



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN TOSSICOLOGIA

Farmacologia e Farmacoterapia delle Tossicodipendenze

Ciclo XXVII

Interazioni neurotrasmettitoriali nel meccanismo d'azione della cocaina: ruolo della serotonina e dell'adenosina

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/14 FARMACOLOGIA

Presentata da:	Dott.ssa Valentina Perra
Coordinatore Dottorato:	Prof. Gaetano Di Chiara
Relatore:	Prof. Gaetano Di Chiara
Tutor:	Dott.ssa Valentina Valentini

Esame finale anno accademico 2013 – 2014

Abstract

The putative 5-HT₆ receptor agonist ST1936 has been shown to increase extracellular dopamine (DA) in the n. accumbens (NAc) Shell and in the medial prefrontal cortex (PFCX). These observations suggest that 5-HT₆ receptors modulate DA transmission in mesolimbic and mesocortical terminal DA areas. To investigate the behavioral counterpart of this interaction I studied in rats the effect of 5-HT₆ receptor blockade on cocaine stimulated overflow of DA in dialysates from the PFCX and from the NAc Shell and on cocaine i.v. self-administration. Pretreatment with the 5-HT₆ antagonist SB271046 reduced cocaine-induced increase of dialysate DA in the NAc Shell but not in the PFCX and impaired i.v. cocaine self-administration. These suggest that 5-HT₆ receptors play a role in cocaine reinforcement via their facilitatory interaction with DA projections to the NAc Shell. This 5-HT/DA interaction might provide the basis for a new pharmacotherapeutic strategy of cocaine addiction.

Caffeine is one of the psychoactive substances most widely used as adulterant in illicit drugs, such as cocaine. Animal studies have demonstrated that caffeine is able to potentiate cocaine actions, although the enhancement of the cocaine reinforcing property by caffeine is less reported, and the results depend on the paradigms and experimental protocols used.

In the present study I examined the ability of caffeine to enhance the motivational and rewarding properties of cocaine using the intravenous self-administration paradigm in rats. Additionally, the role of caffeine as a primer cue during extinction was evaluated. To this end, we assessed in naïve rats: 1) the ability of the combination of cocaine (0,125 mg/kg/infusion) and caffeine (0,0625 mg/kg/infusion) to maintain self-administration in fixed ratio (FR) and progressive ratio (PR) schedules of reinforcement compared with cocaine and caffeine alone; 2) the effect of caffeine in the maintenance of responding in the animals exposed to the combination of the drugs during cocaine extinction.

Cocaine and the combination of cocaine and caffeine were self-administered on a FR and PR schedules of reinforcement, and the responding for the combination of the drugs was higher than cocaine alone. Caffeine was not reliably self-administered, but was able to maintain a drug-seeking behavior in rats previously exposed to cocaine plus caffeine.

These findings suggest that the presence of caffeine enhances the reinforcing effects of cocaine and the motivational value of the drug. Our results highlight the role of active adulterants commonly used in illicit street drugs.

Introduzione

La tossicodipendenza, è definita come uno stato d'intossicazione cronico o periodico prodotto dall'uso di specifiche sostanze chimiche, naturali o di sintesi.

Lo stato di tossicodipendenza s'instaura attraverso complessi meccanismi e fasi successive, caratterizzate da una condizione di craving sempre maggiore, che è capace di fornire alla sostanza d'abuso abnormi proprietà di rinforzo, e promuovendo comportamenti mirati al continuo contatto con la sostanza, che in questo modo assume proprietà motivazionali molto forti.

I farmaci d'abuso sono gratificanti e agiscono su meccanismi e processi che l'organismo utilizza durante lo svolgimento delle proprie funzioni fisiologiche. Da questo punto di vista, i farmaci d'abuso possono essere definiti come surrogati degli stimoli gratificanti naturali, in quanto stimolano le stesse aree cerebrali (sistema limbico) ed i sistemi neurotrasmettitoriali tra cui quello dopaminergico deputato alla percezione della gratificazione (Carlezon e Wise, 1996; Di Chiara, 1995; Di Chiara e Imperato, 1988; Mirenowicz e Schultz, 1996; Pontieri et al., 1995; Robinson e Everitt, 1996; Wise, 1996; Wise, 1998). Il sistema limbico svolge un ruolo importante nelle manifestazioni comportamentali relative alla gratificazione ed all'avversione: è attivato da ogni stimolo dotato di una certa valenza. La valenza motivazionale è correlata al significato positivo o negativo dello stimolo stesso, che potrà essere percepito come tale in maniera specie-specifica, sulla base di parametri puramente istintivi o in modo condizionato attraverso processi d'apprendimento. Per cui, uno stimolo che provoca un effetto piacevole, o che è ritenuto utile, avrà valenza positiva; mentre uno stimolo spiacevole, capace di provocare dolore, stress, ansia, sarà interpretato come uno stimolo dotato di valenza negativa. Nel caso di stimoli piacevoli, il comportamento sarà volto alla ricerca e all'avvicinamento degli stimoli stessi (comportamento motivato); questi si comportano quindi da rinforzi positivi e, come tali, saranno dotati di proprietà gratificanti. Il comportamento motivato può essere condizionato da diversi stimoli gratificanti, dotati di proprietà incentive, essenziali per attivare il comportamento dell'individuo alla ricerca ed al contatto con lo stimolo stesso, e di proprietà funzionali, essenziali per la loro efficacia in termini biologici e fisiologici.

Tutte le più importanti sostanze d'abuso hanno in comune le proprietà di aumentare la concentrazione extracellulare di dopamina (DA) in particolare nella *Shell* del nucleus accumbens (NAc). I meccanismi attraverso i quali aumentano i livelli di DA sono diversi a

seconda della classe farmacologica di appartenenza; in ogni caso la capacità di stimolare la trasmissione DAergica nella *Shell* costituisce una caratteristica fondamentale delle sostanze d'abuso (Di Chiara et al., 2004).

Cocaina

La cocaina è un alcaloide che viene estratto dalle foglie delle varietà di due specie vegetali, *Erythroxylum coca* e *Erythroxylum novagranatense*, piante originarie del Sud America oppure si può ottenere per sintesi dall'ecgonina.

Le foglie di coca contengono l'1-2% di cocaina in peso. La cocaina destinata al commercio illecito deriva da una preparazione chiamata pasta basica di coca, che può essere venduta come tale, e che costituisce il cosiddetto crack, che viene fumato come sigaretta insieme a tabacco e marijuana. La pasta poi può essere sbiancata e attraverso altri vari passaggi si ottiene la pasta basica lavata che costituisce la base per la cocaina cloridrato, sniffata come polvere o iniettata in vena in soluzione acquosa.

La dipendenza da cocaina ha importanti implicazioni psicologiche, psichiatriche, sociali, economiche e giuridiche in America e recentemente è diventata molto rilevante anche nel panorama europeo. Infatti, dopo la cannabis, è la droga illecita più diffusa in Europa e in Italia. Oltre alla dipendenza, l'abuso di cocaina può portare a danni permanenti dei tessuti e alla morte. A breve termine, la cocaina determina un aumento di energia, prontezza mentale, diminuzione dell'appetito, pupille dilatate, aumento della temperatura corporea, della frequenza cardiaca e della pressione sanguigna.

Con l'utilizzo prolungato essa induce modificazioni adattative che possono attenuare alcuni dei suoi effetti e amplificarne altri. Si verifica quindi uno stato di dipendenza, paranoia, irritabilità, irrequietezza, allucinazioni uditive e disturbi dell'umore che cambiano lo stile di vita del tossicodipendente. Altri effetti a lungo termine includono ictus, convulsioni, visione offuscata, febbre, attacchi cardiaci, insufficienza respiratoria, problemi gastrointestinali e spasmi muscolari. Alcuni di questi effetti (cioè estrema stanchezza, nausea/vomito, tremori, dolori muscolari e disturbi del sonno) sono particolarmente diffusi durante la sospensione della cocaina, ma i sintomi più intensi in questa fase sono agitazione, depressione, ansia, irritabilità, desiderio intenso per la droga, mancanza di motivazione e di disturbi del sonno (Fischman et al., 1976; Prahash e Das, 1993; Filip et al., 2005).

Il meccanismo d'azione della cocaina consiste nel blocco del DAT, il trasportatore della DA, con conseguente aumento della concentrazione extracellulare della DA nelle aree terminali del sistema DAergico.

In particolare, numerose evidenze sperimentali indicano che gli effetti di rinforzo della cocaina sono mediati dall'azione nell'area ventrale tegmentale (VTA) e nel NAc (Wise, 1996).

La neurotrasmissione DAergica e l'attivazione indiretta dei recettori DAergici sono stati istituiti come i mediatori primari delle proprietà rinforzanti e della dipendenza di cocaina (Koob e Bloom, 1988; Kuhar et al., 1991; Di Chiara, 1995; Thomsen et al., 2009), anche se la DA non è l'unico mediatore di questi effetti. I dati della letteratura (studi pre-clinici e le sperimentazioni cliniche) degli ultimi anni hanno fornito diverse linee di evidenza che i recettori della serotonina (5-HT) svolgono un ruolo di modulazione nei meccanismi di azione della cocaina (Walsh e Cunningham, 1997; Higgins e Fletcher, 2003; Filip et al., 2005; Bubar e Cunningham, 2008).

Modelli animali di tossicodipendenza

I modelli animali permettono lo studio degli effetti propri delle droghe sul cervello eliminando le complicazioni derivanti dalle differenti storie individuali sconosciute e da quei fattori psicologici e sociali che nell'uomo hanno un ruolo importante.

I test comportamentali usati per lo studio delle proprietà di rinforzo delle droghe permettono di osservare le risposte comportamentali, fisiologiche, biochimiche e neuronali in determinate aree del cervello. Tra questi la place-preference, l'autostimolazione delle aree specifiche coinvolte negli effetti gratificanti, la drug discrimination e l'autosomministrazione (AS) sono i più utilizzati.

L'AS è un utile paradigma sperimentale utilizzato in moltissimi laboratori di tutto il mondo che parte dal presupposto che le sostanze che danno dipendenza hanno la capacità di essere autosomministrate dall'animale, il quale impara a compiere delle azioni che hanno come risultato l'immediata somministrazione endovenosa della sostanza.

I criteri usati come indici di un comportamento animale che presenta analogie con la tossicodipendenza umana sono:

- il persistere in comportamenti di ricerca della sostanza anche quando questa non è disponibile (drug-seeking);
- una motivazione molto più intensa a lavorare per ottenere la sostanza, che nell'animale si può misurare attraverso il numero massimo di risposte che esso è disposto a compiere per ottenere una singola infusione di sostanza (breaking point);
- il continuare a ricercare ed autosomministrarsi la sostanza anche se questo determina delle spiacevoli conseguenze (per esempio una lieve scossa elettrica).

Questi comportamenti emergono solo se la sostanza somministrata possiede un elevato potenziale d'abuso (es. cocaina).

I dispositivi utilizzati, chiamati *operant box*, sono gabbie acusticamente isolate munite di leve o di due fori (nose-poke) provvisti di fotocellule, attivati dal muso dell'animale e posizionati a poca distanza dal pavimento della gabbia. Uno dei due nose-poke è definito *attivo* perché, attraverso l'inserimento del muso, l'animale è in grado di attivare una pompa, collegata esternamente alla gabbia, determinando l'infusione di una quantità nota di farmaco; mentre l'altro nose-poke è *inattivo* perché non determina alcuna attivazione della pompa. A ciascun nose-poke può essere inoltre associato uno stimolo luminoso discriminativo non contingente. La presenza di tale stimolo è importante in quanto l'animale associa ad esso lo stimolo

gratificante del farmaco. I programmi di lavoro (schedula di rinforzo) che l'animale deve compiere per ricevere il farmaco sono diversi. Durante la fase di *acquisizione*, che ha una durata variabile, da giorni a settimane, a seconda del farmaco, l'animale impara ad associare il comportamento operante per ricevere la sua dose di farmaco, eseguendo schedule a rapporto fisso (fixed ratio: FR) in cui il lavoro da seguire è costante. Nella sua forma più semplice si tratta di una schedula a FR1: l'animale riceve una iniezione di farmaco per ciascun nose-poke attivo. A questa fase può seguire una FR più complessa, ad esempio FR n in cui l'animale deve compiere n nose-poke attivi allo scopo di ricevere una sola somministrazione. Ovviamente maggiori sono le proprietà di rinforzo della sostanza in esame e maggiore è la complessità della schedula che l'animale è disposto ad eseguire per ricevere la sostanza. Durante la fase di *mantenimento* l'animale autoregola la somministrazione della sostanza per mantenere il suo consumo è costante. Per valutare la capacità di abuso di una sostanza ed il craving per essa, dopo la fase di mantenimento si passa alla fase di *estinzione* in cui il farmaco viene sostituito con una soluzione priva di attività, generalmente soluzione fisiologica; l'animale a questo punto smetterà di lavorare. Ovviamente maggiore è la durata della fase di estinzione, normalmente giorni, in cui l'animale lavora senza ricevere alcuna dose, o senza percepirne gli effetti, maggiori sono le proprietà gratificanti della sostanza autosomministrata. Nei protocolli di AS, oltre alle schedule a rapporto fisso (FR), possono essere utilizzate anche schedule a rapporto progressivo (PR), in cui il numero di nose-poke attivi che l'animale deve effettuare per ricevere l'iniezione di un farmaco aumenta progressivamente fino ad un punto in cui l'animale smette di rispondere. Questo punto è chiamato *punto di rottura* o *breaking point* (BP) ed è un indice per valutare le potenzialità di abuso di una droga.

Il sistema serotonergico e i meccanismi di rinforzo

Il sistema centrale 5-HTergico è implicato nella regolazione di fondamentali componenti comportamentali quali l'apprendimento, la motivazione, l'umore e l'impulsività. La 5-HT è coinvolta nell'eziologia di alcune malattie mentali come la depressione, disturbi affettivi e ansia (Rich e Nemeroff, 1992). Studi condotti sui ratti hanno rivelato che il sistema 5-HTergico riveste un ruolo principale nei meccanismi di rinforzo (Katz e Carroll, 1977). Il termine "reward" comprende alcuni aspetti tra cui l'esperienza edonistica soggettiva (ciò che piace), la motivazione a guadagnare una particolare ricompensa (il volere), e la capacità di sviluppare rappresentazioni e predizioni circa una futura ricompensa (l'apprendimento) (Berridge e Kringelbach, 2008). La 5-HT media tutti questi tre aspetti essendo contenuta in molti neuroni che formano connessioni con altri sistemi del cervello deputati ai meccanismi di rinforzo. Queste connessioni comprendono aree note per essere coinvolte nei meccanismi di rinforzo come il NAc, l'area ventrale tegmentale (VTA), la sostanza nera, l'ippocampo, l'amigdala e la corteccia prefrontale (Hensler, 2006; Ikemoto, 2010; Lechin et al., 2006). In particolare il NAc, implicato nei processi di ricompensa e di piacere, è stato dimostrato essere modulato dal sistema 5-HTergico (De Deurwaerdere e Spampinato, 1999). Inoltre la 5-HT regola la trasmissione di tutti i maggiori neurotrasmettitori (Fink e Gothert, 2007), inclusa la DA (Alex e Pehek, 2007).

Numerose ricerche sperimentali con differenti paradigmi comportamentali per la misurazione del reward supportano l'ipotesi che la 5-HT giochi un ruolo fondamentale in questo processo (Ahn et al., 2005; Cools et al., 2005; Evers et al., 2005; Vollm et al., 2006; Walker et al., 2006, 2008; Fallon et al., 2007; Liu e Ikemoto, 2007; Van der Plasse et al., 2007; Hayes et al., 2008a,b; Ding et al., 2009). Inoltre, fra le regioni del cervello implicate nei meccanismi di rinforzo, i nuclei dorsali e mediali del raphe sono stati indicati come aree di intensa autostimolazione nei roditori (Miliaressis et al., 1975; Simon et al., 1976; Miliaressis, 1977; Van der Kooy et al., 1978; Corbett e Wise, 1979; Deakin, 1980; Rompre e Miliaressis, 1985). Numerosi studi di risonanza magnetica funzionale dimostrano che il sistema 5-HTergico è implicato nei meccanismi di rinforzo delle sostanze d'abuso (Higgins e Fletcher, 2003; Muller et al., 2007) tra cui psicostimolanti (Muller et al., 2007), etanolo (Vengeliene et al., 2008) e nicotina (Balfour, 2009). Per quanto riguarda la cocaina, esperimenti condotti sugli animali mediante l'accoppiamento di modelli comportamentali e di microdialisi cerebrale, dimostrano che la somministrazione di cocaina sui ratti aumenta la loro attività motoria e il rilascio di DA

e 5-HT nel NAc (Broderick et al., 2004). Simili variazioni della neurotrasmissione DA e 5-HT sono state osservate durante l'AS endovenosa di cocaina (Drummond et al., 1995; Parsons et al., 1995). Questi risultati indicano che gli effetti di rinforzo della cocaina sono mediati dal rilascio simultaneo di DA e 5-HT e che il blocco del trasportatore della 5-HT svolge un ruolo importante nella modulazione di tali effetti (Filip et al., 2005).

Il recettore 5-HT₆

Il recettore 5-HT₆ è stato scoperto nei ratti e nell'uomo, rispettivamente nel 1993 e nel 1996, e solo recentemente nel topo (Monsma et al., 1993; Plassat et al., 1993; Ruat et al., 1993; Kohen et al., 1996). E' un recettore a sette segmenti transmembrana accoppiato a proteine G_s. Il legame della 5-HT al recettore determina l'attivazione dell'adenilato ciclasi e l'aumento della concentrazione intracellulare del cAMP (Monsma et al., 1993; Plassat et al., 1993; Ruat et al., 1993). E' stato ipotizzato recentemente che anche altre vie intracellulari siano coinvolte nella trasduzione del segnale. Infatti il recettore 5-HT₆ stimola il segnale di ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) attraverso un meccanismo dipendente dalla tirosina chinasi Fyn (Yun et al., 2007), membro della famiglia delle protein-kinasi non recettoriali ed altamente espresso nei neuroni, nella glia e negli oligodendrociti.

Nell'uomo questo recettore è molto abbondante nei gangli della base, in particolare nel putamen, nel nucleo caudato e nello striato ventrale. In quantità minori è stato ritrovato nell'ippocampo, nella PFCX, nella corteccia visiva e in quella temporale. Non è stato rintracciato, invece, nel cervelletto (East et al., 2002). Analoghi studi effettuati nel ratto hanno portato a risultati molto simili.

Nel ratto le più alte concentrazioni di recettore 5-HT₆ sono state osservate nei gangli della base ed in alcune strutture collegate, come il caudato-putamen, il NAc, le isole di Calleja e il tubercolo olfattorio e la corteccia cerebrale. Il recettore 5-HT₆ è stato ritrovato inoltre in zone del diencefalo, come il talamo, l'area ipotalamica e, in misura minore, il nucleo ventromediale. Non è stato trovato nelle membrane dei neuroni DAergici della via nigrostriatale (Roberts et al., 2002).

La sovrapposizione osservata tra localizzazione dei recettori 5-HT₆ dell'uomo e del ratto è molto importante se si considera quanto la posizione dei recettori nel cervello influenzi la loro attività. Queste somiglianze suggeriscono che nell'uomo e nei roditori questi recettori hanno ruoli molto simili.

Ruolo dei recettori 5-HT₆ nella ricompensa e nel rinforzo

La somministrazione di agonisti o antagonisti del recettore 5-HT₆ non modifica il rilascio di 5-HT, così come la lesione di neuroni 5-HT non porta a variazioni nell'espressione del recettore 5-HT₆ (Dawson et al., 2001; Gerard et al., 1996). Questi dati evidenziano che i recettori 5-HT₆ non agiscono come auto-recettori e perciò non modulano il rilascio della 5-HT stessa. Si pensa che questi recettori si trovino principalmente sulla membrana di interneuroni GABAergici (Wolley et al., 2004).

I dati presenti in letteratura sul ruolo dei ligandi del recettore 5-HT₆ sui meccanismi di rinforzo delle droghe sono ancora contrastanti.

Frantz et al (2002) hanno riportato che l'antagonista SB258510 potenzia l'attività locomotoria indotta dall'anfetamina e riduce la risposta in un paradigma di AS intravenosa di anfetamina e, a dosi di 3 mg/kg, innalza il BP di anfetamina. L'antagonista, fino a dosi di 10 mg/kg, non modifica l'AS di cocaina e fino a dosi di 3 mg/kg non modifica l'attività locomotoria indotta dalla cocaina. Questi effetti indicano che l'antagonista potenzia le proprietà di rinforzo dell'anfetamina, probabilmente attraverso un potenziamento della proprietà del farmaco di liberare la DA. In accordo con Frantz et al. (2002), Van Gaalen et al. (2010) hanno osservato che gli antagonisti (SB271046 e Ro-04-6790) non influenzano le proprietà di rinforzo della cocaina nella fase di acquisizione e mantenimento del comportamento di AS, ma inibiscono il ripristino della risposta operante (ricaduta) in seguito ad esposizione a stimoli condizionati alla cocaina.

Recentemente Fijal et al. (2010) hanno riportato, in contrasto con studi precedenti, che l'antagonista SB271046 riduce la risposta in animali che rispondono alla cocaina a dosi di 3 e 10 mg/kg i.p. L'agonista WAY 181187, fino a dosi di 30 mg/kg, non influenza AS di cocaina. Alle stesse dosi l'antagonista, in accordo con Van Gaalen et al. (2010), riduce il ripristino della risposta in seguito a somministrazione passiva di cocaina in soggetti nei quali la risposta è stata estinta (priming). L'antagonista riduce la risposta locomotoria alla cocaina mentre non influenza l'attività basale e riduce l'espressione della preferenza spaziale indotta dalla cocaina. D'altra parte, Ferguson et al. (2008) hanno riportato che la transfezione attraverso vettori virali di recettori 5-HT₆ nella Shell del NAc del ratto riduce l'acquisizione della preferenza spaziale condizionata dalla cocaina. Nel complesso queste osservazioni indicano che i recettori 5-HT₆ svolgono un ruolo permissivo sulle proprietà locomotorie e di rinforzo della cocaina e sulle proprietà incentive e di rinforzo di stimoli ad essa condizionati.

In studi di discriminazione e in accordo con le osservazioni di Franz et al. (2002), Pullagurla et al. (2004) hanno dimostrato che il pretrattamento con l'antagonista 5-HT₆, l'MS-245, potenzia la discriminazione dell'anfetamina, mentre non influenza la discriminazione della cocaina. Nello stesso studio, il gruppo ha riportato che l'MS-245 potenzia le proprietà di stimolo discriminativo della nicotina (0,06 e 0,11 mg/kg sc) nei ratti addestrati a discriminare 0,6 mg/kg di nicotina dalla soluzione fisiologica.

Recentemente, nei nostri laboratori è stato dimostrato che l'ST1936 viene autosomministrato a dosi unitarie di 0,5-1,0 mg/kg/inf in un paradigma di rinforzo continuo (FR1) e fino ad un rapporto massimo di 4 (BP) in un paradigma a rapporto progressivo. L'antagonista SB271046 (10 mg/kg i.p.) riduce di circa l'80% la risposta indotta da ST1936 (Valentini et al., 2013).

L'ST1936, a dosi di 20 mg/kg i.p., induce preferenza spaziale condizionata (CPP) in un paradigma a due compartimenti e un'avversione condizionata alla saccarina (CSA) (Fenu et al. in preparazione).

Questi risultati dimostrano che l'ST1936 è dotato di proprietà gratificanti e di rinforzo. La proprietà dell'ST1936 di indurre CSA potrebbe essere l'espressione della proprietà di rilasciare DA nella Shell NAc (Fenu et al., 2006; 2009). Coerentemente con questa possibilità, la CSA indotta dall'ST1936 è prevenuta dalla somministrazione dell' SCH39166, un antagonista dei recettori alla DA di tipo D₁ SCH39166 (Fenu et al. in preparazione).

Scopo della ricerca (parte I)

La DA del NAc gioca un importante ruolo nei meccanismi di rinforzo della cocaina (Di Chiara e Bassareo, 2007; Pierce e Kumaresan, 2006; Thomas et al., 2008; Wise, 1989). Tale evidenza potrebbe candidare la trasmissione DAergica a target per il trattamento farmacologico per la dipendenza da cocaina. Tuttavia, nonostante la disponibilità di farmaci altamente selettivi sulla trasmissione DAergica quali i bloccanti dei recettori D_1 e D_2 , i risultati nell'utilizzo di questi farmaci in trials clinici sono stati scoraggianti (Karila et al., 2008; Platt et al., 2002; Xi e Gardner, 2008). Tra i problemi di questo approccio vi sono gli effetti collaterali relativi all'esteso deficit della trasmissione DAergica. Un'alternativa alla manipolazione farmacologica diretta della trasmissione DAergica è agire su questo sistema indirettamente attraverso altri sistemi che interagiscono con i neuroni DAergici. Per la varietà dei suoi sottotipi recettoriali e la possibilità di agire specificamente sulla trasmissione DAergica mesolimbica manipolando selettivamente specifici sottotipi recettoriali, il sistema 5-HTergico, implicato nei meccanismi di rinforzo (Kranz et al., 2010), è stato proposto come valido target per lo sviluppo di nuovi trattamenti contro la dipendenza di cocaina (Bubar e Cunningham, 2008; Filip et al., 2005; Muller et al., 2007). Tra i diversi sottotipi di recettori per la 5-HT, alcuni studi hanno focalizzato la loro attenzione sul potenziale coinvolgimento della famiglia di recettori 5-HT₂ (Leggio et al., 2009a,b; Auclair et al., 2010; Navailles et al., 2008). E' stato dimostrato che i recettori 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} modulano gli effetti comportamentali della cocaina (Bubar e Cunningham, 2006; Muller e Huston, 2006; Fletcher et al., 2002; Fletcher et al., 2004; Grottick et al., 2000; Nic Dhonnchadha et al., 2009). Altri recettori per la 5-HT potrebbero giocare un ruolo nella modulazione della trasmissione DAergica mesolimbica e sui processi di gratificazione e di rinforzo. Tra questi, i recettori 5-HT₆, grazie alla loro localizzazione nelle aree densamente innervate dai terminali DAergici (Ward, et al., 1995; Gerard et al., 1997; Roberts et al., 2002; Hamon et al., 1999), interagiscono ampiamente con il sistema DAergico regolando le funzioni motivazionali e di rinforzo. In accordo con queste premesse, precedenti studi condotti nei nostri laboratori hanno dimostrato che l'ST1936, un agonista dei recettori 5-HT₆, determina un aumento dei livelli extracellulari di DA e noradrenalina (NA) nella porzione Shell del NAC e nella mPFCX in maniera dose-dipendente (Valentini et al., 2011). Inoltre recentemente è stato confermato che l'ST1936 ha un potenziale di abuso lieve in quanto viene autosomministrato dai ratti in un paradigma a rapporto fisso e a rapporto progressivo con un BP di circa 4. Tale comportamento è mediato dall'azione del farmaco sui

recettori 5-HT₆ poichè il pretrattamento con l'SB271046 riduce in maniera significativa il numero dei nose-poke attivi (Valentini et al., 2013).

Date queste premesse, lo scopo di questa mia prima ricerca è stato investigare ulteriormente il ruolo dei recettori 5-HT₆ nelle proprietà di rinforzo della cocaina. A tal fine, è stato studiato l'effetto dell'antagonista selettivo dei recettori 5HT₆, il composto SB271046, sulla stimolazione della trasmissione DAergica nella PFCX e della Shell del NAC indotta da cocaina e nell'AS intravenosa di cocaina.

Adenosina e recettori adenosinici

L'adenosina è un neuromodulatore che influenza una varietà di neurotrasmettitori tra cui la DA, il GABA e il glutammato attraverso l'attività dei suoi 4 recettori espressi nel cervello (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3). In particolare i recettori adenosinici A_1 e A_{2A} modulano la trasmissione DAergica attraverso i loro effetti sul rilascio di DA e sulle interazioni funzionali tra i recettori adenosinici e DAergici. I recettori A_1 , espressi in tutto il cervello, sono co-localizzati con i recettori D_1 (Ferret et al., 1994; Gines et al., 2000) mentre i recettori A_{2A} , espressi soprattutto a livello delle aree striatali (Dixon et al., 1996), sono co-localizzati con i recettori D_2 (Augood e Emerson, 1994; Fink et al., 1992; Pollack et al., 1993; Schiffmann et al., 1991). Sono entrambi accoppiati a proteine G: gli A_1 a quelle inibitorie e gli A_{2A} a quelle stimolatorie (Svenningsson et al., 1999).

La stimolazione dei recettori A_1 e A_{2A} riduce numerosi comportamenti indotti dalla cocaina attraverso la loro capacità di opporsi funzionalmente all'attività dei recettori selettivi della DA (Hack e Christie, 2003). Ad esempio, la stimolazione di entrambi blocca la place preference di cocaina (Poleszak e Malec, 2002) e inibisce la fase di estinzione del comportamento di AS di cocaina (Bachtell e Self, 2009; Hobson et al., 2013; Knapp et al., 2001; O'Neill et al., 2012). Inoltre, la stimolazione di entrambi i recettori blocca la ricaduta del consumo di cocaina mentre il blocco degli A_{2A} potenzia il comportamento di ricerca (Bachtell e Self, 2009; Hobson et al., 2013; O'Neill et al., 2012).

E' stato ipotizzato che gli eterodimeri A_{2A} - D_2 mediano gli effetti del recettore A_{2A} sui meccanismi di ricompensa degli psicostimolanti. L'interazione A_{2A} - D_2 è stata dimostrata in vitro (Canals et al., 2003; Fuxe et al., 1998; Hillion et al., 2002; Marcellino et al., 2010) e sono state riportate interazioni funzionali tra gli antagonisti dei recettori A_{2A} e i comportamenti mediati dalla cocaina che coinvolgono i recettori D_2 (Adams et al., 2001; Kita et al., 1999; Ushijima et al., 1995). La stimolazione degli A_{2A} blocca la sensitizzazione di cocaina nel NAc (Filip et al 2006; Hobson et al., 2012). In un paradigma di AS di cocaina, la stimolazione degli A_{2A} attenua la fase di acquisizione (Knapp et al., 2001), mentre l'antagonismo degli A_{2A} migliora il comportamento di AS di cocaina sotto una schedula di rinforzo a rapporto progressivo ma non a rapporto fisso (Doyle et al., 2012; Justinova et al., 2011). Nel 1999 Baldo et al. hanno dimostrato che gli agonisti aumentano la soglia di stimolazione intracranica, mentre gli antagonisti la riducono, suggerendo che i recettori A_{2A} sono coinvolti nei processi

di gratificazione regolati dal sistema mesolimbico, e che la modulazione di questo recettore può essere un utile target terapeutico per la dipendenza (Brown e Short, 2008).

Caffeina

La caffeina è un alcaloide naturale appartenente alla classe farmacologica delle metilxantine. Ha numerosi effetti biochimici, ma alle dosi regolarmente consumate dall'uomo il blocco dei recettori adenosinici rappresenta il maggiore target farmacologico. I recettori A_1 e A_{2A} sono maggiormente coinvolti nella modulazione di effetti centrali indotti dalla caffeina, poiché oltre ad avere un'elevata affinità per la caffeina, sono espressi abbondantemente nel cervello. A questo proposito evidenze sperimentali hanno suggerito che anche se la caffeina determina un blocco recettoriale combinato A_1/A_{2A} , entrambi i sottotipi recettoriali possono avere una particolare importanza nel mediare uno specifico effetto della caffeina. Gli effetti discriminativi della caffeina dipendono dall'azione sui recettori A_1 , mentre i recettori A_{2A} sembrano modulare gli effetti eccitanti, sulla vigilanza e di neuro protezione (Higgins et al., 2007; Schwarzschild e Ascherio, 2004). Gli altri sottotipi recettoriali appaiono poco rilevanti sugli effetti centrali della caffeina.

Sebbene il consumo di caffeina sia generalmente considerato sicuro per la maggior parte degli individui, diversi studi mostrano che la caffeina produce stimoli discriminativi ed effetti di rinforzo simili a quelli prodotti da stimolanti classici come la cocaina e le amfetamine (Garrett e Griffiths, 1998).

Alcuni gruppi di ricerca hanno dimostrato che la caffeina può indurre dipendenza (Gilliland e Bullock, 1984; Griffiths et al., 1990; Nehlig, 1999) tuttavia le metilxantine in generale non soddisfano i criteri delineati dal manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali (DSM) che definiscono la farmacodipendenza. Infatti, il DSM IV descrive l'uso della caffeina associato a diverse sindromi psichiatriche distinte: intossicazione, disturbi del sonno e disturbi d'ansia.

La caffeina è in grado di indurre tolleranza ai propri effetti sia nell'animale che nell'uomo manifestandosi generalmente come un'inversione degli effetti acuti della caffeina (Svenningsson et al., 1999; Dews et al., 2002). Nell'uomo, la tolleranza agli effetti comportamentali della caffeina è di bassa intensità (Fredholm et al., 1999; Watson et al., 2002) e si sviluppa alterando lo stato di attenzione e di veglia.

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

Nei modelli animali, l'astinenza induce una diminuzione dell'attività locomotoria (Kaplan et al., 1993; Nikodijevic' et al., 1993). Coerentemente con il vasto e crescente numero di

adolescenti che assumono bevande contenenti caffeina sono sempre più segnalati fenomeni di dipendenza e sintomi di astinenza (Bernstein et al., 2002).

Le proprietà di rinforzo della caffeina appaiono molto variabili a seconda delle dosi utilizzate (Brockwell e Beninger, 1996; Bedingfield et al., 1998; Patkina e Zvartau, 1998). Il potenziale di abuso della caffeina è stato valutato in modelli di AS di sostanze d'abuso, in cui, a differenza dei farmaci classici di abuso, la caffeina è autosomministrata dai ratti da sola in piccola percentuale (Atkinson e Enlsen, 1976). Poiché l'uso di caffeina è associato a conseguenze fisiche e psichiche molto limitate, a deboli proprietà di rinforzo e a sintomi di astinenza, la definizione di caffeina come un "psicostimolante atipico" data da Daly e Fredholm (1998) è ancora ampiamente accettata.

Interazione tra caffeina e cocaina

Gli individui dipendenti da cocaina spesso consumano la sostanza in combinazione con altre sostanze psicoattive, sia lecite che illecite, in quello che viene definita come "poliassunzione di droghe" (Leri et al., 2003). Diversi studi hanno esaminato le interazioni tra metilxantine e cocaina, per verificare se il consumo di metilxantine può influenzare l'abuso di cocaina.

La caffeina potenzia l'attivazione psicomotoria indotta dalla cocaina (Misra et al., 1986; Schenk et al., 1990) e facilita l'AS di cocaina (Horger et al., 1991) rendendone più rapida l'acquisizione. E' stato dimostrato come la caffeina sia in grado di modificare il funzionamento del sistema DAergico mesocorticolimbico, evidenziando quindi il potenziale ruolo della sostanza come fattore facilitante l'insorgenza di dipendenza da altre droghe (Horger et al., 1991). Infine, il consumo di caffeina potrebbe favorire il ripristino di una dipendenza preesistente in soggetti ex-dipendenti, come dimostrato dall'abilità della caffeina di ristabilire, nel ratto, il comportamento di AS di cocaina (ricaduta) dopo la sua estinzione (Green e Schenk, 2002).

Gli studi sull'uomo hanno rivelato l'esistenza di somiglianze negli effetti e di interazioni reciproche tra metilxantine e cocaina. I cocainomani spesso consumano più caffeina rispetto alla popolazione generale (Budney et al., 1993). Inoltre, la caffeina induce effetti soggettivi simili, anche se meno intensi, a quelli della cocaina e induce craving nei consumatori abituali di cocaina (Rush et al., 1995; Oliveto et al., 1998). Questi effetti della caffeina, tuttavia, non sono stati sempre replicati (Liguori et al., 1997).

Pertanto, anche se non è stato dimostrato che il consumo di metilxantine può promuovere l'abuso di cocaina nell'uomo, i dati dimostrano che le metilxantine possono amplificare certi effetti della cocaina e attraverso questo meccanismo analogamente ad altri psicostimolanti (Spealman et al., 1999) indurre craving in soggetti dipendenti alla cocaina.

Scopo della ricerca (parte II)

Numerosi studi di tossicologia forense mostrano che la caffeina è l'adulterante psicoattivo più comune di preparazioni contenenti cocaina, sia in forma di cloridrato, da sniffare, che in forma di base libera (pasta basica di coca crack), da fumare, in droghe illecite di abuso (Cole et al., 2011; Evrardet al., 2010; Lopez-Hill et al., 2011). Si pensa che la caffeina venga aggiunta in parte per aumentare il peso e il volume della preparazione, in parte per imitarne l'effetto psicostimolante ed eventualmente rinforzante, sebbene i dati siano contrastanti (Cole et al., 2010). Alcuni autori considerano la caffeina come una droga atipica (Daly e Fredholm, 1998) poiché soddisfa alcuni, ma non tutti i criteri del DSM-V per le dipendenze da sostanze. Infatti, la caffeina ha deboli proprietà di rinforzo e sono poche le evidenze che le attribuiscono la capacità di indurre dipendenza nell'uomo (Strain e Griffiths, 1995; Nehlig e Boyet, 2000). Negli studi sugli animali, è stato dimostrato che la caffeina può potenziare l'attivazione motoria indotta dalla cocaina (Misra et al., 1986; Lopez-Hillet al., 2011) come pure l'espressione di sensibilizzazione alla cocaina e all'anfetamina (Cauli et al., 2003; Simola et al., 2006; Prieto et al., submitted). Inoltre, la caffeina può potenziare le proprietà gratificanti della cocaina in un paradigma condizionato di place preference (Bedingfield et al., 1998). Inoltre, è stato dimostrato che il pre-trattamento con la caffeina accelera l'acquisizione dell'AS della cocaina (Horger et al., 1991) e incrementa la frequenza di risposta per ottenere cocaina i.v. in una schedula di rinforzo a rapporto fisso (Schenk et al., 1994). Infine, la caffeina può anche fungere da primer per le droghe psicoattive, producendo una riattivazione del comportamento di AS (Worley et al., 1994; Schenk et al., 1996; Green e Schenk, 2002). In considerazione del consumo crescente di prodotti contenenti caffeina come le bevande energetiche (Vester, 2015) spesso congiuntamente ad altre droghe (Reissig et al., 2009) e della diffusione della caffeina come adulterante di sostanze d'abuso (Cole et al., 2011), assume un particolare interesse teorico e pratico lo studio dell'influenza della caffeina sulle proprietà motivazionali di rinforzo della cocaina. A questo scopo abbiamo studiato nel ratto la capacità di una combinazione di cocaina e caffeina nel mantenere un comportamento di AS endovenosa in un paradigma di rinforzo a rapporto fisso e a rapporto progressivo. Inoltre è stato valutato il ruolo della caffeina come stimolo discriminativo della cocaina nei confronti della soluzione fisiologica in condizioni di estinzione.

Materiali e metodi

Animali

In questa ricerca sono stati utilizzati ratti maschi "Sprague-Dawley" forniti dalla ditta Harlan Italy (S. Pietro al Natisone Udine, Italia) del peso di 250-300 grammi. I ratti, prima dell'inizio degli esperimenti, sono stati stabulati in gruppi di quattro per gabbia, per un minimo di cinque giorni prima dell'esperimento, in condizioni standard di temperatura (23° C), umidità (60%), sotto un ciclo artificiale luce/buio di 12 ore ciascuno (luce dalle 8 AM alle 8 PM), con acqua e cibo standard (MIL topi e ratti, GLP diets, Stefano Morini, S.Paolo D'Enza; RE, Italia) ab libitum.

Esperimenti di microdialisi: dopo la chirurgia gli animali sono stati posti in gabbie semisferiche di plexiglas con acqua e cibo ad libitum.

Esperimenti di autosomministrazione: dopo la chirurgia, gli animali sono stati stabulati singolarmente, in condizioni standard di temperatura e umidità e manipolati due volte al giorno per un periodo di 7-10 giorni durante il quale è stata effettuata la terapia antibiotica preventiva con 0,1 ml di Baytril (50mg/Kg) per via endovenosa. Tutti gli esperimenti sono stati condotti secondo quanto approvato dalla Society for Neuroscience nel Gennaio 1995 e secondo le direttive per la cura e l'uso degli animali da esperimento sancite nel 1992 dalla Comunità Economica Europea (86/609; D.L.: 27.01.1992, N° 116) e dalla Commissione Etica per la cura e l'uso degli animali da laboratorio dell'Università di Cagliari.

Farmaci

- La Cocaina HCl (Sigma Milano, Italia) è stata sciolta in soluzione fisiologica sterile (0.9%) ed è stata somministrata alla dose di 10mg/kg/i.p. negli esperimenti di microdialisi e alle dosi di 0,25 mg/kg/inf o 0.15 mg/kg/inf in quelli di AS.
- La Caffaina (Tocris, Regno Unito) è stata sciolta in soluzione fisiologica sterile (0.9%) ed è stata somministrata in associazione alla cocaina alle dosi di 0.125 e 0.0625 mg/kg/inf
- Il composto SB 271046 (Tocris, Regno Unito), è stato disciolto in una soluzione di H₂O sterile e Tween 80 (0.5%) e somministrato alla dose di 10mg/kg/i.p. un'ora prima della somministrazione di cocaina negli esperimenti di microdialisi e della sessione di AS.

- L'antibiotico Baytril (enrofloxacin) (50 mg/1ml), è stato ottenuto da fornitori locali ed è stato somministrato un volume di 0,1 ml.

Esperimenti di microdialisi

Costruzione delle fibre da dialisi

Le sonde vengono preparate ed assemblate non meno di 24 ore prima dell'inizio della procedura chirurgica. Sono costituite da una sottile fibra da dialisi composta da un copolimero acrilico di sodio-meta-allil-solfonato (AN.69 HOSPALD asco, Italia, diametro esterno 310 μm , diametro interno 220 μm), nella quale viene introdotto ad una estremità un mandrino di tungsteno (diametro esterno 200 μm , Clark Instruments U.K), con temporanee funzioni di sostegno.

L'estremità libera della fibra viene sigillata con una piccola goccia di colla epossidica (che viene introdotta all'interno della fibra per capillarità), che verrà fatta solidificare in ambiente protetto dalla luce e dall'umidità per diverse ore. Quando la colla si è solidificata, l'estremità chiusa della fibra viene smerigliata a forma di cono, in maniera tale da produrre il minor danno possibile ai tessuti con i quali verrà a contatto.

Terminata questa procedura il mandrino viene estratto, la fibra viene tagliata in maniera da ottenerne una porzione di circa 6/7 mm, a partire dal tappo di colla precedentemente smerigliato, ed al suo interno si inseriscono due finissimi capillari di silica fusa (diametro interno 75 μm , diametro esterno 150 μm ; Polymicrotechnologies Inc. Phoenix, Arizona, USA), sfalsati tra loro di 3 mm se la fibra è usata per studiare la corteccia cerebrale o di 1.5 mm se è impiegata nello studio del NAc.

I due capillari vengono precedentemente incollati, per la parte che non entra nella fibra da dialisi, all'interno di un sottile ago metallico (22 G, per iniezioni ipodermiche) della lunghezza di 2,7 cm. L'ago viene precedentemente forato lungo l'asse principale per circa 1 mm in maniera da permettere la fuoriuscita laterale del capillare di silica che verrà utilizzato per la raccolta dei dializzati. Il capillare utilizzato come ingresso del liquido di perfusione viene fatto fuoriuscire dall'estremità superiore dell'ago. Il capillare di raccolta viene inserito all'interno di un ago metallico (22 G, per iniezioni ipodermiche) lungo 1,7 cm in maniera da facilitare il recupero dei dializzati.

Chirurgia per la microdialisi cerebrale

I ratti sono stati anestetizzati con Equitesin (0.97 g pentobarbitale sodico, 4.25 g cloralio idrato, 2.1 g solfato di magnesio, 48.8 ml glicole propilenico, 11.5 ml etanolo 90%) alla dose di 5 ml/kg e in seguito montati su un apparecchio stereotassico. La teca cranica viene esposta e, dopo aver praticato due piccoli fori su di essa, si rimuove una piccola parte della dura madre, sulla quale è stata testata la verticalità poggiandovi la parte smerigliata della fibra. La fibra viene quindi inserita lentamente all'interno del cervello sino a livello dei nuclei di interesse.

Per questo lavoro la fibra è stata impiantata nella PFCX (anteriorità: 3.7 mm dal bregma, lateralità: -0.7 mm dal bregma, verticalità: -5 mm dalla dura); nella Shell del NAc (anteriorità: 1.9 mm dal bregma, lateralità: 0.9 mm dal bregma, verticalità: -7.8 mm dalla dura) .

L'inclinazione della teca cranica del ratto e le coordinate dei nuclei sono state tratte dall'atlante di Paxinos e Watson (1998).

La parte della fibra che rimane completamente all'esterno viene fissata alla teca cranica con del cemento dentale vetro-ionomerico (Glass Ionomer Cement, ShofuInc., Japan). Per tutta la durata dell'impianto chirurgico le fibre vengono connesse ad una pompa per microinfusione e perfuse con soluzione fisiologica al flusso di 2 μ l/min.

Procedura analitico sperimentale

Dopo la chirurgia gli animali sono stati trasferiti in una gabbia semisferica di plexiglas del diametro di 50 cm con libero accesso ad acqua e cibo.

Il giorno seguente i ratti sono stati lasciati nella stessa semisfera, dove potevano muoversi liberamente. Il tubo di ingresso della fibra da dialisi è stato connesso ad una pompa di microinfusione che ha spinto la soluzione di Ringer (147 mMNaCl, 2.2 mM CaCl₂, 4 mM KCl) all'interno della fibra ad un flusso costante di 1 μ l/min.

I campioni di dializzato sono stati prelevati ogni venti minuti e analizzati, senza preventiva purificazione, in un sistema di cromatografia ad alta pressione (HPLC) dotato di colonna cromatografica a fase inversa (C8 3.5 μ m, Waters, Mildford Massachusetts) e di detector coulometrico (ESA, Coulochem II, Bedford, MA, USA) per quantificare la DA.

La fase mobile, spinta al flusso costante di 0.6 ml/min da una pompa isocratica per HPLC, era un tampone contenente Na-1-decansulfonato 0.1 M, NaH₂PO₄ • 1H₂O 0.75 M, EDTA 30 mM, metanolo 17.5% e trietilamina 0.01%.

In queste condizioni la sensibilità del metodo per la determinazione dei neurotrasmettitori è stata di 2 fmoli per campione.

Istologia

Al termine degli esperimenti i ratti sono stati anestetizzati con Equitesin e perfusi intracardialmente con 100 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) e successivamente con 100 ml di formaldeide al 10%. I probes sono stati rimossi e i cervelli asportati, conservati in formaldeide al 10% e sezionati, mediante vibratomo, in fette coronali successive orientate secondo l'atlante di Paxinos e Watson (1998), per verificare la precisa localizzazione della fibra.

Esperimenti di autosomministrazione

Impianto del catetere per l'autosomministrazione

I ratti prima dell'inizio della chirurgia sono stati anestetizzati con con Equitesin (0.97 g pentobarbitale sodico, 4.25 g cloralio idrato, 2.1 g solfato di magnesio, 48.8 ml glicole propilenico, 11.5 ml etanolo 90%) alla dose di 5 ml/kg e quindi sottoposti ad impianto del catetere cronico (Medical-Grade Tubing; Silastic, Down Corning MI, USA) che è stato inserito nella vena giugulare destra, passato sotto la cute e fissato al centro della regione scapolare grazie all'ausilio di una rete in polipropilene macroporosa (Evolutionbasic, BULEV, peso 48 gr/mq, Dipromed, Italia). Questa rete è utilizzata anche nelle ernioplastiche nell'uomo, in quanto garantisce una rapida incorporazione fibroblastica da parte del tessuto dell'ospite e quindi una rapida fissazione con assoluta assenza di rigetto e d'infezione. Durante il periodo post-operatorio il catetere cronico è stato risciacquato con 0,1 ml di enrofloxacin (50 mg/1ml), soluzione fisiologica sterile ed eparina (250 U/ml in soluzione fisiologica sterile).

Autosomministrazione

Tutti gli esperimenti sono stati condotti tra le 9:00 AM e le 5:00 PM mediante l'impiego di gabbie acusticamente isolate (Coulburn Instruments, Allentown, NJ USA) munite di due fessure (nose-poke) provviste di fotocellule, attivate dal muso dell'animale, e posizionate alla distanza di 2 cm dal pavimento della gabbia. Uno dei due nose-poke, illuminato tramite luce giallo-verde è stato definito attivo poiché per suo tramite l'animale è stato in grado di attivare la pompa di infusione del farmaco collocata esternamente alla gabbia, mentre la fessura illuminata con luce rossa, tramite la quale il ratto non ha potuto esercitare alcun controllo sulla pompa di infusione, è stata definita nose-poke inattivo. La differenza di illuminazione dei due nose-poke ha costituito lo stimolo discriminativo. Prima che la sessione avesse inizio il catetere cronico è stato lavato con 0,1 ml di soluzione fisiologica sterile e quindi gli animali posizionati nel sistema di AS. La sessione di AS è monitorata da un sistema computerizzato (Graphic State 2 software, Colbourn Instrument, PA, USA) che registra le risposte effettuate da ciascun ratto in entrambi i nose-poke e il numero delle somministrazioni ricevute. La sessione di AS è caratterizzata dalle seguenti fasi:

1. Ready phase, caratterizzata dall'attivazione della pompa di infusione per 4 sec per il riempimento del catetere cronico con la soluzione di cocaina con volume morto di 50 μ l;
2. Drug available phase, durante la quale il comportamento di nose-poking attivo da parte dei ratti ha consentito il passaggio alla fase successiva;
3. Infusion phase costituita dall'iniezione endovenosa di un volume di 24 μ l in un tempo di 2 sec;
4. Time-out phase, successiva all'infusione del farmaco e della durata di 20 sec, nel corso della quale ogni nose-poke è stato registrato ma non ha indotto alcuna infusione addizionale. Durante questo periodo la luce dell'abitacolo è stata accesa, in maniera programmata, ed entrambi i nose-poke illuminati con luce rossa. Al termine del time-out la disponibilità del farmaco è stata segnalata dallo spegnimento della luce nell'abitacolo e dall'illuminazione del nose-poke attivo da luce giallo-verde.

Al termine della sessione il catetere cronico è stato lavato con soluzione fisiologica eparinizzata ed ogni animale è stato riposto nella propria gabbia.

ESPERIMENTO 1

Inizialmente è stata usata una schedula a rapporto fisso 1 (FR1) secondo la quale per ogni nose-poke effettuato l'animale ha ricevuto una dose di farmaco pari a 0,25 mg/kg/24 µl per 12 sessioni giornaliere. Dopo le prime 12 sessioni la dose di cocaina è stata ridotta a 0,15 mg/kg/24 µl sempre con un FR1. Una volta raggiunti i criteri di acquisizione, la schedula di lavoro è stata modificata con una a rapporto progressivo (PR3-4). Con questa schedula il numero di nose-poke richiesti per ottenere una infusione di cocaina (0,15 mg/kg/24 µl) è stato progressivamente incrementato secondo la seguente serie PR 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492 e 603 sino a quando l'animale non ha raggiunto il BP (Richardson e Roberts, 1996). Secondo questa schedula, l'animale aumenta la sua risposta per ottenere il rinforzo, ma quando la risposta richiesta supera il valore di rinforzo della sostanza, l'animale estingue il suo comportamento di AS (BP). Il BP viene definito come il massimo numero di nose-poke effettuato per l'ultima infusione di cocaina seguita da un'ora in cui l'animale non si somministra più il farmaco. Dalla sessione 18 alla 21 gli animali hanno ricevuto una iniezione di veicolo (acqua + tween 80, i.p.) 1 ora prima dell'inizio della sessione di AS. Dopo un BP stabile per 4 sessioni consecutive, è stato valutato l'effetto della somministrazione dell'antagonista del recettore 5-HT₆, SB271046 (10 mg/kg/i.p.), 1 ora prima dell'inizio della sessione (dalla sessione 22 alla 25). Dalla sessione 26 alla 29 il pretrattamento è stato sospeso e gli animali hanno proseguito ad autosomministrarsi la cocaina sempre secondo la schedula PR (3-4). Una volta riacquisito un BP stabile per tre sessioni consecutive la cocaina è stata sostituita con soluzione fisiologica e gli animali sono passati alla fase di estinzione (dalla sessione 30 alla 35).

ESPERIMENTO 2

All'inizio dell'esperimento di AS gli animali sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali: un gruppo è stato allenato ad autosomministrarsi cocaina + caffeina (gruppo cocaina+caffaina 0.25+0.125 mg/kg/24 µl, rispettivamente), il secondo solo cocaina (gruppo cocaina 0.25 mg/kg/24 µl) ed il terzo solo caffeina (gruppo caffeina 0.125 mg/kg/24 µl) sotto una schedula FR1 (dose I) per 15 sessioni giornaliere. Da questo momento tutti i ratti hanno raggiunto l'85% di risposte attive nei nose-poke e le risposte sono risultate stabili nelle ultime tre

sessioni consecutive. Dalla 16th alla 20th sessione la dose di cocaina e di caffeina è stata ridotta della metà (0.125 e 0.0625 mg, rispettivamente) sotto la stessa schedula FR1 per ulteriori 5 sessioni giornaliere (dose II). Successivamente, la schedula a rapporto fisso è stata sostituita con una schedula a rapporto progressivo (PR3-4) per 7 sessioni giornaliere consecutive alla dose II di cocaina e di caffeina (giorni 21th-27th). Dopo aver raggiunto un BP stabile per 3 sessioni consecutive, tutti i gruppi sono stati sottoposti ad estinzione suddivisa in due fasi (dalla 28th alla 38th sessione). Nella prima fase (giorni 28th-34th) la soluzione fisiologica è stata sostituita alla cocaina nel gruppo cocaina+caffeina e nel gruppo cocaina ed alla caffeina nel gruppo caffeina, mentre il gruppo cocaina+caffeina si è ancora autosomministrato la caffeina (0.0625 mg/kg/inf). Nella seconda fase (giorni 35th-38th) la soluzione fisiologica è stata sostituita alla caffeina anche nel gruppo cocaina+caffeina per 4 sessioni. Per ogni sessione sono stati calcolati il numero di nose-poke effettuati (attivi e inattivi) e di infusioni, il consumo di sostanza (cocaina e caffeina) e il valore di BP. Per ciascuna fase sperimentale è stata calcolata la media di ogni dato acquisito da ciascun ratto (FR1 dose I; FR1 dose II; PR; EXT1 e EXT2).

Durante gli esperimenti 1 e 2 i ratti hanno ricevuto una razione controllata di cibo (20 g) al termine di ciascuna sessione. Al termine dell'esperimento i ratti sono stati sacrificati mediante somministrazione endovenosa di una soluzione satura di Equitesin per verificare la reale efficienza del catetere.

Statistica

L'analisi statistica dei dati è stata condotta mediante computer utilizzando il programma "Statistica per Windows".

Esperimenti di microdialisi: I dati ottenuti negli esperimenti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) ad una o due vie per misure ripetute. Quando l'ANOVA ha rivelato differenze significative nei fattori principali ($p < 0.05$) sono stati effettuati contrasti multipli mediante il test del post-hoc delle minime differenze significative (Tukey's test) con un livello di significatività $p < 0.05$. I valori basali sono stati ottenuti dalla media degli ultimi tre campioni consecutivi che differiscono tra loro per non più del 10%.

Tutti gli effetti indotti dal trattamento sono stati espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di base.

Esperimenti di autosomministrazione:

ESPERIMENTO 1: il numero di nose-poke effettuati durante ogni fase dell'esperimento è stato analizzato con analisi della varianza (ANOVA) a una o due vie per misure ripetute. Quando l'ANOVA ha rivelato differenze significative nei fattori principali ($p < 0.05$) sono stati effettuati contrasti multipli mediante il test del post-hoc delle minime differenze significative (Tukey's test) con un livello di significatività $p < 0.05$. Il consumo è stato analizzato mediante l'analisi ANOVA a una via.

ESPERIMENTO 2: il numero di nose-poke (attivi vs inattivi), delle infusioni, del consumo di farmaco e del breaking point è stato utilizzato come misura dipendente e analizzato attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) sull'effetto dei fattori tra i gruppi (coc+caff, coc, caff). L'analisi ANOVA a due vie ha analizzato le differenze tra i gruppi (coc+caff vs coc vs caff) nel numero di nose-poke emessi durante ogni fase di AS e le differenze all'interno di ciascun gruppo nel numero dei nose-poke (attivi vs inattivi). Laddove sono stati ottenuti effetti significativi, sono stati effettuati contrasti multipli mediante il test di Tukey con un livello di significatività $p < 0.05$. Il confronto tra dose I e dose II della fase FR1 e tra EXT1 ed EXT2 per ciascun gruppo è stato effettuato con il test del T di Student. Per determinare gli effetti tra i gruppi sul numero di infusioni e di breaking point sono state eseguite analisi ANOVA a una via seguite dal test del T di Student ($p < 0.05$). Il consumo di farmaco (cocaina e caffeina) è stato analizzato mediante il test del T di Student ($p < 0.05$).

Parte I

Risultati

Effetto dell'SB271046 sul rilascio di dopamina indotto dalla cocaina nella Shell del NAc e nella PFCX.

I livelli basali della DA nei dializzati, calcolati come media \pm SEM, erano di $77,5 \pm 3,8$ fmoli/20 μ l e $27,9 \pm 1,9$ fmoli/20 μ l, rispettivamente nella Shell del NAc e nella PFCX.

I risultati ottenuti dopo trattamento sono stati calcolati come percentuale rispetto ai valori basali.

Come mostrato in Figura 1a, l'SB271046, alla dose di 10 mg/Kg/i.p. si è mostrato efficace nel prevenire l'aumento di DA nei dializzati indotto dalla cocaina (10 mg/Kg/i.p.) nella Shell del NAc.

L'analisi dei risultati ottenuti ha mostrato un effetto del pretrattamento ($F_{1,9}=15.5$, $p<0.01$); tempo ($F_{12,108}=32.9$, $p<0.01$) ed una interazione significativa pretrattamento x tempo ($F_{12,108}=8.9$, $p<0.01$). L'analisi del post-hoc ha mostrato che il pretrattamento con l'SB271046 ha ridotto in maniera significativa l'effetto massimo indotto dalla cocaina sul rilascio di DA.

Al contrario il pretrattamento con l'SB271046 alla dose di 10 mg/kg/i.p. non ha modificato l'aumento di DA nei dializzati della PFCX indotto dalla somministrazione acuta di cocaina (10 mg/kg/i.p.)(Fig 1b).

L'analisi ANOVA a due vie ha mostrato un effetto del tempo ($F_{12,96}=32.3$, $p<0.01$), ma non del trattamento ($p >0.05$).

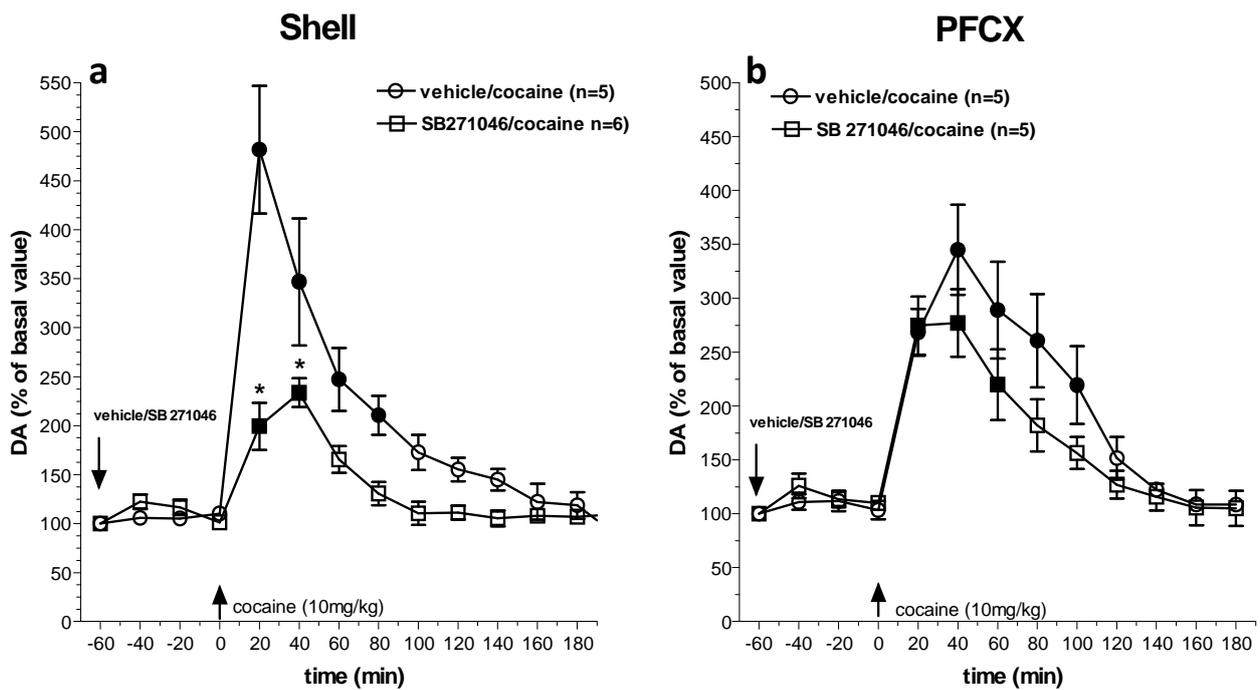


Fig. 1

Effetto dell'antagonista del recettore 5-HT₆ SB271046 (10 mg/Kg/i.p.) sull'aumento di DA extracellulare indotto da cocaina (10 mg/Kg/i.p.) nella Shell del NAc (fig. a) e nella PFCX (fig. b). I risultati, espressi come media \pm SEM in campioni di 20 minuti, sono espressi come percentuale rispetto al valore di base. I simboli pieni: $p < 0.05$ rispetto al valore di base; *: $p < 0.05$ rispetto al corrispondente valore del gruppo di controllo trattato con veicolo.

Autosomministrazione di cocaina e antagonismo dell'SB271046

Come mostrato nella Figura 2a i ratti sono stati allenati per 12 giorni ad autosomministrarsi, con una schedula FR1, una dose di 0,25 mg/Kg/infusione di cocaina; successivamente la dose è stata ridotta a 0,15 mg/Kg/infusione.

In queste condizioni i ratti hanno aumentato la risposta nel nose-poke attivo allo scopo di mantenere un consumo costante di cocaina.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto del nose-poke ($F_{1,28}=34.8$, $p<0.01$), della sessione ($F_{14,392}=7.0$, $p<0.01$) ed una interazione nose-poke x sessione ($F_{14,392}=5.9$, $p<0.01$).

Il post-hoc ha evidenziato che il numero di nose-poke attivi è maggiore rispetto al numero di nose-poke inattivi a partire dalla 9^a sessione.

L'analisi del consumo, condotta con l'ANOVA a una via ha mostrato un effetto della sessione ($F_{14,196}=23.4$, $p<0.01$). Il post-hoc ha evidenziato che il consumo di cocaina è stato incrementato, rispetto al primo giorno, a partire dalla 5^a sessione.

Dalla 16^a alla 29^a sessione, i ratti sono stati allenati ad autosomministrarsi cocaina (0,15 mg/Kg/infusione) con una schedula di lavoro a rapporto progressivo (PR3-4). Dalla 18^a alla 21^a sessione i ratti sono stati pretrattati con veicolo (3 mg/Kg/i.p.) un'ora prima della sessione di AS e dalla 22^a alla 25^a hanno ricevuto un pretrattamento con l'SB271046 in sostituzione al veicolo.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto del nose-poke ($F_{1,28}=40.3$, $p<0.01$), della sessione ($F_{13,364}=4.8$, $p<0.01$) ed una interazione nose-poke x sessione ($F_{13,364}=3.1$, $p<0.01$).

Il post-hoc ha evidenziato che il numero dei nose-poke attivi effettuati era maggiore rispetto al numero di nose-poke inattivi. Il pretrattamento con il veicolo non ha modificato il comportamento di nose-poking, mentre l'SB271046 è stato in grado di ridurre il numero di nose-poke attivi dalla 23^a alla 26^a sessione rispetto alla 31^a sessione.

L'analisi del consumo (Fig. 2b), effettuata con l'ANOVA a una via, ha mostrato un effetto della sessione ($F_{13,182}=4.3$, $p<0.01$). Il post-hoc ha mostrato che l'SB271046 ha ridotto il consumo di cocaina dalla 23^a alla 26^a sessione.

Il breaking-point (Fig. 2c), registrato dalla 16^a sessione alla 29^a sessione, corrisponde al numero di risposte richieste nell'ultimo rapporto completato. L'ANOVA a una via ha mostrato un effetto per il fattore sessione ($F_{13,182}=3.2$, $p<0.01$).

La fase di estinzione è stata condotta a partire dalla 30^a sessione per 6 sessioni consecutive. La sostituzione della cocaina con soluzione fisiologica ha determinato una rapida riduzione della

risposta sin dalla prima sessione di estinzione. L'ANOVA a due vie applicata dalla sessione 29 (ultima sessione di AS con cocaina) alla sessione 35, ha evidenziato un effetto del nose-poke ($F_{1,28}=48.4$, $p<0.01$), della sessione ($F_{6,168}=20.7$, $p<0.01$) ed una interazione nose-poke x sessione ($F_{6,168}=20.1$, $p<0.01$).

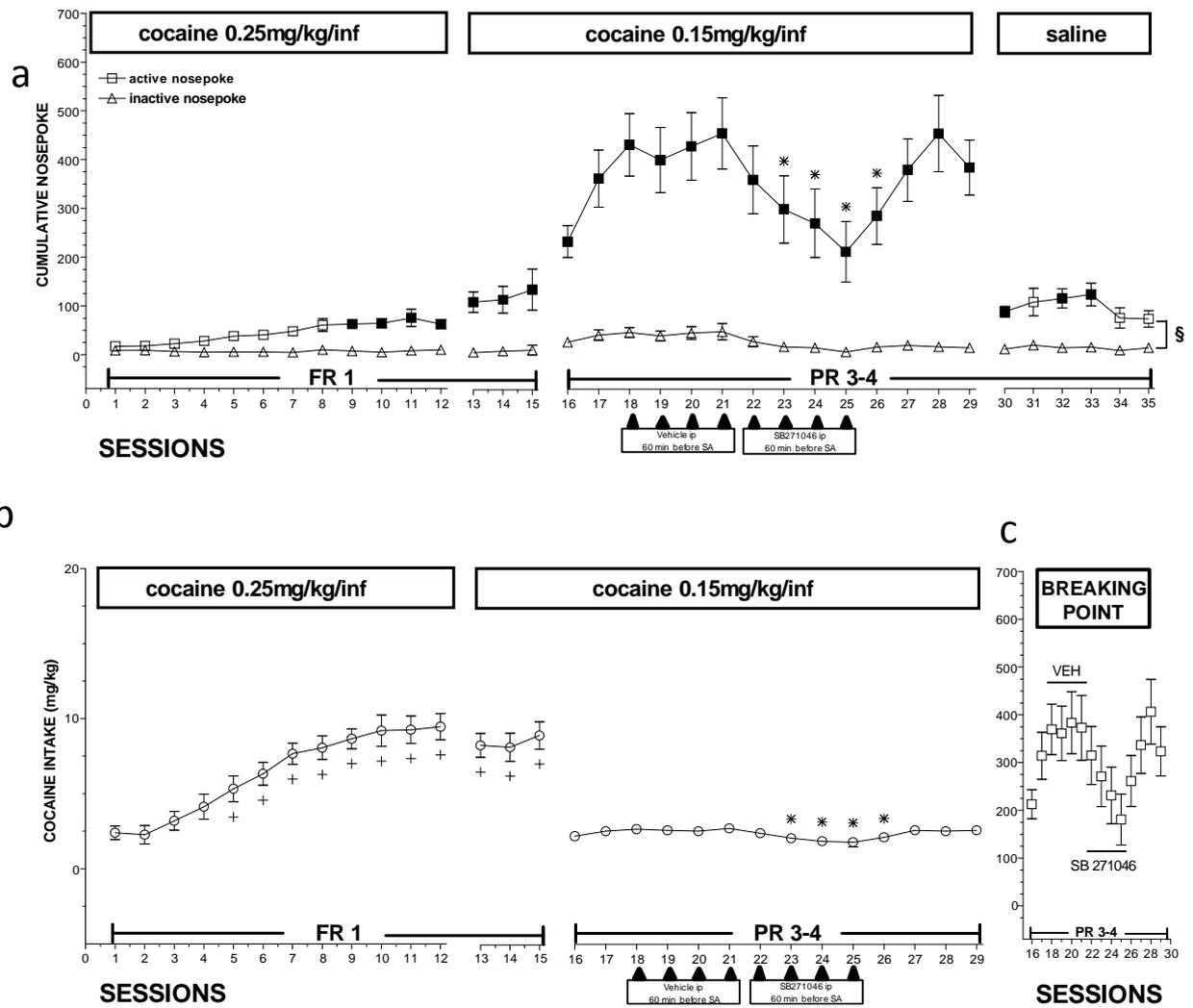


Fig. 2

a) risposte cumulative (nose-poke) durante l'AS di cocaina e la fase di estinzione. I risultati sono espressi come media \pm SEM dei nose-poke attivi e inattivi di n=15 ratti (1^a-35^a sessione). b) Consumo giornaliero di cocaina (espresso in mg/kg) durante l'AS. c) BP durante la fase PR di AS (16^a-29^a sessione). Simboli pieni: p < 0.05 vs. nose-poke inattivo; *: p < 0.05 vs. l'ultima sessione (21^a) prima della somministrazione di SB271046; x: p < 0.05 vs. l'ultima sessione di cocaina (29^a); β : p < 0.05 vs. l'ultima sessione.

Discussione

L'obiettivo di questa ricerca era quello di studiare il ruolo dei recettori 5-HT₆ nelle proprietà di rinforzo della cocaina.

Il primo risultato di questo studio è che l'SB271046 ha ridotto il comportamento di AS di cocaina e ha ridotto il rilascio di DA indotto dalla cocaina nella Shell del NAc.

L'SB271046 ha ridotto di circa il 60% l'effetto di una dose singola di cocaina (10 mg/kg/i.p.) sull'aumento di DA extracellulare nella Shell del NAc ma non nella PFCX. Inoltre, l'SB271046, dato un'ora prima delle sessioni di AS, ha ridotto il numero dei nose-poke attivi, il consumo di cocaina e il BP in una schedula a rapporto progressivo (PR3-4). L'effetto ritardato dell'SB271046 sulla risposta alla cocaina ricorda quanto già osservato nella fase di estinzione da Lecca e coll. (2007) e può essere spiegato ipotizzando che la risposta non è mantenuta soltanto dalle sue conseguenze, cioè dall'azione della cocaina autosomministrata, ma da stimoli che la precedono e quindi secondo una modalità abituale (habit). Pertanto, il fatto che l'SB271046 abbia ridotto le risposte soltanto dopo una somministrazione ripetuta non esclude che non sia in grado di interferire con le proprietà di rinforzo della cocaina. Le nostre osservazioni sono in accordo con le osservazioni di Fijal et al. (2010), i quali hanno riportato che l'SB271046 riduce l'autosomministrazione i.v. di cocaina in un paradigma a rapporto fisso e previene la riattivazione del comportamento di AS (reinstatement) indotta da un'iniezione passiva di cocaina. Tuttavia le osservazioni di Fijal et al. (2010) non sono sufficienti a giustificare la conclusione degli stessi autori, che il blocco dei recettori 5-HT₆ riduce le proprietà di rinforzo della cocaina. Infatti, una riduzione della risposta in un paradigma di AS può essere dovuto ad un aumento delle proprietà di rinforzo della sostanza.

Infatti Franz et al. (2002) pur osservando in un paradigma a rapporto fisso una riduzione della risposta all'autosomministrazione di anfetamina dopo pretrattamento con l'antagonista 5-HT₆ SB258510, hanno riportato un aumento del breaking point in un paradigma a rapporto progressivo, concludendo così che il blocco del recettore 5-HT₆ potenzia le proprietà di rinforzo dell'anfetamina. D'altra parte sia questi autori che van Gaalen et al. (2010), hanno riportato che gli antagonisti SB271046 e Ro-04-6790 non influenzano l'AS di cocaina in un paradigma a rapporto fisso.

Le nostre osservazioni sono chiaramente in contrasto sia con Franz et al. (2002) che con van Gaalen et al. (2010), dato che mostrano come nei ratti Sprague-Dawley l'SB271046 riduce il breaking point dell'autosomministrazione di cocaina, in accordo con una riduzione delle

proprietà di rinforzo della stessa cocaina. Si potrebbe escludere un effetto non specifico dell'SB271046. Il fatto che l'SB271046 non abbia influito sui nose-poke inattivi tende ad escludere un effetto dovuto a impedimento motorio (van Gaalen et al., 2010). La 5-HT è stata implicata nelle proprietà ansiogene della cocaina (Ettenberg e Geist, 1991; Roberts et al., 1994). Inoltre è stato dimostrato che l'infusione intracerebroventricolare di anticorpi contro il recettore 5-HT₆ (Hamon et al., 1999) e di oligonucleotidi antisenso che compromettono la trascrizione dell'mRNA del recettore 5-HT₆ induce ansia (Otano et al., 1999). Su questa base si potrebbe ipotizzare che l'SB271046 riduce l'AS di cocaina in quanto induce uno stato avversivo e ansioso. Non esistono però evidenze che l'SB271046 induca ansia. Al contrario, l'antagonista SB399885 ha mostrato di avere un effetto ansiolitico in vari test (Wesolowska, 2010).

Per quanto riguarda il diverso effetto dell'antagonismo 5-HT₆ sulle proprietà di rinforzo della cocaina, che sono ridotte (Fijal et al., 2010 e questo studio) rispetto a quelle dell'anfetamina che sono potenziate (Franz et al., 2002), questo potrebbe derivare dal diverso meccanismo d'azione dei due psicostimolanti; mentre infatti la cocaina aumenta la DA extracellulare in maniera dipendente dall'attività funzionale del neurone DA, l'anfetamina libera DA in maniera indipendente dall'impulso nervoso.

Bisogna comunque sottolineare che le condizioni sperimentali nello studio di Franz et al. (2002) sono molto diverse da quelle utilizzate nel nostro studio. Lo studio di Franz et al., infatti, è caratterizzato da una notevole restrizione alimentare (5-15 g di cibo al giorno), e dal fatto che la restrizione alimentare è stata applicata per la modalità Fixed Ratio ma non per la Progressive Ratio.

Concludendo, il nostro studio suggerisce che i recettori 5-HT₆ giocano un ruolo nelle proprietà di rinforzo della cocaina attraverso la loro interazione con la trasmissione DAergica nella Shell del NAc. Questa interazione potrebbe fornire un nuovo target per la terapia della dipendenza da cocaina.

Parte II

Risultati

Autosomministrazione di cocaina e caffeina a rapporto fisso 1 (FR1)

La Figura 3 (pannelli a e b) mostra la media delle risposte cumulative (nose-poke) attive e inattive emesse dai ratti nel corso di 20 sessioni giornaliere di AS secondo una schedula di rinforzo a rapporto fisso (FR1). L'AS di cocaina e caffeina è stata effettuata alla dose unitaria di 0.25 mg/Kg e 0.125 mg/Kg rispettivamente per le prime 15 sessioni (dose I; pannello a) e alla dose di 0.125 mg/Kg e di 0.0625 mg/Kg per le successive 5 sessioni (dose II; pannello b). Il gruppo cocaina+caffeina e il gruppo cocaina hanno acquisito il comportamento di AS alla dose I e hanno incrementato le loro risposte di nose-poke attivi quando la dose è stata ridotta (dose II) così da mantenere stabile il consumo di cocaina (vedi tabella 1). I ratti del gruppo caffeina non hanno acquisito il comportamento di AS a nessuna delle dosi, infatti il numero di nose-poke attivi non era diverso dal numero dei nose-poke inattivi.

L'ANOVA a una via applicata ai dati ottenuti con la dose I ha rivelato un effetto del nose-poke ($F_{1,29}=73.0$, $p<0.001$) e una interazione gruppo x nose-poke ($F_{2,29}=6.62$, $p<0.01$).

Il post-hoc ha indicato che il numero dei nose-poke attivi era superiore a quello dei nose-poke inattivi soltanto per il gruppo cocaina+caffeina e per il gruppo cocaina. Inoltre, il numero dei nose-poke attivi per entrambi i gruppi era maggiore a quello del gruppo caffeina.

L'ANOVA a due vie dei dati ottenuti con la dose II ha rivelato un effetto del gruppo ($F_{2,29}=15.6$, $p<0.001$), del nose-poke ($F_{1,29}=93.01$, $p<0.001$) e una interazione gruppo x nose-poke ($F_{2,29}=16.98$, $p<0.001$).

Il post-hoc ha evidenziato che il numero dei nose-poke attivi era superiore a quello dei nose-poke inattivi soltanto nel gruppo cocaina+caffeina e nel gruppo cocaina. Inoltre, in entrambi i gruppi, il numero dei nose-poke attivi era superiore a quello nel gruppo caffeina.

L'analisi del T-test applicato ad ogni gruppo ha rivelato un aumento dei nose-poke attivi alla dose II rispetto la dose I nel gruppo cocaina+caffeina ($p<0.0001$) e nel gruppo cocaina ($p=0.01$) ma non nel gruppo caffeina ($p=0.9$).

La Figura 3 (pannelli c e d) mostra la media delle infusioni ottenute dai ratti di ciascun gruppo durante le sessioni con schedula di rinforzo FR1 alla dose I (pannello c) e II (pannello d). L'ANOVA a una via ha rivelato una differenza tra i gruppi ad entrambe le dosi (dose I: $F_{2,29}=9.96$, $p<0.001$ e dose II: $F_{2,29}=30.03$, $p<0.001$).

Le analisi del T-test hanno indicato che il numero delle infusioni del gruppo cocaina+caffeina e del gruppo cocaina era superiore a quello delle infusioni del gruppo caffeina durante entrambe le fasi FR1 (dose I: $p=0.0001$ e $p=0.002$; dose II: $p<0.0001$ e $p<0.0012$, rispettivamente).

Inoltre, è stato osservato un incremento del numero di infusioni alla dose II rispetto alla dose I nel gruppo cocaina+caffeina ($p<0.0001$) e nel gruppo cocaina ($p=0.003$) ma non nel gruppo caffeina ($p=0.7$).

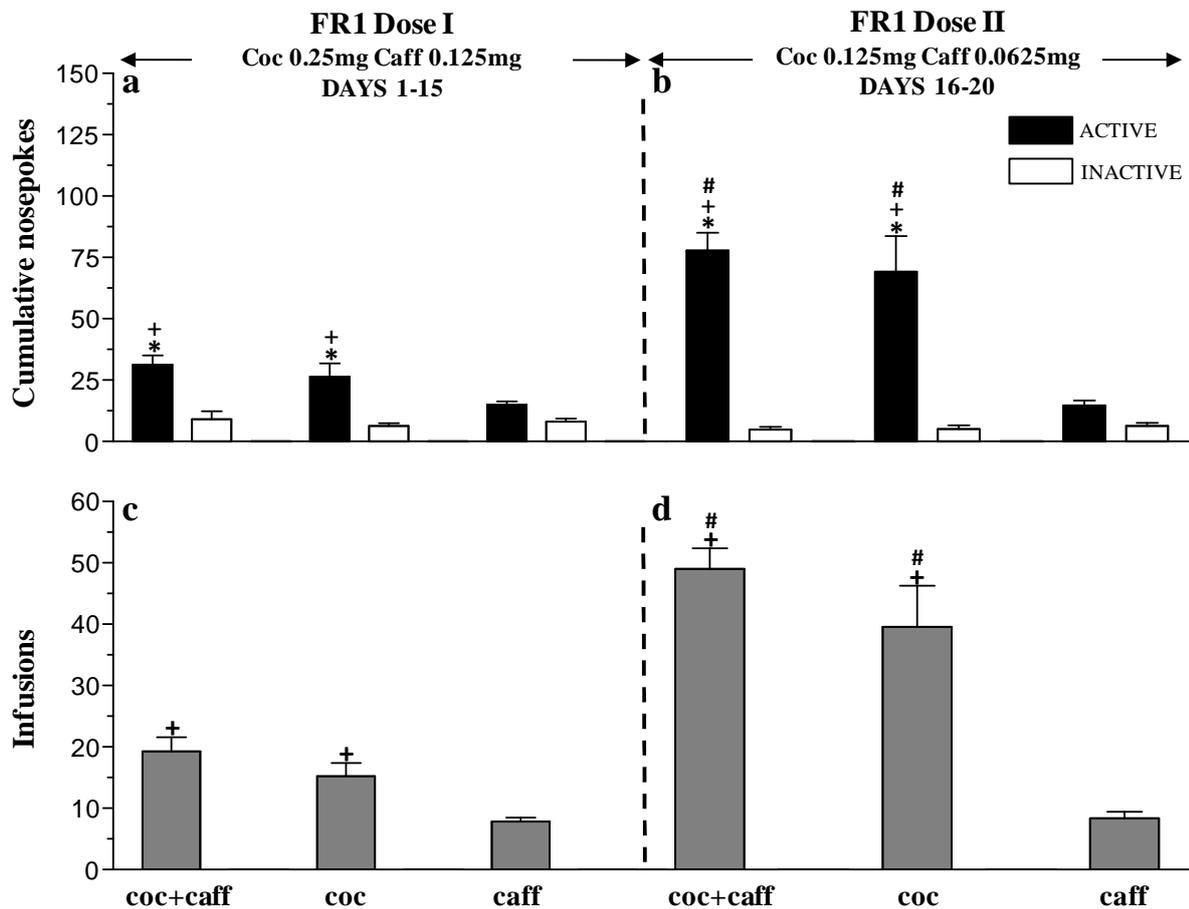


Fig. 3

Media (\pm SEM) delle risposte cumulative (nose-poke) attive e inattive e delle infusioni durante l'AS con una schedula di rinforzo FR1 alla dose I (panelli a,c) e II (panelli b,d). * Differenza significativa vs nose-poke inattivo; + Differenza significativa vs gruppo caffeina. #: Differenza significativa vs dose I.

Autosomministrazione di cocaina e caffeina a rapporto progressivo (PR)

Dalla 21^a alla 27^a sessione, la schedula di rinforzo FR1 è stata sostituita con una schedula a rapporto progressivo (PR3-4).

Come indicato nella Figura 4 (pannello a) i ratti del gruppo cocaina+caffeina e i ratti del gruppo cocaina hanno aumentato selettivamente le loro risposte nel nose-poke attivo e questa risposta è stata maggiore nel gruppo cocaina+caffeina rispetto al gruppo cocaina. I ratti del gruppo caffeina non hanno modificato il loro comportamento secondo quanto richiesto dal programma.

L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto del gruppo ($F_{2,29}=16.81$, $p<0.0001$), del nose-poke ($F_{1,29}=50.70$, $p<0.0001$) e una interazione gruppo x nose-poke ($F_{2,29}=17.07$, $p<0.0001$). Il post-hoc ha indicato che il numero dei nose-poke attivi era superiore a quello dei nose-poke inattivi nel gruppo cocaina+caffeina e nel gruppo cocaina ma non nel gruppo caffeina.

Inoltre il numero dei nose-poke attivi nel gruppo cocaina+caffeina era superiore a quello nel gruppo cocaina. La Figura 4 (pannello b) mostra la media delle infusioni ottenute dai ratti di ciascun gruppo. L'ANOVA a una via ha rivelato un effetto del gruppo ($F_{2,29}=47.25$, $p<0.0001$). Il T-test ha evidenziato che il numero delle infusioni per il gruppo cocaina+caffeina e cocaina era superiore a quello del gruppo caffeina ($p<0.0001$, per entrambi i gruppi). Inoltre le infusioni del gruppo cocaina+caffeina erano superiori a quelle del gruppo cocaina ($p=0.016$).

Il comportamento durante la fase PR è stato valutato anche come numero di risposte richieste nell'ultimo rapporto completato (pannello c). L'ANOVA a una via ha rivelato un effetto del gruppo ($F_{2,29}=10.81$, $p<0.001$). Il T-test ha indicato che il breaking point del gruppo cocaina+caffeina e del gruppo cocaina era superiore rispetto a quello del gruppo caffeina ($p<0.001$, per entrambi i gruppi) ed inoltre il BP del gruppo cocaina+caffeina era maggiore di quello del gruppo cocaina ($p=0.04$).

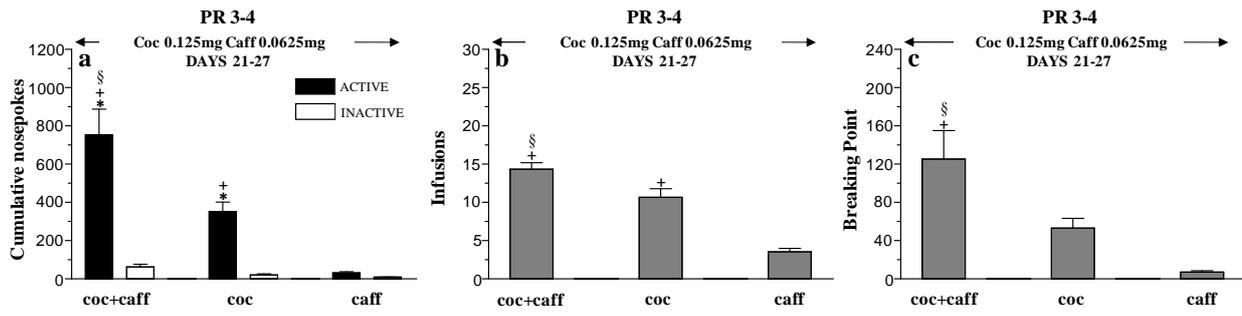


Fig. 4

Media (\pm SEM) dei nose-poke cumulativi attivi e inattivi (panello a), delle infusioni (panello b) e del breaking point (panello c) di ciascun gruppo sotto una scheda di rinforzo PR3-4. * Differenze significative vs nose-poke inattivi; + Differenze significative vs gruppo caffeina. § Differenze significative vs gruppo cocaina.

Consumo di cocaina e caffeina durante le fasi di autosomministrazione

La Tabella 1 mostra la dose media (mg/kg, \pm SEM) di cocaina e di caffeina autosomministrate rispettivamente dal gruppo: cocaina+caffeina, cocaina da sola e caffeina da sola nel corso delle due fasi, a rapporto fisso (FR1) e a rapporto progressivo (PR3-4) dell'autosomministrazione. Durante le sessioni FR1, il consumo di cocaina nel gruppo cocaina+caffeina non è stato diverso rispetto a quello del gruppo cocaina per entrambe le dosi (dose I, $p=0.25$ e dose II, $p=0.19$). Inoltre per ciascun gruppo non è stata trovata alcuna differenza tra le dosi. Al contrario, il consumo di cocaina durante la fase a rapporto progressivo è stato maggiore nel gruppo cocaina+caffeina rispetto a quello del gruppo cocaina ($p=0.003$). Per quanto riguarda il consumo di caffeina, l'analisi statistica ha rivelato che la quantità di caffeina consumata dal gruppo cocaina+caffeina era superiore a quella del gruppo caffeina durante entrambe le fasi FR1 ($p<0.001$) come pure durante la fase PR ($p<0.0001$). Inoltre il consumo di caffeina nel gruppo caffeina alla dose II è stato inferiore rispetto a quello della dose I della fase FR1 ($p<0.001$).

	FR1 dose I		FR1 dose II		PR 3-4 dose II	
	Cocaina	Caffeina	Cocaina	Caffeina	Cocaina	Caffeina
cocaina+caffeina	4.9 \pm 0.6	2.5 \pm 0.3#	6.2 \pm 0.4	3.1 \pm 0.2#	1.9 \pm 0.1*	0.9 \pm 0.05#
cocaina	3.9 \pm 0.5	-----	5.0 \pm 0.8	-----	1.3 \pm 0.1	-----
caffeina	-----	1.0 \pm 0.1	-----	0.6 \pm 0.1§	-----	0.2 \pm 0.02

Tab.1

Dose media espressa in mg/kg \pm SEM del consumo di cocaina e di caffeina dei gruppi cocaina+caffeina, cocaina e caffeina durante ciascuna fase di AS. * Differenze significative vs cocaina; # Differenze significative vs caffeina ; § Differenze significative vs dose I.

Estinzione dell'autosomministrazione di cocaina e caffeina (FR1)

La fase di estinzione è stata condotta dalla 28^a sessione per 10 sessioni consecutive. Sono state condotte due fasi di estinzione come descritto nella sessione dei metodi. Nella prima fase (EXT1) il gruppo cocaina+caffeina aveva ancora accesso alla AS di caffeina (0.0625 mg/kg/inf). Come mostrato nella Figura 5 (pannello a), la sola presenza di caffeina ha determinato un'alta risposta nel gruppo precedentemente trattato con la combinazione di cocaina e di caffeina, mentre la soluzione fisiologica sostituita alla cocaina ha indotto una riduzione più rapida nelle risposte di AS nel gruppo cocaina. L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto del gruppo ($F_{2,29}=20.55$, $p<0.0001$), del nose-poke ($F_{1,29}=79.02$, $p<0.0001$) e una interazione gruppo x nose-poke ($F_{2,29}=19.48$, $p<0.0001$). Il post-hoc ha indicato che il numero di nose-poke attivi era superiore a quello dei nose-poke inattivi nel gruppo cocaina+caffeina e nel gruppo cocaina ma non nel gruppo caffeina. Inoltre i nose-poke attivi nel gruppo cocaina+caffeina erano superiori a quelli nel gruppo cocaina. Nella seconda fase (EXT2) la caffeina è stata sostituita dalla soluzione fisiologica anche nel gruppo cocaina+caffeina (Fig. 5 pannello b). L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto del gruppo ($F_{2,29}=3.64$, $p<0.05$), del nose-poke ($F_{1,29}=49.56$, $p<0.0001$) e una interazione gruppo x nose-poke ($F_{2,29}=6.24$, $p<0.05$). Il post-hoc ha indicato che il numero di nose-poke attivi era maggiore a quello dei nose-poke inattivi nel gruppo cocaina+caffeina e nel gruppo cocaina. Non è stata trovata alcuna differenza sul numero dei nose-poke attivi tra il gruppo cocaina+caffeina e il gruppo cocaina. La Figura 5 (pannello c e d) mostra la media di infusioni ottenute dai ratti di ogni gruppo durante EXT1 (pannello c) e EXT2 (pannello d). L'ANOVA a una via ha rivelato un effetto del gruppo (EXT1: $F_{2,29}=23.11$, $p<0.001$ e EXT2: $F_{2,29}=14.58$, $p<0.001$). Il T-test ha evidenziato che il numero delle infusioni del gruppo cocaina+caffeina e cocaina era significativamente maggiore a quello del gruppo caffeina (EXT1: $p<0.0001$ e $p<0.001$; EXT2: $p<0.0001$ e $p<0.01$, rispettivamente). Inoltre il numero delle infusioni ottenute dal gruppo cocaina+caffeina nell'EXT1 è stato significativamente maggiore a quello del gruppo cocaina ($p=0.0003$).

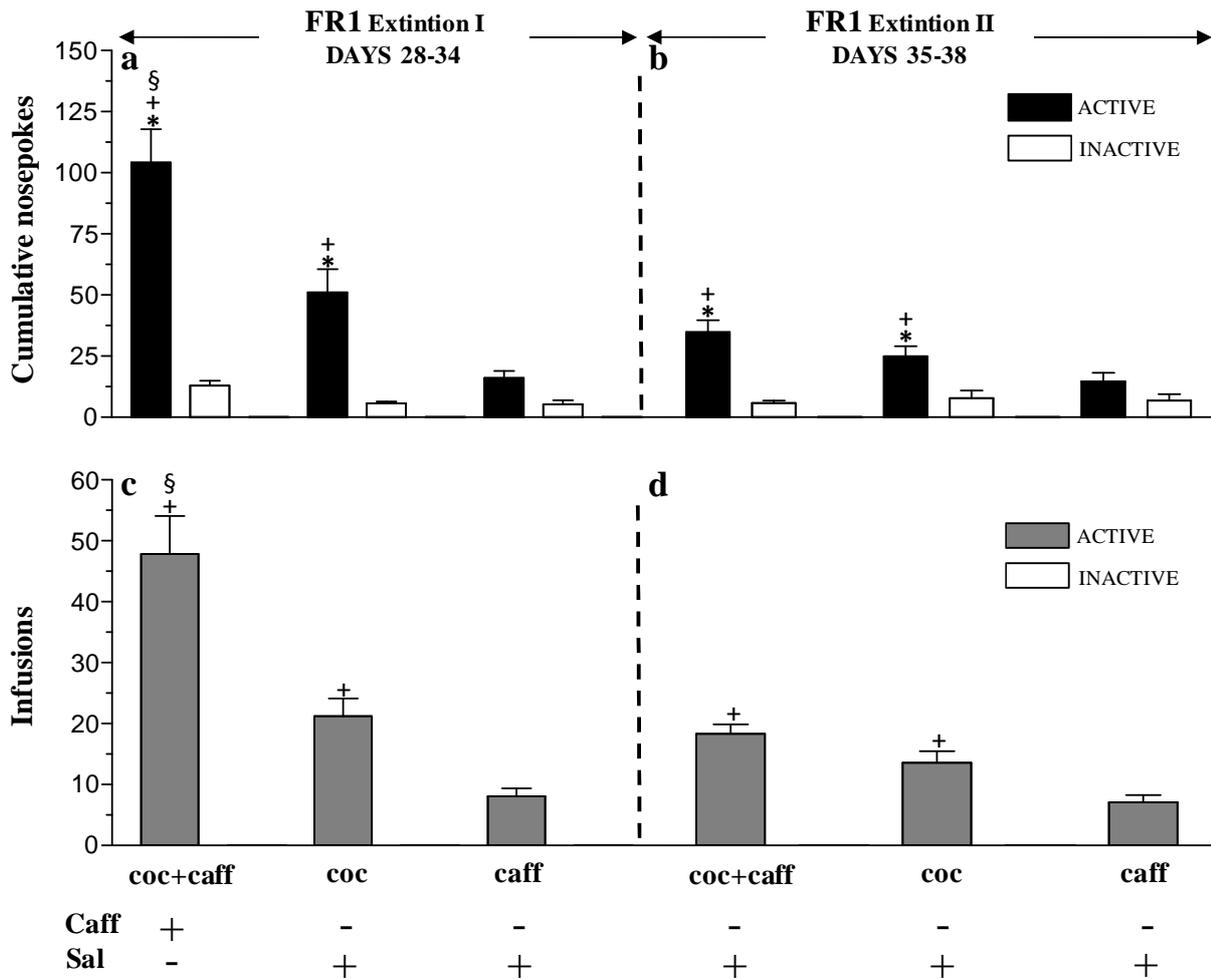


Fig. 5

Media (\pm SEM) delle risposte cumulative (nose-poke) attive e inattive e delle infusioni durante la fase di estinzione 1 (panello a, c) e di estinzione 2 (panello b, d). * Differenze significative vs nose-poke inattivi; † Differenze significative vs gruppo caffeina. § Differenze significative vs gruppo cocaina.

Discussione

Dato che la caffeina viene spesso assunta in grandi quantità insieme alla cocaina, scopo di questo studio è stato quello di stabilire se e in che direzione la caffeina è in grado di modificare le proprietà di rinforzo della cocaina utilizzando un paradigma di autosomministrazione endovenosa nel ratto.

Per nostra conoscenza, questo è il primo lavoro che ha studiato l'AS della cocaina in combinazione con la caffeina con una schedula di rinforzo a rapporto fisso (FR1), a rapporto progressivo (PR) e in estinzione. Il primo risultato di questo studio è che durante la fase di acquisizione con una schedula FR1 la AS di caffeina non ha influenzato la risposta per la cocaina. Infatti, i ratti allenati ad autosomministrarsi cocaina+caffeina hanno acquisito e mantenuto il comportamento di AS in maniera simile al gruppo con sola cocaina. Inoltre, come previsto, la sola caffeina non ha indotto un comportamento di AS come evidenziato dal numero pressochè simile dei nose-poke attivi e inattivi in ciascuna fase. Questa osservazione è in accordo con i risultati della letteratura nell'indicare che la caffeina è priva di proprietà di rinforzo negli animali e della capacità di indurre dipendenza psicologica/addiction nell'uomo (DSM V; Atkinson e Enslin, 1976; Hoffmeister e Wuttke, 1973; Myers e Izbicki, 2006).

Il secondo risultato di questo studio è che la caffeina, nonostante non sia autosomministrata è in grado di potenziare il comportamento di AS in un paradigma di rinforzo a rapporto progressivo (PR). In questa fase, infatti, il numero di nose-poke attivi, di infusioni e il breaking point era maggiore nel gruppo cocaina+caffeina rispetto al gruppo cocaina, indicando che la caffeina aumenta le proprietà di rinforzo della cocaina. L'altra osservazione di questo studio è che, somministrata in estinzione, la caffeina è in grado di mantenere un comportamento di AS in animali che precedentemente si sono autosomministrati la combinazione con la cocaina. Nella fase EXT1, infatti, i ratti che precedentemente si erano autosomministrati cocaina+caffeina mostrano una risposta più elevata rispetto al gruppo cocaina e al gruppo caffeina. Questa osservazione suggerisce che la caffeina possiede proprietà di stimolo in comune con la cocaina e che queste proprietà sono rinforzate dall'associazione con la cocaina. I risultati ottenuti sono in accordo con precedenti studi della letteratura che hanno definito le proprietà di stimolo della caffeina. Esperimenti di drug-discrimination hanno dimostrato che la caffeina può sostituire come stimolo discriminativo la cocaina (Holloway et al., 1985; Harland et al., 1989) e la nicotina (Gasior et al., 2000; 2002). Inoltre, la somministrazione della caffeina aumenta la risposta operante per la cocaina (Schenk et al., 1994; Kuzmin et al.,

2000), per la nicotina (Shoaib et al., 1999), e per l'alcool (Kunin et al., 2000) e ripristina il comportamento di ricerca della cocaina (Worley et al., 1994; Green e Schenk, 2002; Regier et al., 2014). Recenti studi hanno esteso questi effetti della caffeina ad un rinforzo non farmacologico come il cibo (Sheppard et al., 2012). Il fatto che la caffeina potenzi il comportamento di AS della cocaina potrebbe essere collegato alle sue proprietà di stimolazione psicomotoria. La caffeina, infatti, aumenta l'attività motoria e l'effetto acuto potrebbe essere quindi un risultato di un'attivazione aspecifica. Infatti, l'esposizione alla caffeina aumenta gli effetti stimolanti psicomotori dell'anfetamina (Palmatier et al., 2003; Simola et al., 2006; Cauli et al., 2003; Prieto et al., *submitted*), della nicotina (Celik et al., 2006; Gasior et al., 2000) e della cocaina (Misra et al., 1986; Lopez-Hill et al., 2011). Tuttavia questa spiegazione è improbabile per diverse ragioni. In primo luogo, l'aumento delle risposte del gruppo cocaina+caffeina rispetto al gruppo cocaina e al gruppo caffeina è limitato ai nose-poke attivi. Le risposte sul nose-poke inattivo sono rimaste sempre basse per tutta la durata dell'esperimento. In secondo luogo, se con la somministrazione ripetuta la caffeina fosse in grado di potenziare l'attività motoria, avremmo dovuto osservare anche un aumento della risposta nel gruppo caffeina, e ciò è non accaduto. In terzo luogo, le dosi della caffeina utilizzate in questo lavoro (0,0625 e 0,125 mg/kg/inf) erano molto inferiori alle dosi che incrementano l'attività locomotoria riportate in letteratura (Antoniou et al., 1998), laddove basse dosi di caffeina invece hanno un effetto additivo sulla place preference (Bedingfield et al., 1998). Di conseguenza, la capacità della caffeina di migliorare la risposta per la cocaina in una schedula PR e di ripristinare il comportamento di AS della cocaina durante la fase di estinzione non può essere attribuita ai suoi effetti di attivazione motoria. È più probabile che la caffeina, in seguito all'associazione cronica con la cocaina, acquisisca proprietà condizionate capaci di riprodurre le proprietà di stimolo della cocaina.

La caffeina è uno stimolante psicomotorio e, quando somministrata a basse dosi, produce molti dei suoi effetti comportamentali attraverso il blocco dei recettori adenosinici A₁ e A_{2A} influenzando il sistema dopaminergico (Ferré e Fuxe, 1992; Garrett e Griffiths, 1997).). E' ben noto che la cocaina blocca il trasportatore della DA nella membrana plasmatica delle terminazioni DAergiche dello striato. Questo meccanismo porta ad un aumento marcato della trasmissione DAergica che è alla base degli effetti di rinforzo della cocaina e della dipendenza (Di Chiara e Imperato, 1988; Koob e Bloom, 1988; Kalivas e Volkow, 2005). Alcuni autori hanno ipotizzato che la caffeina aumenta il rilascio di DA nella Shell del NAc (Solinas et al., 2002) e quindi potrebbe amplificare gli effetti della cocaina, facilitando la trasmissione

DAergica (Green e Schenk, 2002). Tuttavia i risultati ottenuti nei nostri laboratori sono in contrasto con tale evidenza. Infatti, Acquas et al. (2002) e successivamente De Luca et al. (2007) hanno mostrato che la caffeina non aumenta il rilascio di DA nella Shell del NAc del ratto e recenti studi confermano tale evidenza anche nell'uomo (Volkow et al., 2015). La caffeina aumenta la liberazione di DA nella PFCX (Acquas et al., 2002) ma questo effetto, lungi dall'essere la causa, è la conseguenza degli effetti psicostimolanti della caffeina. E' stato suggerito che la caffeina, pur non stimolando la liberazione di DA, potrebbe potenziare la trasmissione DAergica a livello post-sinaptico aumentando l'espressione dei recettori D2 e/o modificandone l'affinità (Volkow et al., 2015). Più probabilmente, dato che i recettori sui quali agisce la caffeina, cioè i recettori A_{2A}, che stimolano l'adenilato ciclasi, sono espressi dai neuroni della via striatale indiretta assieme ai recettori D2, che invece la inibiscono, è ipotizzabile che la caffeina, bloccando i recettori A_{2A}, faciliterebbe l'inibizione dell'adenilato ciclasi prodotto dalla DA attraverso la stimolazione dei recettori D2 (Ferrè et al., 1990). Vari studi sono in accordo con questo modello funzionale. Per esempio la stimolazione dei recettori A_{1A} e A_{2A} riduce numerosi comportamenti correlati alla cocaina attraverso la loro capacità di opporsi funzionalmente all'attività dei recettori DAergici (Hack e Christie, 2003). La somministrazione di agonisti A_{2A} blocca l'insorgenza della sensitizzazione della cocaina (Filip et al., 2006; Hobson et al., 2012) e modifica l'instaurarsi della conditioned place preference della cocaina (Poleszak e Malec, 2002). D'altra parte, l'antagonismo dei recettori A_{1A} e A_{2A} si sostituisce alla cocaina e produce uno spostamento a sinistra della curva dose-risposta nei test di discriminazione per la cocaina (Justinova et al., 2003). In un paradigma di AS, la stimolazione dei recettori A_{2A} rallenta l'acquisizione del comportamento di AS di cocaina (Knapp et al., 2001), mentre l'antagonismo dei recettori A_{2A} aumenta le risposte per la cocaina sotto una schedula di rinforzo a rapporto progressivo (Doyle et al., 2012; Justinova et al., 2011). Inoltre, la stimolazione dei recettori A_{2A} aumenta la soglia di stimolazione intracranica, mentre gli antagonisti bloccano l'effetto indotto dall'agonista e riducono la soglia di stimolazione che risulta aumentata durante l'astinenza da cocaina (Baldo et al., 1999). Infine, la stimolazione dei recettori A_{1A} e A_{2A} inibisce l'estinzione di cocaina e ne annulla il reinstatement, mentre il blocco dei recettori A_{2A} aumenta il comportamento di ricerca (Bachtell e Self, 2009; Hobson et al., 2013; O'Neill et al., 2012; O'Neill et al., 2014).

In conclusione questi studi confermano ed estendono i dati della letteratura che la caffeina non svolge un ruolo di rinforzo primario, ma potenzia gli effetti di rinforzo della cocaina e del valore motivazionale della sostanza. Questi effetti motivazionali possono avere importanti

implicazioni considerato che la caffeina è un importante ingrediente di bevande energetiche ed è uno degli adulteranti volutamente aggiunti alle droghe illecite, in particolare cocaina ed eroina (Cole et al., 2010).

BIBLIOGRAFIA

- Acquas E, Tanda G, Di Chiara G. (2002). Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharmacology*. 27(2):182-93.
- Adams JU, Careri JM, Efferen TR, Rotrosen J. (2001). Differential effects of dopamine antagonists on locomotor activity, conditioned activity and conditioned place preference induced by cocaine in rats. *Behav Pharmacol*. 12:603-11.
- Ahn KC, Pazderka-Robinson H, Clements R, Ashcroft R, Ali T, Morse C, Greenshaw AJ. (2005). Differential effects of intra-midbrain raphe and sistemi 8-OH-DPAT on VTA self-stimulation thresholds in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 178, 381-388.
- Alex KD, Pehek EA. (2007). Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol. Ther.* 113, 296-320.
- Antoniou K, Kafetzopoulou E, Papadopoulou-Daifotis Z, Hyphantisa T, Marselos M. (1998). d-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neuroscience and Biobehavioral* 23:189-96.
- Atkinson J, Enslen M. (1976). Self-administration of caffeine by the rat. *Arzneimittelforschung* 26:2059-2061.
- Auclair AL, Cathala A, Sarrazin F, Depoortère R, Piazza PV, Newman-Tancredi A, Spampinato U. (2010). The central serotonin 2B receptor: a new pharmacological target to modulate the mesoaccumbens dopaminergic pathway activity. *J Neurochem* 114(5):1323-32.
- Augood SJ, Emson PC. (1994). Adenosine A2a receptor mRNA is expressed by enkephalin cells but not by somatostatin cells in rat striatum: a co-expression study. *Brain Res Mol Brain Res*. 22:204-10.
- Baldo BA, Koob GA, Markou A. (1999). Role of adenosine A2 receptors in brain stimulation reward under baseline conditions and during cocaine withdrawal in rats. *J Neurosci*. 19:11017-26.
- Balfour DJ. (2009). The neuronal pathways mediating the behavioral and addictive properties of nicotine. *Handb Exp Pharmacol* 192: 209-233.
- Bachtell RK, Self DW. (2009). Effects of adenosine A(2A) receptor stimulation on cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 206:469-478.

- Bedingfield JB, King DA, Holloway FA. (1998). Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity, and additivity. *Pharmacol Biochem Behav* 61:291–296.
- Bernstein GA, Carroll ME, Thuras PD et al. (2002). Caffeine dependence in teenagers. *Drug Alcohol Depend* 66:1–6.
- Berridge KC, Kringelbach ML. (2008). Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl.)* 199, 457–480.
- Brockwell NT, Beninger RJ. (1996). The differential role of A1 and A2 adenosine receptor subtypes in locomotor activity and place conditioning in rats. *BehavPharmacol* 7:373–383.
- Broderick PA, Hope O, Okonji C, Rahni DN, Zhou Y. (2004). Clozapine and cocaine effects on dopamine and serotonin release in nucleus accumbens during psychostimulant behavior and withdrawal. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 157–171.
- Brown RM, Short JL. (2008). Adenosine A(2A) receptors and their role in drug addiction. *J Pharm Pharmacol.* 60:1409–30.
- Bubar MJ, Cunningham KA. (2006). Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors as potential targets for modulation of psychostimulant use and dependence. *Curr Top Med Chem* 6:1971-1985.
- Bubar MJ, Cunningham KA. (2008). Prospects for serotonin 5-HT_{2R} pharmacotherapy in psychostimulant abuse. *Prog Brain Res* 172:319–346.
- Budney AJ, Higgins ST, Hughes JR et al. (1993). Nicotine and caffeine use in cocaine-dependent individuals. *J Subst Abuse* 5:117–130.
- Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, et al. (2003). Adenosine A_{2A}Dopamine D₂ receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem.*278:46741–9.
- Carlezon WA Jr, Wise RA.(1996.). Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens Shell and frontal cortex. *J Neurosci* 1; 16(9):3112-22.
- Cauli O, Pinna A, Valentini V, Morelli M. (2003). Subchronic caffeine exposure induces sensitization to caffeine and cross-sensitization to amphetamine ipsilateral turning behavior independent from dopamine release. *Neuropsychopharmacology* 28:1752-1759.

Celik E, Uzbay IT, Karakas S. (2006). Caffeine and amphetamine produce cross-sensitization to nicotine-induced locomotor activity in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:50–55.

Cole C, Jones L, McVeigh J, Kicman A, Syed Q, Bellis M. (2010). *Cut: A Guide to Adulterants, Bulking Agents and Other Contaminants Found in Illicit Drugs*. Centre for Public Health Engagement Liverpool: Liverpool John Moores University.

Cole C, Jones L, McVeigh J, Kicman A, Syed Q, Bellis M. (2011). Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Testing and Analysis* 3:89-96.

Cools R, Roberts AC, Robbins TW. (2005). Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends Cogn. Sci.* 12, 31–40.

Corbett D, Wise RA. (1979). Intracranial self-stimulation in relation to the ascending noradrenergic fiber systems of the pontine tegmentum and caudal midbrain: a moveable electrode mapping study. *Brain Res* 177:423–436.

Daly JW, Fredholm BB. (1998). Caffeine--an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend.* 51(1-2):199-206.

Dawson L.A, Nguyen HQ, Li P. (2000). In vivo effects of the 5-HT₆ antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. *Br.J.Pharmacol.* 130:23-26.

Deakin JF. (1980). On the neurochemical basis of self-stimulation with midbrain raphe electrode placements. *Pharmacol Biochem Behav* 13:525–530.

De Deurwaerdere P, Spampinato U. (1999). Role of serotonin(2A) and serotonin(2B/2C) receptor subtypes in the control of accumbal and striatal dopamine release elicited in vivo by dorsal raphe nucleus electrical stimulation. *J Neurochem* 73:1033–1042.

De Luca MA, Bassareo V, Bauer A, Di Chiara G. (2007). Caffeine and accumbens shell dopamine. *J Neurochem.* 103(1):157-63.

Dews PB, O'Brien CP, Bergman J. (2002). Caffeine: behavioral effects of withdrawal and related issues. *Food Chem Toxicol.* 40(9):1257-61.

Di Chiara G. (1995). The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend* 38:95–137.

Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D. (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens Shell connection. *Neuropharmacology* 47: 227-241.

Di Chiara G, Bassareo V. (2007). Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr. Opin. Pharmacol* 7:69-76.

Di Chiara G, Imperato A. (1988). Opposite effects of mu and kappa opiate agonists and dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 1067-1080.

Ding ZM, Toalston JE, Oster SM, McBride WJ, Rodd ZA. (2009). Involvement of local serotonin-2A but not serotonin-1B receptors in the reinforcing effects of ethanol within the posterior ventral segmenta area of female Wistar rats. *Psychopharmacology* 204:381– 390.

Dixon AK, Gubitza AK, Sirinathsinghi DJ, Richardson PJ, Freeman TC. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 118:1461–1468.

Doyle SE, Breslin FJ, Rieger JM, Beauglehole A, Lynch WJ. (2012). Time and sex-dependent effects of an adenosine A2A/A1 receptor antagonist on motivation to self-administer cocaine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 102:257–263.

Drummond DC, Tiffany ST, Glautier S, Remington B. (1995). *Addictive behavior: cue exposure theory and practice*. West Sussex, England, Wiley.

East SZ, Burnet PWJ, Leslie RA, Roberts JC, Harrison PJ. (2002). 5-HT₆ receptor binding sites in schizophrenia and following antipsychotic drug administration: autoradiographic studies with [¹²⁵I] SB-258585. *Synapse* 45,191-199.

Ettenberg A, Geist TD. (1991). Animal model for investigating the anxiogenic effects of self-administered cocaine. *Psychopharmacology (Berl.)* 103, 455e461.

Evers EA, Cools R, Clark L, van der Veen FM, Jolles J, Sahakian BJ, Robbins TW. (2005). Serotonergic modulation of prefrontal cortex during negative feedback in probabilistic reversal learning. *Neuropsychopharmacology* 30:1138–1147.

Evrar I, Legleye S, Cadet-Tairou A. (2010). Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *Int J Drug Policy*. 21(5):399-406.

Fallon S, Shearman E, Sershen H, Lajtha A. (2007). Food reward-induced neurotransmitter changes in cognitive brain regions. *Neurochem Res* 32:1772–1782.

Fenu S, Rivas E, Di Chiara G. (2009). Differential involvement of dopamine D1 receptors in morphine and lithium-conditioned saccharin avoidance. *Physiol. Behav* 96:73-77.

- Fenu S, Spina L, Rivas E, Longoni R, Di Chiara G. (2006). Morphine-conditioned single-trial place preference: role of nucleus accumbens Shell dopamine receptors in acquisition, but not expression. *Psychopharmacology (Berl)* 187:143-153.
- Ferguson SM, Mitchell ES, Neumaier JF. (2008). Increased expression of 5-HT₆ receptors in the nucleus accumbens blocks the rewarding but not psychomotor activating properties of cocaine. *Biol. Psychiatry* 63:207-213.
- Ferre S, Diamond I, Goldberg SR, Yao L, Hourani SM, Huang ZL, et al. (2007). Adenosine A_{2A} receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry implications for drug addiction, sleep and pain. *Prog Neurobiol.* 83:332-47.
- Ferrè S, Fuxe K, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB. (1992). Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience* 51, 501-512.
- Fijal K, Pachuta A, McCreary AC, et al. (2010). Effects of serotonin 5-HT₆ receptor ligands on responding for cocaine reward and seeking in rats. *Pharmacol. Reports* 62: 1005-1014.
- Filip M, Frankowska M, Zaniewska M, Gołda A, Przegalin'ski E. (2005). The serotonergic system and its role in cocaine addiction. *Pharmacol Rep* 57:685-700.
- Filip M, Frankowska M, Zaniewska M, Przegalinski E, Muller CE, Agnati L et al. (2006). Involvement of adenosine A_{2A} and dopamine receptors in the locomotor and sensitizing effects of cocaine. *Brain Res* 1077:67-80.
- Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM et al. (1992). Molecular cloning of the rat A₂ adenosine receptor: selective co-expression with D₂ dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 14:186-195.
- Fink KB, Gothert M. (2007). 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol. Rev.* 59, 360-417.
- Fischman MW, Schuster CR, Resnekov L, Shick FE, Krasnegor NA, Fennell DX. (1976). Cardiovascular and subjective effects of intravenous cocaine administration in humans. *Arch Gen Psychiatry* 33:983-989.
- Fletcher PJ, Chintoh AF, Sinyard J, Higgins GA. (2004). Injection of the 5-HT_{2C} receptor agonist Ro60-0175 into the ventral tegmental area reduces cocaine-induced locomotor activity and cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 29:308-318.
- Fletcher PJ, Grottick AJ, Higgins GA. (2002). Differential effects of the 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907 and the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB242084 on cocaine-induced locomotor activity, cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of responding. *Neuropsychopharmacology* 27:576-586.

Frantz KJ, Hansson KJ, Stouffer DG, Parsons LH. (2002). 5-HT₆ receptor antagonism potentiates the behavioral and neurochemical effects of amphetamine but not cocaine. *Neuropharmacology* 42, 170– 180.

Fredholm BB, Battig K, Holmen J et al. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83–133.

Fuxe K, Ferre S, Zoli M, Agnati LF. (1998). Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A_{2A}/dopamine D₂ and adenosine A₁/ dopamine D₁ receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Mol Brain Res Rev.* 26:258–73.

Garrett BE, Griffiths RR. (1997). The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacol Biochem Behav* 57:533–541.

Gasior M, Jaszyna M, Peters J, Goldberg SR. (2000). 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* 295:1101–1111.

Gasior M, Jaszyna M, Munzar P et al. (2002). Caffeine potentiates the discriminative-stimulus effects of nicotine in rats. *Psychopharmacology* 162:385–395.

Gerard C, el Mestikawy S, Lebrand C, Adrien J, Ruat M, Traiffort E, et al. (1996). Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT₆ receptor mRNA in the central nervous system of control or dihydroxytryptamine-treated rats. *Synapse* 23, 164-173.

Gerard C, Martres MP, Lefevre K, Miquel MC, Verge D, Lanfumey L et al. (1997). Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res* 746, 207– 219.

Gines S, Hillion J, Torvinen M. (2000). Dopamine D₁ and adenosine A₁ receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:8606–11.

Gilliland K, Bullock W. (1984). Caffeine: a potential drug of abuse. *Adv Alcohol Subst Abuse* 3:53–73.

Green TA, Schenk S. (2002). Dopaminergic mechanism for caffeine-produced cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology* 26:422–430.

Griffiths RR, Evans SM, Heishman SJ et al. (1990). Low-dose caffeine physical dependence in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 255:1123–1132.

Griffiths RR, Woodson PP. (1988). Caffeine physical dependence: a review of human and laboratory animal studies. *Psychopharmacology (Berl).* 94(4):437-51.

Grottick AJ, Fletcher PJ, Higgins GA. (2000). Studies to investigate the role of 5-HT_{2C} receptors on cocaine and food-maintained behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1183-1191.

Hack SP, Christie MJ. (2003). Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. *Crit Rev Neurobiol* 15:235-274.

Hamon M, Doucet E, Lefevre K, Miquel MC, Lanfumey L, Insausti R et al. (1999). Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT₆ receptors. *Neuropsychopharmacology* 21: 68S-76S.

Harland RD, Gauvin DV, Michaelis RC, Carney JM, Seale TW, Holloway FA. (1989). Behavioral interaction between cocaine and caffeine: A drug discrimination analysis in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32:1017-1023.

Hayes DJ, Clements R, Greenshaw AJ. (2008a). Effects of systemic and intra-nucleus accumbens 5-HT(2C) receptor compounds on ventral tegmental area self-stimulation thresholds in rats. *Psychopharmacology* 203:579-588.

Hayes DJ, Graham DA, Greenshaw AJ. (2008b). Effects of systemic 5-HT(1B) receptor compounds on ventral tegmental area intracranial self-stimulation thresholds in rats. *Eur J Pharmacol* 604: 74-78.

Hensler JG. (2006). Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 203-214.

Higgins GA, Fletcher PJ. (2003). Serotonin and drug reward: focus on 5-HT_{2C} receptors. *Eur J Pharmacol* 480:151-162.

Higgins GA, Grzelak ME, Pond AJ, Cohen-Williams ME, Hodgson RA, Varty GB. (2007). The effect of caffeine to increase reaction time in the rat during a test of attention is mediated through antagonism of adenosine A_{2A} receptors. *Behav Brain Res.* 185(1):32-42.

Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, et al. (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors. *J Biol Chem.* 2002; 277:18091-7.

Hobson BD, Merritt KE, Bachtell RK. (2012). Stimulation of adenosine receptors in the nucleus accumbens reverses the expression of cocaine sensitization and cross-sensitization to dopamine D₂ receptors in rats. *Neuropharmacology* 63:1172-1181.

Hobson BD, O'Neill, CE, Levis, SC, Monteggia, LM, Neve, RL, Self, DW, et al. (2013). Adenosine A and Dopamine D Receptor Regulation of AMPA Receptor Phosphorylation and Cocaine- Seeking Behavior. *Neuropsychopharmacology.*

- Hoffmeister F, Wuttke W. (1973). Self-administration of acetylsalicylic acid and combinations with codeine and caffeine in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* Aug;186(2):266-75.
- Horger BA, Wellman PJ, Morien A, Davies BT, Schenk S. (1991). Caffeine exposure sensitizes rats to the reinforcing effects of cocaine. *Neuroreport* 2:53-56.
- Ikemoto S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 129-150.
- Juliano LM, Griffiths RR. (2004). A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. *Psychopharmacology (Berl).* 176(1):1-29.
- Justinova Z, Ferre S, Segal PN, Antoniou K, Solinas M, Pappas LA, Highkin JL. et al. (2003). Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the adenosinergic modulation of the discriminative-stimulus effects of cocaine and methamphetamine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 977-986.
- Justinova Z, Ferre S, Redhi GH, Mascia P, Stroik J, Quarta D et al. (2011). Reinforcing and neurochemical effects of cannabinoid CB1 receptor agonists, but not cocaine, are altered by an adenosine A2A receptor antagonist. *Addict Biol* 16:405-415.
- Kalivas PW, Volkow ND. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162(8):1403-13.
- Kaplan GB, Greenblatt DJ, Kent MA et al. (1993). Caffeine treatment and withdrawal in mice: relationships between dosage, concentrations, locomotor activity and A1 adenosine receptor binding. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1563-1572.
- Karila L, Gorelick D, Weinstein A, Noble F, Benyamina A, Coscas S, Blecha L et al. (2008). New treatments for cocaine dependence: a focused review. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:425-438.
- Katz RJ, Carroll BJ. (1977). Intracranial reward after Lilly 110140 (fluoxetine HCl): evidence for an inhibitory role for serotonin. *Psychopharmacology* 51, 189-193.
- Kita K, Shiratani T, Takenouchi K, Fukuzako H, Takigawa M. (1999). Effects of D1 and D2 dopamine receptor antagonists on cocaine-induced self-stimulation and locomotor activity in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 9(1-2):1-7.
- Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lanchowicz JE, et al. (1996). Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J neurochem* 66, 47-56.

- Koob GF, Bloom FE. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242:715–723.
- Knapp CM, Foye MM, Cottam N, Ciraulo DA, Kornetsky C. (2001). Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 68:797–803.
- Kranz GS, Kasper S, Lanzenberger R. (2010). Reward and the serotonergic system. *Neuroscience* 166: 1023–1035.
- Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW. (1991). The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* 14:299–302.
- Kunin D, Gaskin S, Rogan F. (2000). Caffeine promotes ethanol drinking in rats. Examination using a limited-access free choice paradigm. *Alcohol* 21:271–277.
- Kuzmin A, Johansson B, Semenova S. (2000). Differences in the effect of chronic and acute caffeine on self-administration of cocaine in mice. *Eur J Neurosci* 12:3026–3032.
- Lecca D, Cacciapaglia F, Valentini V, Acquas E, Di Chiara G. (2007). Differential neurochemical and behavioral adaptation to cocaine after response contingent and noncontingent exposure in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 191, 653e667.
- Lechin F, van der Dijs B, Hernandez-Adrian G. (2006). Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 565–585.
- Leggio GM, Cathala A, Moison D, Cunningham KA, Piazza PV, Spampinato U. (2009a). Serotonin_{2C} receptors in the medial prefrontal cortex facilitate cocaine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 56(2): 507-13.
- Leggio GM, Cathala A, Neny M, Rouge-Pont F, Drago F, Piazza PV, Spampinato U. (2009b). In vivo evidence that constitutive activity of serotonin_{2C} receptors in the medial prefrontal cortex participates in the control of dopamine release in the rat nucleus accumbens: differential effects of inverse agonist versus antagonist. *J Neurochem* 111(2):614-23.
- Leri F, Bruneau J, Stewart J. (2003). Understanding polydrug use: review of heroin and cocaine use. *Addiction* 98:7–22.
- Liguori A, Hughes JR, Goldberg K et al. (1997). Subjective effects of oral caffeine in formerly cocaine-dependent humans. *Drug Alcohol Depend* 49:17–24.

Liu ZH, Ikemoto S. (2007). The midbrain raphe nuclei mediate primary reinforcement via GABA(A) receptors. *Eur J Neurosci* 25:735–743.

López-Hill X, Prieto J, Meikle M, Urbanavicius J, Abín-Carriquiry A, Prunell G, Umpiérrez E, Scorza C. (2011). Cocaine paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behavioural Brain Research* 221:134-141.

Marcellino D, Navarro G, Sahlholm K, Nilsson J, Agnati LF, Canela EI, et al. (2010). Cocaine produces D2R-mediated conformational changes in the adenosine A(2A)R-dopamine D2R heteromer. *Biochem Biophys Res Commun.* 394:988–92.

Miliaressis E, Bouchard A, Jacobowitz DM. (1975). Strong positive reward in median raphe: specific inhibition by para-chlorophenylalanine. *Brain Res* 98:194–201.

Miliaressis E. (1977). Serotonergic basis of reward in median raphe of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 7:177–180.

Mirenowicz J, Schultz W. (1996). Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature* 379(6564):449-51.

Misra AL, Vadlamani NL, Pontani RB. (1986). Effect of caffeine on cocaine locomotor stimulant activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 24:761–764.

Monsma FJ, Shen Y, Ward RP, Hamblin MW, Sibley DR. (1993). Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol Pharmacol* 43, 320-327.

Muller CP, Carey RJ, Huston JP, De Souza Silva MA. (2007). Serotonin and psychostimulant addiction: focus on 5-HT1A-receptors. *Prog Neurobiol* 81:133–178.

Müller CP, Huston JP. (2006). Determining the region-specific contributions of 5-HT receptors to the psychostimulant effects of cocaine. *Trends Pharmacol Sci* 27:105–112.

Myers KP, Izbicki EV. (2006). Reinforcing and aversive effects of caffeine measured by flavor preference conditioning in caffeine-naive and caffeine-acclimated rats. *Physiol Behav.* 2006 Jul 30;88(4-5):585-96.

Navailles S, Moison D, Cunningham KA, Spampinato U. (2008). Differential regulation of the mesoaccumbens dopamine circuit by serotonin 2C receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens: an *in vivo* microdialysis study with cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33:237-246.

Nehlig A. (1999). Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev* 23:563–576.

Nehlig A, Boyet S. (2000). Dose-response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. *Brain Research* 858:71-77.

Nic Dhonnchadha BA, Fox RG, Stutz SJ, Rice KC, Cunningham KA. (2009). Blockade of the serotonin 5-HT_{2A} receptor suppresses cue-evoked reinstatement of cocaine-seeking behavior in a rat self-administration model. *Behav. Neurosci.* 123, 382-396.

Nikodijević O, Jacobson KA, Daly JW. (1993). Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. *Pharmacol Biochem Behav* 44:199–216.

O'Neill CE, LeTendre ML, Bachtell RK. (2012). Adenosine A_{2A} receptors in the nucleus accumbens bi-directionally alter cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology* 37:1245–1256.

O'Neill CE, Hobson BD, Levis SC, Bachtell RK. (2014). Persistent reduction of cocaine seeking by pharmacological manipulation of adenosine A₁ and A_{2A} receptors during extinction training in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 231(16):3179-88.

Oliveto AH, McCance-Katz E, Singha A et al. (1998). Effects of d-amphetamine and caffeine in humans under a cocaine discrimination procedure. *Behav Pharmacol* 9:207–217.

Otano A, Frechilla D, Cobreros A, Cruz-Orive LM, Insausti A, Insausti R, Hamon M, Del RJ. (1999). Anxiogenic-like effects and reduced stereological counting of immunolabelled 5-hydroxytryptamine₆ receptors in rat nucleus accumbens by antisense oligonucleotides. *Neuroscience* 92, 1001e1009.

Palmatier MI, Fung EY, Bevins RA. (2003). Effects of chronic caffeine pre-exposure on conditioned and unconditioned psychomotor activity induced by nicotine and amphetamine in rats. *Behav Pharmacol*. 14(3):191-8

Parsons LH, Koob GF, Weiss F. (1995). Serotonin dysfunction in the nucleus accumbens of rats during withdrawal after unlimited access to intravenous cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, 274, 1182–1191.

Patkina NA, Zvartau EE. (1998). Caffeine place conditioning in rats: comparison with cocaine and ethanol. *Eur Neuropsychopharmacol* 8:287–291.

Paxinos G, Watson C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.

Pierce RC, Kumaresan V. (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev.* 30(2): 215-38.

Plassat JL, Amlaiky N, Hen R. (1993). Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 44, 229-236.

Platt DM, Rowlett JK, Spealman RD. (2002). Behavioral effects of cocaine and dopaminergic strategies for preclinical medication development. *Psychopharmacology (Berl)* 163(3-4): 265-82.

Poleszak E, Malec D. (2002). Adenosine receptor ligands and cocaine in conditioned place preference (CPP) test in rats. *Pol J Pharmacol* 54:119–126.

Pollack AE, Harrison MB, Wooten GF, Fink JS. (1993). Differential localization of A2a adenosine receptor mRNA with D1 and D2 dopamine receptor mRNA in striatal output pathways following a selective lesion of striatonigral neurons. *Brain Res.* 631:161–6.

Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. (1995). Intravenous cocaine, morphine and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “Shell” as compared with the “core” of the rat NAc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12304-12308.

Prahash A, Das G. (1993). Cocaine and the nervous system. *Int J Clin Pharmacol Therap Toxicol* 31:575–581.

Prieto JP, Galvalisi M, López-Hill X, Meikle MN, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. (2015). Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *Am J on Addictions*. Submitted.

Pullagurla M, Bondareva T, Young R, Glennon RA. (2004). Modulation of the stimulus effects of (+)amphetamine by the 5-HT₆ antagonist MS-245. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78: 263-268.

Regier PS, Claxton AB, Zlebnik NE, Carroll ME. (2014). Cocaine-, caffeine-, and stress-evoked cocaine reinstatement in high vs. low impulsive rats: treatment with allopregnanolone. *Drug Alcohol Depend*;143:58-64.

Reissig Ch, Strain E, Griffiths R. (2009). Caffeinated energy drinks - a growing problem. *Drug and Alcohol Dependence* 99:1-10.

Richardson NR, Roberts DC. (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 66:1–11.

Risch SC, Nemeroff CB. (1992). Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J. Clin. Psychiatry (Suppl. 3–7)*, 53.

Roberts DC, Loh EA, Baker GB, Vickers G. (1994). Lesions of central serotonin systems affect responding on a progressive ratio schedule reinforced either by intravenous cocaine or by food. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 177-182.

Roberts JC, Reavill C, East SZ, Harrison PJ, Patel S, Routledge C, Leslie RA. (2002). The distribution of 5-HT₆ receptors in rat brain: an autoradiographic binding study using the radiolabelled 5-HT₆ receptor antagonist [¹²⁵I] SB-258585. *Brain Research* 934, 49-57.

Romppe PP, Miliareisis E. (1985). Pontine and mesencephalic substrates of self-stimulation. *Brain Res* 359:246-259.

Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Leurs R, et al. (1993). A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 268-276.

Rush CR, Sullivan JT, Griffiths RR. (1995). Intravenous caffeine in stimulant drug abusers: subjective reports and physiological effects. *J Pharmacol Exp Ther* 273:351-358.

Schenk S, Horger B, Snow S. (1990). Caffeine preexposure sensitizes rats to the motor activating effects of cocaine. *Behav Pharmacol* 1:447-451.

Schenk S, Valadez A, Horger B, Snow S, Wellman P. (1994). Interactions between caffeine and cocaine in tests of self-administration. *Behavioural Pharmacology* 5:153-158.

Schenk S, Worley C, McNamara C, Valadez A. (1996). Acute and repeated exposure to caffeine: effects on reinstatement of extinguished cocaine-taking behavior in rats. *Psychopharmacology* 126:17-23.

Schiffmann SN, Libert F, Vassart G, Vanderhaeghen JJ. (1991). Distribution of adenosine A₂ receptor mRNA in the human brain. *Neurosci Lett.* 130:177-81.

Shen HY, Chen JF. (2009). Adenosine A_{2A} receptors in psychopharmacology: modulators of behavior, mood and cognition. *Curr Neuropharmacol.* 7:195-206.

Sheppard AB, Gross SC, Pavelka SA, Hall MJ, Palmatier MI. (2012). Caffeine increases the motivation to obtain non-drug reinforcers in rats. *Drug Alcohol Depend.* 124(3):216-22.

Shoib M, Swanner LS, Yasar S. (1999). Chronic caffeine exposure potentiates nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 142:327-333.

- Simola N, Cauli O, Morelli M. (2006). Sensitization to caffeine and cross-sensitization to amphetamine: Influence of individual response to caffeine. *Behavioural Brain Research* 172:72-79.
- Simon H, Le Moal M, Cardo B. (1976). Intracranial self-stimulation from the dorsal raphe nucleus of the rat: effects of the injection of para-chlorophenylalanine and of alpha-methylparatyrosine. *Behav Biol* 16:353-364.
- Solinas M, Ferré S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR. (2002). Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci*. 22(15):6321-4.
- Spealman RD, Barrett-Larimore RL, Rowlett JK et al. (1999). Pharmacological and environmental determinants of relapse to cocaine-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 64:327-336.
- Strain E, Griffiths R. (1995). Caffeine dependence: fact of fiction? *Journal of the Royal Society of Medicine* 88:437-440.
- Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB. (1999). The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J Neurosci* 19:4011-4022.
- Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. (2008). Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol*; 154(2):327-42.
- Thomsen M, Hall FS, Uhl GR, Caine SB. (2009). Dramatically decreased cocaine self-administration in dopamine but not serotonin transporter knock-out mice. *J Neurosci* 29: 1087- 1092.
- Ushijima I, Carino MA, Horita A. (1995). Involvement of D1 and D2 dopamine systems in the behavioral effects of cocaine in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 52:737-41.
- Valentini V, Frau R, Bordi F, Borsini F, Di Chiara G. (2011). A microdialysis study of ST1936, a novel 5-HT₆ receptor agonist. *Neuropharmacol* 60: 602-608.
- Valentini V, Piras G, De Luca MA, Perra V, Bordi F, Borsini F, Frau R, Di Chiara G. (2013). Evidence for a role of dopamine/5-HT₆ receptor interaction in cocaine reinforcement. *Neuropharmacol* 65: 58-64.
- Van der Kooy D, Fibiger HC, Phillips AG. (1978). An analysis of dorsal and median raphe self-stimulation: effects of parachlorophenylalanine. *Pharmacol Biochem Behav* 8:441-445.
- Van der Plasse G, La Fors SS, Meerkerk DT, Joosten RN, Uylings HB, Feenstra MG. (2007). Medial prefrontal serotonin in the rat is involved in goal-directed behaviour when affect guides decision making. *Psychopharmacology* 195:435-449.

- Van Gaalen MM, Schetters D, Schoffelmeer AN, De Vries TJ. (2010). 5-HT₆antagonism attenuates cue-induced relapse to cocaine seeking without affecting cocaine reinforcement. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13: 961-965.
- Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R. (2008). Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol* 154:299-315.
- Verster JC. (2015). Caffeine Consumption in Children, Adolescents and Adults. *Curr Drug Abuse Rev.*
- Volkow ND, Wang GJ, Logan J, Alexoff D, Fowler JS, Thanos PK, Wong C, Casado V, Ferre S, Tomasi D. (2015). Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. *Transl Psychiatry.* 5:e549. doi: 10.1038/tp.2015.46.
- Vollm B, Richardson P, McKie S, Elliott R, Deakin JF, Anderson IM. (2006). Serotonergic modulation of neuronal responses to behavioural inhibition and reinforcing stimuli: an fMRI study in healthy volunteers. *Eur J Neurosci* 23:552-560.
- Walker SC, Mikheenko YP, Argyle LD, Robbins TW, Roberts AC. (2006). Selective prefrontal serotonin depletion impairs acquisition of a detour-reaching task. *Eur J Neurosci* 23:3119-3123.
- Walker SC, Robbins TW, Roberts AC. (2008). Differential contributions of dopamine and serotonin to orbitofrontal cortex function in the marmoset. *Cereb Cortex* 19:889-898.
- Walsh SL, Cunningham KA. (1997). Serotonergic mechanisms involved in the discriminative stimulus, reinforcing and subjective effects of cocaine. *Psychopharmacology* 130:41-58.
- Ward RP, Hamblin MW, Lachowicz JE, Hoffman, BJ, Sibley, DR, Dorsa DM. (1995). Localization of serotonin subtype 6 receptor messenger RNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 64: 1105-1111.
- Watson J, Deary I, Kerr D. (2002). Central and peripheral effects of sustained caffeine use: tolerance is incomplete. *Br J Clin Pharmacol* 54:400-406.
- Wesolowska A. (2010). Potential role of the 5-HT₆ receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data. *Pharmacol. Rep.* 62, 564e577.
- Wise RA, Rompre PP. (1989). Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol*;40:191-225.
- Wise RA. (1996). Neurobiology of addiction. *Curr Opin. Neurobiol.* 6, 243-251.
- Wise RA. (1998). Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend*; 51(1-2):13-22.

Wolley ML, Marsden CA, Fone KCF. (2004). 5-HT₆ receptors. *Current Drug Targets-CNS and Neurological Diseases* 3, 59-79.

Worley Ch, Valadez A, Schenk S. (1994). Reinstatement of extinguished cocaine-taking behavior by cocaine and caffeine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 48:217-221.

Xi ZX, Gardner EL. (2008). Hypothesis-driven medication discovery for the treatment of psychostimulant addiction. *Curr Drug Abuse Rev* 1(3): 303-27.

Indice

Abstract	1
Introduzione	2
Cocaina	4
Modelli animali di tossicodipendenza	6
Il sistema serotonergico e i meccanismi di rinforzo	8
Il recettore 5-HT₆	10
• Ruolo dei recettori 5-HT ₆ nella ricompensa e nel rinforzo	11
Scopo della ricerca (parte I)	13
Adenosina e recettori adenosinici	15
Caffeina	17
• Interazione tra caffeina e cocaina	18
Scopo della ricerca (parte II)	20
Materiali e metodi	21
• Animali	21
• Farmaci	21
• Esperimenti di microdialisi	22
○ <i>Costruzione delle fibre da dialisi</i>	22
○ <i>Chirurgia per la microdialisi cerebrale</i>	23
○ <i>Procedura analitico sperimentale</i>	23
• Istologia	24
• Esperimenti di autosomministrazione	24
○ <i>Impianto del catetere per l'autosomministrazione</i>	24
○ <i>Autosomministrazione</i>	25
○ <i>Esperimento 1</i>	26
○ <i>Esperimento 2</i>	26
• Statistica	28

Parte I	29
• Risultati	29
○ <i>Effetto dell'SB271046 sul rilascio di dopamina indotto dalla cocaina nella SHELL e nella PFCX del NAc</i>	29
○ <i>Autosomministrazione di cocaina e antagonismo dell'SB271046</i>	31
• Discussione	34
Parte II	36
• Risultati	36
○ <i>Autosomministrazione di cocaina e caffeina a rapporto fisso 1 (FR1)</i>	36
○ <i>Autosomministrazione di cocaina e caffeina a rapporto progressivo (PR)</i>	38
○ <i>Consumo di cocaina e caffeina durante le fasi di autosomministrazione</i>	40
○ <i>Estinzione dell'autosomministrazione di cocaina e caffeina (FR1)</i>	41
• Discussione	43
Bibliografia	47