Fredholm et al., 1999).

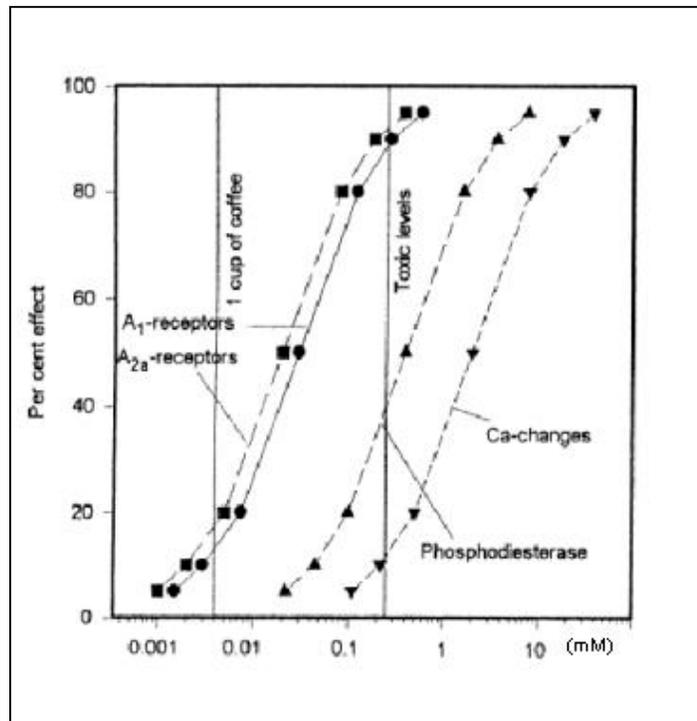


Fig. 13 Grafico riassuntivo della relazione esistente tra concentrazioni plasmatiche (in mM) di caffeina e suoi meccanismi molecolari di azione. Da Fredholm et al., 1999.

Recenti studi hanno contribuito significativamente a chiarire i meccanismi molecolari alla base degli effetti della caffeina provocati dall'antagonismo dei recettori A_{2A} grazie alla dimostrazione del ruolo esercitato dalla proteina DARPP-32 nella trasduzione del segnale mediata da questi recettori (Svenningsson et al., 1998, 2000; Lindskog et al., 2002).

La DARPP-32 è profondamente coinvolta nella cascata del segnale connessa al recettore A_{2A} come evidenziato dal fatto che la delezione genica di questa proteina nei topi riduce notevolmente la risposta alla stimolazione o all'antagonismo del recettore A_{2A}. In particolare, è stato dimostrato come la stimolazione motoria indotta dalla caffeina, così come quella indotta dall'antagonista selettivo dei recettori A_{2A} SCH 58261, sia

significativamente ridotta in topi privi del gene che codifica per la DARPP-32 rispetto a quanto osservato in animali che esprimono la proteina (Lindskog et al., 2002).

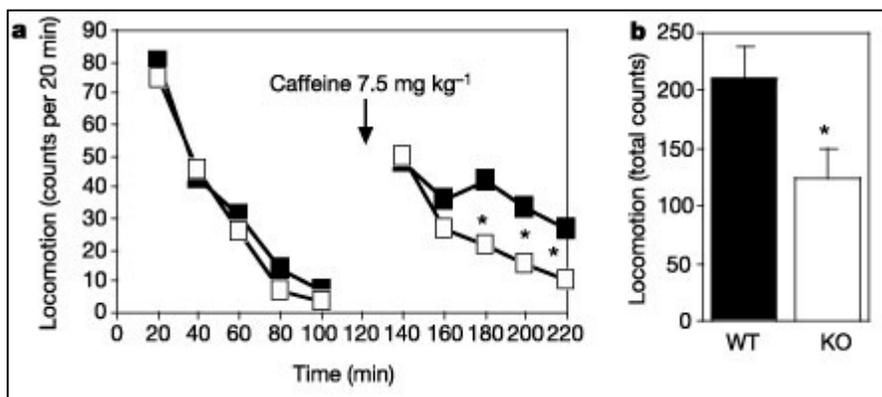


Fig. 14 Riduzione degli effetti stimolanti motori acuti della caffeina in topi privi del gene per la DARPP-32. I topi geneticamente modificati (KO, quadratini bianchi e colonna bianca) mostrano una ridotta attività motoria in risposta alla somministrazione di caffeina rispetto a topi non modificati (WT, quadratini neri e colonna nera). Da Lindskog et al., 2002.

Inoltre, mediante studi effettuati impiegando metodiche di biologia molecolare, è stato evidenziato come la somministrazione di caffeina si accompagna ad una aumentata fosforilazione della DARPP-32 nel residuo di treonina (Thr) in posizione 75 e come almeno il 50% della DARPP-32 sia presente in neuroni che esprimono anche il recettore A_{2A} (Lindskog et al., 2002).

La DARPP-32 presenta due distinti residui di Thr che possono essere fosforilati, rispettivamente in posizione 34 e 75 (Bibb et al., 1999). La DARPP-32 viene fosforilata in Thr-34 per azione diretta della PKA e si comporta come un inibitore delle fosfatasi delle proteine bersaglio della PKA, potenziando l'azione di quest'ultima.

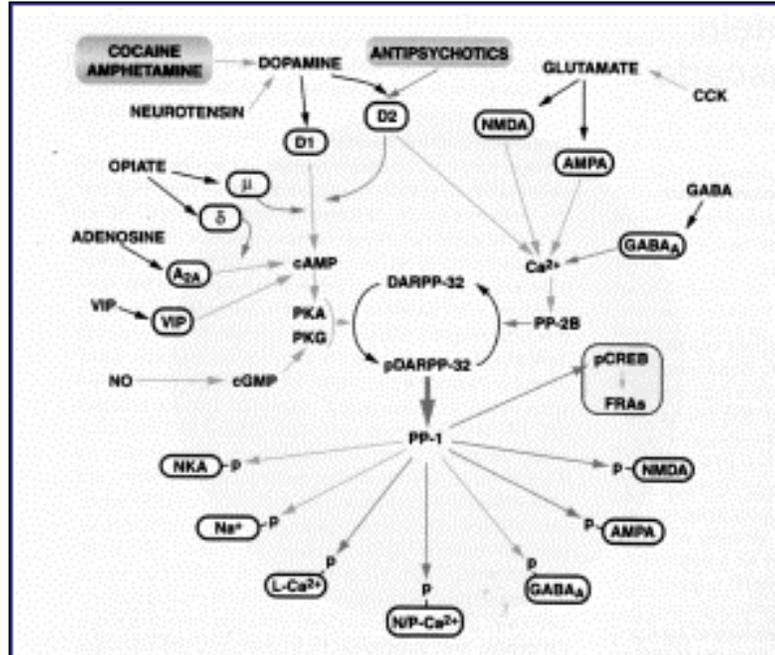


Fig. 15 Quadro generale della regolazione della fosforilazione in Thr-34 della DARPP-32 ad opera di vari neurotrasmettitori. L'isoforma fosforilata in Thr-34 è un potente inibitore delle fosfatasi delle proteine bersaglio della PKA.

La DARPP-32 è invece fosforilata in Thr-75 per opera delle ciclasti costitutive, come Cdk5 ed è in equilibrio con la sua forma defosforilata derivante dall'azione della proteina-fosfatasi-2A (PP2-A), attivata anch'essa dalla PKA. La DARPP-32 fosforilata in thr-75 funziona da inibitore per la PKA attenuando lo stato di fosforilazione delle proteine bersaglio di questa kinasi ed in definitiva inibendo l'azione dell'adenosina, che attiva la PKA mediante il recettore A_{2A} (Bibb, et al., 1999; Nishi et al., 2000; Svenningsson et al., 2000).

Su queste basi, è stato proposto un meccanismo di azione molecolare secondo cui l'antagonismo dei recettori A_{2A} operato dalla caffeina provocherebbe il blocco dell'AC con diminuita produzione di cAMP intracellulare e conseguente riduzione della

stimolazione della PKA; ciò implicherebbe la disattivazione della PP2A per la DARPP-32, che quindi persisterebbe in uno stato fosforilato in Thr-75 contribuendo ad attenuare l'azione della PKA stessa. In tal modo l'inibizione della PKA ad un duplice livello comporterebbe il blocco della fosforilazione delle proteine substrato della stessa con conseguente annullamento dell'azione inibitoria dell'adenosina, giustificando gli effetti stimolanti della caffeina (Lindskog et al., 2002; Vaugeois et al., 2002).

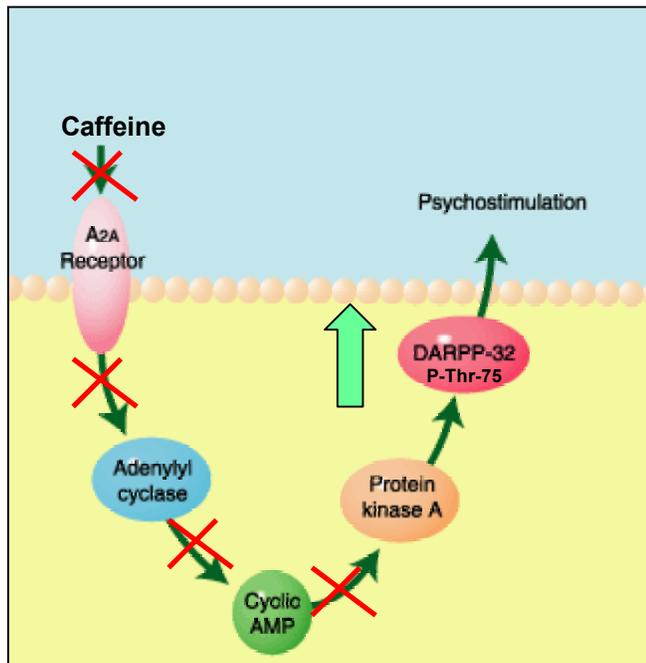


Fig. 16 Ipotetico meccanismo d'azione della caffeina. L'antagonismo dei recettori A_{2A} da parte della caffeina indurrebbe una modificazione della cascata del segnale connesso a tali recettori ed un conseguente aumento dei livelli intracellulari di DARPP-32 fosforilata in Thr-75, che sarebbe responsabile degli effetti psicostimolanti della caffeina.

CAPITOLO 4

POTENZIALE D'ABUSO DELLA CAFFEINA ED INTERAZIONE TRA CAFFEINA E FARMACI D'ABUSO

4.1 Definizione di farmacodipendenza e neuroanatomia del fenomeno

Le proprietà di abuso dei farmaci sono direttamente dipendenti dal cosiddetto effetto di rinforzo il quale non indica semplicemente le proprietà gratificanti di una sostanza ma la sua capacità di modificare i circuiti neuronali coinvolti nei processi di apprendimento associativo e di orientare il comportamento dell'individuo dipendente verso la ricerca compulsiva della stessa (Di Chiara et al., 1999; Weiss et al., 2001). A tale riguardo, è ampiamente dimostrato come il sistema dopaminergico mesocorticolimbico (MCL) rivesta un ruolo importante nei processi di apprendimento associativo e come modificazioni della funzionalità di questo sistema siano alla base della dipendenza da farmaci (Berridge and Robinson, 1998; Parkinson et al., 2000; Di Chiara et al., 2004).

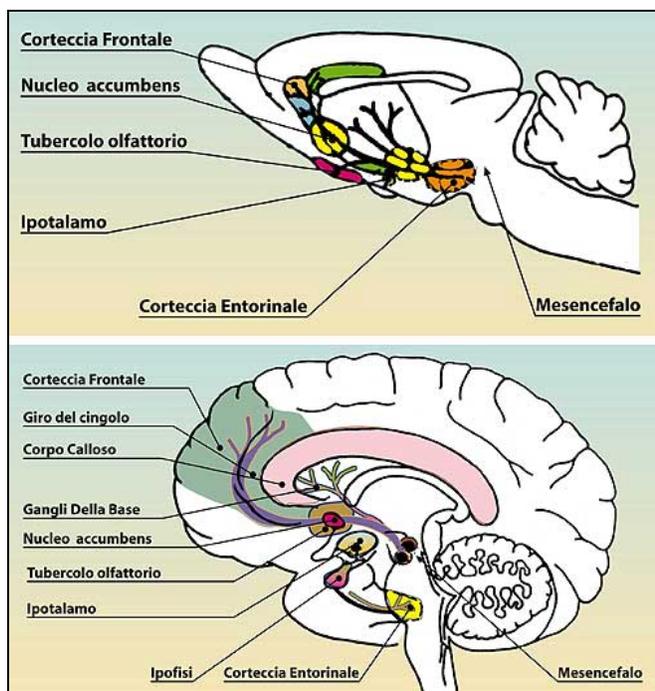


Fig. 17 Anatomia del sistema dopaminergico mesocorticolimbico nel ratto (pannello superiore) e nell'uomo (pannello inferiore).

Il MCL origina dai neuroni siti nell'area ventrale tegmentale mesencefalica (VTA) e termina a livello del nucleus accumbens (NAc) che è composto da due regioni distinte, il core, aventi funzioni essenzialmente motorie e connesso con il corpo striato, e la shell connessa con l'amigdala estesa e coinvolta nei processi di gratificazione ed apprendimento associativo (Kelley, 1999; Di Chiara, 2002). E' stato dimostrato come i neuroni dopaminergici della VTA rispondano con un incremento della loro attivazione a stimoli nuovi od inaspettati; ad esempio la presentazione ad un animale di cibo in un ambiente in cui tale evenienza non si sia mai verificata è in grado di attivare questi neuroni in modo potente (Mirenowicz and Schultz, 1994). Il MCL ha quindi la funzione di caratterizzare i vari stimoli cui un soggetto è sottoposto associandoli al contesto di presentazione, con il fine di dirigere il comportamento individuale verso la ricerca degli stimoli gratificanti e l'evitamento di quelli spiacevoli (Mirenowicz and Schultz, 1996; Schultz, 1997, Bassareo and Di Chiara, 1997; Bassareo and Di Chiara, 1999a,b).

La teoria dopaminergica della dipendenza prevede che tutti i farmaci d'abuso, sebbene mediante meccanismi molecolari diversi, siano in grado di attivare direttamente il MCL e di fare in modo che tale stimolazione sia percepita a livello inconscio come un'esperienza gratificante e da ripetere, ponendo quindi i presupposti per una assunzione continuata di farmaci da parte del soggetto dipendente (Robinson and Berridge, 1993; Di Chiara, 1995; Schultz, 2002).

Al momento non esistono dati certi che dimostrino la capacità della caffeina di stimolare il MCL in modo diretto, sebbene esistano studi che avvalorano questa possibilità (Solinas et al., 2002). Tuttavia, la caffeina, in virtù della sua azione facilitante sulla trasmissione dopaminergica, potrebbe amplificare l'attivazione del MCL operata da altri

psicostimolanti, quali cocaina ed amfetamina, ed in questo senso la caffeina potrebbe influenzare sia lo sviluppo che il mantenimento di una farmacodipendenza verso queste sostanze (Horger et al., 1991; Gasior et al., 2000).

4.2 La caffeina è un farmaco d'abuso?

Come indicato dal manuale diagnostico dei disturbi mentali (DMS) e dall'associazione degli psichiatri americani (APA), la farmacodipendenza è descritta da sette criteri fondamentali:

- 1) tolleranza agli effetti del farmaco (di grado non specificato)
- 2) sindrome di astinenza fisica e/o psicologica (di severità non specificata)
- 2) assunzione del farmaco in dosi o per tempi superiori al previsto
- 3) desiderio persistente del farmaco o tentativi falliti di limitarne l'uso
- 4) destinazione di molto tempo o lavoro all'ottenimento del farmaco
- 5) influenza notevole dell'assunzione del farmaco sulla vita privata e sociale del soggetto dipendente
- 6) uso protratto del farmaco nonostante la consapevolezza dei suoi effetti avversi.
- 7) uso protratto del farmaco nonostante la consapevolezza dei suoi effetti avversi

In particolare, la capacità di provocare tolleranza ai propri effetti farmacologici, la presenza di proprietà di rinforzo e la capacità di indurre sindrome di astinenza sono caratteristiche fondamentali che contribuiscono alla classificazione di un farmaco tra le sostanze d'abuso.

La caffeina è in grado di indurre tolleranza ai propri effetti sia nell'animale che nell'uomo; la tolleranza si manifesta generalmente come un'inversione degli effetti acuti della caffeina (Svenningsson et al., 1999; Dews et al., 2002). Tuttavia i dati finora disponibili hanno dimostrato l'esistenza di un'estrema variabilità nello sviluppo di tolleranza alla caffeina, che sembra sostanzialmente interessare solamente alcuni effetti della sostanza e non appare di intensità tale da influenzare il comportamento di assunzione della stessa (Nehlig, 1999; Dews et al., 2002), sebbene questa ipotesi non sia universalmente ritenuta valida (Griffiths and Woodson, 1988).

Analogamente a quanto osservato per la tolleranza, le proprietà di rinforzo della caffeina appaiono molto variabili. Infatti, sebbene la caffeina possieda effetti psicostimolanti e gratificanti, come dimostrato dalla sua capacità di indurre place preference nel ratto (Bedingfield et al., 1998; Patkina and Zvartau, 1998), questa sostanza viene autosomministrata in maniera molto irregolare sia dall'uomo che dagli animali da esperimento (Oliveto et al., 1992) il che viene assunto come dato indicativo delle scarse proprietà di rinforzo possedute dalla caffeina. Nei primati non umani l'autosomministrazione di caffeina presenta un andamento discontinuo, alternando periodi in cui gli animali si somministrano elevate dosi di sostanza ad altri in cui il comportamento è del tutto assente (Griffiths and Mumford 1995).

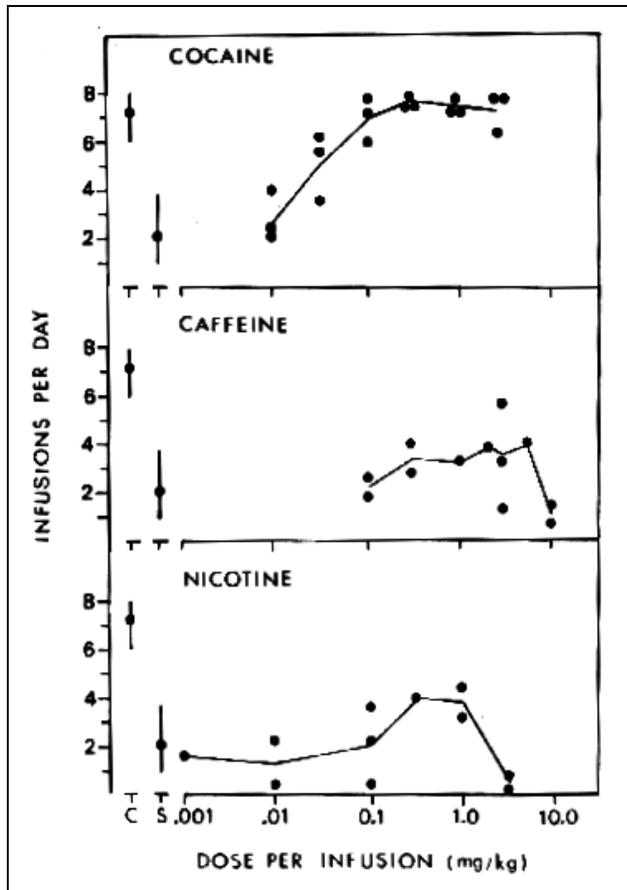


Fig. 18 Autosomministrazione di caffeina in primati non umani. Il grafico evidenzia come il numero di autosomministrazioni giornaliere (in ordinata) di caffeina sia molto più variabile rispetto a quanto osservato per cocaina e nicotina. Inoltre, la caffeina è autosomministrata solamente in un intervallo ristretto di dosi. Da Griffiths, Brady and Bradford. 1979.

L'autosomministrazione di caffeina si dimostra molto irregolare anche nel ratto (Atkinson and Enslin 1976; Briscoe et al., 1998) essendo inoltre meno pronunciata di quella osservabile con psicostimolanti dopaminergici non xantinici. Non esistono, inoltre, chiare evidenze che dimostrino inequivocabilmente l'esistenza di proprietà di rinforzo da parte della caffeina in condizioni sperimentali in cui cocaina ed amfetamina mostrano

chiaramente proprietà di rinforzo. Infine, analogamente a quanto osservato negli animali da esperimento, la caffeina mostra modeste proprietà di rinforzo anche nell'uomo (Griffiths and Chausmer, 2000). I risultati precedentemente descritti suggeriscono quindi che sebbene la caffeina possa presentare proprietà di rinforzo, queste siano sostanzialmente inferiori a quelle di altri psicostimolanti aventi un comprovato potenziale d'abuso.

La presenza di sindrome di astinenza da caffeina è stata osservata sia negli animali da esperimento che nell'uomo (Griffiths and Woodson, 1988; Juliano and Griffiths, 2004).

Nel ratto l'astinenza da caffeina si manifesta con alterazioni dell'attività motoria spontanea e con insorgenza di ansia (Holtzman 1983; Bhattacharya et al., 1997). Nell'uomo, invece, l'astinenza da caffeina provoca numerosi sintomi che comprendono stanchezza, nervosismo, cefalea con dolore vasale, ansia, aumento della frequenza cardiaca ed occasionalmente nausea, vomito e tremore (Juliano and Griffiths, 2004).

Sintomi di astinenza da caffeina sono inoltre stati riscontrati in neonati nati da madri forti consumatrici di caffè (McGowan et al., 1988) ed in adolescenti consumatori di bevande contenenti caffeina (Goldstein and Wallace, 1997). Non esistono comunque evidenze che la sindrome di astinenza da caffeina comporti effetti deleteri sulle relazioni sociali del consumatore.

In base alle considerazioni precedenti appare chiaro come il consumo di caffeina non soddisfi in pieno i criteri del DMS IV che descrivono la farmacodipendenza e per tale motivo la caffeina non è ritenuta una sostanza d'abuso, ma solamente uno psicostimolante atipico (Daly and Fredholm, 1998). Il consumo di caffeina è invece definito come

assunzione abitudinaria, ossia un consumo ripetuto di farmaco che non presenta però le caratteristiche proprie della farmacodipendenza.

4.3 Interazioni tra caffeina e farmaci d'abuso

Nonostante la sua assunzione sia ritenuta relativamente innocua, la caffeina si è comunque dimostrata in grado di interagire con i circuiti neuronali coinvolti nella farmacodipendenza e di amplificare gli effetti degli psicostimolanti d'abuso.

La caffeina, infatti, potenzia l'attivazione psicomotoria indotta dalla cocaina (Misra et al., 1986; Schenk et al., 1990), dalle amfetamine e dalla nicotina (Kuribara, 1994; Gasior et al., 2000; Palmatier et al., 2003) nei roditori da esperimento. Inoltre, nel ratto, la caffeina facilita l'autosomministrazione di nicotina (Tanda and Goldberg, 2000) e di cocaina (Horger et al. 1991) rendendone più rapida l'acquisizione ed è stato dimostrato come la caffeina sia in grado di modificare il funzionamento del MCL, evidenziando quindi il potenziale ruolo della sostanza come fattore facilitante nell'insorgenza di farmacodipendenza (Horger et al. 1991). Infine, il consumo di caffeina potrebbe favorire il ripristino di una farmacodipendenza preesistente in soggetti ex-dipendenti, come dimostrato dall'abilità della caffeina nel ristabilire, nel ratto, il comportamento di autosomministrazione di cocaina dopo la sua estinzione (Green and Schenk, 2002).

Un punto molto interessante osservato nei roditori da esperimento circa le interazioni tra caffeina e psicostimolanti d'abuso riguarda la stretta influenza del protocollo di somministrazione di caffeina sugli effetti degli psicostimolanti d'abuso. In particolare, studi che hanno considerato le variazioni dell'attività motoria nel ratto hanno dimostrato

come il potenziamento degli effetti di amfetamina, cocaina e nicotina non fosse osservabile in ratti preesposti alla caffeina secondo un protocollo di somministrazione capace di indurre tolleranza agli effetti motori della caffeina stessa (Garrett and Holtzman, 1995; Gasior et al., 2000) ma solamente in ratti soggetti ad un protocollo di somministrazione di caffeina tale da non indurre tolleranza agli effetti motori della sostanza (Schenk et al., 1990; Gasior et al., 2000; Palmatier et al., 2003). Inoltre, studi precedenti compiuti nei nostri laboratori hanno dimostrato come gli effetti motori dell'amfetamina fossero notevolmente potenziati in ratti aventi una denervazione unilaterale del sistema dopaminergico nigrostriatale e trattati con caffeina secondo un protocollo di somministrazione intermittente in grado di indurre sensibilizzazione agli effetti stimolanti motori della caffeina (Cauli et al., 2003).

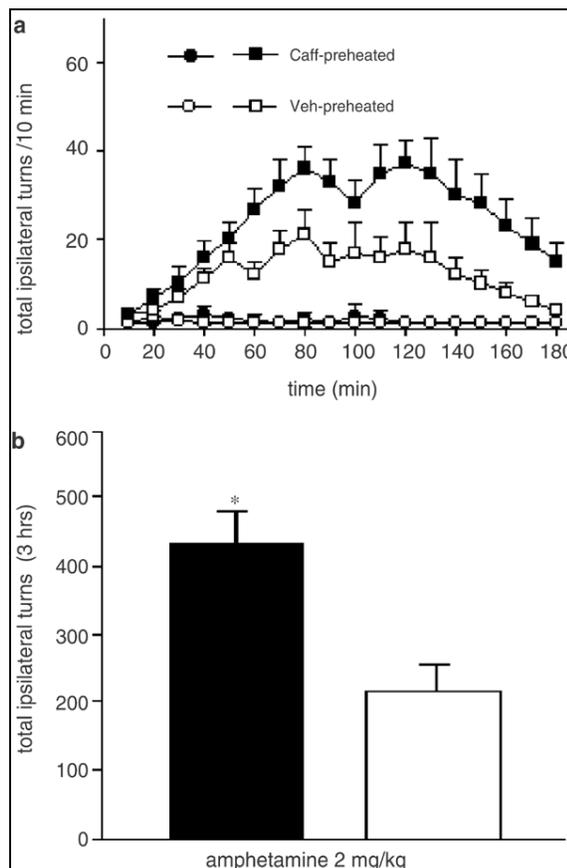


Fig. 19 Potenziamento degli effetti stimolanti motori dell'amfetamina in ratti aventi una denervazione unilaterale del sistema dopaminergico nigrostriatale e sottoposti ad un trattamento ripetuto ed intermittente con caffeina. Da Cauli et al., 2003.

L'esistenza di una sensibilizzazione crociata fra gli effetti stimolanti motori della caffeina e quelli dell'amfetamina rappresenta un punto di notevole interesse nella comprensione delle interazioni fra questi due farmaci. Infatti, la sensibilizzazione comportamentale rappresenta un valido modello per lo studio delle risposte neuroadattative prodotte dai farmaci (Robinson and Berridge, 1993; Stewart and Badiani, 1993) ed è perciò ipotizzabile che le azioni facilitatorie della caffeina sugli effetti dell'amfetamina siano dovuti all'induzione di modificazioni neuroplastiche persistenti ad opera della somministrazione ripetuta di caffeina e non semplicemente ad un'azione additiva tra effetti della caffeina ed effetti dell'amfetamina.

CAPITOLO 5

LA SENSIBILIZZAZIONE AGLI EFFETTI DEI FARMACI

5.1 Definizione di sensibilizzazione e sue caratteristiche

Per sensibilizzazione si intende, in senso generale, l'aumento progressivo degli effetti di un particolare stimolo, ad esempio un farmaco, osservabili in un soggetto che sia sottoposto in modo continuativo a tale stimolo.

La sensibilizzazione comporta innanzitutto la modificazione di specifici circuiti neuronali ed in particolare si ritiene che l'insorgenza di fenomeni neuroplastici a carico del MCL e del sistema glutamatergico sia profondamente coinvolta nello sviluppo di sensibilizzazione (Trujillo and Akil, 1995; Wolf, 1998; Vanderschuren and Kalivas, 2000). La sensibilizzazione neuronale può provocare, anche se non necessariamente, una sensibilizzazione di tipo comportamentale, è questo il caso tipico delle sostanze psicostimolanti che, se somministrate a dosi adeguate, sono in grado di indurre nei roditori da esperimento sensibilizzazione ai loro effetti di attivazione motoria (Vanderschuren and Kalivas, 2000). L'espressione della sensibilizzazione a livello comportamentale è, ad ogni modo, un fenomeno complesso e soggetto a numerose variabili.

Il protocollo di somministrazione dei farmaci è un fattore in grado di influenzare profondamente lo sviluppo di sensibilizzazione comportamentale ed è stato dimostrato come spesso questo fenomeno si manifesti in maniera più marcata in seguito a somministrazione ripetuta ed intermittente che non a somministrazione continua dei

farmaci sensibilizzanti (Vanderschuren et al., 1997). Inoltre, lo sviluppo di sensibilizzazione comportamentale è fortemente regolato dalle caratteristiche del soggetto cui il farmaco è somministrato e presenta una notevole variabilità interindividuale che è stata chiaramente dimostrata nell'animale da esperimento (Jodogne et al., 1994; Marinelli and White, 2000; Samaha et al., 2002; Sabeti et al., 2003; Giorgi et al., 2007). Tra le più importanti cause alla base della variabilità interindividuale si trovano i fattori genetici ed ormonali, che possono rendere un soggetto più o meno sensibile agli effetti acuti ed a lungo termine prodotti da un particolare farmaco.

L'influenza dei fattori genetici sullo sviluppo di sensibilizzazione comportamentale agli effetti dei farmaci è dimostrata da studi che evidenziano come roditori di ceppo diverso si sensibilizzino in maniera differenziale agli effetti stimolanti motori degli psicostimolanti dopaminergici e dell'etanolo (Haile et al., 2001; Hoshaw and Lewis, 2001; Yang et al., 2006). Per quanto riguarda gli ormoni, è appurato come essi possano modulare le vie metaboliche epatiche ed extraepatiche in modo differente tra maschi e femmine (i cosiddetti metabolismo maschile e femminile) (Gustafsson and Stenberg, 1976; Hoang and Bergeron, 1987; Hart et al., 1998): tali differenze possono avere un effetto marcato sulla farmacocinetica e sulla farmacodinamica dei farmaci sensibilizzanti (Beierle et al., 1999) ed in tal modo favorire, od ostacolare, lo sviluppo di sensibilizzazione a seconda del sesso del soggetto considerato (Becker, 1999).

Il contesto di presentazione è un altro fattore che modula lo sviluppo di sensibilizzazione comportamentale agli effetti dei farmaci. E' stato infatti dimostrato come, a parità di dose somministrata, gli psicostimolanti dopaminergici e la morfina siano in grado di indurre una sensibilizzazione ai loro effetti motori più intensa nel caso in cui questi farmaci

vengano somministrati all'animale in un ambiente a lui non familiare, ad esempio una gabbia diversa da quella in cui vive solitamente (Badiani et al., 1995a, b; 2000).

Lo sviluppo di sensibilizzazione motoria è un fenomeno caratteristico della somministrazione prolungata di farmaci d'abuso nei roditori da esperimento ed è considerato un parametro correlato all'abilità di questi farmaci nell'indurre modificazioni a carico dei sistemi neuronali coinvolti nel fenomeno della farmacodipendenza (Robinson and Berridge, 1993; Stewart and Badiani, 1993; Vanderschuren and Kalivas, 2000). Studi precedenti in cui la caffeina è stata somministrata ad alte dosi ed in modo continuo hanno dimostrato la sua inefficacia nell'indurre sensibilizzazione motoria evidenziando, al contrario, lo sviluppo di tolleranza agli effetti motori della sostanza (Holtzman, 1983; Holtzman and Finn, 1988; Svenningsson et al., 1999) e contribuendo ulteriormente a rimarcare le differenze esistenti tra caffeina e psicostimolanti d'abuso. Studi effettuati nei nostri laboratori hanno tuttavia evidenziato come in ratti aventi una denervazione unilaterale del sistema dopaminergico nigrostriatale la somministrazione intermittente e ripetuta di dosi moderate di caffeina induca sensibilizzazione agli effetti motori della caffeina e potenze quelli dell'amfetamina somministrata successivamente (Cauli et al., 2003). Su queste basi, ed anche in considerazione delle interazioni tra caffeina e psicostimolanti dopaminergici precedentemente descritte, risulta quindi interessante caratterizzare gli effetti della somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina in ratti neurologicamente intatti allo scopo di verificare se l'esposizione prolungata alla caffeina sia in grado di indurre modificazioni neuroadattative facilitatorie e persistenti in grado di influenzare gli effetti dei farmaci d'abuso.

CAPITOLO 6

SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo studio è stato in primo luogo quello di valutare, nel ratto, il possibile sviluppo di sensibilizzazione motoria durante un trattamento ripetuto ed intermittente con caffeina. Inoltre, allo scopo di caratterizzare meglio il fenomeno, è stata studiata la possibile influenza della differente suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina sullo sviluppo e sull'intensità della sensibilizzazione motoria alla caffeina. Infine, questo studio ha valutato se esista un'influenza della suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina e dell'intensità della sensibilizzazione alla caffeina sugli effetti stimolanti motori dell'amfetamina in ratti precedentemente trattati con caffeina in maniera ripetuta ed intermittente.

CAPITOLO 7

MATERIALI E METODI

7.1 Animali

In questo studio sono stati utilizzati ratti maschi di ceppo Sprague-Dawley, del peso di 180-200 g all'inizio del trattamento con caffeina. I ratti sono stati stabulati singolarmente in gabbie trasparenti di polycarbonato (lunghezza 47 cm, larghezza 23 cm, altezza 19 cm) con fondo ricoperto da segatura ed aventi per coperchio superiore una griglia metallica forata (*home cage*). La stabulazione ha previsto cicli luce-buio di durata controllata e costante (dodici ore consecutive di luce a partire dalle 08:00) e condizioni standard di temperatura ed umidità. Gli animali hanno avuto libero accesso al cibo ed all'acqua, eccetto che durante la misurazione dell'attività motoria. Gli esperimenti sono stati condotti secondo le direttive per la cura e l'utilizzo degli animali da esperimento emanate dalla Comunità Europea (86/609/EEC; DL, 27.01.1992, numero 116).

7.2 Misurazione dell'attività motoria e del comportamento stereotipato

L'attività motoria ed il comportamento stereotipato sono state misurate per due ore consecutive, suddivise in dodici frazioni da dieci minuti ciascuna, in ogni sessione di esperimento. Gli esperimenti sono stati eseguiti ponendo i ratti singolarmente all'interno di gabbie trasparenti in Plexiglas (lunghezza 47 cm, larghezza 27 cm, altezza 29 cm)

aventi sul fondo una griglia metallica e dotate di un coperchio in plastica provvisto di fori (*test cage*). Le gabbie erano equipaggiate con due pannelli disposti lungo l'asse longitudinale delle stesse e provvisti di un sistema emittente/ricevente di fotocellule a raggi infrarossi. Ogni movimento dell'animale ha provocato un'interruzione di uno o più raggi infrarossi che è stata misurata da un contatore dotato di display (Opto-Varimex Mini; Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA).

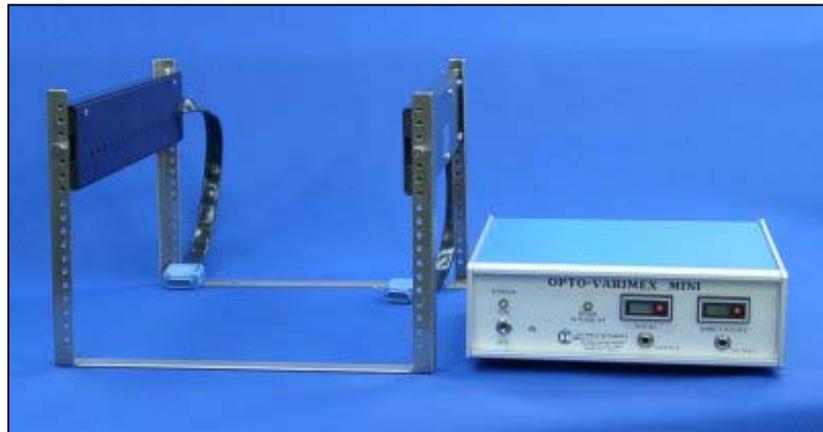


Fig. 20 Contatore per attività motoria Opto Varimex Mini

I contatori hanno registrato due tipi di comportamento: attività locomotoria, costituita dai movimenti dell'animale lungo gli assi della gabbia, ed attività motoria totale, rappresentata dalla combinazione dell'attività locomotoria e del comportamento stereotipato. Per comportamento stereotipato si intende l'insieme dei movimenti a finalistici e confinati eseguiti dall'animale conseguentemente all'attivazione del sistema dopaminergico. Sono stati valutati i comportamenti stereotipati di grooming (autopulizia del mantello, delle zampe e dei genitali), rearing (sollevamento sulle zampe posteriori), sniffing (annusamento confinato verso il fondo della gabbia). In tutti gli esperimenti i ratti

hanno eseguito pochissimi comportamenti stereotipati di tipo orale quali masticamenti, leccate, sbadigli o morsi della grata metallica situata sul pavimento della gabbia.

Il comportamento stereotipato è stato valutato da un operatore presente durante l'esperimento che ha provveduto alla sua caratterizzazione qualitativa ed alla determinazione della sua durata, calcolata osservando il comportamento di ciascun animale consecutivamente per un minuto in ogni sessione da 10 minuti e per un totale di 12 minuti complessivi. Solamente i comportamenti che hanno fatto registrare una durata di almeno 4 secondi consecutivi sono stati inclusi nella valutazione.

7.3 Procedura sperimentale

Gli esperimenti si sono articolati in due fasi distinte, una fase di induzione, costituita dal trattamento ripetuto ed intermittente con caffeina, o veicolo, ed una fase di espressione, rappresentata dalla valutazione degli effetti motori acuti dell'amfetamina somministrata dopo tre giorni dal termine del trattamento con caffeina.

Fase di Induzione. Durante questa fase ciascun ratto ha ricevuto una iniezione di acqua bidistillata (veicolo i.p.) ed è stato lasciato abituare alla *test cage* per un ora. Al termine dell'ambientamento un gruppo di ratti ha ricevuto caffeina (15 mg/kg i.p.) mentre un altro ha ricevuto veicolo (i.p.) a giorni alterni, per la durata di 14 giorni e per un totale di 7 somministrazioni. Dopo due ore dalla somministrazione di caffeina o veicolo, durante le quali sono state eseguite le misurazioni dell'attività locomotoria e del comportamento stereotipato, ciascun ratto è stato nuovamente trasferito nella sua *home cage*. La dose di

caffèina scelta (15 mg/kg i.p.) ed il protocollo di somministrazione usato in questo studio sono stati adottati sulla base di esperimenti precedentemente compiuti nei nostri laboratori che hanno dimostrato l'abilità della caffèina nell'indurre sensibilizzazione al comportamento rotatorio omolaterale in ratti aventi una denervazione unilaterale del sistema dopaminergico nigrostriatale (Cauli et al., 2003).

Fase di Espressione. Dopo tre giorni dall'ultima somministrazione di caffèina, o di veicolo, i ratti hanno ricevuto un'iniezione di veicolo (i.p.) e sono stati trasferiti nella *test cage* allo scopo di estinguere l'attività motoria spontanea. Dopo un'ora dalla somministrazione di veicolo, i ratti hanno ricevuto un'iniezione di amfetamina (0.5 mg/kg s.c.) e nelle due ore seguenti sono state eseguite le misurazioni dell'attività locomotoria e stereotipata. La dose di amfetamina utilizzata in questo studio è stata impiegata sulla base di esperimenti precedentemente compiuti nei nostri laboratori che hanno dimostrato un potenziamento degli effetti motori di questa dose di amfetamina in ratti pretrattati con caffèina (Simola et al., 2004).

7.4 Farmaci

La caffèina base libera (15 mg/kg) e l'amfetamina solfato (0.5 mg/kg) sono state solubilizzate in acqua bidistillata, senza l'ausilio di alcun agente solubilizzante. La caffèina è stata somministrata per via intraperitoneale (3 ml/kg) mentre l'amfetamina per via sottocutanea (1 ml/kg).

7.5 Statistica

I ratti sono stati suddivisi in “low” responders alla caffeina, quando il valore dell’attività motoria totale misurato durante la prima somministrazione di caffeina è stato inferiore al valore medio, ed in “high” responders quando tale valore è stato superiore rispetto alla media.

Durante la fase di induzione, lo sviluppo di sensibilizzazione alla caffeina è stato valutato per mezzo della analisi di regressione lineare applicata alle medie \pm S.E.M. dei valori di attività motoria totale, attività locomotoria e comportamento stereotipato misurati durante ciascuna somministrazione. Allo scopo di analizzare la presenza e l’intensità della sensibilizzazione alla caffeina è stato calcolato il coefficiente angolare delle rette di regressione relative a tutto il gruppo di ratti trattati, al gruppo di ratti “low” responders, al gruppo di ratti “high” responders e ad ogni singolo ratto. Un valore positivo del coefficiente angolare è stato assunto come indicativo della presenza di sensibilizzazione (Badiani et al., 1995a) mentre un elevato valore del coefficiente angolare è stato considerato come indicativo di un’elevata intensità di sensibilizzazione. Inoltre, l’influenza della diversa suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina sullo sviluppo di sensibilizzazione ai suoi effetti motori è stata ulteriormente analizzata mediante uno studio di correlazione tra gli effetti acuti della caffeina ed il coefficiente angolare delle rette di regressione lineare relative alla somministrazione di caffeina.

Durante la fase di espressione è stata valutata la presenza di possibili differenze nel comportamento motorio stimolato, rispettivamente, dal veicolo o dall’amfetamina tra i ratti trattati con veicolo ed i ratti trattati con caffeina. Inoltre, è stata determinata

l'influenza della differente suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina e della differente intensità della sensibilizzazione alla caffeina sugli effetti stimolanti motori mediati dall'amfetamina. A questo scopo è stata impiegata l'analisi statistica ANOVA ad una, due o tre vie, seguita dal post-hoc di Newman-Keuls, nonché lo studio di correlazione.

CAPITOLO 8

RISULTATI

8.1 Effetto della somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina nella fase di induzione

La somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina (15 mg/kg, i.p.) ha indotto sensibilizzazione dell'attività motoria totale (coefficiente angolare, c.a.= 683, $r^2 = 0.89$, $P = 0.001$, dell'attività locomotoria (c.a. = 633, $r^2 = 0.89$, $P = 0.001$) e del comportamento stereotipato di rearing (c.a. = 15.7, $r^2 = 0.88$, $P = 0.001$). Al contrario, la sensibilizzazione non è stata osservata per quanto riguarda i comportamenti stereotipati di grooming (c.a. = 5.5, $r^2 = 0.22$, $P = 0.29$) e sniffing (c.a. = -0.9, $r^2 = 0.27$, $P = 0.28$) stimolati dalla caffeina (Fig. 21 A e B).

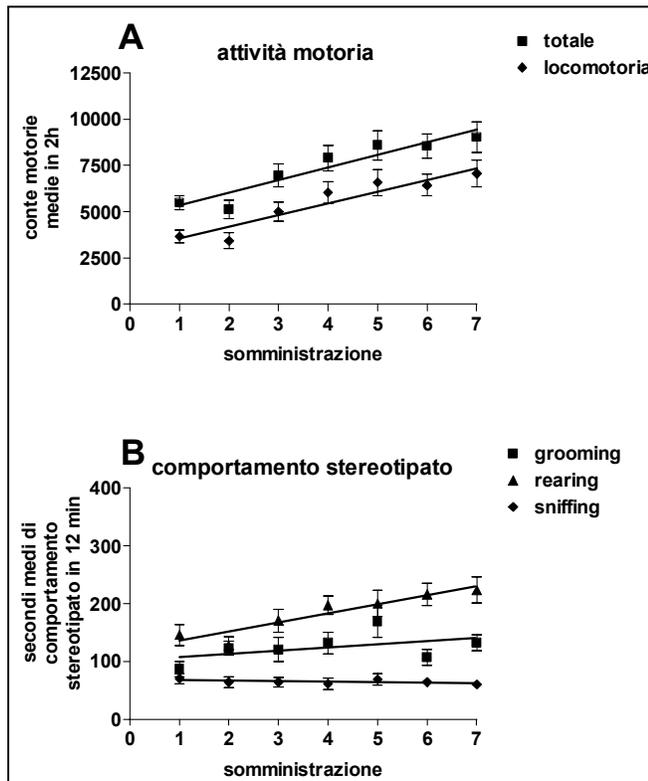


Fig. 21 Modificazioni degli effetti stimolanti motori della caffeina (15 mg/kg i.p.) durante la sua somministrazione a giorni alterni per 14 giorni (7 somministrazioni in totale). E' stato osservato lo sviluppo di sensibilizzazione per: attività motoria totale, attività locomotoria e comportamento stereotipato di rearing . N = 19.

Lo sviluppo di sensibilizzazione agli effetti stimolanti motori della caffeina è stato osservato sia nei ratti “low” che in quelli “high” responders per quanto riguarda attività motoria totale (“low”: c.a. = 620, $r^2 = 0.87$, $P = 0.002$; “high”: c.a. = 752, $r^2 = 0.87$, $P = 0.002$), attività locomotoria (“low”: c.a. = 702, $r^2 = 0.88$, $P = 0.002$; ”high”: c.a. = 572, $r^2 = 0.87$, $P = 0.002$) e comportamento stereotipato di rearing (“low”: c.a. = 13.9, $r^2 = 0.82$, $P = 0.01$; “high”: c.a. = 11.05, $r^2 = 0.7$, $P = 0.02$) (Fig. 22 A-C).

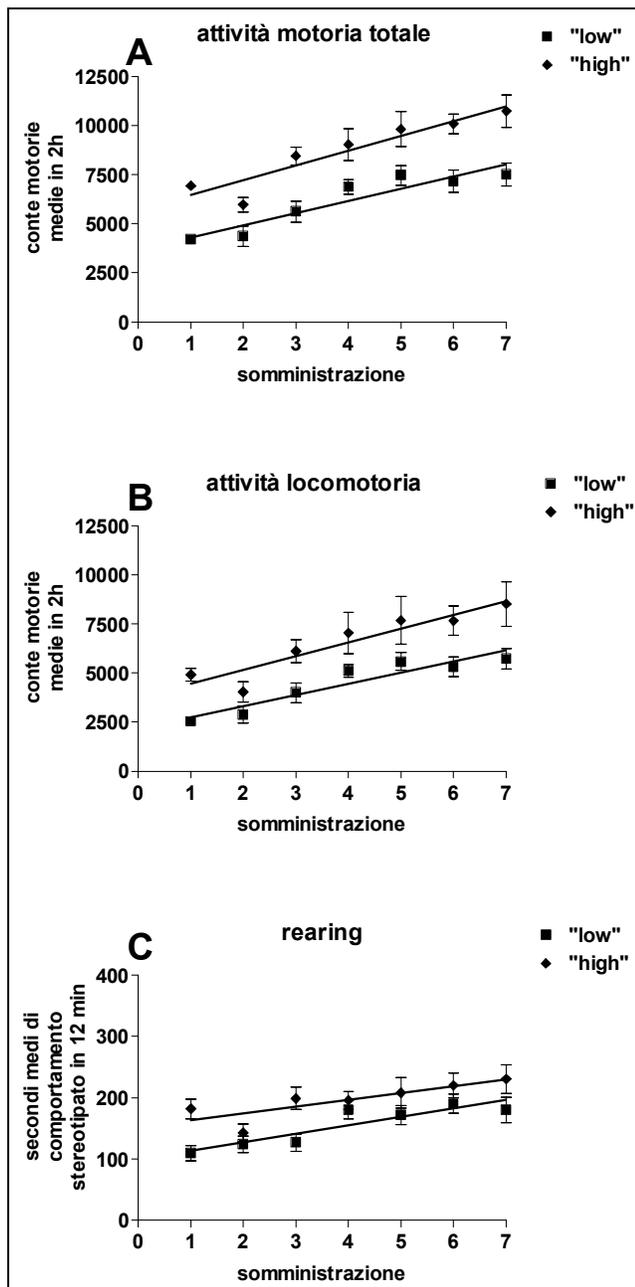


Fig. 22 Effetto della differente suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina sullo sviluppo di sensibilizzazione. La caffeina (15 mg/kg i.p.) è stata somministrata a giorni alterni per 14 giorni (ved Fig. 21).

I risultati dimostrano come la suscettibilità individuale non influenzi lo sviluppo di sensibilizzazione alla caffeina dal momento che questa è stata osservata sia nei ratti “low” che nei ratti “high” responders alla caffeina. N = 19.

Lo studio di correlazione ha confermato come la differente suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina non influenzi lo sviluppo di sensibilizzazione verso gli effetti motori della sostanza (attività motoria totale c.a. = 0.08, $r^2 = 0.2$; P = 0.19, attività locomotoria c.a. = 0.11, $r^2 = 0.13$; P = 0.13; rearing c.a. = -0.04, $r^2 = 0.06$; P = 0.29).

L'applicazione individuale dell'analisi di regressione lineare agli effetti della somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina ha evidenziato la presenza di un valore positivo del coefficiente angolare per ciascuno dei ratti trattati, indicando come tutti i ratti utilizzati in questi esperimenti abbiano sviluppato sensibilizzazione agli effetti della caffeina. Quindi, allo scopo di valutare la possibile influenza dell'intensità della sensibilizzazione alla caffeina sugli effetti dell'amfetamina i ratti sono stati suddivisi in weak sensitized (WS), quando il valore del coefficiente angolare è stato inferiore al valore medio ed in strong sensitized (SS) quando il valore del coefficiente angolare è stato superiore alla media (Fig. 23).

8.2 Effetto della somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina sul comportamento motorio stimolato dal veicolo nella fase di espressione

Il trattamento ripetuto ed intermittente con caffeina non ha prodotto alterazioni nel comportamento motorio indotto dalla somministrazione di veicolo nei ratti, indicando come la precedente esposizione alla caffeina non influenzi l'attività motoria in maniera aspecifica [attività motoria totale: veh + veh = 2384 ± 217 , caff + veh = 2024 ± 134 ($F_{1,28} = 1.23$, P = 0.26); attività locomotoria: veh + veh = 1690 ± 181 , caff + veh = 1307 ± 109

($F_{1,28} = 0.95$, $P = 0.34$; one-way ANOVA, attività motoria misurata per un'ora tre giorni dopo il termine del trattamento].

La differente suscettibilità individuale agli effetti motori acuti della caffeina ed il grado di sensibilizzazione alla caffeina non hanno quindi influenzato l'attività motoria stimolata dal veicolo nei ratti precedentemente trattati con caffeina (dati non mostrati).

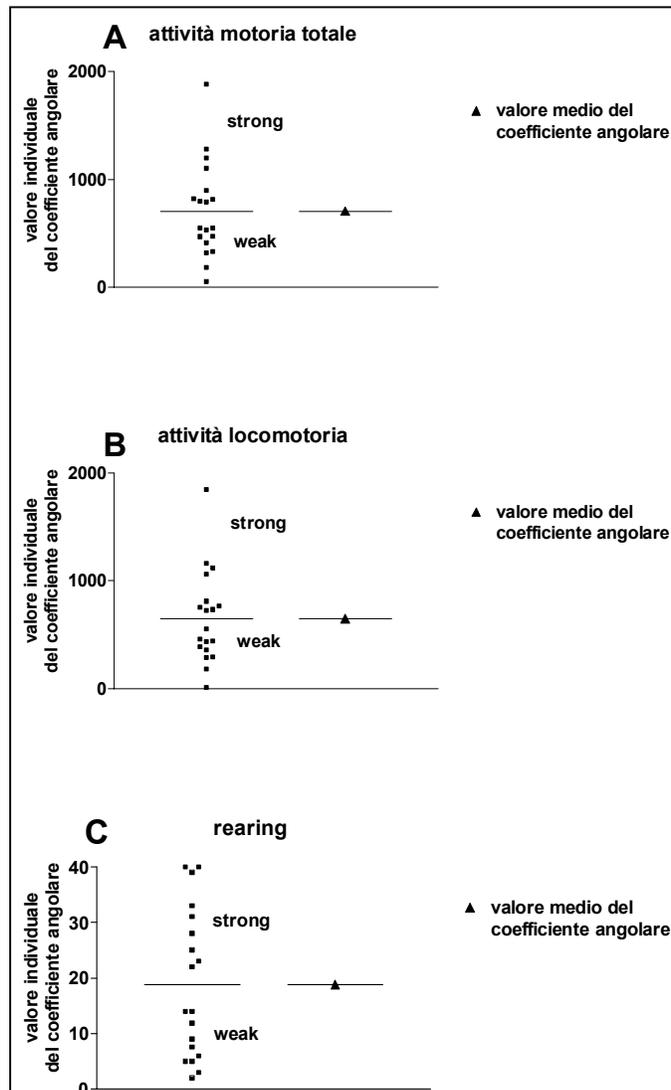


Fig. 23 Suddivisione dei ratti trattati con caffeina in “weak sensitized” (WS) e “strong sensitized” (SS) sulla base del valore del coefficiente angolare ottenuto dall’analisi di regressione lineare individuale. I ratti con un coefficiente angolare superiore alla media sono stati considerati SS, mentre quelli per cui tale valore si è rivelato inferiore alla media sono stati classificati come WS. $N = 19$.

8.3 Effetto della somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina sull'attivazione comportamentale stimolata dall'amfetamina nella fase di espressione

Il trattamento ripetuto ed intermittente con caffeina ha indotto un significativo potenziamento dell'attività motoria totale e dell'attività locomotoria stimulate dall'amfetamina (0.5 mg/kg, s.c.), come mostrato dall'analisi statistica ANOVA a due vie (Fig. 24 A).

Per quanto riguarda l'attività motoria totale si è evidenziato un effetto significativo del trattamento ($F_{1,28} = 10.8$, $P = 0.003$), un significativo effetto del tempo ($F_{11,308} = 41.6$, $P = 0.00$) ed una significativa interazione trattamento per tempo ($F_{11,308} = 2.6$, $P = 0.004$). Inoltre il post hoc di Newman-Keuls ha evidenziato un effetto significativo del trattamento con caffeina a 10, 20 e dai 40 ai 100 minuti dalla somministrazione di amfetamina (Fig. 24 C).

In modo analogo, per quanto attiene l'attività locomotoria l'analisi statistica ANOVA a due vie ha rivelato un effetto significativo del trattamento ($F_{1,28} = 13.2$, $P = 0.001$), un significativo effetto del tempo ($F_{11,308} = 27.7$, $P = 0.000$) ed una significativa interazione trattamento per tempo ($F_{11,308} = 2.2$, $P = 0.01$). Inoltre, il post hoc di Newman-Keuls ha mostrato un effetto significativo del trattamento con caffeina dai 10 ai 70 ed a 90 e 100 minuti dalla somministrazione di amfetamina (Fig. 24 D).

Gli effetti del pretrattamento con caffeina sul comportamento stereotipato stimolato dall'amfetamina sono mostrati in figura 24 B. L'analisi statistica ANOVA ad una via ha evidenziato un effetto significativo del trattamento con caffeina sul comportamento di

rearing stimolato dall'amfetamina ($F_{1,28} = 7.3$, $P = 0.01$) mentre non ha mostrato alcun effetto del trattamento con caffeina sui comportamenti di grooming ($F_{1,28} = 2.78$, $P = 0.11$) e di sniffing ($F_{1,28} = 0.13$, $P = 0.72$) indotti dall'amfetamina.

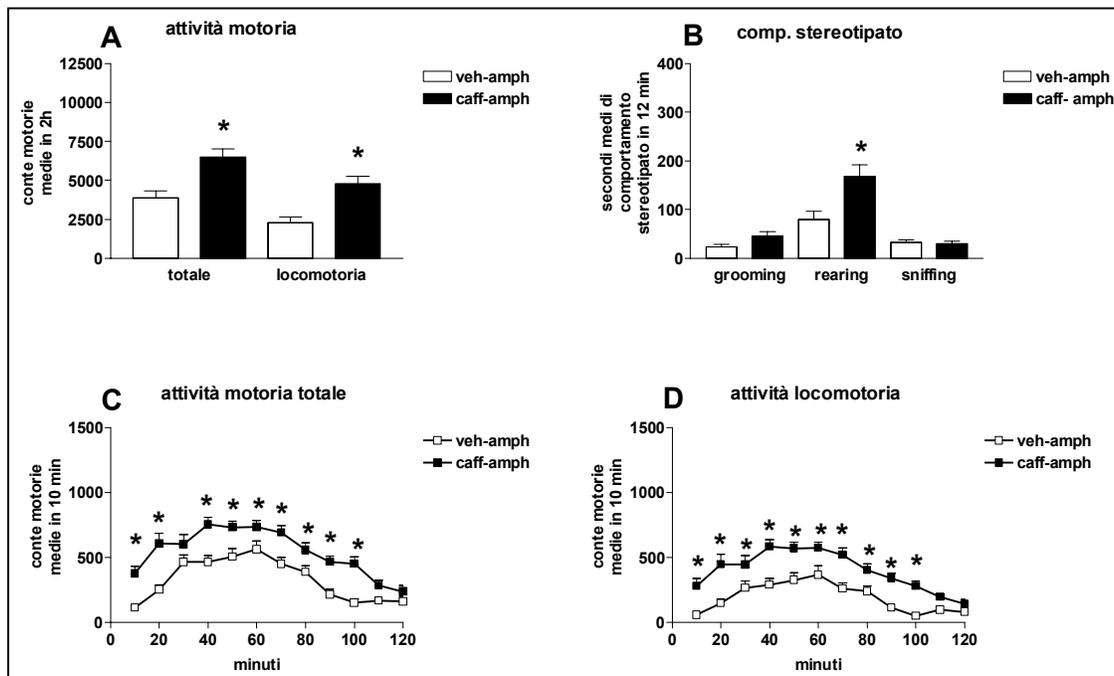


Fig. 24 Effetto del trattamento ripetuto ed intermittente con caffeina sugli effetti motori acuti dell'amfetamina. Il trattamento con caffeina ha potenziato significativamente l'attività motoria totale, l'attività locomotoria ed il comportamento stereotipato di rearing indotti dall'amfetamina (0.5 mg/kg s.c.) (A-B). le differenze nell'andamento temporale dell'attività motoria stimolata dall'amfetamina tra i ratti pretrattati con caffeina ed i ratti di controllo sono mostrate nei riquadri C e D. * $P < 0.05$. $N = 11$ per i ratti di controllo, $N = 19$ per i ratti trattati con caffeina.

8.4 Effetto della suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina e dell'intensità della sensibilizzazione alla caffeina sulla stimolazione motoria indotta dall'amfetamina nella fase di espressione

Gli effetti stimolanti motori dell'amfetamina osservati nella fase di espressione sono stati significativamente influenzati dall'intensità della sensibilizzazione alla caffeina ma non dalla differente suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina (Fig. 25-26)

L'analisi ANOVA a tre vie applicata all'attività motoria totale ha mostrato un effetto significativo dell'intensità della sensibilizzazione ($F_{1,15} = 18.9$, $P = 0.001$), un effetto significativo del tempo ($F_{11,165} = 30.5$, $P = 0.000$), ed una significativa interazione tra l'intensità della sensibilizzazione ed il tempo ($F_{11,165} = 3.55$, $P = 0.001$). Al contrario, l'effetto della suscettibilità individuale ($F_{1,15} = 3.04$, $P = 0.08$), l'interazione tra suscettibilità individuale ed intensità della sensibilizzazione ($F_{1,15} = 0.01$, $P = 0.91$), l'interazione tra suscettibilità individuale e tempo ($F_{11,165} = 1.6$, $P = 0.1$) e l'interazione tra suscettibilità individuale, intensità della sensibilizzazione e tempo ($F_{11,165} = 1.34$, $P = 0.21$) non si sono dimostrati significativi. Sia nei ratti "low" che in quelli "high" responders l'attività motoria totale stimolata dall'amfetamina è stata significativamente più intensa nei ratti SS che in quelli WS (Fig 25 A e 26 A-B).

In maniera analoga, l'analisi ANOVA a tre vie applicata all'attività locomotoria totale ha evidenziato un effetto significativo dell'intensità della sensibilizzazione ($F_{1,15} = 16.9$, $P = 0.001$), un effetto significativo del tempo ($F_{11,165} = 25.9$, $P = 0.000$), ed una significativa interazione tra l'intensità della sensibilizzazione ed il tempo ($F_{11,165} = 9.8$, $P = 0.001$). Al contrario, l'effetto della suscettibilità individuale ($F_{1,15} = 4.15$, $P = 0.07$), l'interazione tra

suscettibilità individuale ed intensità della sensibilizzazione ($F_{1,15} = 0.2$, $P = 0.9$), l'interazione tra suscettibilità individuale e tempo ($F_{11,165} = 1.7$, $P = 0.07$) e l'interazione tra suscettibilità individuale, intensità della sensibilizzazione e tempo ($F_{11,165} = 1.3$, $P = 0.2$) non si sono rivelati significativi. Sia nei ratti “low” che in quelli “high” responders l'attività locomotoria indotta dall'amfetamina è stata significativamente più marcata nei ratti SS che in quelli WS (Fig 25 B e 26 C-D).

L'analisi ANOVA a due vie applicata al comportamento stereotipato di rearing ha evidenziato un significativo effetto dell'intensità della sensibilizzazione ($F_{1,15} = 20.2$, $P = 0.000$), mentre l'effetto della suscettibilità individuale ($F_{1,15} = 3.55$, $P = 0.08$) e l'interazione tra suscettibilità individuale ed intensità della sensibilizzazione ($F_{1,15} = 0.6$, $P = 0.45$) non si sono rivelati statisticamente significativi. Sia nei ratti “low” che in quelli “high” responders il comportamento stereotipato di rearing indotto dall'amfetamina è stato significativamente più intenso nei ratti SS che in quelli WS (Fig 25 C).

L'influenza dell'intensità della sensibilizzazione alla caffeina sugli effetti acuti dell'amfetamina è stata confermata dallo studio di correlazione tra il coefficiente angolare ottenuto dalla regressione lineare applicata individualmente a ciascun ratto e l'intensità della stimolazione motoria indotta dall'amfetamina (attività motoria totale c.a. = 0.15, $r^2 = 0.66$ $P \leq 0.0001$, attività locomotoria c.a. = 0.16, $r^2 = 0.61$; $P < 0.0001$; rearing c.a. = 3.9, $r^2 = 0.25$; $P < 0.03$).

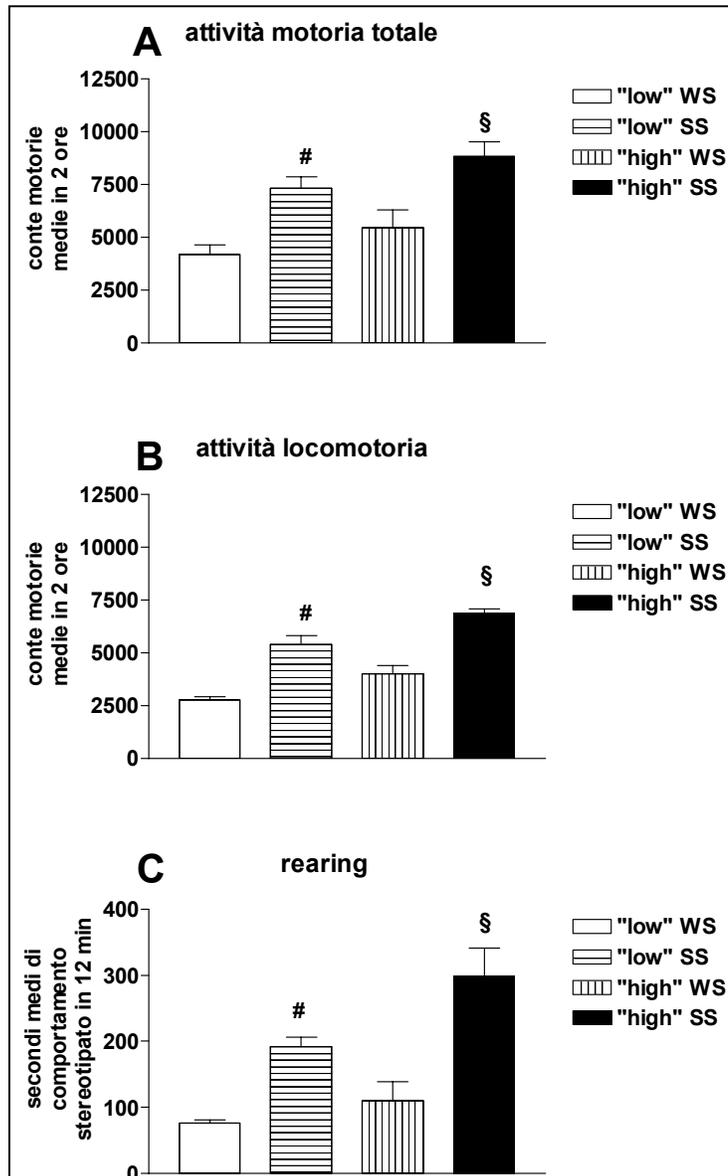


Fig. 25 Effetto dell'intensità della sensibilizzazione e della suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina (15 mg/kg i.p.) sugli effetti stimolanti motori dell'amfetamina (0.5 mg/kg s.c.). Il grado di sensibilizzazione alla caffeina, ma non la suscettibilità individuale, influenza il potenziamento degli effetti stimolanti motori dell'amfetamina nei ratti pretrattati con caffeina. Sia nei ratti "low" che in quelli "high" responders trattati con amfetamina l'attività motoria totale (A), l'attività locomotoria (B) ed il comportamento di rearing (C) sono stati più marcati nei ratti SS che nei ratti WS, come indicato dal post-hoc di Newman-Keuls. # $P < 0.05$ vs. "low" WS; § $P < 0.05$ vs "high" WS. $N = 4-5$

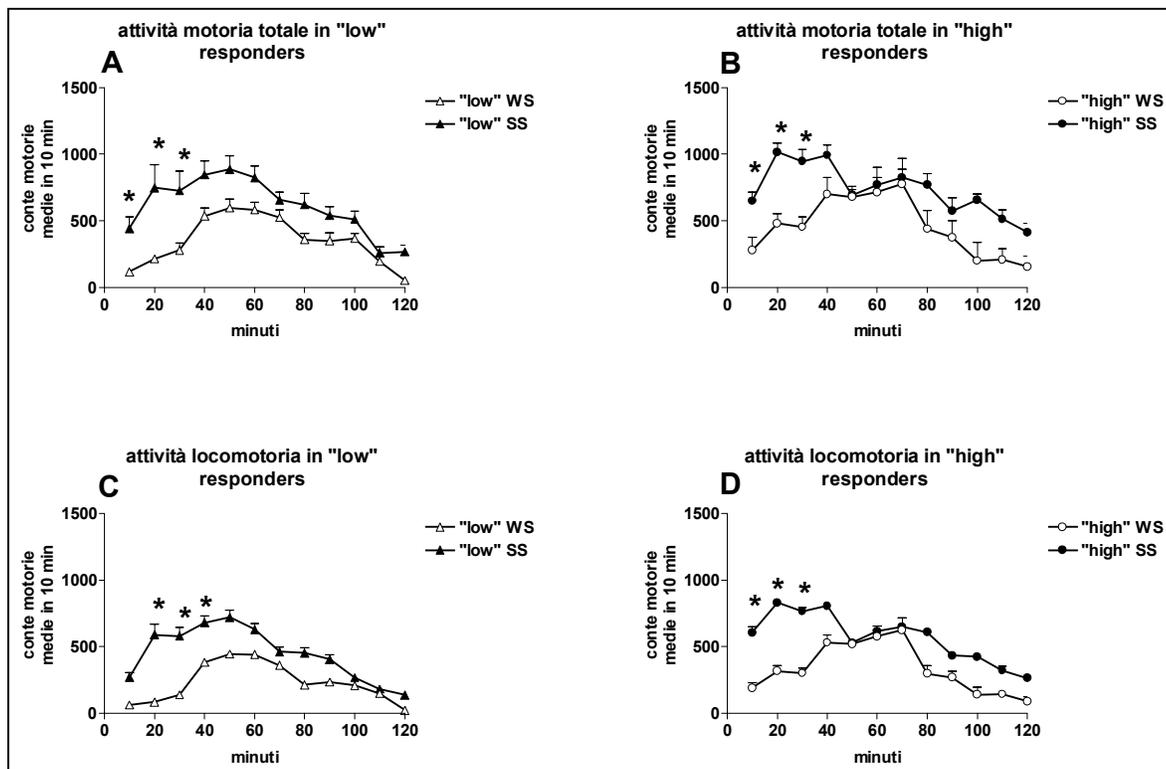


Fig. 26 Differenze nell'andamento temporale dell'attività motoria totale (A e B) e locomotoria (C e D) stimolata dall'amfetamina (0.5 mg/kg s.c.) in ratti WS e SS sia "high" che "low" responders alla caffeina. * $P < 0.05$. $N = 4-5$

CAPITOLO 9

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio dimostrano che la somministrazione ripetuta ed intermittente di una dose moderata di caffeina induce, nel ratto, un progressivo incremento dell'attività motoria, che si traduce nello sviluppo di sensibilizzazione. Ad ogni modo, non è stata riscontrata una correlazione tra l'insorgenza di sensibilizzazione e la suscettibilità individuale agli effetti motori acuti della caffeina, dal momento che la sensibilizzazione è stata osservata sia nei ratti "high" che in quelli "low" responders alla caffeina. L'analisi della risposta individuale ha evidenziato una sensibilizzazione di intensità variabile tra i ratti, laddove i ratti che hanno mostrato una sensibilizzazione alla caffeina di intensità elevata hanno anche presentato un'intensa attivazione motoria in seguito alla somministrazione di amfetamina.

Studi precedenti eseguiti allo scopo di determinare gli effetti a lungo termine della caffeina hanno dimostrato come la somministrazione prolungata di caffeina induca tolleranza ai propri effetti stimolanti motori (Holtzman, 1983; Holtzman and Finn, 1988; Svenningsson et al., 1999). Inoltre, studi precedenti che hanno valutato le modificazioni degli effetti motori della caffeina in seguito alla sua somministrazione ripetuta nei roditori hanno prodotto risultati contrastanti. Infatti, è stato dimostrato come la somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina nel ratto produca sensibilizzazione del comportamento di corsa quando venga somministrata in una gabbia provvista di ruota (Meliska et al., 1990), mentre altri studi eseguiti sia dal nostro che da altri gruppi di ricerca hanno dimostrato solamente una tendenza alla sensibilizzazione dell'attività

motoria in ratti e topi dopo somministrazione intermittente di caffeina (Kuribara, 1994; Cauli and Morelli, 2002).

A questo proposito è rilevante evidenziare alcune differenze metodologiche esistenti tra questo studio e gli studi precedenti del nostro gruppo che hanno esaminato gli effetti della somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina nel ratto. Come prima cosa, l'osservazione dell'attività motoria dei ratti nel presente studio è stata limitata a due ore a differenza degli studi precedenti in cui tale periodo di osservazione era di tre ore. Questo accorgimento potrebbe avere reso più evidente l'espressione della sensibilizzazione per mezzo dell'eliminazione dal computo dell'attività motoria stimolata dalla caffeina dei comportamenti aspecifici che si possono verificare al termine dell'effetto del farmaco. Inoltre, in questo studio, gli animali sono stati fatti abituare alla gabbia in cui è stata eseguita la valutazione dell'attività motoria per un'ora prima della somministrazione di caffeina. Considerando che la caffeina è in grado di indurre vari effetti avversi, tra cui ansia (Fredholm et al., 1999) e che un ambiente non familiare può di per se stesso indurre ansia nei roditori (Merali et al., 2003) l'accoppiamento simultaneo tra ambiente non familiare e somministrazione di caffeina potrebbe esacerbare gli effetti ansiogeni della caffeina, i quali a loro volta potrebbero interferire con lo sviluppo di sensibilizzazione. Su queste basi è quindi ipotizzabile che l'acclimatazione alla gabbia in cui la caffeina è stata somministrata abbia potuto facilitare l'espressione della sensibilizzazione alla caffeina mediante una riduzione dei suoi effetti ansiogeni.

Questo studio dimostrando lo sviluppo di sensibilizzazione a diversi aspetti della attivazione motoria indotta dalla caffeina, quali attività motoria totale, attività locomotoria e comportamento stereotipato di rearing, suggerisce che la somministrazione

intermittente di caffeina sia in grado di indurre modificazioni neuroadattative a lungo termine, in maniera simile a quanto osservato in seguito a somministrazione di altri psicostimolanti quali amfetamina e cocaina.

Numerosi studi indicano come gli effetti della caffeina siano estremamente variabili sia negli animali da esperimento che nell'uomo (Atkinson and Enslin, 1976; Hughes et al., 1993; Kendler and Prescott, 1999; Griffiths and Chausmer, 2000). Quindi, il differente grado di sensibilizzazione osservato in questo studio è di particolare importanza in quanto potrebbe essere correlato ad una differente responsività interindividuale alle modificazioni neuronali indotte dalla caffeina.

Inoltre, i risultati di questo studio dimostrano che la differente suscettibilità individuale agli effetti motori acuti della caffeina non influenza lo sviluppo di sensibilizzazione motoria alla caffeina, dal momento che questa è stata osservata sia in ratti "low" che in ratti "high" responders. Questo fatto suggerisce come la sensibilizzazione alla caffeina non sia semplicemente un epifenomeno dovuto alla suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina, ma piuttosto rifletta l'induzione di modificazioni neuroadattative persistenti da parte della somministrazione ripetuta della sostanza.

Oltre ad un progressivo incremento degli effetti motori della caffeina, nei ratti sensibilizzati alla caffeina è stato evidenziato un significativo potenziamento degli effetti dell'amfetamina. A questo proposito è importante evidenziare come l'intervallo di tre giorni tra la fine del trattamento con caffeina e la somministrazione di amfetamina impiegato in questo studio escluda la presenza di caffeina residua o di metaboliti (Lau et al., 1995) che potrebbero direttamente potenziare gli effetti motori dell'amfetamina. In base a queste considerazioni, il potenziamento degli effetti dell'amfetamina qui descritto

osservato nei ratti pretrattati con caffeina è quindi verosimilmente dovuto alla presenza di modificazioni neuronali facilitatorie a lungo termine prodotte dal precedente trattamento con caffeina.

È interessante notare come, analogamente a quanto osservato per la sensibilizzazione alla caffeina, il potenziamento degli effetti dell'amfetamina non sia significativamente influenzato dalla suscettibilità individuale agli effetti acuti della caffeina, ma sia piuttosto correlato al grado di sensibilizzazione alla caffeina. Questi risultati suggeriscono che ratti che abbiano sviluppato una forte sensibilizzazione alla caffeina presentino modificazioni neurologiche più profonde rispetto ai ratti che abbiano sviluppato una sensibilizzazione di grado ridotto.

La caffeina produce i suoi effetti stimolanti motori agendo come un antagonista competitivo dei recettori per l'adenosina, in particolare del sottotipo A_{2A} (Fredholm et al., 1999; Fisone et al., 2003). I recettori adenosinergici A_{2A} e quelli dopaminergici D_2 sono colocalizzati sui neuroni striatopallidali (Schiffmann and Vanderhaeghen, 1993) ed interagiscono in maniera opposta a livello recettore-recettore ed a livello dei secondi messaggeri, dove i recettori A_{2A} ed i recettori D_2 inibiscono e stimolano, rispettivamente, la formazione di cAMP (Kull et al., 2000). Quindi l'antagonismo dei recettori A_{2A} da parte della caffeina può, da una parte, facilitare direttamente le azioni dei recettori D_2 sui neuroni striatopallidali e, dall'altra, attraverso i circuiti dei gangli della base che coinvolgono i neuroni striatopallidali e le proiezioni subtalamico-nirgo-cortico-striatali indirettamente potenziare l'attivazione dei recettori D_1 situati sui neuroni striatonigrali (Pinna et al., 1996). Su queste basi è ipotizzabile che l'antagonismo prolungato dei recettori A_{2A} da parte di un trattamento ripetuto con caffeina possa produrre

modificazioni persistenti nell'interazione tra recettori per l'adenosina e recettori per la dopamina, risultando in una facilitazione della trasmissione dopaminergica che potrebbe giustificare i risultati osservati in questo studio. Questa ipotesi è corroborata da risultati precedenti del nostro gruppo di ricerca che hanno mostrato un incremento della risposta alla stimolazione dei recettori D₁ e D₂ in ratti trattati in maniera ripetuta ed intermittente con caffeina (Cauli and Morelli, 2002).

La sensibilizzazione agli effetti motori degli psicostimolanti è uno dei migliori esempi di plasticità neuronale e comportamentale indotta da farmaci (Stewart and Badiani, 1993) ed è stato ipotizzato che questo fenomeno possa riprodurre negli animali da esperimento alcune delle modificazioni neuroplastiche che si pensa siano coinvolte nei fenomeni di farmacodipendenza (Robinson and Berridge, 1993; Vanderschuren and Kalivas, 2000).

La dimostrazione che la somministrazione ripetuta ed intermittente di caffeina induce sensibilizzazione ai propri effetti stimolanti motori e potenzia gli effetti comportamentali dell'amfetamina nel ratto enfatizza, come sottolineato dalle ricerche svolte da Griffiths e collaboratori, che il potenziale d'abuso degli psicostimolanti potrebbe non essere ristretto solamente alle sostanze illecite o pericolose. Questo studio quindi propone un modello di somministrazione di caffeina attraverso il quale valutare i meccanismi che potrebbero essere alla base dell'uso improprio e del possibile abuso di caffeina e la possibile interazione della caffeina con altri farmaci come gli psicostimolanti dotati di proprietà d'abuso nell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

Alloisio S, Cugnoli C, Ferroni S, Nobile M.

Differential modulation of ATP-induced calcium signalling by A1 and A2 adenosine receptors in cultured cortical astrocytes.
Br J Pharmacol. 2004, 141:935-942.

Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Hyphantis T, Papathanasiou G, Bekris E, Marselos M, Panlilio L, Muller CE, Goldberg SR, Ferré S.

A detailed behavioral analysis of the acute motor effects of caffeine in the rat: involvement of adenosine A1 and A2A receptors.
Psychopharmacology. 2005, 183:154-162.

Atkinson J, Enslen M.

Self-administration of caffeine by the rat.
Arzneimittelforschung. 1976, 26:2059-2061.

Badiani A, Anagnostaras SG, Robinson TE.

The development of sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine is enhanced in a novel environment.
Psychopharmacology. 1995a, 117:443-452.

Badiani A, Browman KE, Robinson TE.

Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine.
Brain Res. 1995b, 674:291-298.

Badiani A, Oates MM, Robinson TE.

Modulation of morphine sensitization in the rat by contextual stimuli.
Psychopharmacology. 2000, 151:273-282.

Banner KH, Page CP.

Theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors as anti-inflammatory drugs in the treatment of bronchial asthma.
Eur Respir J. 1995, 8:996-1000.

Bassareo V, Di Chiara G.

Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum.
J Neurosci. 1997, 17:851-861

Bassareo V, Di Chiara G.

Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments.

Neuroscience. 1999a, 89:637-641.

Bassareo V, Di Chiara G.

Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state.

Eur J Neurosci. 1999b, 11:4389-4397.

Becker JB.

Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens.

Pharmacol Biochem Behav. 1999, 64:803-812.

Bedingfield JB, King DA, Holloway FA.

Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity, and additivity.

Pharmacol Biochem Behav. 1998, 61:291-296.

Beierle I, Meibohm B, Derendorf H.

Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics.

Int J Clin Pharmacol Ther. 1999, 37:529-547.

Berridge KC, Robinson TE.

What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?

Brain Res Rev. 1998, 28:309-369.

Bhattacharya SK, Satyan KS, Chakrabarti A.

Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats.

J Psychopharmacol. 1997, 11:219-224.

Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, Yan Z, Meijer L, Fienberg AA, Tsai LH, Kwon YT, Girault JA, Czernik AJ, Haganir RL, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P.

Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons.

Nature. 1999, 402:669-671.

Blanchard J, Sawers SJ.

The absolute bioavailability of caffeine in man.

Eur J Clin Pharmacol. 1983, 24:93-98.

Bourin M, Malinge M, Guitton B.

Provocative agents in panic disorder.

Therapie. 1995, 50:301-306.

Briscoe RJ, Vanecek SA, Vallett M, Baird TJ, Holloway FA, Gauvin DV.
Reinforcing effects of caffeine, ephedrine, and their binary combination in rats.
Pharmacol Biochem Behav. 1998, 60:685-693.

Broderick P, Benjamin AB.
Caffeine and psychiatric symptoms: a review.
J Okla State Med Assoc. 2004, 97:538-542.

Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF.
Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989, 86:7696-7700.

Cattabeni F, Abbracchio MP.
Trasmissione Purinergica in "*Farmacologia Generale e Molecolare*" UTET, Torino, 1996, pp.469-480

Cauli O, Morelli M.
Subchronic caffeine administration sensitizes rats to the motor-activating effects of dopamine D(1) and D(2) receptor agonists.
Psychopharmacology. 2002, 162:246-254.

Cauli O, Morelli M.
Caffeine and the dopaminergic system.
Behav Pharmacol. 2005, 16:63-77.

Cauli O, Pinna A, Valentini V, Morelli M.
Subchronic caffeine exposure induces sensitization to caffeine and cross-sensitization to amphetamine ipsilateral turning behavior independent from dopamine release.
Neuropsychopharmacology. 2003, 28:1752-1759.

Cunha RA.
Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors.
Neurochem Int. 2001, 38:107-125

Daly JW, Fredholm BB.
Caffeine--an atypical drug of dependence.
Drug Alcohol Depend. 1998, 51:199-206.

D'Ambrosio SM.
Evaluation of the genotoxicity data on caffeine.
Regul Toxicol Pharmacol. 1994, 19:243-281.

Dews PB, O'Brien CP, Bergman J.

Caffeine: behavioral effects of withdrawal and related issues.
Food Chem Toxicol. 2002, 40:1257-1261.

Di Chiara G.

The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation.
Drug Alcohol Depend. 1995, 38:95-137.

Di Chiara G.

Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder.
Eur J Pharmacol. 1999, 375:13-30.

Di Chiara G.

Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction.
Behav Brain Res. 2002, 137:75-114.

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 1:227-241.

Dixon AK, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC.

Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat.
Br J Pharmacol. 1996, 118:1461-1468.

Dunwiddie TV, Masino SA.

The role and regulation of adenosine in the central nervous system.
Annu Rev Neurosci. 2001, 24:31-55.

El Yacoubi M, Ledent C, Menard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM.

The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors.
Br J Pharmacol. 2000, 129:1465-1473.

Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K.

Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia.
Trends Neurosci. 1997, 20:482-487.

Ferré S, Rimondini R, Popoli P, Reggio R, Pezzola A, Hansson AC, Andersson A, Fuxe K. Stimulation of adenosine A1 receptors attenuates dopamine D1 receptor-mediated increase of NGFI-A, c-fos and jun-B mRNA levels in the dopamine-denervated striatum and dopamine D1 receptor-mediated turning behaviour.
Eur J Neurosci. 1999, 11:3884-3892.

Ferré S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K.

Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, 88:7238-7241.

Fisone G, Borgkvist A, Usiello A.

Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action.

Cell Mol Life Sci. 2004, 61:857-872.

Fredholm BB

Activation of adenylate cyclase from rat striatum and tuberculum olfactorium by adenosine.

Med. Biol. 1977, 55: 262-267

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M.

Nomenclature and classification of purinoceptors.

Pharmacol Rev. 1994, 46:143-156.

Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE.

Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use.

Pharmacol Rev. 1999, 51:83-133.

Fredholm BB, Dunwiddie TW

How does adenosine inhibit transmitter release?

Trends Pharmacol Sci. 1988, 9:130-134

Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G.

Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells.

Biochem Pharmacol. 2001, 61:443-448.

Frost L, Vestergaard P.

Caffeine and risk of atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study.

Am J Clin Nutr. 2005, 81:578-582.

Fuxe K, Ferré S, Canals M, Torvinen M, Terasmaa A, Marcellino D, Goldberg SR, Staines W, Jacobsen KX, Lluís C, Woods AS, Agnati LF, Franco R.

Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function.

J Mol Neurosci. 2005, 26:209-220.

Garrett BE, Griffiths RR.

The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans.

Pharmacol Biochem Behav. 1997, 57:533-541.

Garrett BE, Holtzman SG.

D1 and D2 dopamine receptor antagonists block caffeine-induced stimulation of locomotor activity in rats.

Pharmacol Biochem Behav. 1994, 47:89-94.

Garrett BE, Holtzman SG.

The effects of dopamine agonists on rotational behavior in non-tolerant and caffeine-tolerant rats.

Behav Pharmacol. 1995, 6:843-851

Gasior M, Jaszyna M, Peters J, Goldberg SR.

Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose.

J Pharmacol Exp Ther. 2000, 295:1101-1111.

Gillingham RL, Keefe AA, Tikuisis P.

Acute caffeine intake before and after fatiguing exercise improves target shooting engagement time.

Aviat Space Environ Med. 2004, 75:865-871.

Giorgi O, Piras G, Corda MG.

The psychogenetically selected Roman high- and low-avoidance rat lines: A model to study the individual vulnerability to drug addiction.

Neurosci Biobehav Rev. 2007, 31:148-163.

Goldstein A, Wallace ME.

Caffeine dependence in schoolchildren?

Exp Clin Psychopharmacol. 1997, 5:388-392.

Golgeli A, Ozesmi C, Ozesmi M.

The effects of theophylline and caffeine on the isolated rat diaphragm.

Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam. 1995, 45:105-113.

Gouyon JB, Guignard JP.

Renal effects of theophylline and caffeine in newborn rabbits.

Pediatr Res. 1987, 21:615-618.

Green TA, Schenk S.

Dopaminergic mechanism for caffeine-produced cocaine seeking in rats.

Neuropsychopharmacology. 2002, 26:422-430.

Griffiths RR, Chausmer AL.

Caffeine as a model drug of dependence: recent developments in understanding caffeine withdrawal, the caffeine dependence syndrome, and caffeine negative reinforcement.

Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. 2000, 20:223-231.

Griffiths RR, Mumford GK.

Caffeine-A drug of abuse? in *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress* (Bloom F.E. and Kupfer D.J eds) Raven Press, New York. 1995. pp. 1699-1713.

Griffiths RR, Woodson PP.

Reinforcing properties of caffeine: studies in humans and laboratory animals.
Pharmacol Biochem Behav. 1988, 29:419-427.

Gubitz AK, Widdowson L, Kurokawa M, Kirkpatrick KA, Richardson PJ.

Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals.

J Neurochem. 1996, 67:374-381.

Gustafsson JA, Stenberg A.

On the obligatory role of the hypophysis in sexual differentiation hepatic metabolism in rats.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1976, 73:1462-1465.

Haile CN, Hiroi N, Nestler EJ, Kosten TA.

Differential behavioral responses to cocaine are associated with dynamics of mesolimbic dopamine proteins in Lewis and Fischer 344 rats.

Synapse. 2001, 41:179-190.

Hart CD, Flozak AS, Simmons RA.

Modulation of glucose transport in fetal rat lung: a sexual dimorphism.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1998, 19:63-70.

Hauber W.

Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation.

Prog Neurobiol. 1998, 56:507-540.

Hettinger BD, Lee A, Linden J, Rosin DL.

Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum.

J Comp Neurol. 2001, 431:331-346.

Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferré S, Fuxe K.

Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors.

J Biol Chem. 2002, 277:18091-18097.

Hoang T, Bergeron MD.

Androgen modulation of ornithine decarboxylase and compensatory renal growth.
Growth. 1987, 51:202-212.

Holtzman SG.

Complete, reversible, drug-specific tolerance to stimulation of locomotor activity by caffeine.

Life Sci. 1983, 33:779-787.

Holtzman SG, Finn IB.

Tolerance to behavioral effects of caffeine in rats.

Pharmacol Biochem Behav. 1988, 29:411-418.

Horger BA, Wellman PJ, Morien A, Davies BT, Schenk S.

Caffeine exposure sensitizes rats to the reinforcing effects of cocaine.

Neuroreport. 1991, 2:53-56.

Hoshaw BA, Lewis MJ.

Behavioral sensitization to ethanol in rats: evidence from the Sprague-Dawley strain.

Pharmacol Biochem Behav. 2001, 68:685-690

Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O.

Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine.

Nat Neurosci. 2005, 8:858-859.

Hughes JR, Oliveto AH, Bickel WK, Higgins ST, Badger GJ.

Caffeine self-administration and withdrawal: incidence, individual differences and interrelationships.

Drug Alcohol Depend. 1993, 32:239-246.

Jodogne C, Marinelli M, Le Moal M, Piazza PV.

Animals predisposed to develop amphetamine self-administration show higher susceptibility to develop contextual conditioning of both amphetamine-induced hyperlocomotion and sensitization.

Brain Res. 1994, 657:236-244.

Juliano LM, Griffiths RR.

A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features.

Psychopharmacology. 2004, 176:1-29.

Kaufman KR, Sachdeo RC.

Caffeinated beverages and decreased seizure control.

Seizure. 2003, 12:519-521.

Kelley AE.

Functional specificity of ventral striatal compartments in appetitive behaviors.
Ann N Y Acad Sci. 1999, 877:71-90.

Kendler KS, Prescott CA.

Caffeine intake, tolerance, and withdrawal in women: a population-based twin study.
Am J Psychiatry. 1999, 156:223-228.

Khanna NN, Somani SM.

Maternal coffee drinking and unusually high concentrations of caffeine in the newborn.
J Toxicol Clin Toxicol. 1984, 22:473-483.

Kull B, Ferré S, Arslan G, Svenningsson P, Fuxe K, Owman C, Fredholm BB.

Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors.
Biochem Pharmacol. 1999, 58:1035-1045.

Kuribara H.

Caffeine enhances the stimulant effect of methamphetamine, but may not affect induction of methamphetamine sensitization of ambulation in mice.
Psychopharmacology. 1994, 116:125-129.

Kuzmin A, Johansson B, Gimenez L, Ogren SO, Fredholm BB.

Combination of adenosine A1 and A2A receptor blocking agents induces caffeine-like locomotor stimulation in mice.
Eur Neuropsychopharmacol. 2006, 16:129-136.

Latini S, Pedata F.

Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations.
J Neurochem. 2001, 79:463-484.

Lau CE, Ma F, Falk JL.

Oral and IP caffeine pharmacokinetics under a chronic food-limitation condition.
Pharmacol Biochem Behav. 1995, 50:245-252.

Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M.

Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor.
Nature. 1997, 388:674-678.

Lelo A, Birkett DJ, Robson RA, Miners JO.

Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man.
Br J Clin Pharmacol. 1986, 22:177-182.

Lieberman HR, Tharion WJ, Shukitt-Hale B, Speckman KL, Tulley R.
Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. Sea-Air-Land.
Psychopharmacology. 2002, 164:250-261.

Lindskog M, Svenningsson P, Pozzi L, Kim Y, Fienberg AA, Bibb JA, Fredholm BB, Nairn AC, Greengard P, Fisone G.
Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine.
Nature. 2002, 418:774-778.

Lorist MM, Tops M.
Caffeine, fatigue, and cognition.
Brain Cogn. 2003, 53:82-94.

Lynge J, Hellsten Y.
Distribution of adenosine A1, A2A and A2B receptors in human skeletal muscle.
Acta Physiol Scand. 2000, 169:283-290.

Mackay DC, Rollins JW.
Caffeine and caffeinism.
J R Nav Med Serv. 1989, 75:65-67.

Marinelli M, White FJ.
Enhanced vulnerability to cocaine self-administration is associated with elevated impulse activity of midbrain dopamine neurons.
J Neurosci. 2000, 20:8876-8885.

McGowan JD, Altman RE, Kanto WP Jr.
Neonatal withdrawal symptoms after chronic maternal ingestion of caffeine.
South Med J. 1988, 81:1092-1094.

Meliska CJ, Landrum RE, Landrum TA.
Tolerance and sensitization to chronic and subchronic oral caffeine: effects on wheelrunning in rats.
Pharmacol Biochem Behav. 1990, 35:477-479.

Merali Z, Levac C, Anisman H.
Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice.
Biol Psychiatry. 2003, 54:552-565.

Mirenowicz J, Schultz W.
Importance of unpredictability for reward responses in primate dopamine neurons.
J Neurophysiol. 1994, 72:1024-1027.

Mirenowicz J, Schultz W.

Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli.

Nature. 1996, 379:449-451.

Misra AL, Vadlamani NL, Pontani RB.

Effect of caffeine on cocaine locomotor stimulant activity in rats.

Pharmacol Biochem Behav. 1986, 24:761-764.

Morgan JC, Sethi KD.

Drug-induced tremors.

Lancet Neurol. 2005, 4:866-876.

Mrvos RM, Reilly PE, Dean BS, Krenzelok EP.

Massive caffeine ingestion resulting in death.

Vet Hum Toxicol. 1989, 31:571-572.

Nehlig A.

Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data.

Neurosci Biobehav Rev. 1999, 23:563-576.

Nehlig A, Daval JL, Debry G.

Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects.

Brain Res Rev. 1992, 17:139-170.

Nishi A, Bibb JA, Snyder GL, Higashi H, Nairn AC, Greengard P.

Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97:12840-12845.

Oo CY, Burgio DE, Kuhn RC, Desai N, McNamara PJ.

Pharmacokinetics of caffeine and its demethylated metabolites in lactation: predictions of milk to serum concentration ratios.

Pharm Res. 1995, 12:313-316.

Oliveto AH, Bickel WK, Hughes JR, Shea PJ, Higgins ST, Fenwick JW.

Caffeine drug discrimination in humans: acquisition, specificity and correlation with self-reports.

J Pharmacol Exp Ther. 1992, 261:885-894.

Palmatier MI, Fung EY, Bevins RA.

Effects of chronic caffeine pre-exposure on conditioned and unconditioned psychomotor activity induced by nicotine and amphetamine in rats.

Behav Pharmacol. 2003, 14:191-198

Parkinson JA, Cardinal RN, Everitt BJ.

Limbic cortical-ventral striatal systems underlying appetitive conditioning.
Prog Brain Res. 2000, 126:263-285.

Patkina NA, Zvartau EE.

Caffeine place conditioning in rats: comparison with cocaine and ethanol.
Eur Neuropsychopharmacol. 1998, 8:287-291.

Pinna A, Di Chiara G, Wardas J, Morelli M.

Blockade of A2a adenosine receptors positively modulates turning behaviour and c-Fos expression induced by D1 agonists in dopamine-denervated rats.
Eur J Neurosci. 1996, 8:1176-1181.

Pollack AE, Fink JS.

Synergistic interaction between an adenosine antagonist and a D1 dopamine agonist on rotational behavior and striatal c-Fos induction in 6-hydroxydopamine-lesioned rats.
Brain Res. 1996, 743:124-130.

Pons G, Carrier O, Richard MO, Rey E, d'Athis P, Moran C, Badoual J, Olive G.

Developmental changes of caffeine elimination in infancy.
Dev Pharmacol Ther. 1988, 11:258-264.

Preston Z, Lee K, Widdowson L, Freeman TC, Dixon AK, Richardson PJ.

Adenosine receptor expression and function in rat striatal cholinergic interneurons.
Br J Pharmacol. 2000, 130:886-890.

Rebola N, Rodrigues RJ, Lopes LV, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA.

Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus.
Neuroscience. 2005a, 133:79-83.

Rebola N, Rodrigues RJ, Oliveira CR, Cunha RA.

Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons.
Neurochem Int. 2005b, 47:317-325.

Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A.

Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications.
Prog Neurobiol. 2002, 68:377-392.

Robinson TE, Berridge KC.

The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction.
Brain Res Rev. 1993, 18:247-291.

Rodrigues RJ, Alfaro TM, Rebola N, Oliveira CR, Cunha RA.

Co-localization and functional interaction between adenosine A_{2A} and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum.

J Neurochem. 2005, 92:433-441.

Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J.

Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system.

J Comp Neurol. 1998, 401: 163-186.

Sabeti J, Gerhardt GA, Zahniser NR.

Individual differences in cocaine-induced locomotor sensitization in low and high cocaine locomotor-responding rats are associated with differential inhibition of dopamine clearance in nucleus accumbens.

J Pharmacol Exp Ther. 2003, 305:180-190.

Samaha AN, Li Y, Robinson TE.

The rate of intravenous cocaine administration determines susceptibility to sensitization.

J Neurosci. 2002, 22:3244-3250.

Schenk S, Horger B, Snow S.

Caffeine preexposure sensitizes rats to the motor activating effects of cocaine.

Behav Pharmacol. 1990, 1:447-451.

Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ.

Adenosine A₂ receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons.

J Neurosci. 1993, 13:1080-1087.

Schultz W.

Dopamine neurons and their role in reward mechanisms.

Curr Opin Neurobiol. 1997, 7:191-197.

Schultz W.

Getting formal with dopamine and reward.

Neuron. 2002, 36:241-263.

Simola N, Cauli O, Pinna A, Chopde CT, Morelli M.

Interaction between caffeine and the dopaminergic system.

Eur Neuropsychopharm. 2004, 14:S157-158.

Simola N, Fenu S, Baraldi PG, Tabrizi MA, Morelli M.

Involvement of globus pallidus in the antiparkinsonian effects of adenosine A_{2A} receptor antagonists.

Exp Neurol. 2006a, 202:255-257.

Simola N, Tronci E, Pinna A, Morelli M.

Subchronic-intermittent caffeine amplifies the motor effects of amphetamine in rats.
Amino Acids. 2006b, 31:359-363.

Smith A.

Effects of caffeine on human behavior.
Food Chem Toxicol. 2002, 40:1243-1255.

Solinas M, Ferré S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR.

Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens.
J Neurosci. 2002, 22:6321-6324.

Stewart J, Badiani A.

Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs.
Behav Pharmacol. 1993, 4:289-312.

Sung BH, Lovallo WR, Pincomb GA, Wilson MF.

Effects of caffeine on blood pressure response during exercise in normotensive healthy young men.
Am J Cardiol. 1990, 65:909-913.

Svenningsson P, Hall H, Sedvall G, Fredholm BB.

Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study.
Synapse. 1997a, 27:322-335.

Svenningsson P, Le Moine C, Kull B, Sunahara R, Bloch B, Fredholm BB.

Cellular expression of adenosine A2A receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas.
Neuroscience. 1997b, 80:1171-1185.

Svenningsson P, Lindskog M, Ledent C, Parmentier M, Greengard P, Fredholm BB, Fisone G.

Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97:1856-1860.

Svenningsson P, Lindskog M, Rognoni F, Fredholm BB, Greengard P, Fisone G. Activation of adenosine A2A and dopamine D1 receptors stimulates cyclic AMP-dependent phosphorylation of DARPP-32 in distinct populations of striatal projection neurons.

Neuroscience. 1998, 84:223-228.

Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB.

The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions.

J Neurosci. 1999, 19:4011-4022.

Tanda G, Goldberg SR.

Alteration of the behavioral effects of nicotine by chronic caffeine exposure.

Pharmacol Biochem Behav. 2000, 66:47-64.

Tebano MT, Martire A, Rebola N, Peponi R, Domenici MR, Gro MC, Schwarzschild MA, Chen JF, Cunha RA, Popoli P.

Adenosine A2A receptors and metabotropic glutamate 5 receptors are co-localized and functionally interact in the hippocampus: a possible key mechanism in the modulation of N-methyl-D-aspartate effects.

J Neurochem. 2005, 95:1188-1200.

Trujillo KA, Akil H.

Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence.

Drug Alcohol Depend. 1995, 38:139-154.

Umemura T, Ueda K, Nishioka K, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Jitsuiki D, Soga J, Goto C, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y.

Effects of acute administration of caffeine on vascular function.

Am J Cardiol. 2006, 98:1538-1541.

Vaugeois JM.

Signal transduction: positive feedback from coffee.

Nature. 2002, 418:734-736.

Vanderschuren LJ, Kalivas PW.

Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies.

Psychopharmacology. 2000, 151:99-120.

Vanderschuren LJ, Tjon GH, Nestby P, Mulder AH, Schoffelmeer AN, De Vries TJ. Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen.

Psychopharmacology. 1997, 131:115-122.

von Lubitz DK, Lin RC, Popik P, Carter MF, Jacobson KA.

Adenosine A3 receptor stimulation and cerebral ischemia.

Eur J Pharmacol. 1994, 263:59-67.

Watanabe C, Yamamoto H, Hirano K, Kobayashi S, Kanaide H.

Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle.

J Physiol. 1992, 456:193-213.

Weiss F, Ciccocioppo R, Parsons LH, Katner S, Liu X, Zorrilla EP, Valdez GR, Ben-Shahar O, Angeletti S, Richter RR.

Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors.

Ann N Y Acad Sci. 2001, 937:1-26.

Wolf ME.

The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants.

Prog Neurobiol. 1998, 54:679-720.

Yang SN, Dasgupta S, Lledo PM, Vincent JD, Fuxe K.

Reduction of dopamine D2 receptor transduction by activation of adenosine A2a receptors in stably A2a/D2 (long-form) receptor co-transfected mouse fibroblast cell lines: studies on intracellular calcium levels.

Neuroscience. 1995, 68:729-736.

Yang PB, Swann AC, Dafny N.

Acute and chronic methylphenidate dose-response assessment on three adolescent male rat strains.

Brain Res Bull. 2006, 71:301-310.

Yazdani M, Ide K, Asadifar M, Gottschalk S, Joseph F Jr, Nakamoto T.

Effects of caffeine on the saturated and monounsaturated Fatty acids of the newborn rat cerebellum.

Ann Nutr Metab. 2004, 48:79-83.

Zevin S, Benowitz NL.

Drug interactions with tobacco smoking. An update.

Clin Pharmacokinet. 1999, 36:425-438.