

**Alma Mater Studiorum**  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

**Dottorato di Ricerca in Farmacologia e Tossicologia**

Area 05- Scienze Biologiche  
S.S.D. BIO/14 - Farmacologia

*BACLOFEN E D-CICLOSERINA COME POTENZIALI  
STRUMENTI TERAPEUTICI NELLA DIPENDENZA DA  
SOSTANZE: STUDI PRECLINICI NEL RATTO*

Tesi di Dottorato presentata dalla:  
Dott.ssa FRANCESCA RICCI

Docente guida:  
Prof.ssa MARGHERITA GAIARDI

Coordinatore:  
Prof. GIORGIO CANTELLI FORTI

XIX ciclo  
Anno Accademico 2005-2006

## INDICE

### **Introduzione generale**

L' "addiction"	p. 1
L'abuso di droga nel mondo: statistiche di consumo e approccio terapeutico	p. 3
Il modello di Stolerman	p. 6
Neurotrasmettitori e aree cerebrali coinvolti nella dipendenza	p. 8
Sistema dopaminergico	p.12
Sistema glutamatergico	p.14
Sistema gabaergico	p.15
Sistema serotoninergico	p.16
Sistema oppioide endogeno	p.18

### **Obiettivi generali del progetto di ricerca**

#### **Modelli comportamentali**

Modello della sensibilizzazione locomotoria	p.21
Modello della drug discrimination	p.24

### **Capitolo 1: modulazione gabaergica della sensibilizzazione locomotoria indotta da amfetamina e morfina**

Introduzione	
Amfetamine	p.28
Morfina	p.29
Baclofen	p.30
Scopo dell'esperimento	p.31
Materiali e metodi	
Animali	p.31
Farmaci	p.32
Apparato	p.32
Risultati	p.34
Discussione	p.45

## **Capitolo 2: modulazione glutammatergica della sensibilizzazione locomotoria indotta da amfetamina**

Introduzione	p.50
D-cicloserina	p.51
Scopo dell'esperimento	p.52
Materiali e metodi	
Animali	p.52
Farmaci	p.53
Apparato	p.53
Risultati	p.53
Discussione	p.59

## **Capitolo 3: modulazione gabaergica delle proprietà discriminative di amfetamina e morfina**

Introduzione	p.63
Scopo dell'esperimento	p.64
Materiali e metodi	
Animali	p.65
Farmaci	p.65
Apparato	p.65
Procedura generale	p.66
Risultati	p.71
Discussione	p.80

## **Capitolo 4: modulazione glutammatergica delle proprietà discriminative dell'amfetamina**

Introduzione	p.89
Scopo dell'esperimento	p.91
Materiali e metodi	
Animali	p.91
Farmaci	p.91
Apparato e procedura generale	p.91

Risultati	p.91
Discussione	p.95
<b>Conclusioni</b>	p.98
<b>Bibliografia</b>	p.102

## INTRODUZIONE GENERALE

### L'“addiction”

Il problema della tossicodipendenza non nasce nel mondo moderno, ma in esso ha trovato terreno fertile al suo sviluppo, tanto da essere divenuto un elemento non trascurabile per la politica di ogni paese, a causa delle complesse problematiche etiche, sociali, sanitarie ed economiche ad esso correlate.

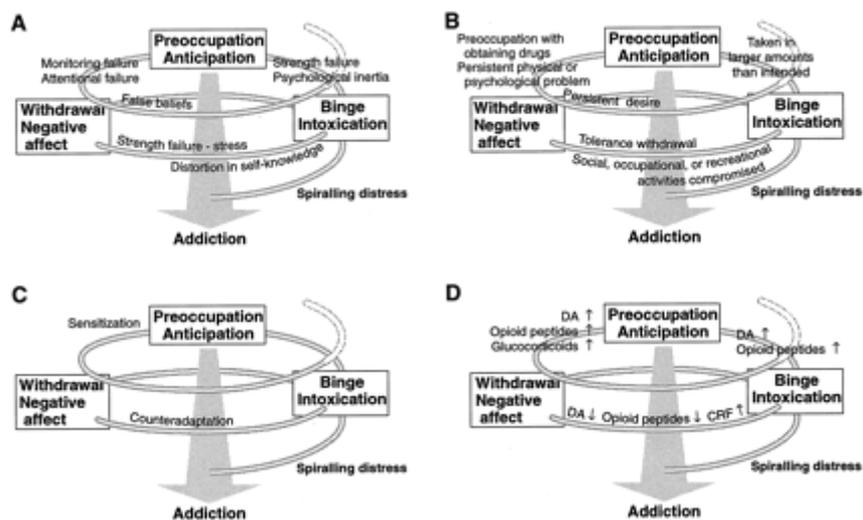
Fin dai tempi più remoti è documentato l'utilizzo di sostanze psicotrope al fine di migliorare le prestazioni fisiche dell'animale e dell'uomo, per consentire la sopravvivenza in ambienti ostili, per favorire l'aggregazione sociale, come strumento di ascesi e divinazione, o come mezzo per lasciar fluire l'impulso creativo.

Quello che oggi fa della tossicodipendenza uno dei maggiori problemi della società è in realtà il passaggio chiave dall'*USO* consapevole, e talvolta perfino terapeutico, delle sostanze, all'*ABUSO* sconsiderato, con conseguenti danni, spesso irreparabili, dal punto di vista fisico, psichico e sociale.

La dipendenza da una sostanza, meglio definita dal termine inglese “addiction”, è un disordine cronico ricorrente, caratterizzato da una ricerca compulsiva della sostanza desiderata, con totale perdita di controllo nella sua assunzione e sintomi gravi di astinenza in caso di mancanza della stessa (86).

Di fatto l' “addiction” segna il passaggio da un utilizzo impulsivo ad uno compulsivo di un farmaco. Nel primo caso l'individuo sceglie di utilizzare una sostanza per curiosità, per motivi legati all'ambiente in cui vive, per alleviare uno stato di tensione o affrontare una situazione difficile; lo stato di gratificazione immediata che ne consegue lo spinge verso ulteriori assunzioni (RINFORZO POSITIVO). Nel secondo caso l'azione farmacologica indotta dalla assunzione ripetuta della sostanza sui circuiti neuronali determina una perdita dell'omeostasi fisiologica, ovvero un disequilibrio a carico dei diversi sistemi cerebrali coinvolti, dovuta in gran parte alla loro eccessiva stimolazione. L'organismo, trovandosi nell'incapacità di controbilanciare la perdita di questo equilibrio, reagisce creando un nuovo “set-

point” ad un livello non più fisiologico ma patologico. Questo nuovo equilibrio, o allostasi, viene mantenuto dalla assunzione ripetuta della sostanza di abuso: la mancanza della stessa determina un diffuso stato di malessere a carico di vari organi che si manifesta nella sindrome astinenziale. Per rimuovere questa sensazione di malessere, che è sia mentale che fisico, il soggetto deve ricorrere a nuove somministrazioni della sostanza (RINFORZO NEGATIVO). L’instaurarsi di una tolleranza nei confronti di certi effetti del farmaco, che intercorre in seguito ad un contatto prolungato, costringono il tossicomane ad aumentare la dose alimentando quella che viene chiamata una “spiralling of distress”, che rende di fatto il soggetto dipendente dal farmaco in questione (66).

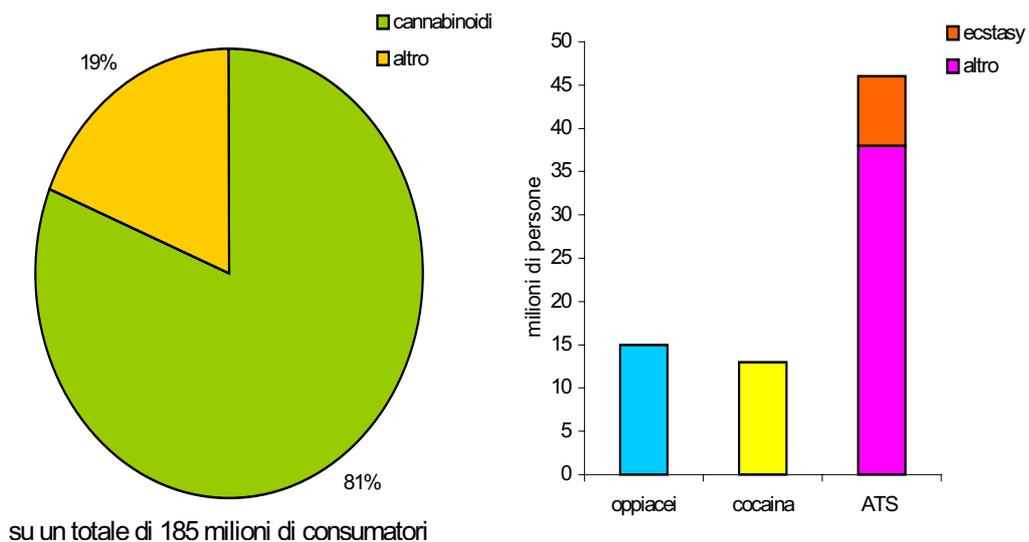


(Koob GF, Le Moal M. *Science* 1997)

Il diagramma descrive la « spiralling of distress » dell’ “addiction” attraverso quattro diverse prospettive: socio-psicologica, psichiatrica, disadattativa e neurobiologica. Il ciclo dell’ “addiction” può essere concettualizzato come una spirale che aumenta in ampiezza in seguito alle ripetute esperienze, fino a portare da uno stato iniziale di intossicazione acuta ad uno stato patologico di dipendenza.

L'abuso di droga nel mondo: statistiche di consumo e cenni di approccio terapeutico

Il rapporto ONU 2004 “*dati e tendenze dell'abuso di droga nel mondo*” pubblicato dall'Osservatorio Fumo, Alcol e Droga dell'Istituto Superiore di Sanità rivela che, secondo studi riportati dall' UNODOC (United Nations Office on Drugs and Crime), il 3% della popolazione mondiale (circa 185 milioni di persone) ha abusato di droghe nel 2003. Di questi circa 150 milioni sono consumatori di cannabis che, nel 55% dei casi, è assunta in associazione con altre sostanze di abuso. In particolare, mentre si osserva un calo nel consumo di oppiacei (15 milioni di persone abusano di eroina, morfina e oppio) appare in grande aumento l'assunzione di psicostimolanti come cocaina (13 milioni di persone) e ATS, sostanze stimolanti di tipo amfetaminico (38 milioni, di cui 8 milioni di consumatori di ecstasy).



Tale dato si presenta certamente allarmante, anche in considerazione del fatto che, mentre si conoscono farmaci utili al divezzamento dalla dipendenza da oppiacei, nessuna strategia terapeutica efficace è in uso per il trattamento della dipendenza da cocaina, sebbene si stiano sperimentando numerosi trattamenti (45) e poco o nulla ancora si conosce su come affrontare una dipendenza da amfetamine ed altri derivati sintetici.

Nella ricerca di potenziali farmaci per il trattamento del tossicodipendente possono essere prese in considerazione diverse possibilità:

- 1) **terapia sostitutiva:** permette di sostituire la sostanza tossicomane con un'altra avente proprietà farmacologiche corrispondenti, ma con più lunga durata di azione e attiva per via orale, allo scopo di stabilizzare il paziente con questo farmaco, evitando le crisi di astinenza, per poi gradualmente sospendere la somministrazione. Ne è un esempio classico il metadone, agonista dei recettori oppioidi, farmaco usato regolarmente per il disassuefazione da eroina (44).
- 2) **terapia con antagonisti:** permette di bloccare, attraverso l'impiego di antagonisti recettoriali delle sostanze di abuso, l'effetto di quest'ultime in caso di autosomministrazione e può quindi allontanare la possibilità di eventuali ricadute. Un esempio classico è costituito dal naltrexone, antagonista degli oppioidi; questo farmaco però, a differenza del metadone, viene generalmente male accettato dai tossicodipendenti (44).
- 3) **terapia con farmaci agenti su altre vie:** consiste nel bloccare, o regolare, la sindrome astinenziale agendo indirettamente attraverso la stimolazione o l'inibizione di altre vie nervose. Un esempio classico è quello della clonidina, agonista del recettore  $\alpha_2$ -adrenergico, utilizzata per il disassuefazione da oppioidi poiché, riducendo la liberazione di nor-adrenalina, attenua molti segni di iperattività simpatica (44). Il vantaggio di questa terapia è che questi farmaci, non avendo una azione simile a quella della sostanza abusata, normalmente non danno dipendenza (113).

Il disassuefazione del tossicodipendente, di per sé, è un processo farmacologicamente abbastanza semplice; quello che risulta più difficile è il controllo della situazione psicologica data dal contesto personale e sociale in cui l'individuo viene a trovarsi. Proprio per questo se è alto il numero di pazienti disassuefati è pure alto il numero di soggetti che vanno incontro a ricidive.

Ultimamente la ricerca si è concentrata sullo studio di farmaci che possano agire in modo da ripristinare l'omeostasi alterata del soggetto fino a riportarlo al normale livello fisiologico, allo scopo di renderlo meno vulnerabile in caso di ricadute o comunque meno suscettibile ai condizionamenti ambientali. In questa categoria rientra l'utilizzo nel tossicodipendente di antidepressivi e sedativi, spesso associati ad altre sostanze, e di composti che vadano ad agire in maniera diretta o indiretta sui circuiti dopaminergici e serotoninergici, notoriamente legati al tono dell'umore e alle aree del rinforzo endogeno.

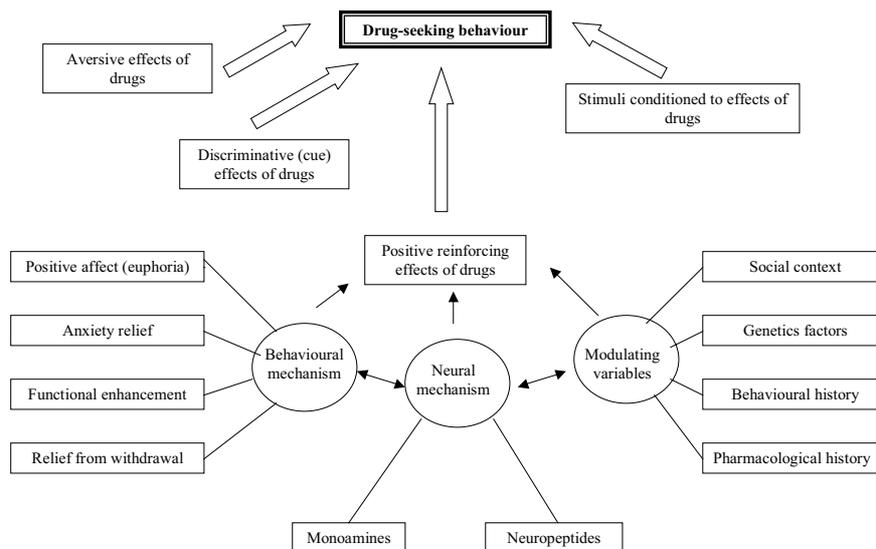
Un altro punto di indagine è quello che chiama in causa il legame fra dipendenza e plasticità neuronale. Pare infatti che il fenomeno della tossicodipendenza possa essere messo in relazione con i processi di apprendimento e memoria legati all'assunzione della sostanza (123) dal momento che "l'addiction" può essere definito anche come un disturbo derivante da modificazioni della plasticità sinaptica (122). In particolare, nell'instaurarsi di una dipendenza, il soggetto è sottoposto, a seguito del contatto con il farmaco di abuso, ad una sorta di "apprendimento aberrante" che lo indirizza, in maniera spesso involontaria, verso la ricerca compulsiva del farmaco stesso e verso comportamenti anomali associati al consumo che fa di esso (56). A questo proposito recenti studi hanno dimostrato che diversi effetti comportamentali di farmaci di abuso, come cocaina ed alcol, sono sotto il controllo di neurotrofine, come il BDNF e il GDNF (87), implicate nella regolazione della crescita e del differenziamento dei neuroni.

Un'ultima frontiera per la terapia delle tossicodipendenze è rappresentata dalla profilassi immunitaria. La terapia immunofarmacologica è basata sulla somministrazione di anticorpi o sulla stimolazione di una risposta anticorpale nel soggetto, al fine di evitare al farmaco di abuso di raggiungere il proprio target nel cervello. Recentemente molti esperimenti sono stati condotti per testare la possibilità di una immunizzazione attiva o passiva verso la cocaina, la nicotina, il PCP e la metamfetamina nell'animale da laboratorio e sono rispettivamente in fase I e II nella sperimentazione clinica sull'uomo per cocaina e nicotina (47, 77).

Esiste quindi una fiorente sperimentazione ma, in termini di terapie, poco ancora si ha a disposizione. Quello che è certo è che la tossicodipendenza è una malattia complessa e multi-settoriale, e che sarebbe necessario trovare farmaci in grado di avere una azione il più possibile specifica e selettiva. Per fare questo è necessario avere una conoscenza profonda del fenomeno “addiction”, sia a livello macro che microscopico.

### Il modello di Stolerman

Seppur ormai datato il modello proposto da Stolerman (101) è ancora utile per chiarire quelli che sono i molteplici fattori alla base della dipendenza.



Un ruolo di primo piano spetta agli effetti rinforzanti delle droghe di abuso: la capacità di agire come un rinforzatore è infatti il requisito minimo richiesto per il mantenimento del “drug-seeking” (ricerca ossessiva del farmaco). Questi effetti comprendono sia gli effetti rinforzanti positivi, come l’euforia, che quelli negativi, come l’alleviazione del senso di ansia o del malessere da astinenza, e possono essere variamente modulati da diversi fattori: un farmaco avente

proprietà rinforzanti in certe circostanze può non averne affatto in altre. Fra queste variabili modulatorie hanno un ruolo importante il contesto sociale in cui opera il soggetto, che può incoraggiare o scoraggiare certi comportamenti, la storia comportamentale e farmacologica, che può predisporre il soggetto verso particolari atteggiamenti nei confronti dei farmaci di abuso, e il fattore genetico. Sembra infatti ormai accertato che esista una predisposizione genetica alla dipendenza, non solo dall'alcol, ma anche da eroina, morfina e amfetamino-simili, fatto riscontrato sia nell'animale da laboratorio che nell'uomo (89).

Sebbene gli effetti rinforzanti siano un attributo essenziale delle sostanze in grado di mantenere il "drug-seeking", questo non è l'unico aspetto ad avere una grossa influenza sull'instaurarsi e sul mantenimento di una tossicodipendenza. Il secondo maggiore processo alla base dell' "addiction" è dato dalla capacità di un farmaco di agire da stimolo discriminativo. Tutte le principali droghe di abuso mostrano proprietà discriminative, possono cioè essere riconosciute sulla base degli effetti soggettivi che inducono in chi le assume, sia esso uomo o animale da laboratorio. Una delle ragioni per cui gli uomini abusano di certe sostanze è proprio la ricerca degli effetti soggettivi caratteristici che esse producono. L'abilità di percepire e identificare l'effetto soggettivo caratteristico di una sostanza o della sua assenza (nel caso di una sindrome astinenziale) possono incoraggiare il "drug-seeking" e dirigere l'organismo verso l'assunzione di un composto piuttosto che di un altro.

Un altro effetto da tenere in considerazione quando ci si interroga sui fenomeni alla base dell' "addiction" è la componente avversiva intrinseca in molte sostanze comunemente abusate. Tale componente in qualche modo disturba l'assunzione della sostanza, allo stesso modo in cui la componente gratificante, con cui spesso coesiste, la promuove.

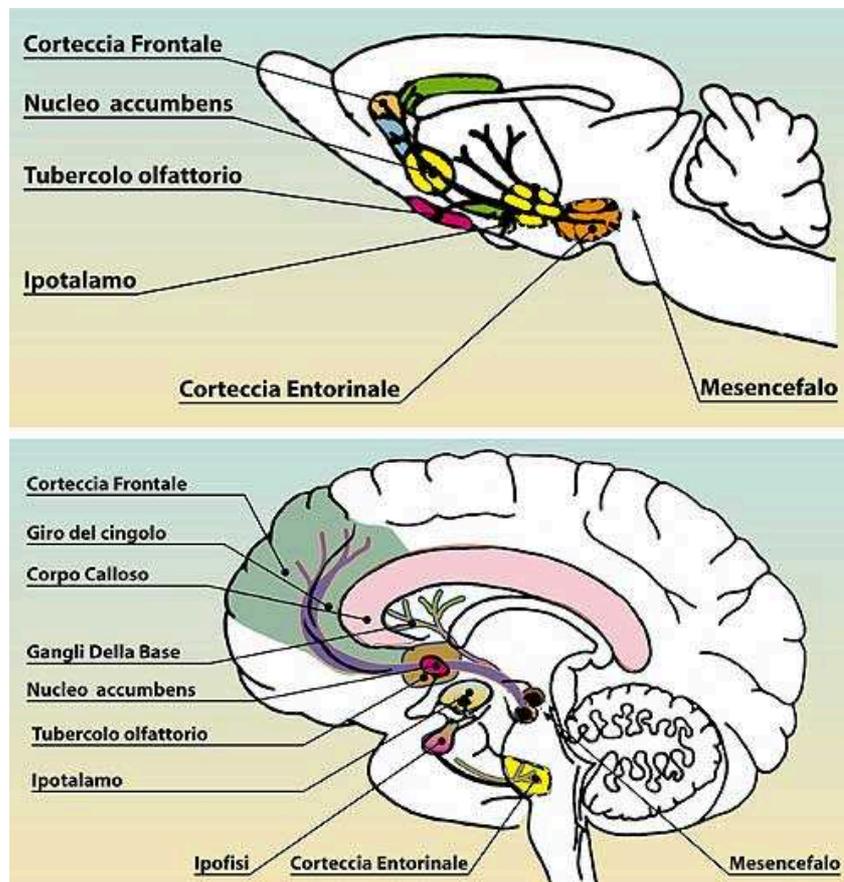
Ultimi, ma non in ordine di importanza, gli stimoli condizionati. Gli stimoli ambientali associati alla sperimentazione della sostanza di abuso da parte del soggetto rappresentano una componente fondamentale nei fenomeni di "addiction" e ricaduta, perché possono condizionare moltissimo il

comportamento. In particolare certi aspetti legati alla ritualità di alcuni gesti, o alla necessità di assumere una sostanza quando si è in particolari luoghi o situazioni, sono uno degli aspetti fondamentali della componente psicologica legata al problema delle dipendenze (101).

### Neurotrasmettitori e aree cerebrali coinvolti nella dipendenza

Dal punto di vista microscopico e molecolare il fenomeno dell' "addiction" chiama in causa pressoché tutti i neurotrasmettitori centrali e coinvolge aree cerebrali implicate in attività molto diverse. Le aree maggiormente chiamate in causa sono quelle che fanno capo al sistema meso-cortico- limbico, costituito da porzioni appartenenti al mesencefalo, al circuito limbico e alla corteccia.

La figura mostra il paragone fra le aree meso-cortico- limbiche nel cervello di ratto (in alto) e in quello umano (in basso).



Il concetto di sistema limbico non è tanto morfologico quanto fisiologico e psicologico. Tale porzione del sistema nervoso centrale (SNC) interviene nell'elaborazione di tutto l'insieme dei comportamenti correlati con la sopravvivenza della specie, elabora le emozioni e le manifestazioni vegetative che ad essa si accompagnano, ed è coinvolto nei processi di memorizzazione. Il sistema limbico è una formazione filogeneticamente antica; il suo sviluppo e la sua organizzazione nelle varie specie di mammiferi sono simili, il che fa ritenere che le basi fisiologiche dell'emotività e del comportamento siano analoghe per tutti i mammiferi (17).

Esso è costituito da una porzione di tessuto corticale primitivo, e da un insieme di strutture appartenenti al diencefalo e al telencefalo, ad esso collegate mediante importanti fasci di connessione. Tali strutture sono: l'ipotalamo, il talamo, l'ippocampo e l'amigdala. La struttura anatomica "chiusa" del sistema limbico spiega la relativa indipendenza dei circuiti emozionali e motivazionali dalle influenze corticali.

Il talamo costituisce una stazione di collegamento ove si arrestano tutte le vie della sensibilità eccetto quella olfattiva. Esso lascia filtrare verso la corteccia le informazioni fornite dalle stimolazioni meno intense, mentre arresta quelle fornite dalle stimolazioni più intense, elaborando subito una risposta emotiva ad esse. Il talamo interviene nel controllo della motilità suscitata da stimolazioni dolorose o affettive, attraverso connessioni dirette con la corteccia cerebrale motoria e indirette con il sistema extrapiramidale (17).

L'ipotalamo rappresenta la regione deputata al controllo delle funzioni viscerali. Questa struttura, che si trova alla base dell'encefalo, sotto al talamo, e riceve afferenze dal SNC e dagli organi periferici, di cui controlla l'omeostasi tramite un meccanismo di feedback. A sua volta, l'ipotalamo manda efferenze a vari distretti del SNC e all'ipofisi. L'asse ipotalamo ipofisario svolge un ruolo centrale nella modulazione dei fenomeni di stress, e pare, per questo motivo, essere coinvolto nell'instaurarsi e nel mantenimento della farmacodipendenza (42). A livello ipotalamico esiste poi un centro "del piacere": animali elettrostimolati in

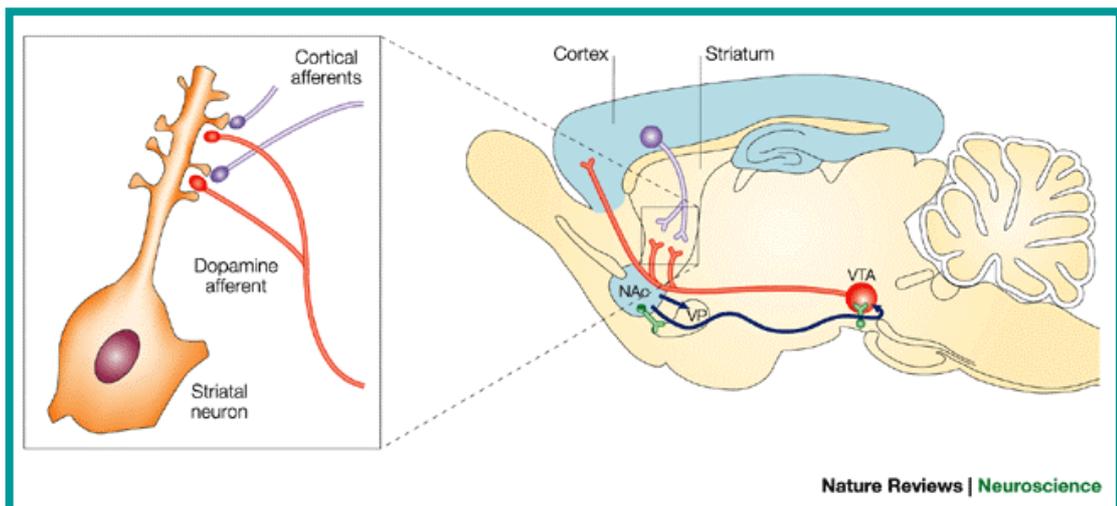
quella regione perdono infatti qualsiasi interesse per il cibo o i comportamenti sessuali (42).

L'ippocampo fa parte dei circuiti legati alle manifestazioni emozionali e motivazionali ed è coinvolto nella memoria episodica. E' direttamente implicato nei fenomeni di dipendenza, soprattutto per la componente che riguarda gli stimoli ambientali e i comportamenti condizionati (34).

L'amigdala è un nucleo di sostanza grigia alla base dell'encefalo. E' ritenuta un centro di integrazione di processi neurologici superiori, soprattutto per quanto riguarda la componente emozionale. L'amigdala è connessa con le reazioni più primitive, come la paura, durante la quale essa interviene paralizzando il ragionamento logico lasciando spazio ai comportamenti automatici. L'amigdala gioca un ruolo fondamentale in diversi aspetti che riguardano la dipendenza da sostanze e questo è stato ampiamente dimostrato sia nell'animale da laboratorio che nell'uomo (65).

Le aree maggiormente chiamate in causa nei modelli di dipendenza sono però essenzialmente l'area tegmentale ventrale (ATV) e i nuclei della base.

L' ATV corrisponde alla area A10 del mesencefalo, regione alla quale giungono le afferenze glutammatergiche provenienti dalla corteccia prefrontale (CPF) e da cui si irradiano le afferenze dopaminergiche indirizzate al sistema limbico e ai nuclei della base. A livello di questa regione si realizza la perfetta integrazione dei tre circuiti neurotrasmettitoriali essenziali nel controllo della dipendenza: il dopaminergico, il glutammatergico e il gabaergico (109).



I nuclei motori, o nuclei della base, sono un insieme di nuclei grigi sub-corticali appartenenti al sistema extrapiramidale, le cui funzioni riguardano la regolazione dei movimenti. Essi sono essenzialmente composti dal cosiddetto corpo striato che a sua volta si suddivide in diverse porzioni; fra esse la più importante, quando si parla di dipendenza, è il nucleus accumbens (NA), che rappresenta il centro della via extra-piramidale, controlla il movimento involontario ed è implicato nel presiedere le risposte attive e automatiche non sotto il controllo diretto della coscienza. Esso comunica direttamente con un altro nucleo, il pallido ventrale, al quale è connesso attraverso numerose fibre di tipo gabaergico (109). Tutti i dati disponibili inducono a fare l'ipotesi che certe aree emotive del cervello possono funzionare in condizioni di parziale disconnessione dalle aree cognitive. Tali aree, più che inconse, sarebbero parzialmente automatiche o vissute dal soggetto come qualcosa di più forte di se stesso, non sottoponibili a riflessività e controllo.

Recentemente è stato rivalutato, però, anche il coinvolgimento delle aree corticali nella farmacodipendenza. In particolare, la regione della CPF sembra essere direttamente implicata nella dipendenza da psicostimolanti, mentre ancora non è chiarito il suo ruolo nella dipendenza da altre sostanze. Essa comunica direttamente con la VTA e il NA. Certamente è importante il suo ruolo nella memoria associativa e nella modulazione cosciente degli eventi.

Per quanto riguarda i neurotrasmettitori coinvolti possiamo individuare i seguenti sistemi:

- sistema dopaminergico
- sistema glutammatergico
- sistema gabaergico
- sistema serotoninergico
- sistema oppioide endogeno

Essi non agiscono separatamente ma interagiscono, creando fitte reti di trasmissione e modulazione del segnale, reti che vengono modificate e compromesse dalla somministrazione acuta e cronica di sostanze psicotrope (82).

#### *Sistema dopaminergico*

La dopamina (DA) è il neurotransmettore maggiormente impegnato nella regolazione del piacere e del rinforzo. Nel cervello esistono due maggiori sistemi a trasmissione dopaminergica: il *sistema nigrostriatale*, che proietta dalla sostanza nigra verso il corpo striato, deputato alla coordinazione del movimento volontario, e il sistema *mesolimbicocorticale*, che proietta dalla ATV al NA, al tubercolo olfattorio, alla CPF e all'amigdala. L'aumento del tono dopaminergico a livello mesolimbico determina sensazioni di felicità ed euforia, e tali effetti aumentano la probabilità che il comportamento venga ripetuto, spingendo l'animale verso i comportamenti che hanno generato lo stato di benessere e che sono normalmente quelli deputati alla sopravvivenza: ricerca di cibo, acqua, di un partner o di una particolare situazione che sia stata precedentemente associata ad una ricompensa e quindi ritenuta favorevole per la sopravvivenza. Nell'uomo tali ricompense sono prodotte anche dal raggiungimento di obiettivi astratti e intellettuali (31).

Tutte le sostanze di abuso, attraverso meccanismi più o meno diretti, si sono dimostrate in grado di aumentare i livelli di dopamina nelle aree limbiche,

determinando sull'individuo una sovrastimolazione di quelli che sono i circuiti del piacere endogeno. Studi di microdialisi in ratti evidenziano un significativo aumento dei livelli di DA nel NA in seguito alla somministrazione di oppiacei, nicotina, amfetamina, cocaina, etanolo (36).

La sindrome astinenziale da qualsiasi sostanza di abuso è normalmente accompagnata da una deplezione dei depositi di DA, probabilmente conseguente una sovrastimolazione dei circuiti dopaminergici stessi, carenza che spinge il soggetto alla riassunzione del farmaco stesso nel tentativo di ristabilire gli equilibri (118).

Il ruolo centrale della dopamina nei processi di dipendenza ha fatto sì che gli antagonisti dopaminergici fossero i primi candidati come terapia per diminuire il "craving", tuttavia farmaci come aloperidolo o tiapride hanno dimostrato di incrementare la crisi astinenziale. Un crescente numero di studi ha dimostrato l'efficacia di agonisti parziali del recettore D3 in modelli animali di dipendenza (19). Una via alternativa è data dallo sviluppo di agonisti e antagonisti selettivi dei recettori D1 e di inibitori del re-uptake di dopamina (48).

Essendo la DA il neurotrasmettitore maggiormente coinvolto nel rinforzo endogeno, il limite nell'utilizzo di antagonisti dopaminergici risiede nella loro capacità di interferire con gli stimoli rinforzanti naturali.

Sebbene la dopamina sia la catecolamina maggiormente chiamata in causa nei fenomeni di dipendenza, anche adrenalina e nor-adrenalina svolgono un ruolo importante nella modulazione degli effetti dei farmaci di abuso: l'aumento di concentrazione di dopamina che si registra nel NA in seguito a contatto con amfetamina avviene tramite stimolazione del recettore  $\alpha$ 1-adrenergico (3), mentre la sensibilizzazione motoria alla amfetamina sembra essere dovuta ad un disaccoppiamento fra il sistema adrenergico e quello serotoninergico (vedi dopo) oltre che da un aumento diretto della trasmissione dopaminergica (90).

### *Sistema glutammatergico*

Il glutammato è il neurotrasmettitore eccitatorio maggiormente diffuso nel SNC e la sua azione è regolata da due tipi di recettore: gli ionotropi (iGlu) e i metabotropi (mGlu). I recettori ionotropi sono canali ionici che, in seguito al legame con il glutammato, incrementano l'afflusso di cationi sodio e potassio causando depolarizzazione della membrana (33). Essi si dividono in tre sottotipi recettoriali: N-methyl-D-aspartate (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazole-propionic acid (AMPA) e kainato. I recettori metabotropi sono recettori accoppiati a proteina G e sono suddivisi in tre gruppi (I, II e III) sulla base della omologia delle sequenze, del meccanismo di traduzione del segnale e della loro selettività farmacologica (21). I recettori metabotropi sono localizzati principalmente nelle aree limbiche e in quelle frontali maggiormente implicate nei meccanismi di dipendenza; in particolare i recettori del gruppo I sembrano avere un ruolo importante nella regolazione degli effetti rinforzanti dei farmaci, mentre quelli di tipo II sono implicati nelle modificazioni sinaptiche che intercorrono in seguito ad una esposizione prolungata al farmaco e negli effetti avversi delle sindromi astinenziali (63). In seguito alla somministrazione di qualsiasi sostanza di abuso si assiste ad un' aumento della trasmissione glutammatergica nel sistema limbico e nella CPF che sembra essere responsabile, in primis, di un maggior rilascio di dopamina, ma anche di effetti non dopamino-dipendenti. In particolare mentre fenomeni come la sensibilizzazione, il "craving", la ricaduta, il rinforzo sembrano derivare dall'interazione fra modificazioni dopaminergiche e glutammatergiche, gli aspetti contesto specifico e i comportamenti condizionati legati all'assunzione di sostanze sembrano dipendere soprattutto da meccanismi glutammatergici (106). Sommarariamente si può dire che il sistema glutammato-dopamina è, nel NA, responsabile dell'instaurarsi del "drug-seeking", mentre il solo glutammato è maggiormente implicato nella ricaduta (23).

La riduzione dei livelli di glutammato extracellulare nelle aree limbiche sembra essere strettamente correlata alla sindrome astinenziale da psicostimolanti:

agonisti dei recettori metabotropi del glutammato sembrano essere in grado di ridurre il “drug craving” e di esercitare una prevenzione nei confronti delle ricadute mettendo in atto un meccanismo di compensazione. Anche gli antagonisti dei recettori metabotropi sembrano però essere in grado di bloccare gli effetti comportamentali di cocaina, nicotina e alcol, così come antagonisti NMDA sembrano essere potenziali candidati per il trattamento della sindrome astinenziale da oppiacei, alcool e sedativi (48).

### *Sistema gabaergico*

Il GABA (acido gamma-aminobutirrico) è il neurotrasmettitore inibitorio più abbondante a livello del sistema nervoso centrale (circa il 35-40% delle sinapsi cerebrali dei mammiferi sono gabaergiche) e svolge un ruolo fondamentale nel controllo dell'eccitabilità neuronale; in particolare esso sembra in grado di modulare il rilascio di numerosi neurotrasmettitori, GABA incluso, ed è quindi essenziale per un corretto bilancio tra eccitazione e inibizione neuronale (60). Il GABA è diffuso, anche se in piccole concentrazioni, in tutte le parti del cervello e del midollo spinale, con l'eccezione di sostanza nera e ipotalamo dove è presente in alte concentrazioni. La sua biosintesi avviene esclusivamente nei neuroni a partire dall'acido S-glutammico, catalizzata dall'acido glutammico decarbossilasi e dipendente dal piridossal fosfato (vitamina B6). Il GABA agisce attraverso un discreto numero di sottotipi di recettori GABA che possono essere raggruppati schematicamente in due famiglie: recettori ionotropi (GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub>) e recettori metabotropi (GABA<sub>B</sub>).

I GABA<sub>A</sub> sono recettori-canale permeabili allo ione cloro: la risposta inibitoria indotta dal passaggio dello ione e dalla iperpolarizzazione di membrana che ne consegue può avvenire sia a livello pre-sinaptico, inibendo quindi il rilascio del neurotrasmettitore, che post-sinaptico, con conseguente inibizione della trasmissione (117). I recettori GABA<sub>C</sub> sono, come i GABA<sub>A</sub>, recettori ionotropi accoppiati a un canale al cloro. Attualmente, gli unici recettori GABA<sub>C</sub> con struttura molecolare nota sono localizzati nei neuroni della retina dove

potrebbero avere un ruolo nel controllo inibitorio delle risposte indotte dalla luce. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono l'esistenza di più sottotipi di recettori GABA<sub>C</sub>, ma le loro funzioni fisiologiche non sono ancora note (117).

I recettori GABA<sub>B</sub> sono recettori transmembrana accoppiati a proteine G di tipo inibitorio: l'attivazione di tali recettori determina una riduzione nei livelli di cAMP che si traduce in una riduzione dei livelli di fosforilazione ed inibizione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti implicati nel controllo pre-sinaptico del rilascio del neurotrasmettitore (14). Esistono due differenti sottopopolazioni del recettore GABA<sub>B</sub>, identificate come GABA<sub>B1</sub> e GABA<sub>B2</sub>, che sono espresse sia nel cervello sia in organi periferici.

Tutti sottotipi recettoriali sono localizzati in modo non uniforme a livello centrale: sono presenti soprattutto nella corteccia, nella substantia nigra, nell'ippocampo, nell'ipotalamo e nella ATV.

Promotori della trasmissione gabaergica agenti a vari livelli si sono dimostrati utili nel ridurre il "craving"; fra essi promotori del rilascio di GABA, come la gabapentina, o inibitori del reuptake del GABA, come la tiagabina, sembrano ridurre in maniera efficace l'astinenza da etanolo e cocaina. Ultimamente l'indagine si è focalizzata su agonisti o modulatori allosterici del solo recettore GABA<sub>B</sub>, che sembrano avere un ruolo più selettivo/specifico nel controllo dell'"addiction" (48).

### *Sistema serotoninergico*

La serotonina (5-idrossitriptamina) è considerata nel SNC un neurotrasmettitore modulatorio con effetti generali di tipo inibitorio. Essa è coinvolta in numerosi processi di tipo psicobiologico, tanto da poter affermare che "non esista un disturbo della sfera psichica nel quale non sia coinvolto, in modo più o meno esteso, il sistema serotoninergico" (72). Modificazioni nella trasmissione serotoninergica si verificano in caso di somministrazione acuta e cronica di numerosi farmaci di abuso; un aumento nel rilascio di serotonina è associato all'assunzione di numerose sostanze, fra cui gli oppiacei (103), e sembra essere

connesso con la sensazione di appagamento che essi determinano. Durante l'astinenza si ha, invece, una massiccia diminuzione della serotonina circolante, con conseguente facilitazione di comportamenti aggressivi, tipici della sindrome astinenziale. Lesioni al sistema serotoninergico portano, nell'animale da laboratorio, a comportamenti aggressivi e disinibiti, e alla perdita del controllo nei confronti di comportamenti vietati o puniti (54).

La serotonina interferisce in maniera massiva sul rilascio e l'effetto di altri neurotrasmettitori: nello specifico è in grado di regolare il rilascio di dopamina e di glutammato (105). Studi di microdialisi hanno dimostrato come sia il GABA che il glutammato hanno poi essi stessi un effetto modulatore nei confronti del rilascio di serotonina (102), realizzando quindi un circuito estremamente sensibile e variamente modulabile.

La co-somministrazione di inibitori selettivi del re-uptake della serotonina e di antagonisti selettivi del recettore 5-HT<sub>1A</sub> sembra essere un approccio terapeutico possibile per prevenire il "drug-seeking" e la ricaduta; un altro possibile tentativo è dato dalla somministrazione combinata di farmaci attivi contemporaneamente sui trasportatori serotoninergici e dopaminergici (72).

### *Sistema oppioide endogeno*

Il sistema oppioide endogeno si compone di un piccolo gruppo di peptidi, sintetizzati a partire da precursori, che si legano a tre specifici recettori accoppiati a proteina G, la  $\beta$ -endorfina (per il recettore  $\mu$ ), le encefaline (per il recettore  $\delta$ ) e la dinorfina (per il recettore  $\kappa$ ) e sono implicati principalmente nel controllo endogeno del dolore attraverso un meccanismo inibitorio di controllo delle sensazioni nocicettive che giungono al talamo. Tale sistema sembra avere un ruolo di primo piano non solo nella modulazione del rinforzo indotto da oppiacei, che per la loro analogia strutturale vanno a stimolare gli stessi recettori degli oppioidi endogeni, ma anche nella dipendenza da cocaina e da altre sostanze di abuso di natura non oppioide (111).

Risultati incoraggianti si sono ottenuti in clinica utilizzando antagonisti dei recettori degli oppioidi nel trattamento di alcolisti ed eroinomani (48).

Oltre a questi circuiti principali altri sembrano avere un ruolo nell' "addiction". Fra essi sicuramente non può mancare di citazione il sistema degli endocannabinoidi, gruppo di sostanze endogene prodotte all'interno di cellule neuronali a partire da precursori lipidici, non immagazzinati in vescicole e deputati al controllo di diverse funzioni, fra cui processi di apprendimento, memoria e analgesia. Per questa somiglianza funzionale con i peptidi oppiacei e per il fatto che agisca legandosi a tali recettori proprio la sostanza maggiormente abusata al mondo, la *cannabis*, numerosi studi stanno mettendo a fuoco la componente del sistema endocannabinoide sugli effetti motivazionali e sul rilascio di dopamina indotto da tutti i farmaci di abuso (82).

La tabella sottostante riassume il “**ciclo dell’addiction**”, con i fenomeni associati ad ogni stadio dell’azione della sostanza e i processi molecolari e cellulari correlati:

<b>Azione acuta della sostanza</b>	<b>Effetti a lungo termine</b>	<b>Astinenza a breve termine</b>	<b>Astinenza a lungo termine</b>
Rinforzo	Tolleranza Sensibilizzazione Dipendenza	Sindrome astinenziale	Craving Ricaduta
Aumento tono dopaminergico  Aumento tono serotoninergico	Adattamenti recettoriali  Aumento vie cAMP  Aumento trascrizione genica	Aumento tono glutammatergico  Aumento tono nor-adrenergico  Riduzione tono dopaminergico e serotoninergico	Rimodellamento sinaptico  Aumento rilascio glucocorticoidi (stress)  Meccanismi molecolari e cellulari ancora non conosciuti
Da minuti a ore	Da giorni ad anni	Da ore a giorni	Da giorni a anni

*(Nestler EJ, Aghajanian GK Science 1997)*

## OBIETTIVI GENERALI DEL PROGETTO DI RICERCA

Nell'impossibilità di prendere in considerazione la totalità delle interazioni che concorrono all'instaurarsi e al mantenimento della dipendenza, nel corso del mio Dottorato lo studio si è concentrato nella valutazione del ruolo esercitato dalle vie **glutammatergiche** e **gabaergiche** nella modulazione degli effetti motivazionali di MORFINA (MOR) e AMFETAMINA (AMF), allo scopo di ricercare farmaci utili nella cura del tossicodipendente e, nello specifico, sostanze che possano agire sulle modificazioni indotte dal contatto ripetuto con la sostanza abusata, piuttosto che sui sintomi collegati alla crisi astinenziale.

Per fare questo ci siamo avvalsi di metodiche di farmacologia comportamentale nel ratto, analizzando gli effetti prodotti da 2 diversi farmaci: il baclofen (BCF), agonista dei recettori GABA<sub>B</sub> e la D-cicloserina (DCS), agonista parziale al sito della glicina del recettore NMDA. Nello specifico sono stati analizzati gli effetti prodotti dal trattamento combinato del farmaco con la sostanza di abuso, per meglio chiarire i neuroadattamenti che portano all'instaurarsi della dipendenza e al suo mantenimento, e gli effetti dati dal trattamento ripetuto con il solo farmaco in soggetti astinenti, per valutarne, in maniera pre-clinica, il possibile impiego terapeutico nel trattamento delle tossicodipendenze.

I modelli comportamentali utilizzati sono stati:

- la SENSIBILIZZAZIONE LOCOMOTORIA
- la "DRUG DISCRIMINATION"

- **MODELLI COMPORTAMENTALI**

*Il modello della sensibilizzazione locomotoria*

Con il termine sensibilizzazione comportamentale (o tolleranza inversa) ci si riferisce al fenomeno che comporta un progressivo aumento della risposta comportamentale del soggetto alla sostanza in seguito a somministrazione ripetuta e intermittente della stessa (100). Sono numerosi i meccanismi responsabili dell'instaurarsi della sensibilizzazione e le modificazioni funzionali possono attuarsi a diversi livelli: cambiamenti nella disponibilità e nella sensibilità recettoriale, nella sintesi e degradazione dei trasmettitori, nei meccanismi sinaptici che controllano l'eccitazione neuronale e il rilascio del trasmettitore (80).

Il circuito maggiormente coinvolto nella sensibilizzazione è quello che fa capo al sistema mesolimbico dopaminergico e allo striato. Dato che questo sistema sembra presiedere a numerose attività, quali la locomozione di avvicinamento ad un obiettivo, l'aumentata l'efficacia di stimoli di rinforzo positivo nonché la gratificazione indotta da stimoli naturali, una sensibilizzazione di tale sistema può aumentare la risposta verso tutti gli agenti che vadano a stimolare o ad agire tramite tale sistema. Da qui la possibilità di osservare una sensibilizzazione crociata fra farmaci, per esempio fra amfetamina e morfina, o il fatto che stimoli ambientali possano venire associati ad un farmaco e promuovere una sensibilizzazione ambiente-specifica, cioè sotto controllo dello stimolo ambientale dato dal contesto in cui il farmaco è stato sperimentato. Probabilmente, sempre per la stessa ragione, anche agenti stressanti possono dare sensibilizzazione ad un farmaco se associati alla sua sperimentazione (80).

Ci sono due principali classi di effetti che vanno incontro a sensibilizzazione: effetti eccito-motori ed effetti incentivo-motivazionali (86). Per quanto riguarda questi ultimi è stato recentemente dimostrato che le sostanze di abuso più comuni producono, quando somministrate in maniera intermittente, sensibilizzazione agli

effetti di ricompensa. Un pre-trattamento con amfetamina, cocaina o morfina, aumenta le proprietà di rinforzo positivo proprie di tali farmaci misurate mediante un test di *conditioned place preference* (70). Proprio la modalità di somministrazione sembra essere essenziale nell'instaurarsi di una sensibilizzazione: normalmente basse dosi di farmaco somministrato in maniera intermittente e generalmente per via sistemica danno sensibilizzazione, dosi più alte somministrate in maniera continua danno tolleranza ai medesimi effetti (80). Il motivo sembra da ricercarsi nel fatto che una somministrazione continua determina una rapida deplezione dei depositi di catecolamine a seguito di un meccanismo di tachifilassi, una sorta di autodifesa che l'organismo mette in atto nei confronti di una eccessiva sovrastimolazione, e questo sembra impedire l'instaurarsi della sensibilizzazione (73).

La sensibilizzazione locomotoria determina un aumento della motilità osservabile negli animali dopo un contatto ripetuto con il farmaco. Essa costituisce un buon modello sperimentale di "craving" (desiderio smodato della sostanza abusata). Il possibile collegamento fra sensibilizzazione e dipendenza è stato elaborato da Robinson e Berridge che hanno ipotizzato come l'uso ripetuto ed intermittente di una sostanza possa determinare l'attribuzione di una "salienza" agli stimoli associati ad essa, responsabile del desiderio patologico di assumerla nuovamente. Tale desiderio è attivato implicitamente e spinge la persona, o l'animale da laboratorio, a ricercare la sostanza senza che esso ne abbia un reale bisogno, e ad una assunzione compulsiva del farmaco slegata dai suoi reali effetti gratificanti (86). Questo desiderio può essere paragonato ad una memoria implicita che influenza il comportamento del soggetto senza che esso ne sia pienamente consapevole. Sebbene la sensibilizzazione locomotoria non possa considerarsi equivalente al "craving", numerosi studi indicano che entrambi i fenomeni coinvolgono gli stessi circuiti neuronali (nello specifico il sistema mesolimbico dopaminergico e le sue proiezioni al NA e ai centri motori) determinando un aumento degli stessi neurotrasmettitori, in particolare di DA e glutammato, e che lo stesso farmaco è normalmente responsabile dell'insorgenza di entrambi. In

accordo con la teoria di Wise e Bozart gli effetti stimolanti la motilità sarebbero predittivi delle potenzialità di abuso di una sostanza, grazie alle strette analogie esistenti fra effetti rinforzanti ed effetti attivanti motori (123). Ad ulteriore riprova della specularità dei 2 fenomeni c'è la permanenza dell'evento di sensibilizzazione: esso si instaura in tempi relativamente brevi e, così come il "craving", può permanere anche per un lungo periodo dopo la sospensione del contatto con il farmaco, in particolare anche dopo che altri effetti sono andati incontro a tolleranza (85). Il modello della sensibilizzazione motoria appare quindi fra i migliori allo scopo di indagare l'efficacia o meno di un trattamento nell'annullare alcuni fra gli effetti di una sostanza.

Il fenomeno della sensibilizzazione può essere distinto in due diversi domini temporali: l'*induzione* e l'*espressione* (62).

L'induzione della sensibilizzazione viene definita operativamente come la sequenza di eventi cellulari dovuta alla somministrazione del farmaco e responsabile di cambiamenti transitori nel circuito neuronale e nella sua funzione (109). La ATV è il sito criticamente coinvolto nell'induzione della sensibilizzazione sia da psicostimolanti che da oppiacei, la CPF sembra essere coinvolta chiaramente nella induzione della sensibilizzazione da cocaina, anche se con funzioni prevalentemente modulatorie, mentre il suo ruolo nella induzione della sensibilizzazione da amfetamina e morfina non è ancora ben chiarito (109).

La fase di espressione della sensibilizzazione comportamentale si manifesta con un'alterazione neuronale duratura derivante dal processo di induzione e rilevabile in un aumento della risposta dovuto ad un nuovo contatto con il farmaco dopo un breve o lungo periodo di sospensione dal trattamento cronico. Analizzando i fenomeni che accompagnano l'espressione della sensibilizzazione i ricercatori si sono resi conto delle diversità esistenti tra le misurazioni effettuate a breve termine (pochi giorni dalla sospensione del trattamento cronico) rispetto a quelle effettuate a lungo termine (settimane o mesi dalla sospensione del trattamento). Per quanto riguarda i neuroadattamenti precoci le notizie a disposizione sono ancora piuttosto scarse, in quanto si tratta di modificazioni temporalmente non

ben definite, cambiamenti che rappresentano di fatto un veicolo fra l'induzione e l'espressione di effetti tardivi. Maggiori sono le conoscenze sui neuroadattamenti che si instaurano nella fase tardiva dell'espressione: in particolare è possibile rilevare un aumento dell'attività dei neuroni dopaminergici nel mesencefalo, soprattutto nell'ATV e nella sostanza nigra compatta (o sostanza del Sommering, centro della via extrapiramidale che svolge un'attività stabilizzante sui movimenti volontari assicurando il mantenimento del tono muscolare), che si riflette in una maggiore stimolazione dopaminergica a livello dei gangli della base. Il NA sembra svolgere un ruolo critico nell'espressione della sensibilizzazione (116).

In generale, oltre al ruolo centrale svolto dalla dopamina (81), l'evento di sensibilizzazione è caratterizzato da numerosi cambiamenti nella trasmissione glutammatergica (106) e in particolare si registra un aumento della trasmissione glutammatergica nella ATV (59) e nel NA (84). E' riscontrabile inoltre una variazione nell'espressione dei tipi di recettori per il glutammato e dei tipi di subunità che li compongono (18).

Molte ricerche si sono focalizzate sulla caratterizzazione della sensibilizzazione locomotoria nei roditori, tuttavia numerosi studi suggeriscono che la sensibilizzazione comportamentale può essere indotta anche nell'uomo (8).

#### *Il modello della drug discrimination*

Una caratteristica comune a tutte le sostanze d'abuso è la loro capacità di indurre effetti soggettivi, che si differenziano da ogni altro effetto prodotto da un farmaco in quanto di natura maggiormente introspettiva, non quantificabile mediante la misurazione di parametri fisiologici. Tali effetti, di fatto, sono la somma delle complesse sensazioni (sia piacevoli che spiacevoli) indotte nell'individuo dal contatto con il farmaco. L'interesse nei loro confronti è legato principalmente al fatto che essi sembrano essere fra i responsabili delle potenzialità di abuso delle sostanze e che possono, quindi, giocare un ruolo fondamentale nella dipendenza e nella ricaduta, in quanto sono proprio tali effetti quelli maggiormente ricercati dal tossicodipendente (51).

Esiste una stretta analogia fra gli effetti soggettivi percepiti dall'uomo e gli stimoli discriminativi indotti nell'animale da laboratorio. Per stimolo discriminativo si intende uno stimolo in presenza del quale, e solo in presenza del quale, la risposta emessa da un soggetto viene rinforzata. Possono funzionare a tale scopo stimoli di tipo esteroceettivo, come una luce o un suono, o anche farmaci. In laboratorio è possibile creare situazioni in cui un certo tipo di comportamento nell'animale è rinforzato in presenza del farmaco, e un secondo tipo di comportamento è rinforzato in sua assenza. In altre parole l'esecuzione di un particolare compito discrimina la presenza o l'assenza di un farmaco sulla base del manifestarsi degli effetti soggettivi indotti dalla sostanza: le modifiche dello stato interno prodotte da un farmaco vengono infatti riconosciute dall'animale e utilizzate come stimolo per guidare un certo tipo di risposta comportamentale. Per questo motivo possiamo dire che la "drug discrimination" risulta la procedura più utilizzata per la comprensione degli effetti soggettivi delle sostanze di abuso.

Le strategie utilizzate per gli esperimenti di discriminazione presentano una notevole variabilità; gli apparati sperimentali e le procedure generali di allenamento differiscono a seconda dell'animale scelto come soggetto dell'esperimento. Si utilizzano molto spesso ratti, ma vengono utilizzate anche scimmie (20), topi, spesso geneticamente modificati (93), e piccioni (68).

Per l'allenamento viene utilizzata in genere una dose fissa di farmaco e un appropriato veicolo; i rinforzi possono essere di "tipo positivo" (presentazione di uno stimolo piacevole come la stimolazione celebrale, la somministrazione di cibo o acqua ad animali affamati o assetati), o di "tipo negativo" (l'interruzione di uno shock elettrico ecc.).

Per la frequenza dell'erogazione del rinforzo esistono schedule a rinforzi continui, a intervalli fissi, a intervalli variabili, ma la più usata è la schedula fissa "fixed ratio" (F.R.), secondo la quale è richiesto al soggetto di compiere una determinata azione per un numero fissato di volte prima di ricevere una ricompensa.

Una volta che l'animale, dopo ripetuta esposizione allo stimolo, ha associato un certo tipo di comportamento con la presenza del farmaco e un altro tipo di comportamento in sua assenza, si può dire che il soggetto è in grado di discriminare. Per dimostrare con esattezza l'effettivo apprendimento di una discriminazione vengono fissati dei criteri a priori, che l'animale deve raggiungere in numerose sessioni di allenamento consecutive.

Il raggiungimento di una discriminazione stabile permette poi il passaggio alle prove cosiddette di generalizzazione. Durante queste sessioni, entrambi i modelli operativi vengono rinforzati e vengono imposte condizioni farmacologiche diverse da quelle dell'allenamento (come per esempio dosi diverse dello stesso farmaco o altri farmaci). Questi test possono dare diversi tipi di risultati: le nuove condizioni farmacologiche possono provocare una risposta sostanzialmente indistinguibile, o molto simile, a quella provocata dal farmaco di allenamento: in questo caso si parla di generalizzazione. In altri casi, le nuove condizioni farmacologiche provocano una risposta simile a quella provocata dalla assenza del farmaco di allenamento: un tale risultato è interpretato come una mancanza di generalizzazione.

Una proprietà caratteristica della procedura di discriminazione è un'elevata specificità farmacologica. Si ha infatti generalizzazione di solito tra sostanze appartenenti alla stessa classe, e che quindi inducono effetti farmacologici simili nell'animale, mentre è più difficile osservarla utilizzando farmaci di classi diverse. In relazione a tale elevata specificità alcuni autori hanno classificato molti farmaci basandosi proprio sulle loro proprietà discriminative.

La potenzialità di funzionare come stimolo discriminativo sembra essere una caratteristica comune dei farmaci psicoattivi. Sostanze appartenenti a una larga varietà di classi farmacologiche, tra cui gli antidepressivi, gli stimolanti del sistema nervoso centrale, gli allucinogeni, i sedativi-ipnotici e gli oppiacei, sono in grado di funzionare, in particolari condizioni, da stimolo discriminativo (101). E' importante sottolineare come, anche nel caso della discriminazione, si possa fare riferimento ad una fase di *induzione* delle proprietà discriminative, che

coincide con la fase di allenamento, ed una di *espressione* delle stesse, che si osserva durante la prova test.

## **CAP.1: MODULAZIONE GABAERGICA DELLA SENSIBILIZZAZIONE LOCOMOTORIA INDOTTA DA AMFETAMINA E MORFINA**

### Introduzione

#### *Amfetamine*

Le amfetamine sono farmaci appartenenti alla classe degli psicostimolanti, a cui appartengono varie sostanze che si differenziano per caratteristiche chimiche ma che presentano proprietà farmaco-dinamiche sostanzialmente analoghe. Sono tutte sostanze capaci di stimolare il SNC e di esercitare azioni di tipo simpaticomimetico.

Il sito molecolare d'azione di farmaci amfetamino-simili corrisponde al trasportatore delle monoamine (dopamina, serotonina, nor-adrenalina) ed in particolare al trasportatore della DA. Quest'ultima sembra avere un ruolo centrale nella mediazione di entrambe le proprietà caratteristiche degli psicostimolanti: l'aumento dell'attività motoria e il rinforzo (116). A livello mesolimbico l'amfetamina agisce come falso substrato legandosi al trasportatore della DA, viene così trasportata all'interno del citoplasma con un meccanismo di antiporto che promuove la fuoriuscita di DA nello spazio extracellulare.

L'amfetamina è in grado di promuovere la sensibilizzazione agli effetti eccito-motori a causa dei neuroadattamenti che la sua somministrazione determina a livello del mesolimbo e dello striato. Quando viene somministrata cronicamente si registra un aumento marcato e prolungato dei livelli extracellulari di DA determinato da diversi fattori: un aumento della esocitosi di neurotrasmettitore calcio-calmodulina dipendente, un incremento nella densità e nella cinetica d'azione del trasportatore della dopamina, una diminuzione della sensibilità degli autorecettori D2 situati sul neurone dopaminergico, con conseguente aumento nel rilascio di dopamina a seguito di un meccanismo di compensazione, una modificazione nella funzionalità dell'enzima tiroxina idrossilasi, con conseguente promozione della sintesi di neurotrasmettitore. Risultati sperimentali evidenziano come non vi siano alterazioni nella densità recettoriale imputabili alla somministrazione ripetuta di amfetamina,

tuttavia la stimolazione dei recettori di tipo D1 si traduce in un aumento sensibile della cascata di trasduzione del segnale attraverso un sistema di secondi messaggeri che porta poi all'espressione di geni precoci e neurotrofine che determinano l'aumento della trascrizione e conseguentemente della sintesi di subunità recettoriali, trasportatori, un incremento del numero delle spine dendritiche e delle sinapsi. Questo determina modificazioni permanenti nella rete neuronale e questi neuroadattamenti sono alla base, non solo del manifestarsi della sensibilizzazione motoria alla sostanza, ma anche della dipendenza fisica e psicologica indotta da essa.

### *Morfina*

La morfina appartiene alla famiglia degli oppiacei, composti terapeuticamente utilizzati contro il dolore, con un ruolo influente anche sull'emotività e sul comportamento. Essa agisce superando la barriera emato-encefalica e legandosi ai recettori  $\mu$  che sono localizzati sia centralmente, sia a livello nigro-striatale. Fra essi il sottotipo  $\mu_1$  controlla le azioni farmacologiche come l'analgesia, mentre il sottotipo  $\mu_2$  controlla gli effetti collaterali come la depressione respiratoria. La proteina  $G_i$  associata a tali recettori agisce inibendo l'adenilato ciclasi e controllando direttamente un canale ionico, che può essere permeabile al  $K^+$  o al  $Ca^{2+}$ . Aumentando la corrente al primo ione e diminuendo invece quella del secondo, si ha iperpolarizzazione delle cellule nervose ed inibizione pre-sinaptica del rilascio di neurotrasmettitore (78). Questa azione, nell'area striatale comporta una variazione dell'attività locomotoria, nell'area mesolimbica una variazione del tono dell'umore. La capacità della morfina di provocare euforia, felicità e diffuso senso di benessere la rende in grado di funzionare come rinforzatore positivo.

L'assunzione ripetuta di morfina porta a fenomeni di tolleranza, dipendenza e, in seguito alla sospensione della somministrazione, a sindrome di astinenza, dovuta principalmente alla riduzione compensatoria della produzione endogena di endorfine (110). Il circuito dopaminergico mesolimbico è quello maggiormente coinvolto in tali effetti poiché la morfina, legandosi al proprio recettore localizzato sugli interneuroni GABAergici determina diminuzione del rilascio di GABA nella ATV e

conseguentemente un aumento della stimolazione dopaminergica (50). Recenti studi hanno evidenziato come nelle scimmie ad una somministrazione acuta di morfina, faccia seguito una rapida “down-regulation” del trasportatore della dopamina nello striato, con conseguente accumulo del neurotrasmettitore nello spazio extracellulare (127). A questi meccanismi fanno seguito variazioni nell’espressione genica di alcuni trasportatori, come il GRK2, dei recettori per la dopamina, dei recettori NMDA, GABA<sub>A</sub> e alfa2, tutti variamente implicati nel controllo della plasticità sinaptica. Dosi medie o alte di morfina, somministrate per via sistemica, provocano una iniziale depressione comportamentale, seguita da un aumento dell’attività locomotoria. Iniezioni ripetute tendono ad indurre prevalentemente attivazione comportamentale. La sensibilizzazione agli effetti eccito-motori indotti dalla morfina avviene principalmente a seguito dell’aumento della trasmissione dopaminergica che si registra nella ATV ma sembra essere coinvolto anche il glutammato. Nello specifico in ratti morfino-dipendenti è presente una alterazione nell’espressione delle subunità del recettore NMDA, in particolar modo nel NA, mentre sembra esserci una soppressione del rilascio di glutammato in CPF e NA (100).

### *Baclofen*

Dal momento che i neuroni a trasmissione gabaergica sono largamente diffusi a livello mesolimbico e che è stato ampiamente dimostrato il ruolo inibitorio svolto da agonisti gabaergici sul rilascio di dopamina e di altri neurotrasmettitori (6), i nostri studi si sono indirizzati verso un agonista del recettore GABA<sub>B</sub>, il baclofen ( $\beta$ -p-clorofenil-GABA).

Il baclofen è un farmaco altamente lipofilo, quindi in grado di passare la barriera emato-encefalica; è un attivo miorilassante utilizzato per il trattamento della spasticità muscolare anche in virtù della sua capacità di ridurre il dolore, probabilmente inibendo il rilascio di sostanza P a livello del midollo spinale.

Il baclofen si sembra poter essere efficace nel trattamento dell’ abuso di alcol, nicotina e cocaina nell’uomo, come evidenziato da studi clinici condotti su consumatori abituali, e sembra avere la capacità di ridurre gli effetti rinforzanti di

diverse sostanze di abuso in modelli animali, come dimostrato in diversi esperimenti di auto-stimolazione intracranica, autosomministrazione e place preference (24).

### Scopo dell'esperimento

- valutare gli effetti del BCF sulla motilità spontanea e sulla iperattività indotta dalla AMF dopo somministrazione singola, alla dose scelta in base alla letteratura e utilizzata negli esperimenti successivi (**esperimento preliminare**).
- valutare l'effetto di una co-somministrazione di BCF sull'induzione (**esperimento 1A**) e l'espressione (**esperimento 1B**) della sensibilizzazione agli effetti eccito-motori indotti da amfetamina.
- valutare se un trattamento ripetuto con BCF sia in grado di desensibilizzare animali precedentemente sensibilizzati alla AMF (**esperimento 2A**) o prevenire l'instaurarsi di una sensibilizzazione (**esperimento 2B**).
- valutare se un trattamento ripetuto con BCF sia in grado di desensibilizzare animali precedentemente sensibilizzati alla MOR (**esperimento 3A**) o prevenire l'instaurarsi di una sensibilizzazione (**esperimento 3B**).

### Materiali e metodi

#### *Animali*

Per la sperimentazione sono stati utilizzati ratti maschi Sprague-Dawley del peso variabile tra i 275 e i 300 gr. all'inizio della fase sperimentale. Gli animali sono stati stabulati in gabbie metalliche a gruppi di due o tre, con cibo ed acqua continuamente disponibili. Le condizioni di illuminazione prevedevano 12 ore di luce, dalle 07:00

alle 19:00, alternate a 12 ore di buio. Le condizioni di umidità e temperatura erano mantenute costanti (60% U.R. e 22°C).

#### *Farmaci*

d-amfetamina solfato,

baclofen,

morfina cloridrato

somministrati i.p. dopo dissoluzione in soluzione fisiologica (FIS) (NaCl 0,9%).

Le dosi riportate sono sempre espresse in mg/kg.

#### *Apparato*

Per la registrazione della motilità sono stati utilizzati cinque actografi a gabbia oscillante. La struttura consiste di una gabbia metallica cilindrica, sospesa ad una molla, dentro la quale viene collocato l'animale. Le oscillazioni che esso provoca alla gabbia vengono registrate tramite due diverse procedure che permettono di avere una visione sia qualitativa che quantitativa dei movimenti dell'animale.



La presenza di una penna ad inchiostro scrivente su chimografo fornisce un disegno qualitativo della motilità del ratto, mentre un sistema di fotocellule fisso, che registra gli spostamenti di un pettine sostenuto da un'asta di metallo sincrona con i movimenti della penna, fornisce una registrazione quantitativa dell'attività motoria. Un contatore elettromeccanico stampante totalizza gli impulsi.

Poiché la gabbia viene tarata ogni volta sul peso dell'animale mediante una vite di regolazione che agisce su di una balestra, l'escursione della molla è sempre la stessa, per uno spostamento di pari ampiezza, qualunque sia il peso del ratto.

Per tutta la durata dell'esperimento nella gabbia sono presenti cibo ed acqua che permettono all'animale una permanenza prolungata nell'apparato.

Prima dell'immissione nella gabbia le apparecchiature vengono appositamente tarate con il peso del ratto che le occuperà, successivamente gli animali vengono posti nelle gabbie actografiche per 1 ora di ambientamento senza alcun trattamento farmacologico. E' noto, infatti, che la motilità del ratto, posto in un ambiente sconosciuto, si presenta elevata per un periodo che va dai 30 ai 40 minuti, per poi seguire un andamento decrescente fino a mantenersi costante per varie ore. Questo tipo di fenomeno è in stretto rapporto con il comportamento esplorativo messo in atto dall'animale nei confronti di un ambiente nuovo.

Poiché l'attività locomotoria varia in rapporto alle ore del giorno e a seconda delle condizioni di illuminazione, la prova è stata eseguita durante le ore diurne, quando l'attività è minore, ma in condizioni di buio, allo scopo di ottenere una motilità di base che renda possibile mettere in evidenza gli effetti indotti dal trattamento, siano essi stimolanti o depressivi.

Al termine dell'ora di ambientamento gli animali ricevono il trattamento farmacologico e vengono posti nuovamente nelle gabbie sperimentali al fine di registrarne l'attività per un tempo variabile a seconda della sostanza utilizzata.

## Risultati

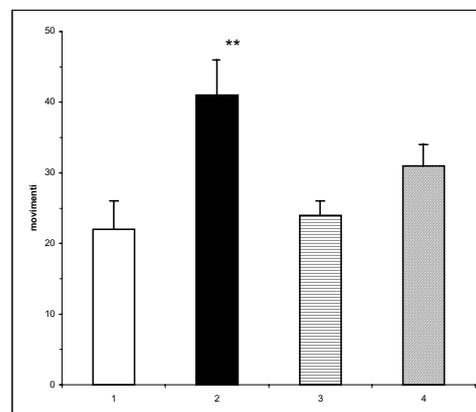
### Esperimento preliminare

Per questo esperimento sono stati utilizzati 28 animali suddivisi in 4 gruppi da 7 ratti ciascuno e trattati, una sola volta, secondo il seguente schema:

Gruppo	Trattamento
1	FIS
2	AMF
3	BCF
4	BCF + AMF

AMF alla dose di 1,5; BCF alla dose di 2.

Dopo il trattamento gli animali sono stati posti immediatamente nelle gabbie actografiche ed ha avuto inizio la registrazione dei movimenti per 1h. I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante un'analisi della varianza ad una via seguita dal test *t* di Dunnett per verificare le differenze dal controllo e riportati in **figura 1**.



**Figura 1:** effetto della co-somministrazione di BCF e AMF sull'attività motoria del ratto. I valori rappresentano la media di 7 animali  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo 1: \*\* $P < 0,01$ .

L'ANOVA rivela una differenza significativa nell'attività motoria degli animali sottoposti ai diversi trattamenti ( $F=7,09$ ; g.l. 3/23;  $P < 0,01$ ). Nello specifico il test *t* di

Dunnett indica che è presente una attività locomotoria massima negli animali trattati acutamente con AMF rispetto a quelli trattati con FIS (controllo)( $t=4,22$ ; g.l. 23;  $P<0,01$ ), mentre non differiscono da quelli di controllo gli animali trattati con il BCF da solo ( $t=0,26$ ; g.l.23; N.S.) o associato alla AMF ( $t=1,31$ ; g.l. 23; N.S.).

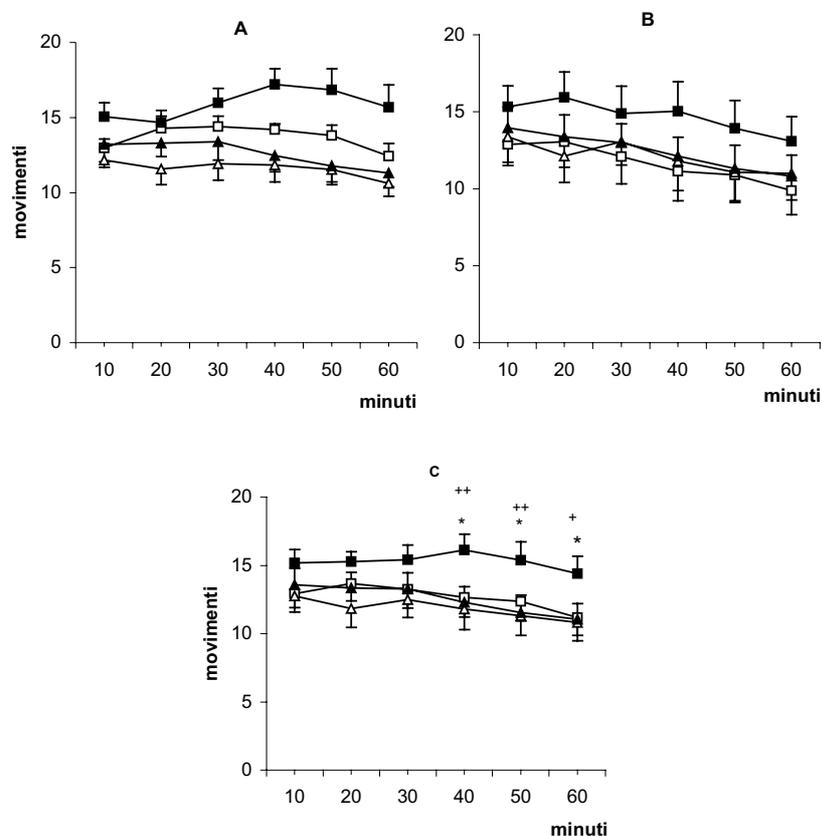
**Esperimento 1A: effetto di una co-somministrazione di baclofen sull' induzione della sensibilizzazione alla amfetamina.**

Per questo esperimento sono stati utilizzati 32 animali suddivisi in 4 gruppi da 8 ratti ciascuno. Ogni gruppo ha ricevuto il trattamento riportato nello schema:

<b>Gruppo</b>	<b>1-10gg</b>	<b>11-12gg</b>	<b>13g</b>	<b>14-42gg</b>	<b>43g</b>
<b>1</b> □	FIS+FIS	-	AMF	-	AMF
<b>2</b> ■	FIS+AMF	-	AMF	-	AMF
<b>3</b> △	BCF+FIS	-	AMF	-	AMF
<b>4</b> ▲	BCF+AMF	-	AMF	-	AMF

AMF alla dose di 1,5; BCF alla dose di 2

I dati, forniti ogni 10 minuti per il totale di 1h, sono stati analizzati mediante un'analisi della varianza a 4 fattori (BCF, AMF, test e tempi) con misure ripetute sul fattore tempi e successivi confronti singoli effettuati con il test di Bonferroni. I risultati dell'esperimento sono riportati in **figura 2**.



**Figura 2:** effetto della co-somministrazione di BCF sull'acquisizione della sensibilizzazione alla AMF. Gli animali ricevono AMF (0,75) a 3 giorni (grafico A) e 30 giorni (grafico B) dalla sospensione dei trattamenti cronici; media dei dati relativi alle due prove (grafico C). I valori rappresentano la media di 8 valori  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo 1 (FIS+FIS): \* $P < 0,05$ ; statisticamente differente dal gruppo 4 (BCF+AMF): + $P < 0,05$  - ++ $P < 0,01$ .

L'ANOVA mostra un effetto significativo del BCF ( $F=4,59$ ; g.l. 1/56;  $P < 0,05$ ) dell'AMF ( $F=3,87$ ; g.l. 1/56;  $P < 0,05$ ) e dei tempi ( $F=20,03$ ; g.l. 5/280;  $P < 0,01$ ), ma non una differenza significativa fra i due test ( $F < 1$ ). E' significativa l'interazione

“BCF x AMF x tempi” (F=3,39; g.l. 5/280; P<0,01) ma non quella “BCF x AMF x tempi x test”( F<1). Per questo le successive analisi sono state effettuate sulla media dei due test nei singoli intervalli di tempo. Esse hanno evidenziato l’esistenza di una **sensibilizzazione** negli animali trattati cronicamente con AMF rispetto a quelli trattati con FIS, evidente a partire dalla seconda mezz’ora di registrazione (“10min”F=3,23; g.l 1/336; NS; “20min”F=1,68; g.l 1/336; NS; “30min”F=3,00; g.l 1/336; NS; “40min”F=7,63, g.l 1/336; P<0,0,5; “50min”F=5,79, g.l 1/336; P<0,05; “60min”F=6,50; g.l 1/336; P<0,05). La somministrazione di BCF associato alla AMF determina il **blocco dell’induzione** di tale sensibilizzazione, dal momento che questi animali presentano una motilità significativamente ridotta rispetto a quelli trattati cronicamente con la sola AMF (“40min”F=11,74; g.l 1/336; P<0,01; “50min”F=9,25; g.l 1/336; P<0,01; “60min”F=6,97; g.l 1/336; P<0,05). Il trattamento cronico con BCF da solo non ha invece alcun effetto sull’attività motoria indotta dalla AMF somministrata acutamente (F<1 per tutti i tempi).

**Esperimento 1B: effetto di una co-somministrazione di baclofen sull’espressione della sensibilizzazione alla amfetamina.**

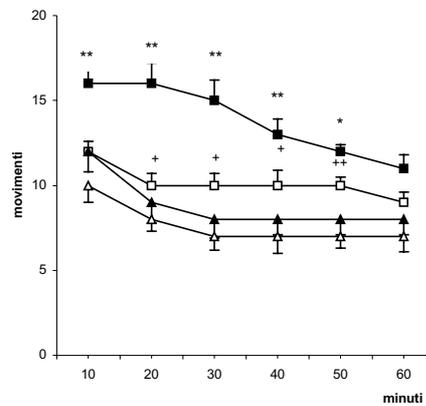
Per questo primo esperimento sono stati utilizzati 33 animali suddivisi in 4 gruppi da 8-9 ratti ciascuno. Ogni gruppo ha ricevuto i trattamenti riportati nello schema:

Gruppo	1-10gg	11-29gg	30g
1 □	FIS	-	FIS+AMF(0,75)
2 Δ	FIS	-	BCF+AMF(0,75)
3 ■	AMF(1,5)	-	FIS+AMF(0,75)
4 ▲	AMF(1,5)	-	BCF+AMF(0,75)

BCF alla dose di 2.

I dati, forniti ogni 10 minuti per il totale di 1h, sono stati analizzati mediante un’analisi della varianza a 3 fattori (AMF, BCF e tempi) con misure ripetute sul

fattore tempi e successivi confronti singoli effettuati con il test F. I risultati dell'esperimento sono riportati in **figura 3**.



**Figura 3:** effetto del BCF sull'espressione della sensibilizzazione alla AMF. I valori rappresentano la media di 8-9 valori  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo 4 (AMF/BCF+AMF): \* $P < 0,05$  - \*\* $P < 0,01$ ; statisticamente differente dal gruppo 2 (FIS/BCF+AMF): + $P < 0,05$  - ++ $P < 0,01$ .

L'ANOVA mostra un effetto del trattamento cronico con AMF ( $F=10,18$ ; g.l. 1/24;  $P < 0,01$ ), indice dell'avvenuta **sensibilizzazione**, del trattamento con BCF associato ad AMF effettuato prima della prova ( $F=21,65$ ; g.l. 1/24;  $P < 0,01$ ) e una significativa differenza fra i tempi ( $F=31,83$ ; g.l. 5/120;  $P < 0,001$ ). E' significativa anche l'interazione "AMF x BCF x tempi" ( $F=3,47$ ; g.l. 5/120;  $P < 0,01$ ). L'analisi effettuata sui singoli intervalli di tempo indica che durante i primi 10 minuti la somministrazione di BCF associato ad AMF **riduce** significativamente **la motilità negli animali sensibilizzati** ( $F=11,52$ ; g.l. 1/144;  $P < 0,01$ ) ma non in quelli non sensibilizzati ( $F=2,98$ ; g.l. 1/144; NS). Per gli intervalli di tempo successivi il BCF riduce la risposta motoria all'AMF sia negli animali sensibilizzati che in quelli non sensibilizzati ("20min":  $F=28,04$ ; g.l. 1/144;  $P < 0,01$  - "30min":  $F=23,11$ ; g.l. 1/144;  $P < 0,051$  - "40min":  $F=12,31$ ; g.l. 1/144;  $P < 0,01$  - "50min":  $F=6,74$ ; g.l. 1/144;  $P < 0,05$  - "60min":  $F=3,68$ ; g.l. 1/144; NS), ma l'effetto è superiore nei sensibilizzati.

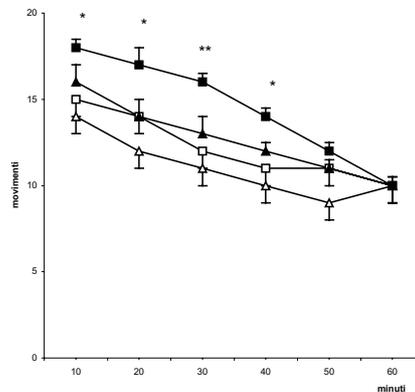
**Esperimento 2A: effetto di un trattamento cronico con baclofen in animali sensibilizzati alla amfetamina.**

Questo esperimento è il proseguimento di quello precedente: sono stati utilizzati gli stessi animali e ogni gruppo ha ricevuto i trattamenti riportati in grassetto nello schema:

Gruppo	1-10gg	11-29gg	30g	31-45gg	46-55gg	56-74gg	75g
1 □	FIS	-	FIS+AMF(0,75)	-	<b>FIS</b>	-	<b>AMF(0,75)</b>
2 Δ	FIS	-	BCF+AMF(0,75)	-	<b>BCF</b>	-	<b>AMF(0,75)</b>
3 ■	AMF(1,5)	-	FIS+AMF(0,75)	-	<b>FIS</b>	-	<b>AMF(0,75)</b>
4 ▲	AMF(1,5)	-	BCF+AMF(0,75)	-	<b>BCF</b>	-	<b>AMF(0,75)</b>

BCF alla dose di 2.

I dati dell'esperimento, forniti ogni 10 minuti per il totale di 1h, sono stati analizzati mediante un'analisi della varianza a 3 fattori (AMF, BCF e tempi) con misure ripetute sul fattore tempi e riportati in **figura 4**.



**Figura 4:** effetto di un trattamento ripetuto con BCF sull'espressione della sensibilizzazione alla AMF. I valori rappresentano la media di 8-9 valori  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo 4 (AMF/BCF): \* $P < 0,05$  - \*\* $P < 0,01$ .

L'ANOVA mostra un effetto significativo dell'AMF ( $F=6,95$ ; g.l. 1/29;  $P < 0,01$ ) e del BCF ( $F=4,14$ ; g.l. 1/29;  $P < 0,05$ ). E' significativa l'interazione "AMF x BCF x

tempi ( $F=2,19$ ; g.l. 5/145;  $P<0,05$ ). L'analisi effettuata sui singoli intervalli di tempo ha evidenziato che il trattamento cronico con BCF determina il **blocco dell'espressione** della sensibilizzazione negli animali sensibilizzati ("10min" $F=5,42$ ; g.l. 1/174;  $P<0,05$ ; "20min" $F=4,22$ ; g.l. 1/174;  $P<0,05$ ; "30min" $F=10,71$ ; g.l. 1/174;  $P<0,01$ ; "40min" $F=4,75$ ; g.l. 1/174;  $P<0,05$ ) mentre non ha alcun effetto sull'attività motoria indotta dalla AMF somministrata acutamente ( $F<1$  per tutti i tempi).

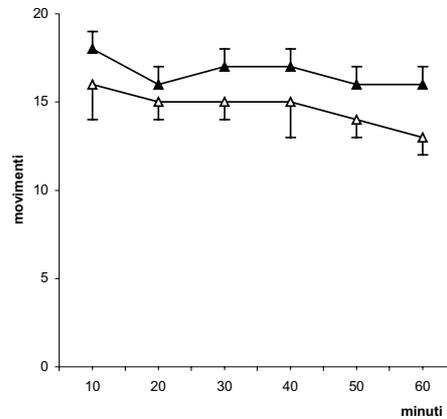
**Esperimento 2B: effetto di un trattamento cronico con baclofen sulla successiva induzione della sensibilizzazione alla amfetamina.**

Per questo esperimento sono stati utilizzati 20 animali suddivisi in 2 gruppi da 10 ratti ciascuno. Ogni gruppo ha ricevuto i trattamenti riportati nello schema:

Gruppo	1-10gg	11-12gg	13-22gg	23-24gg	25g
1 $\Delta$	FIS	-	AMF	-	AMF
2 $\blacktriangle$	BCF	-	AMF	-	AMF

BCF alla dose di 2; AMF alla dose di 1,5.

I dati dell'esperimento, forniti ogni 10 minuti per il totale di 1h, sono stati analizzati mediante un'analisi della varianza a 2 fattori (BCF e tempi) con misure ripetute sul fattore tempi e riportati in **figura 5**.



**Figura 5:** effetto di un trattamento ripetuto con BCF sulla successiva induzione della sensibilizzazione alla AMF. I valori rappresentano la media di 10 valori  $\pm$  ES.

L'ANOVA non mostra alcun effetto del trattamento con il BCF ( $F < 1$ ) né un'interazione "BCF x tempi" ( $F < 1$ ). Il trattamento ripetuto con BCF **non impedisce l'instaurarsi di una sensibilizzazione** agli effetti eccito-motori dell'AMF.

**Esperimento 3A: effetto di un trattamento cronico con baclofen in animali sensibilizzati alla morfina.**

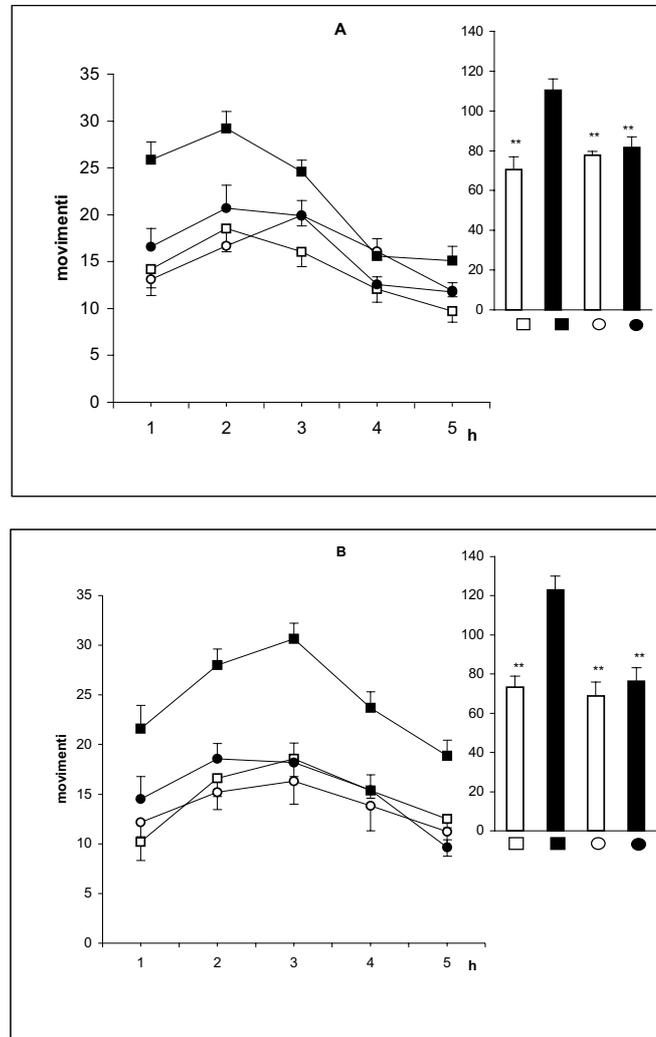
Per questo esperimento sono stati utilizzati 40 ratti suddivisi in 4 gruppi da 10 animali ciascuno. Ogni gruppo ha ricevuto i trattamenti riportati nello schema:

Gruppi	1-10gg	11-20gg	23g	23-49gg	50g
1 □	FIS	FIS	MOR	-	MOR
2 ■	MOR	FIS	MOR	-	MOR
3 ○	FIS	BCF	MOR	-	MOR
4 ●	MOR	BCF	MOR	-	MOR

MOR alla dose di 10; BCF alla dose di 2.

I dati dell'esperimento forniti ogni 60 minuti per il totale di 5h di registrazione, sono stati analizzati mediante una analisi della varianza applicata ad un disegno a 3 fattori

(MOR, BCF e tempi) con misure ripetute sul fattore tempi e successivi confronti effettuati con il *t* di Dunnett e riportati in **figura 6**.



**Figura 6:** effetto di un trattamento ripetuto con BCF sull'espressione della sensibilizzazione alla MOR. Gli istogrammi si riferiscono alle 5 ore di registrazione. Prove eseguite dopo 3 giorni (grafico A) e 30 giorni (grafico B) dalla sospensione dei trattamenti cronici. I valori rappresentano la media di 10 valori  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo 2 (MOR/FIS): \*\* $P < 0,01$ .

Per quanto riguarda il primo test (giorno 23) l'ANOVA mostra un effetto significativo della MOR (F=18,31; g.l. 1/36, P<0,01) e del BCF (F=4,52; g.l. 1/36, P<0,05), una interazione significativa "MOR x BCF" (F=12,42; g.l. 1/36, P<0,01) ma non un' interazione "MOR x BCF x tempi" (F<1), per questo i successivi confronti sono stati condotti sulla media dei dati ottenuti nelle 5 ore di registrazione. L'analisi mette in evidenza la **sensibilizzazione** negli animali trattati cronicamente con MOR/FIS, i quali mostrano una attività motoria significativamente superiore rispetto al controllo (FIS/FIS) (t=5,52; g.l. 36, P<0,01). Tale **sensibilizzazione è annullata** dal trattamento ripetuto con il BCF (t=4,00; g.l. 36, P<0,01). L'effetto del farmaco sembra essere permanente, dal momento che anche le prove effettuate durante il secondo test (giorno 50) danno risultati analoghi. Anche in questo caso è presente un significativo effetto della MOR (F=17,84; g.l. 1/36, P<0,01) e del BCF (F=14,27; g.l. 1/36, P<0,01), una interazione significativa "MOR x BCF" (F=9,46; g.l. 1/36, P<0,01) ma non "MOR x BCF x tempi" (F<1). Dai confronti effettuati in maniera analoga ai precedenti appare evidente il **permanere della sensibilizzazione** così come è **permanente l'effetto desensibilizzante** del trattamento con il BCF, dal momento che il gruppo MOR/FIS presenta valori di motilità ancora superiori sia rispetto al controllo (t= 5,18; g.l. 36; P<0,01) che rispetto al gruppo dei trattati con il BCF (t=4,87; g.l. 36; P<0,01).

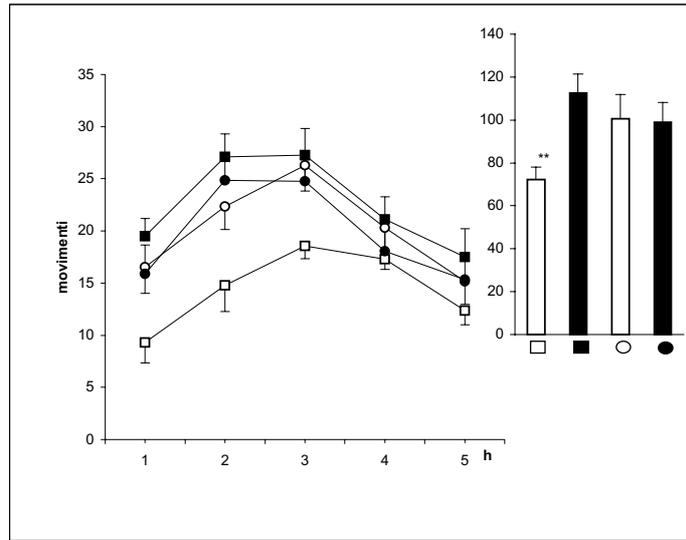
**Esperimento 3B: effetto di un trattamento cronico con baclofen sulla successiva induzione della sensibilizzazione alla morfina.**

Questo esperimento è il proseguimento di quello precedente: sono stati utilizzati gli stessi animali e ogni gruppo ha ricevuto i trattamenti riportati in grassetto nello schema:

<b>Gruppi</b>	1-10gg	11-20gg	23g	23-49gg	50g	<b>51-60gg</b>	<b>70g</b>
<b>1</b> □	FIS	FIS	MOR	-	MOR	<b>FIS</b>	<b>MOR</b>
<b>2</b> ■	MOR	FIS	MOR	-	MOR	<b>FIS</b>	<b>MOR</b>
<b>3</b> ○	FIS	BCF	MOR	-	MOR	<b>MOR</b>	<b>MOR</b>
<b>4</b> ●	MOR	BCF	MOR	-	MOR	<b>MOR</b>	<b>MOR</b>

MOR alla dose di 10; BCF alla dose di 2.

I dati dell'esperimento, forniti ogni 60 minuti per il totale di 5h di registrazione, sono stati analizzati mediante una analisi della varianza applicata ad un disegno a 3 fattori (MOR, BCF/MOR e tempi) con misure ripetute sul fattore tempi e successivi confronti effettuati con il *t* di Dunnett e riportati in **figura 7**.



**Figura 7:** effetto di un trattamento ripetuto con BCF sulla successiva induzione della sensibilizzazione alla MOR. . Gli istogrammi si riferiscono alle 5 ore di registrazione. I valori rappresentano la media di 10 valori  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo 2 (MOR/FIS/FIS): \*\* $P < 0,01$ .

L'ANOVA mostra ancora un effetto significativo della MOR ( $F=4,62$ ; g.l. 1/35;  $P < 0,05$ ) ma non del BCF/MOR ( $F < 1$ ). E' significativa però l'interazione "MOR x BCF/MOR" ( $F= 5,54$ ; g.l. 35;  $p < 0,05$ ) mentre non è significativa l'interazione "MOR x BCF/MOR x tempi" ( $F < 1$ ) e quindi anche in questo caso, i successivi confronti sono stati condotti sulla media dei dati ottenuti nelle 5 ore di registrazione. L'analisi mostra la **permanenza della sensibilizzazione** nel gruppo MOR/FIS/FIS, che presenta ancora una attività motoria significativamente superiore rispetto al controllo (FIS/FIS/FIS) ( $t= 3,23$ ; g.l. 35;  $P < 0,01$ ) ma non differente dal gruppo FIS/BCF/MOR ( $t= 0,93$ ; g.l. 35; NS) ed al gruppo MOR/BCF/MOR ( $t= 1,10$ ; g.l. 35; NS), che quindi risultano sensibilizzati, indice del fatto che il trattamento ripetuto

con il BCF **non è in grado di prevenire l'instaurarsi della sensibilizzazione** in animali mai venuti prima a contatto con la morfina, **né di impedire la risensibilizzazione** in animali precedentemente desensibilizzati.

### *Discussione*

I risultati riguardanti l'**esperimento preliminare** confermano l'effetto eccitante sulla motilità indotto dalla dose di 1,5 mg/kg di amfetamina. Il baclofen, invece, alla dose scelta di 2 mg/kg, non causa alcun effetto, eccitante o inibitorio, sulla motilità spontanea del ratto. Questo è in accordo con altri studi che dimostrano una inibizione della motilità spontanea dell'animale per dosi comprese fra 2,5 e 16 mg/kg (124), mentre per dosi più basse (0,25-0,5-1,00 mg/kg), il farmaco non presenta alcun effetto significativo sull'attività locomotoria (124). Sulla base dei dati presenti in letteratura e dei risultati ottenuti nel presente esperimento si è quindi scelto di proseguire negli esperimenti successivi impiegando proprio questa dose di farmaco.

I risultati ottenuti con l'**esperimento 1A** confermano che l'esposizione per 10 giorni ad amfetamina alla dose di 1,5 mg/kg è in grado di indurre sensibilizzazione all'effetto stimolante sull'attività locomotoria. La co-somministrazione di baclofen 2 mg/kg durante il trattamento cronico con amfetamina determina il blocco dell'induzione di tale sensibilizzazione.

E' importante sottolineare che le iniezioni del trattamento cronico sono sempre state eseguite in stabulario, mentre quelle prima della prova test sono state eseguite nella stessa sala dove poi si è proceduto alla misurazione dell'attività locomotoria, questo al fine di minimizzare la componente ambiente-specifica della sensibilizzazione. Quando la somministrazione di un farmaco si accompagna ad un particolare stimolo ambientale è infatti possibile che la sensibilizzazione si manifesti a seguito di tale stimolo che si ripete e non per un reale effetto farmacologico della sostanza.

Si potrebbe ipotizzare che durante l'esposizione alla amfetamina la somministrazione dell'agonista GABA<sub>B</sub> determini un antagonismo acuto, giorno per giorno, degli effetti dello psicostimolante, impedendo lo sviluppo dei neuroadattamenti che sono

necessari perché sia indotta la sensibilizzazione. I risultati ottenuti nell'esperimento preliminare sembrano supportare questa ipotesi rivelando un effetto acuto del baclofen sugli effetti eccitanti la motilità dell'amfetamina.

Dai nostri studi non è risultata una significativa differenza fra le prove effettuate 3 giorni e quelle effettuate 30 giorni dopo la sospensione del trattamento cronico con amfetamina. Ne consegue che gli eventi neuronali che svolgono un ruolo importante nell'acquisizione della sensibilizzazione non sono eventi transitori ma si mantengono nel tempo, tanto da rappresentare l'inizio dei meccanismi che sono alla base del "craving".

I risultati dell'**esperimento 1B** mostrano che la co-somministrazione di baclofen associato ad amfetamina prima della prova test determina un blocco dell'espressione della sensibilizzazione precedentemente instauratasi in seguito al contatto ripetuto con lo psicostimolante che è, invece, presente negli animali che non ricevono i due farmaci ma la sola amfetamina prima del "challenge", e mostrano, quindi, una attività locomotoria superiore.

L'effetto sembra essere, anche in questo caso, imputabile all'antagonismo acuto realizzato dal baclofen sugli effetti indotti dall'amfetamina, che impedisce agli animali di riconoscere il farmaco e di esprimere la sensibilizzazione acquisita.

Nel presente esperimento l'effetto del baclofen è stato saggiato sulla espressione della sensibilizzazione a lungo termine (30 giorni dalla sospensione del trattamento cronico). Gli studi condotti entro i primi 3 giorni dalla sospensione del trattamento sono importanti per comprendere i meccanismi neuronali alla base dei comportamenti che accompagnano la sindrome da astinenza, tuttavia sono di maggiore rilevanza gli studi condotti dopo una settimana o più dalla sospensione del trattamento cronico, in quanto possono chiarire i meccanismi che sono alla base del "craving" verso una sostanza, che può condizionare un tossicodipendente anche mesi o anni dall'ultima somministrazione della sostanza.

Le prove effettuate consentono di comprendere meglio i meccanismi responsabili dell'instaurarsi della dipendenza ma di fatto non hanno una valenza terapeutica, dal momento che non è proponibile una terapia che preveda la co-somministrazione del

farmaco di abuso e di un potenziale agente terapeutico che ne limiti gli effetti. Per questo un ulteriore passo nella ricerca è stato quello di proporre un trattamento ripetuto con il solo farmaco in soggetti astinenti, simulando in questo modo quello che può essere un approccio clinico. In questa direzione sono stati condotti gli esperimenti successivi.

I risultati dell'**esperimento 2A** mostrano che il trattamento ripetuto con il baclofen su animali precedentemente sensibilizzati alla amfetamina determina una significativa desensibilizzazione. Questo risultato fa presupporre non solo la capacità dell'agonista gabaergico di modulare gli effetti indotti dalla amfetamina acutamente ma anche di annullare in modo permanente i neuroadattamenti che si manifestano a seguito dell'evento di sensibilizzazione e che sono alla base della sua permanenza, riportando di fatto gli animali allo stato fisiologico iniziale. A conferma di ciò prove nel ratto hanno evidenziato che un trattamento di tre giorni con 2,5mg/kg di baclofen può ridurre la successiva autosomministrazione di cocaina (94).

Il trattamento ripetuto con il baclofen sugli animali non sensibilizzati all'amfetamina non modifica, invece, la risposta motoria conseguente alla somministrazione acuta dello psicostimolante. La somministrazione cronica dell'agonista gabaergico non è quindi in grado di per sé di modificare l'effetto acuto dell'amfetamina, a meno di non essere somministrato in associazione con essa.

I risultati dell'**esperimento 2B** sembrano confermare questa ultima affermazione ed estenderla, dal momento che il trattamento ripetuto con il baclofen si è dimostrato inefficace nel prevenire l'instaurarsi della sensibilizzazione alla amfetamina. Il farmaco sembra quindi in grado di intervenire annullando i neuroadattamenti che sottendono alla sensibilizzazione locomotoria ma non è in grado di prevenirli in alcun modo. Questo probabilmente è dovuto al fatto che a seguito di una sovrastimolazione dopaminergica si registra un aumento fisiologico del rilascio di GABA endogeno (43). Quando tale sovrastimolazione non è presente non si ha necessità dell'intervento del GABA che quindi risulta inutile e non efficace a scopo preventivo, anche se somministrato per via esogena.

I risultati riguardanti l'**esperimento 3** confermano come la sensibilizzazione agli effetti eccito-motori sia un fenomeno che accompagna la somministrazione della maggior parte dei farmaci di abuso. Non solo gli psicostimolanti sono infatti in grado di dare tale sensibilizzazione, ma anche farmaci come gli oppiacei, normalmente più conosciuti per le loro proprietà sedative che eccitanti. E' interessante inoltre notare come gli effetti motori della morfina abbiano inizialmente un marcato andamento difasico, caratterizzato da una prima fase di depressione motoria seguita da effetti eccito-motori osservabili soprattutto tra la seconda e la terza ora di registrazione della prova actografica. Col proseguire delle somministrazioni si instaura tolleranza agli effetti depressivi ma sensibilizzazione agli effetti stimolanti (4).

Evidenze bibliografiche dimostrano che il baclofen, quando co-somministrato in associazione a morfina prima della prova test, blocca l'espressione della sensibilizzazione motoria indotta dall'oppiaceo e riduce significativamente l'iperattività indotta dalla morfina acuta nel topo (69). La co-somministrazione ripetuta di baclofen in associazione con la morfina determina un blocco dell'induzione della sensibilizzazione agli effetti eccito-motori dell'oppiaceo (69).

Il trattamento ripetuto con il baclofen su animali precedentemente sensibilizzati alla morfina realizzato nel presente esperimento è responsabile di una significativa e permanente desensibilizzazione, mentre non modifica in alcun modo la risposta motoria conseguente alla somministrazione acuta dell'oppiaceo.

Analogamente a quanto già visto con l'amfetamina, il trattamento ripetuto con il baclofen non è efficace nel prevenire l'instaurarsi della sensibilizzazione né in ratti "naive" alla morfina, cioè animali che non hanno mai sperimentato cronicamente l'oppiaceo, né negli animali "ex-dipendenti", i quali vanno incontro a risensibilizzazione. Infatti, anche gli animali che avevano mostrato una desensibilizzazione in seguito ad esposizione cronica al baclofen, se nuovamente esposti al trattamento cronico con morfina acquisiscono una nuova sensibilizzazione. Alla luce dei risultati ottenuti è possibile affermare che la sensibilizzazione comportamentale indotta sia da amfetamina che da morfina può essere modulata dalla attivazione dei recettori GABA<sub>B</sub>. Nonostante le profonde differenze nel

meccanismo d'azione delle due sostanze alla base della sensibilizzazione vi sono per entrambe gli adattamenti chimici e fisiologici che intercorrono a livello delle aree dopaminergiche del SNC e, in particolar modo, della ATV e dei gangli della base e il coinvolgimento principale, anche se non esclusivo, dei recettori dopaminergici di tipo D1 (109), recettori che hanno un ruolo fondamentale anche nella mediazione dello stimolo discriminativo indotto da amfetamina (15) e da morfina (104).

Al momento attuale non è tuttavia possibile definire in maniera chiara in che modo le modificazioni indotte a livello del sistema dopaminergico da un trattamento ripetuto con sostanze GABA-mimetiche possano influire sui meccanismi neurochimici in precedenza alterati dalla somministrazione cronica di sostanze. Dal punto di vista neuro-fisiologico evidenze bibliografiche mostrano una riduzione del livello di DA extracellulare nel NA in seguito alla somministrazione di baclofen, livello che invece normalmente aumenta a seguito della somministrazione di amfetamina. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di neuroni a trasmissione GABA-ergica che dal NA e proiettano verso la regione della ATV, realizzando un sistema di feedback inibitorio (49). Il controllo inibitorio esercitato dalla stimolazione di tali recettori attenua o blocca l'aumento dei livelli extracellulari di DA osservato nel NA durante la fase di sensibilizzazione senza promuovere, alla dose utilizzata anche nel presente esperimento, alcun cambiamento nei livelli basali di dopamina (49), il che spiegherebbe la capacità del farmaco di agire solamente laddove vi siano delle alterazioni della neurotrasmissione. Cambiamenti nei recettori GABA<sub>B</sub> si osservano infatti nella CPF e nel NA in ratti sensibilizzati all'amfetamina (131). La somministrazione dell'antagonista GABA<sub>B</sub>, phaclofen, determina, invece, l'aumento dei livelli extracellulari di DA (98).

Il baclofen influenza, riducendolo, anche il rilascio di glutammato nel NA (107), con conseguente diminuzione dello stimolo eccitatorio e riduzione del rilascio di DA.

## **CAP.2: MODULAZIONE GLUTAMMATERGICA DELLA SENSIBILIZZAZIONE LOCOMOTORIA INDOTTA DA AMFETAMINA**

### Introduzione

Del ruolo svolto dalla dopamina nell'evento di sensibilizzazione all'amfetamina abbiamo già discusso nel capitolo 1. Recentemente numerosi studi si sono concentrati sul ruolo esercitato dal glutammato nell'instaurarsi e nel mantenimento della dipendenza da sostanze. Evidenze sperimentali hanno messo in rilievo l'importanza del glutammato e dell'interazione fra esso e la dopamina anche nel processo della sensibilizzazione locomotoria (92).

La somministrazione di psicostimolanti determina un aumento del rilascio di glutammato sia DA-dipendente che non DA-dipendente nello spazio extracellulare. Nel primo caso è la stimolazione dei recettori D1 attuata dalla DA che determina una inibizione del re-uptake del glutammato Na/K-ATPasi dipendente, nel secondo è la presenza di metaboliti indotti dalla somministrazione di amfetamina, quali radicali liberi, NO e acido arachidonico, che determina una inibizione del re-uptake del neurotrasmettitore. La somministrazione acuta di amfetamina promuove l'aumento dell'esocitosi del glutammato. La somministrazione ripetuta del farmaco determina modificazioni dell'espressione dei geni per le subunità che compongono i recettori per il glutammato, oltre alla variazione nel livello delle proteine che regolano il rilascio e il recupero del neurotrasmettitore (35). Ne consegue l'aumento della comunicazione glutammatergica fra la CPF e il sistema limbico (57), che non sembra essere implicato direttamente nel rinforzo operato dalla sostanza, ma che svolge un ruolo fondamentale nell'instaurarsi della dipendenza (75).

Proprio una alterazione della trasmissione glutammatergica, più ancora di quella dopaminergica, sembra infatti avere un ruolo chiave sia nel mantenimento di uno stato di dipendenza che nei fenomeni di ricaduta.

Evidenze sperimentali testimoniano il ruolo chiave svolto dal glutammato, più ancora che dalla dopamina, nell'evento di sensibilizzazione alla cocaina; meno chiaro è

invece il coinvolgimento di questo neurotrasmettitore nelle diverse fasi della sensibilizzazione alla amfetamina.

I recettori AMPA e NMDA sembrano essere coinvolti in modo differente nei due momenti in cui si suddivide il processo di sensibilizzazione: l'induzione e l'espressione. La fase di induzione richiede l'attivazione dei recettori NMDA presenti a livello della ATV (112). Contemporaneamente però, sempre nella ATV, si registra un transitorio aumento nella responsività dei recettori AMPA. Tale aumento potrebbe essere fondamentale per il "trasferimento" delle informazioni al NA, centro importante per la fase di espressione del fenomeno, il quale necessita, per il suo mantenimento, della trasmissione eccitatoria AMPA-mediata (76).

La somministrazione di un inibitore del re-uptake di glutammato è in grado di indurre, di per se, cioè in assenza di somministrazione di amfetamina, sensibilizzazione a successive somministrazioni dello psicostimolante (2).

La somministrazione di antagonisti al recettore NMDA, come MK-801, ha dato risultati contrastanti: da un lato questi farmaci sembrano essere in grado di bloccare l'espressione della sensibilizzazione all'amfetamina e alla cocaina, ma non alla morfina (120), dall'altro sono responsabili essi stessi dell'induzione della sensibilizzazione se somministrati da soli (121), mentre facilitano la sensibilizzazione alla amfetamina o alla cocaina se co-somministrati in associazione con esse (12).

Lavori più recenti hanno messo in luce come anche promotori del rilascio del glutammato possano trovare impiego nel modulare la dipendenza da sostanze: il modafinil è stato proposto in clinica per il trattamento della dipendenza da cocaina (26) e sono in fase sperimentale farmaci agenti sullo scambiatore cistina/glutammato, che permette di riequilibrare i livelli di neurotrasmettitore alterati, e ridotti, dalla somministrazione ripetuta di cocaina (5).

#### *D-cicloserina*

La nostra indagine si è focalizzata su una sostanza avente una storia farmacologica un po' complessa, la D-cicloserina (DCS). La DCS, a basse dosi (sotto i 20 mg/kg) si

comporta da agonista parziale ad elevata efficacia per il sito della glicina sul recettore NMDA (52), mentre per dosi più alte (sopra i 30 mg/kg) diventa antagonista (64). La DCS nasce come antibiotico efficace nella cura della tubercolosi, ma è stato recentemente proposto come farmaco utile nel trattamento degli attacchi di panico, dal momento che si è rivelato efficace nel promuovere l'estinzione della paura condizionata, sia nell'animale da laboratorio che nell'uomo, probabilmente stimolando l'apprendimento di comportamenti che possano contrastare quelli automatici indotti dal senso di panico (114).

Negli ultimi anni la DCS è stata proposta anche come adiuvante ai neurolettici tradizionali nella cura della schizofrenia (16). Non è stato ben chiarito il suo ruolo in tale terapia ed esistono pareri contraddittori circa la sua efficacia (55), tuttavia il fatto che si siano ottenuti risultati positivi nella terapia di una patologia che deriva da una alterazione della trasmissione dopaminergica fa presupporre che il farmaco possa avere un effetto anche nella cura delle tossicodipendenze (28).

### Scopo dell'esperimento

- valutare l'effetto di una co-somministrazione di DCS sull'induzione e l'espressione della sensibilizzazione agli effetti eccito-motori indotti da amfetamina (**esperimento 4**)
- valutare se un trattamento ripetuto con DCS sia in grado di desensibilizzare animali precedentemente sensibilizzati alla AMF (**esperimento 5A**) o prevenire l'instaurarsi di una sensibilizzazione (**esperimento 5B**).

### Materiali e metodi

#### *Animali*

(vedi capitolo 1)

### *Farmaci*

d-amfetamina solfato,

d-cicloserina

somministrati i.p. dopo dissoluzione in soluzione fisiologica.

Le dosi riportate sono sempre espresse in mg/kg.

### *Apparato*

(vedi capitolo 1)

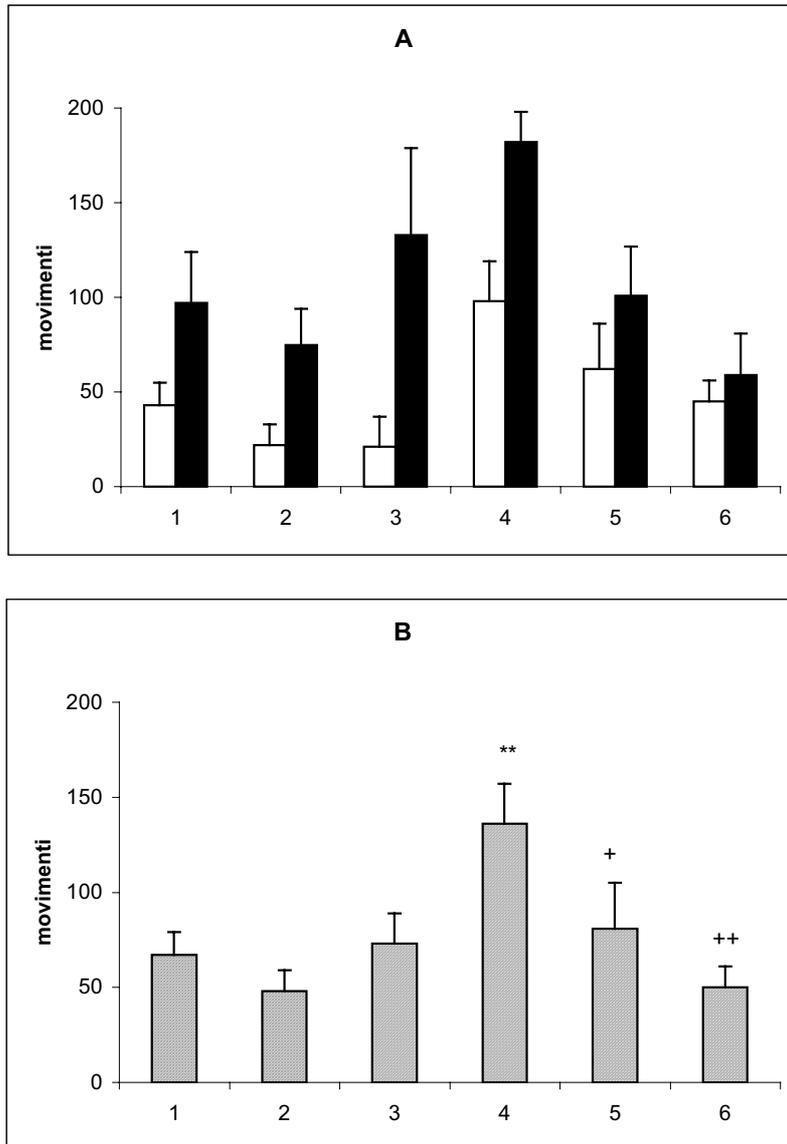
### Risultati

#### **Esperimento 4: effetto di una co-somministrazione di D-cicloserina sull'induzione e l'espressione della sensibilizzazione alla amfetamina.**

Per questo esperimento sono stati utilizzati 160 animali suddivisi in 6 gruppi da 7-17 ratti ciascuno. Ogni gruppo ha ricevuto il trattamento riportato nello schema:

<b>Gruppo</b>	<b>1-10gg</b>	<b>11-12gg</b>	<b>13g</b>
<b>1</b>	FIS+FIS	-	FIS+AMF(0,75-1,5)
<b>2</b>	DCS(6)+AMF(1,5)	-	FIS+AMF(0,75-1,5)
<b>3</b>	FIS+FIS	-	DCS(6)+ AMF(0,75-1,5)
<b>4</b>	FIS+AMF(1,5)	-	FIS+AMF(0,75-1,5)
<b>5</b>	DCS(6)+AMF(1,5)	-	FIS+AMF(0,75-1,5)
<b>6</b>	FIS+AMF(1,5)	-	DCS(6)+ AMF(0,75-1,5)

I dati, raccolti dopo 1h di registrazione, sono stati analizzati mediante un'analisi della varianza a 3 fattori (DCS, AMF e dose-test) e successivi confronti singoli effettuati con il test *t* di Dunnett. I risultati dell'esperimento sono riportati in **figura 8**.



**Figura 8:** effetto della co-somministrazione di DCS sulla induzione e sulla espressione della sensibilizzazione ad AMF. Valori ottenuti dopo somministrazione di AMF (grafico A: □ 0,75 - ■ 1,50) e media dei dati relativi alle due dosi (grafico B). I valori rappresentano la media di 7-17 animali  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo 1: \*\* $P < 0,01$ . Statisticamente differente dal gruppo 4: + $P < 0,05$  - ++ $P < 0,01$ .

L'ANOVA mette in evidenza un effetto significativo della DCS ( $F=4,05$ ; g.l. 2/148;  $P < 0,05$ ) ma non della AMF ( $F=3,28$ ; g.l. 1/148; NS) mentre è significativo l'effetto

della dose-test ( $F=17,25$ ; g.l. 12/148;  $P<0,001$ ). Essendo significativa l'interazione "DCS x AMF" ( $F=3,34$ ; g.l. 2/148;  $P<0,05$ ) ma non la "DCS x AMF x dose-test" ( $F=1,50$ ; g.l. 2/148; NS) i successivi confronti sono stati effettuati sulla media dei dati ottenuti con le due dosi-test. Essi mostrano l'esistenza di una **sensibilizzazione** negli animali trattati cronicamente con AMF (sensibilizzati), i quali differiscono significativamente da quelli trattati con FIS (controllo) ( $t=9,88$ ; g.l. 148;  $P<0,01$ ). Nessuna differenza significativa si registra negli animali trattati cronicamente ( $t=0,82$ ; g.l. 148; NS) o testati ( $t=0,23$ ; g.l. 148; NS) con la DCS associata a FIS. L'associazione di DCS+AMF durante il trattamento cronico determina, invece, una significativa riduzione dell'attività motoria rispetto agli animali sensibilizzati ( $t=2,52$ ; g.l. 148;  $P<0,05$ ) indice di un **blocco dell'induzione della sensibilizzazione**; una riduzione significativa della motilità si registra anche negli animali trattati prima della prova test con l'associazione DCS+AMF, sempre se confrontati con i sensibilizzati ( $t=3,63$ ; g.l. 148;  $P<0,01$ ) indice, in questo caso, di un **blocco dell'espressione della sensibilizzazione** precedentemente instauratasi.

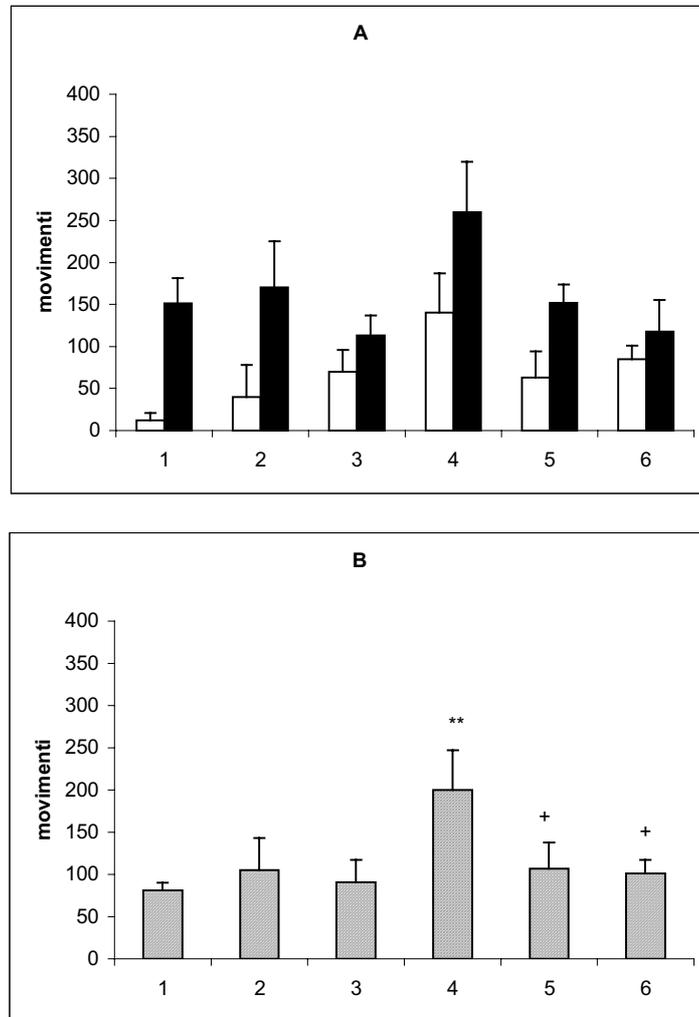
**Esperimento 5A: effetto di un trattamento cronico con D-cicloserina in animali sensibilizzati alla amfetamina.**

Per questo esperimento sono stati utilizzati 48 animali suddivisi in 6 gruppi da 8 ratti ciascuno. Ogni gruppo ha ricevuto il trattamento riportato nello schema:

<b>gruppo</b>	<b>1-10gg</b>	<b>11-20gg</b>	<b>21-29gg</b>	<b>30g</b>	<b>31-69gg</b>	<b>70g</b>
<b>1</b>	FIS	FIS	-	AMF	-	AMF
<b>2</b>	FIS	DCS(3)	-	AMF	-	AMF
<b>3</b>	FIS	DCS(6)	-	AMF	-	AMF
<b>4</b>	AMF	FIS	-	AMF	-	AMF
<b>5</b>	AMF	DCS(3)	-	AMF	-	AMF
<b>6</b>	AMF	DCS(6)	-	AMF	-	AMF

AMF alla dose di 1,5

I dati, raccolti dopo 1h di registrazione, sono stati analizzati mediante un'analisi della varianza a 3 fattori (AMF, DCS e test) e successivi confronti singoli effettuati mediante il test *t* di Dunnett. I risultati dell'esperimento sono riportati nella **figura 9**.



Effetto della somministrazione ripetuta di DCS sulla espressione della sensibilizzazione ad AMF. Valori ottenuti nelle due sessioni test (grafico A: □ test 1 - ■ test 2) e media dei dati relativi alle due prove (grafico B). I valori rappresentano la media di 7-8 animali  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo 1: \*\* $P < 0,01$ . Statisticamente differente dal gruppo 4: + $P < 0,05$ .

L'ANOVA mette in evidenza un effetto significativo dell'AMF ( $F=4,33$ ; g.l. 1/83;  $P<0,05$ ) ma non della DCS ( $F=1,68$ ; g.l. 2/83; NS) mentre è significativa l'interazione "AMF x DCS" ( $F=3,27$ ; g.l. 2/83;  $P<0,05$ ). Nonostante vi sia una differenza tra le due prove test ( $F=19,53$ ; g.l. 1/83;  $P<0,01$ ) non vi è alcuna interazione significativa fra i test e i trattamenti ("AMF x test":  $F<1$ ; "DCS x test":  $F=1,79$ ; g.l. 2/83; NS) né è significativa l'interazione tripla "AMF x DCS x test" ( $F<1$ ) ed è per questo che le successive analisi sono state condotte sulla media dei dati ottenuti nei due test. I confronti hanno sottolineato l'esistenza di una **sensibilizzazione** negli animali esposti cronicamente alla AMF (sensibilizzati), i quali presentano valori di motilità superiori rispetto a quelli trattati con FIS (controllo) ( $t=3,29$ ; g.l. 83;  $P<0,01$ ). Il trattamento ripetuto con **entrambe le dosi di DCS** è in grado di **desensibilizzare gli animali precedentemente sensibilizzati**, dal momento che l'attività motoria in questi gruppi si presenta significativamente inferiore rispetto a quella degli animali sensibilizzati ("DCS(3)":  $t=2,57$ ; g.l. 83;  $P<0,05$  – "DCS(6)":  $t=2,75$ ; g.l. 83;  $P<0,05$ ). Il trattamento cronico con il farmaco non sembra avere, invece, alcun effetto sulla motilità indotta da una somministrazione acuta di amfetamina: i due gruppi di animali trattati, infatti, non differiscono statisticamente dal gruppo di controllo ("DCS(3)":  $t=0,76$ ; g.l. 83; NS – "DCS(6)":  $t=0,29$ ; g.l. 83; NS).

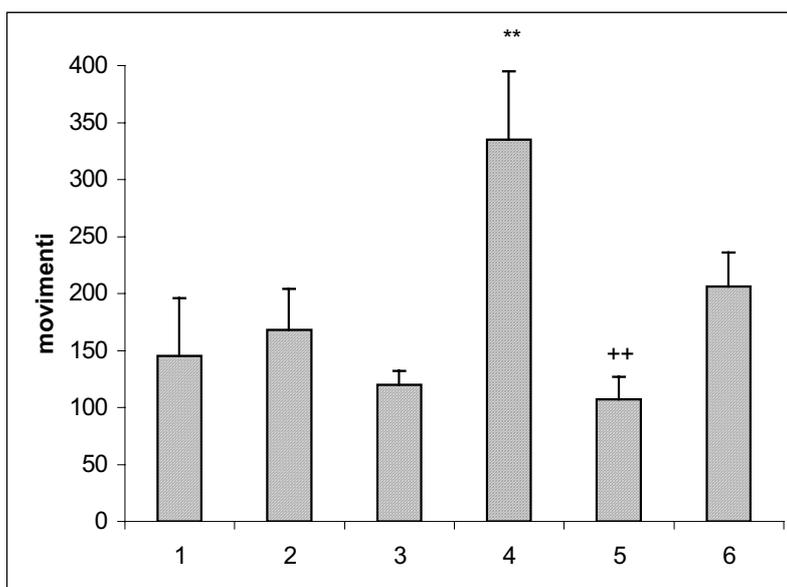
**Esperimento 5B: effetto di un trattamento cronico con D-cicloserina sulla successiva induzione della sensibilizzazione alla amfetamina.**

Questo esperimento è il proseguimento di quello precedente: sono stati utilizzati gli stessi animali e ogni gruppo ha ricevuto i trattamenti riportati in grassetto nello schema:

gruppo	1-10gg	11-20gg	21-110gg	111-120 gg	130g
1	FIS	FIS	-	FIS	AMF
2	FIS	DCS(3)	-	AMF	AMF
3	FIS	DCS(6)	-	AMF	AMF
4	AMF	FIS	-	FIS	AMF
5	AMF	DCS(3)	-	AMF	AMF
6	AMF	DCS(6)	-	AMF	AMF

AMF alla dose di 1,5

I dati, raccolti dopo 1h di registrazione, sono stati analizzati mediante un'analisi della varianza a 2 fattori (AMF e DCS) e successivi confronti singoli effettuati mediante il test *t* di Dunnett. I risultati dell'esperimento sono riportati nella **figura 10**.



**Figura 10:** effetto della somministrazione ripetuta di DCS sulla successiva induzione della sensibilizzazione ad AMF. I valori rappresentano la media di 7-8 animali  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo 1: \*\* $P < 0,01$ . Statisticamente differente dal gruppo 4: ++ $P < 0,01$ .

L'ANOVA mostra ancora un effetto significativo dell'AMF ( $F=4,22$ ; g.l. 1/39;  $P<0,05$ ). E' significativo l'effetto del trattamento con DCS ( $F=3,21$ ; g.l. 2/39;  $P<0,05$ ) ed è altresì significativa l'interazione "AMF x DCS" ( $F=4,34$ ; g.l. 1/39;  $P<0,05$ ). I successivi confronti evidenziano la **permanenza della sensibilizzazione** anche dopo un lungo periodo di sospensione del trattamento cronico: gli animali sensibilizzati (gruppo AMF/FIS/FIS) presentano infatti una attività motoria notevolmente superiore rispetto al gruppo di controllo (gruppo FIS/FIS/FIS) ( $t=3,26$ ; g.l. 39;  $P<0,01$ ). Il trattamento ripetuto con **DCS (3) è in grado di prevenire l'instaurarsi di una sensibilizzazione** sia negli animali precedentemente desensibilizzati (gruppo AMF/DCS/AMF), che differiscono significativamente dai sensibilizzati ( $t=3,78$ ; g.l. 39;  $P<0,01$ ) ma non dal controllo ( $t=0,63$ ; g.l. 39; NS), sia negli animali "naive" all'amfetamina (gruppo FIS/DCS/AMF) che non differiscono dal controllo ( $t=0,37$ ; g.l. 39; NS). Il trattamento ripetuto con **DCS(6) sembra avere un ruolo preventivo più efficace negli animali "naive"**, i quali non differiscono dal gruppo di controllo ( $t=0,41$ ; g.l. 39; NS) mentre determina una riduzione al limite della significatività negli animali precedentemente desensibilizzati ( $t=2,21$ ; g.l. 39;  $P<0,10$ ).

### Discussione

**L'esperimento 4** mostra come un trattamento ripetuto con DCS 6 mg/kg associata ad AMF sia efficace nel prevenire l'instaurarsi della sensibilizzazione agli effetti eccito-motori indotti da due dosi di psicostimolante (0,75 e 1,5 mg/kg rispettivamente). La DCS è inoltre in grado, quando co-somministrata, di inibire l'espressione di una sensibilizzazione precedentemente instauratasi e non a seguito di un effetto deprimente aspecifico del farmaco, dal momento che la somministrazione, sia acuta che cronica di DCS non modifica in maniera significativa la motilità indotta dall'AMF. La DCS, d'altronde, non modifica neppure l'attività locomotoria spontanea dell'animale (52). Il meccanismo d'azione di tale farmaco, sebbene non ancora ben chiarito, sembra essere dovuto ad una sua azione inibente sulla trasmissione dopaminergica. A riprova di ciò, studi in vivo dimostrano che la DCS è

in grado di esercitare una azione inibitoria sulla trasmissione dopaminergica quando somministrata in associazione con agonisti D1 e D2 (27). Anche la stimolazione motoria indotta da metamfetamina viene antagonizzata da varie dosi di DCS (0,375-3 mg/kg)(58).

I risultati da noi ottenuti nella prima parte dell' esperimento sono certamente incoraggianti e fornisco un quadro della possibile azione "acuta" della DCS: può essere ragionevole supporre che durante l'esposizione cronica ad AMF (fase di induzione), la co-somministrazione dell'agonista NMDA determini un antagonismo acuto, giorno per giorno, degli effetti dell'AMF, impedendo quindi lo sviluppo della sensibilizzazione. In maniera analoga, la somministrazione di DCS associata ad AMF prima del test (fase di espressione), antagonizzando gli effetti dello psicostimolante, impedisce l'espressione della sensibilizzazione precedentemente acquisita.

Per chiarire ulteriormente il possibile meccanismo d'azione di questo farmaco e analizzarne un eventuale possibile impiego in terapia si è passati all' **esperimento 5**, dove il farmaco è somministrato, alla dose di 3 e 6 mg/kg, in animali sensibilizzati all'amfetamina, dal momento che questo tipo di approccio è quello che maggiormente si avvicina ad un eventuale impiego clinico del farmaco.

I risultati della nostra ricerca confermano la capacità dell'amfetamina di indurre una sensibilizzazione motoria permanente a seguito alla somministrazione ripetuta, dal momento che essa è rilevabile durante il TEST 1, effettuato 10 giorni dopo la sospensione del trattamento cronico, ed è ancora presente al momento del TEST 2, effettuato 50 giorni dopo la sospensione del medesimo trattamento. Dal confronto fra i due test appare evidente però, non solo la permanenza del fenomeno, ma anche un aumento dell'attività motoria, esteso a tutti i gruppi, nel TEST 2, dovuto, probabilmente, ad una sensibilizzazione ambiente-specifica.

La somministrazione ripetuta ed intermittente di psicostimolanti induce, oltre ad un aumento del rilascio di dopamina, un aumento nel rilascio di glutammato. Il glutammato liberato interagisce con i propri recettori AMPA e NMDA. Tale attivazione determina una maggiore trascrizione genica della subunità GluR1 che

compone i recettori AMPA e una conseguente esternalizzazione sulle membrane post-sinaptiche di tali recettori, localizzati normalmente in compartimenti endocellulari e per questo “silenti” (108). Entrambi questi processi determinano un aumento dell’eccitabilità e dell’attività dei neuroni dopaminergici della ATV, nonché un aumento della loro sensibilità all’azione farmacologica degli psicostimolanti (130).

E’ dimostrato che la DCS, nonostante la sua attività di agonista glutammatergico, è in grado di ridurre la trasmissione AMPA-mediata (88), probabilmente riportando alla normalità il numero delle subunità GluR1 che aumentano durante il processo di sensibilizzazione (38). Poiché i recettori contenenti la subunità GluR1 permettono un maggiore ingresso di ioni  $Ca^{2+}$ , la DCS, favorendo la loro endocitosi (74), determina probabilmente una diminuzione dell’afflusso di  $Ca^{2+}$  all’interno dei neuroni, con conseguente diminuzione delle cascate di trasduzione endocellulari che sono alla base dei cambiamenti a lungo termine responsabili della fase di espressione della sensibilizzazione. Questo potrebbe portare alla desensibilizzazione permanente di animali precedentemente sensibilizzati alla amfetamina.

La DCS potrebbe essere in grado di agire a livello dei sistemi neuronali alterati dall’assunzione di amfetamina, inducendo a sua volta ulteriori neuroadattamenti che contrastano e annullano quelli causati dalla assunzione cronica dello psicostimolante riportando la situazione neuronale, fino a questo momento alterata, allo stato fisiologico.

Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che durante il periodo di astinenza si verifica una riduzione nei livelli extracellulari di glutammato nel NA probabilmente a seguito di un meccanismo di compensazione endogeno (75). La DCS, agendo come agonista parziale dei recettori NMDA, potrebbe determinare una maggiore stimolazione di tali recettori, portando ad una riduzione degli spiacevoli sintomi legati all’astinenza, dovuti in parte alla diminuzione dei livelli dello stesso neurotrasmettitore, e, conseguentemente, alla diminuzione del rischio di ricaduta. L’**esperimento 5** è stato condotto proprio per valutare se un trattamento ripetuto con D-cicloserina fosse in grado di prevenire l’instaurarsi di una sensibilizzazione agli

effetti eccito-motori indotti da amfetamina o la risensibilizzazione in soggetti dipendenti. I risultati ottenuti mostrano come la DCS sia in grado di prevenire l'instaurarsi di una sensibilizzazione in ratti "naive", cioè ratti che non sono mai venuti a contatto con lo psicostimolante, ad entrambe le dosi considerate (3 mg/Kg e 6 mg/Kg); mentre sui ratti "desensibilizzati", cioè quelli riportati a valori analoghi a quelli di controllo a seguito della somministrazione del farmaco durante l'esperimento 4, la dose di 3 mg/Kg si è dimostrata apparentemente più efficace nel prevenire l'instaurarsi della sensibilizzazione rispetto alla dose di 6 mg/Kg.

Come già detto per l'esperimento precedente, l'azione esercitata dalla DCS nella regolazione del traffico transmembrana dei recettori AMPA, nella trasmissione NMDA-mediata e nell'interazione fra i due diversi tipi recettoriali, potrebbe essere in grado di indurre, a livello degli stessi sistemi neuronali coinvolti nel fenomeno dell'"addiction", dei neuroadattamenti che formano un background all'interno del quale le modificazioni neuronali provocate da successive somministrazioni di amfetamina non sono più in grado di svolgere la loro azione. La DCS sembra agire, non cancellando la memoria precedentemente instauratasi, ma dando luogo ad un nuovo apprendimento che in pratica impedisce l'espressione della memoria originale. Una ulteriore prova della contingenza fra i fenomeni di apprendimento e di "addiction" è data da studi clinici e preclinici, i quali hanno rivelato una buona efficacia della DCS nei test di estinzione. Il modello dell'estinzione fornisce infatti un buon metodo per valutare la capacità del soggetto di "disimparare" a riconoscere uno stimolo al quale era stato abituato.

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che somministrazioni sistemiche (o intra-amigdala) di DCS sono in grado di facilitare l'estinzione della *place-preference* indotta da cocaina nel ratto probabilmente estinguendo la risposta emozionale associata agli stimoli derivanti dal farmaco (13). Allo stesso modo, analoghe somministrazioni del farmaco si sono dimostrate efficaci nel facilitare l'estinzione della paura condizionata nel ratto (114) e nell'uomo (46).

### **CAP.3: MODULAZIONE GABAERGICA DELLE PROPRIETA' DISCRIMINATIVE DI AMFETAMINA E MORFINA**

#### Introduzione

Nonostante i numerosi progressi compiuti negli ultimi venti anni nel delucidare la neurobiologia delle sostanze d'abuso, sia a livello recettoriale che trasmettitoriale, sono ancora tante le lacune al riguardo e molte difficoltà sono dovute all'estrema soggettività e variabilità degli effetti comportamentali e psicologici indotti dal consumo abituale di sostanze psicotrope. Un modello che permette di valutare gli effetti di una sostanza tenendo conto della totalità delle sue rappresentazioni è quello della discriminazione, dal momento che esso si avvale dello studio dello stimolo indotto dalla somministrazione ripetuta di una sostanza, stimolo che viene percepito dall'animale da laboratorio come la somma di tutti gli effetti che si verificano dopo la somministrazione della sostanza in esame, a seguito sia del suo reale effetto farmacologico, che di tutte le componenti ambientali, psicologiche, sociali ed emozionali coinvolte.

Sebbene ci siano recenti evidenze che suggeriscono il coinvolgimento di sistemi non dopaminergici, come il nor-adrenergico, il serotoninergico e l'istaminergico, nella modulazione dello stimolo discriminativo indotto da una sostanza, tuttavia il sistema dopaminergico mesolimbico appare, anche in questo caso, quello maggiormente coinvolto, sia nell'induzione che nell'espressione dello stimolo discriminativo (79). Infatti, mentre antagonisti D1 selettivi, quali ad esempio SCH 39166, bloccano gli effetti della d-amfetamina in ratti allenati a discriminare amfetamina da fisiologica, antagonisti adrenergici e serotoninergici (prazosina, yhoimbina, propanololo, ketanserina) non attenuano gli effetti discriminativi dello psicostimolante. Analogamente agonisti  $\alpha$ 2-adrenergici (es. clonidina) e  $\beta$ -adrenergici (es. salbutamolo) non alterano le proprietà di stimolo della amfetamina (115).

D'altra parte anche gli effetti discriminativi di altri farmaci quali etanolo (91), cocaina (129) ed oppiacei (94) sono legati a neuroadattamenti che si verificano a

livello delle aree dopaminergiche del SNC e in particolar modo della ATV e dei gangli della base.

E' quindi logico presupporre che quei farmaci in grado di interagire con i circuiti dopaminergici possano modulare efficacemente anche le proprietà stimolo-discriminative delle sostanze, il che fornirebbe una ulteriore prova a supporto della loro possibilità di impiego nella cura del tossicodipendente. Nello specifico la nostra indagine si è proposta di indagare il ruolo del baclofen sullo stimolo discriminativo indotto da amfetamina e morfina, dal momento che il farmaco ha dimostrato di avere un effetto ancora non ben chiarito su di esso. Se da un lato infatti è accertato il ruolo della modulazione gabaergica nella regolazione della capacità di discriminare sia amfetamina che morfina, tuttavia la stimolazione diretta dei recettori GABA<sub>B</sub> si è dimostrata inefficace nel diminuire la capacità di discriminare cocaina e metamfetamina (79) nel ratto, mentre una inibizione del reuptake del GABA ha dato risultati più incoraggianti. Va tuttavia osservato che, nonostante le marcate somiglianze strutturali, amfetamina e metamfetamina presentano differenze neurochimiche e comportamentali rilevanti (96) e occorre considerare che l'effetto dopamino-mimetico della cocaina è dovuto ad un blocco della ricaptazione del neurotrasmettitore, mentre quello della metamfetamina, e più ancora quello della amfetamina, è dovuto anche ad una aumentata liberazione di dopamina. E' quindi possibile che il baclofen, in quanto agonista diretto del recettore GABA<sub>B</sub>, possa interferire direttamente e specificamente con la liberazione di dopamina indotta dalla somministrazione ripetuta di amfetamina e morfina a livello delle aree mesolimbiche, e responsabile, per la maggior parte, dell'espressione delle proprietà discriminative, e quindi degli effetti soggettivi, proprie di tali farmaci.

#### Scopo dell'esperimento

- Valutare gli effetti del BCF sulla capacità di discriminare amfetamina, sia quando co-somministrato con essa (**esperimento 6A**) sia dopo un trattamento cronico (**esperimento 6B**)

- Valutare gli effetti del BCF sulla capacità di discriminare morfina, sia quando co-somministrato con essa (**esperimento 7A**) sia dopo un trattamento cronico (**esperimento 7B**)

### Materiali e metodi

#### *Animali*

Per la sperimentazione sono stati utilizzati ratti maschi Sprague-Dawley del peso variabile tra i 275 e i 300 gr. all'inizio della fase sperimentale. Gli animali sono stati stabulati in gabbie metalliche a gruppi di due o tre, con acqua continuamente disponibile e cibo limitato a due pellets serali per animale (circa 9gr. l'una). Le condizioni di illuminazione prevedevano 12 ore di luce, dalle 07:00 alle 19:00, alternate a 12 ore di buio. Le condizioni di umidità e temperatura erano mantenute costanti (60% U.R. e 22°C).

#### *Farmaci*

d-amfetamina solfato

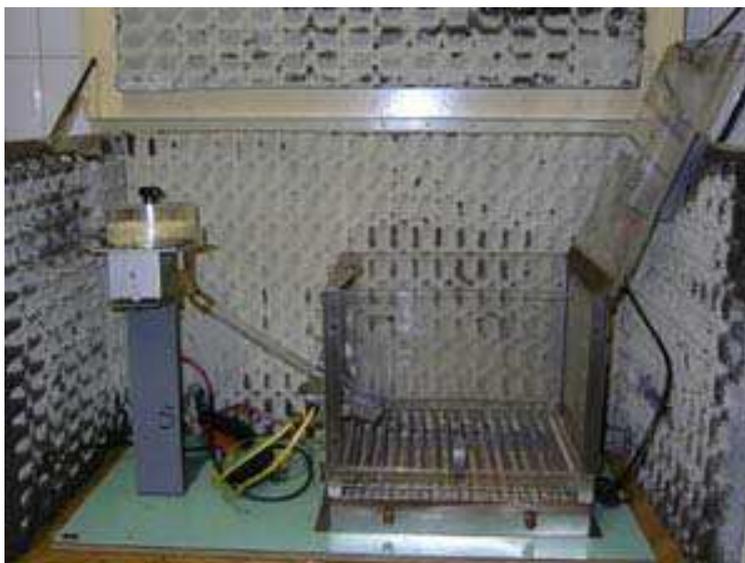
morfina cloridrato

baclofen

somministrati ip dopo dissoluzione in soluzione fisiologica.

Le dosi riportate sono sempre espresse in mg/kg.

#### *Apparato*



Sono state utilizzate sei gabbie per comportamento operativo, della misura di 20x20x30cm con pareti in plexiglas e pavimento a griglia. Su di un lato della gabbia è montata, al centro, una mangiatoia e, ai due lati di questa, due leve (denominate rispettivamente leva destra e leva sinistra). Sul coperchio della gabbia è collocata una fonte luminosa che illumina l'interno della stessa. All'esterno della gabbia è presente un apparecchio dispensatore di micropellets di cibo, in grado di erogare le pellets in relazione alle risposte dell'animale. Sia la gabbia sia il dispensatore sono racchiusi in un contenitore insonorizzato munito di ventilatore; il tutto è situato in una stanza con condizioni costanti di temperatura.

Tutte le fasi sperimentali sono controllate mediante computer.

### *Procedura generale*

#### *Allenamento alla schedula fissa*

In una fase iniziale gli animali sono stati introdotti nella gabbia sperimentale in presenza di un'unica leva (destra o sinistra a giorni alterni). Alle battute dell'animale sulla leva corrisponde l'erogazione di una micropellet (ricompensa). Il numero di battute necessario per ottenere una ricompensa, denominato "Fixed Ratio" (FR), aumenta progressivamente da 1:1 a 15:1 all'aumentare dei giorni di allenamento.

La durata della sessione di allenamento è di 60 minuti per la prima prova e diminuisce rapidamente nelle prove successive fino ad assestarsi a 15 minuti per la AMF e a 30 minuti per la MOR.



### *Allenamento alla discriminazione*

Una volta appreso tale tipo di schedula è iniziato l'allenamento alla discriminazione. Gli animali sono stati allenati (in presenza di due leve nella gabbia) a premere su di una determinata leva quando trattati con il farmaco di allenamento e sull'altra quando trattati con soluzione fisiologica.



L'assegnazione della leva ad uno dei due trattamenti è stata fatta per tutti i ratti in modo casuale.

L'animale, per ottenere il cibo, doveva imparare a scegliere la leva appropriata al trattamento ricevuto; qualsiasi battuta effettuata sulla leva non corretta non aveva effetto, l'animale cioè non riceveva nessuna ricompensa. Le iniezioni, sia di farmaco sia di soluzione fisiologica, sono state effettuate nello stabulario e gli animali sono stati lasciati nelle loro gabbie di stabulazione nel periodo che intercorreva tra l'iniezione e l'immissione nella gabbia sperimentale.

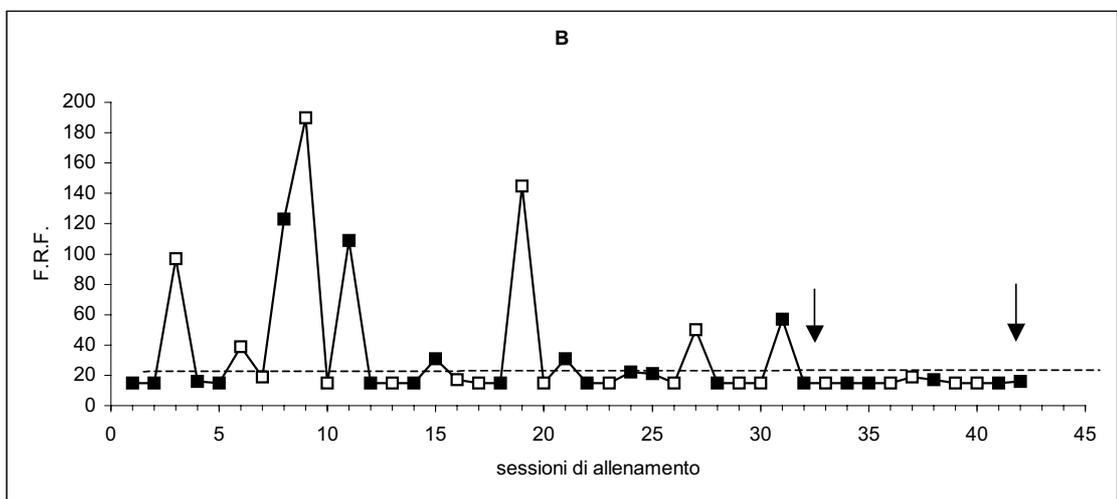
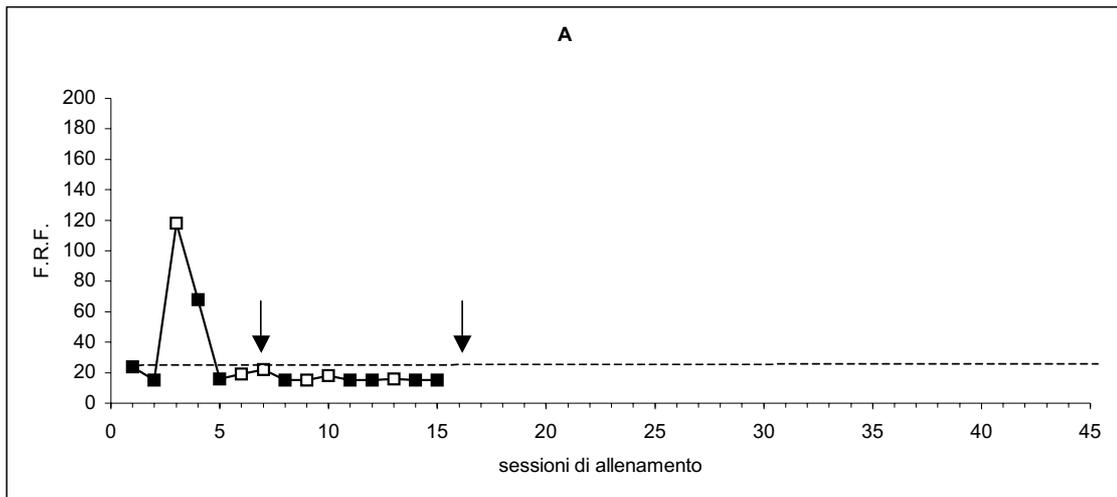
Le prove sono state effettuate al mattino per cinque giorni alla settimana; i trattamenti seguivano la sequenza FA (farmaco di allenamento), SF (soluzione fisiologica), SF, FA, FA in una settimana e SF, FA, FA, SF, SF nella successiva. La durata di ciascun allenamento è stata di 15 minuti per la AMF, di 30 minuti per la MOR

Per ogni sessione sono stati registrati tre tipi di dati:

1. il numero di battute su ambedue le leve prima di ottenere la prima ricompensa (F.R.F.);
2. il numero totale di battute su ambedue le leve effettuate durante tutta la sessione;
3. il numero totale di ricompense.

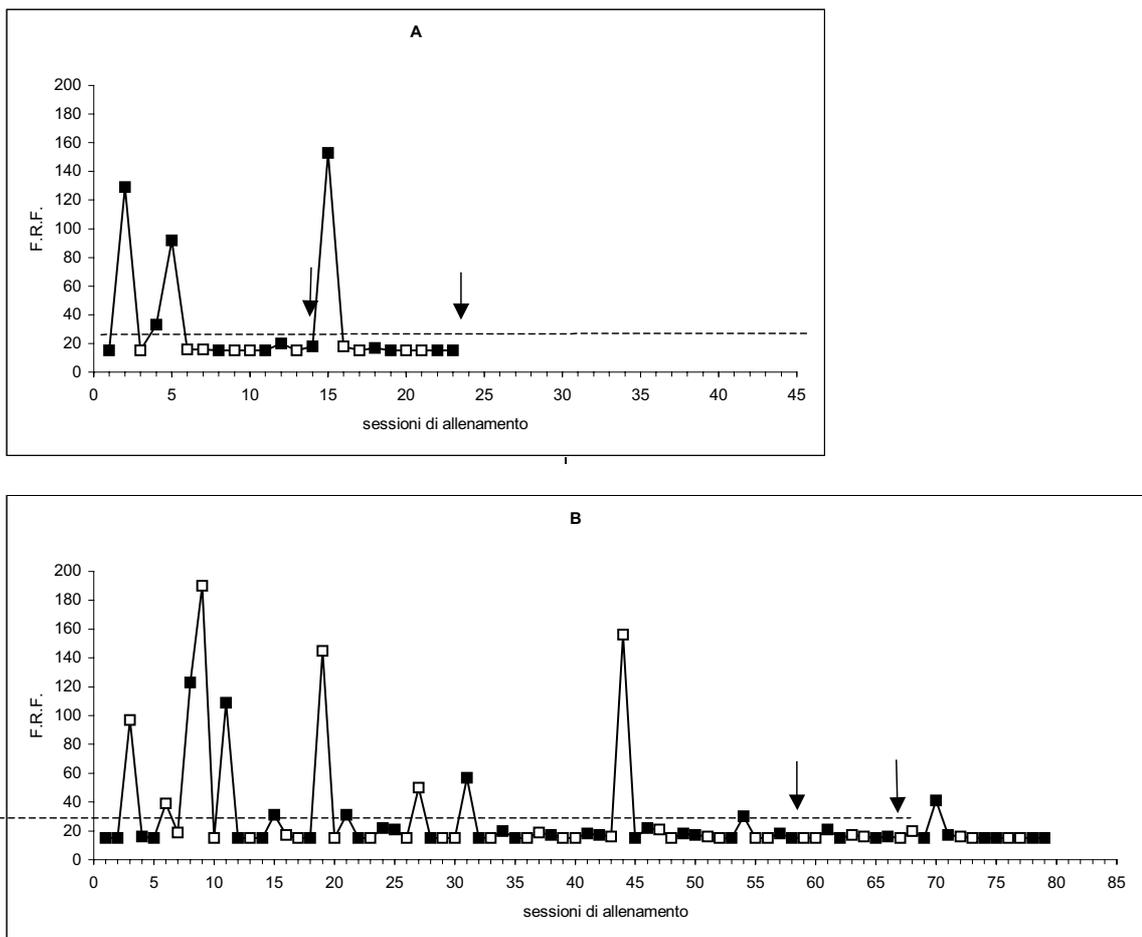
Per stabilire il raggiungimento da parte degli animali di una discriminazione stabile tra farmaco di allenamento e soluzione fisiologica si è fissato un criterio a priori. In conformità a tale criterio il ratto non doveva effettuare più di quattro battute sulla leva non corretta prima di aver battuto 15 volte sulla leva appropriata ( $F.R.F. \leq 19$ ); l'animale cioè doveva effettuare almeno l'80% delle battute sulla leva corretta prima di ottenere la prima ricompensa. Il criterio doveva essere rispettato in 10 su 11 sessioni consecutive.

Il numero medio di sessioni per raggiungere una discriminazione stabile tra amfetamina 0,5 mg/kg e soluzione fisiologica 2 ml/kg è stato di 28, con un range compreso tra 15 sessioni, per l'animale che ha mostrato il più veloce apprendimento, e 42 sessioni, per l'animale che ha presentato il più lento apprendimento.



**Figura 11:** apprendimento della discriminazione in due differenti animali (A e B). □ sessioni di allenamento con FIS; ■ sessioni di allenamento con AMF (0,5mg/kg); ↓↓ sessioni di allenamento consecutive nelle quali l'animale ha raggiunto per 10 volte il criterio stabilito a priori ( $F.R.F. \leq 19$ ).

Per quanto riguarda la morfina il numero medio di sessioni di allenamento impiegate per raggiungere una discriminazione stabile tra morfina 5 mg/kg e soluzione fisiologica 2 ml/kg è stato di 50, con un range compreso tra 23 sessioni, per l'animale che ha mostrato il più veloce apprendimento, e 82 sessioni, per l'animale che ha presentato il più lento apprendimento.



**Figura 12:** apprendimento della discriminazione in due differenti animali (A e B). □ sessioni di allenamento con FIS; ■ sessioni di allenamento con MOR (5mg/kg); ↓↓ sessioni di allenamento consecutive nelle quali l'animale ha raggiunto per 10 volte il criterio stabilito a priori (F.R.F ≤ 19).

La velocità di apprendimento della discriminazione varia a seconda del farmaco utilizzato e della dose: maggiore è l'effetto percepito dall'animale, più veloce sarà il suo apprendimento. In alcuni casi si allena l'animale con una dose di farmaco per poi abbassarla una volta che l'animale ha imparato a discriminare.

#### *Prove di generalizzazione*

Successivamente sono iniziate le prove test nelle quali l'animale riceveva il trattamento (vedi risultati) e poi veniva posto nella gabbia sperimentale per la sessione di test che aveva durata analoga a quella dell'allenamento. Una volta introdotto il ratto nella gabbia, veniva registrato su quale leva l'animale effettuava le prime 15 battute; questa leva era designata come "leva selezionata" e l'animale continuava ad essere rinforzato solo battendo quella leva per tutta la durata della sessione. Oltre ai dati usuali (vedi allenamento), nel caso delle prove test è stata registrata anche la percentuale di risposte sulla leva selezionata (% R.S.L.). Tale percentuale, basata sulle risposte effettuate dopo la selezione della leva, veniva calcolata dividendo il numero di risposte sulla leva selezionata per il totale di battute effettuate su entrambe le leve e moltiplicando il risultato per 100.

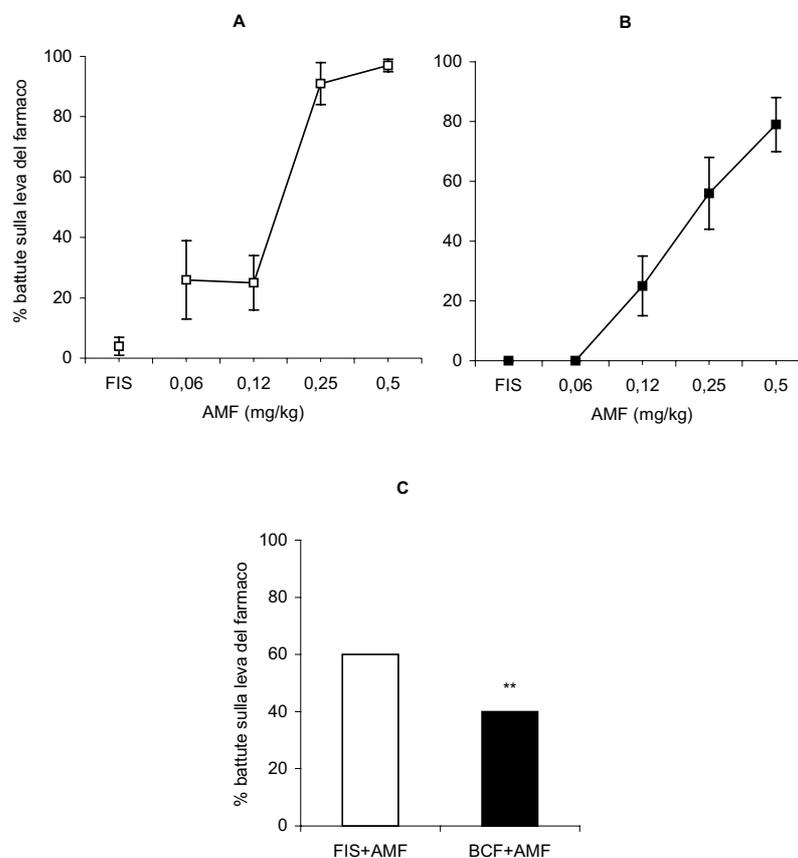
Si ritiene che un aumento sia dei valori di F.R.F. che delle risposte sulla leva non selezionata durante le prove di generalizzazione possa essere collegato ad effetti di tipo disorganizzante indotti dal farmaco: i dati che presentavano contemporaneamente valori di F.R.F. > 17 e percentuali di risposta sulla leva selezionata < 99 sono stati omessi dalle successive analisi.

#### Risultati

##### **Esperimento 6A: effetto della co-somministrazione di baclofen sulle proprietà discriminative della amfetamina.**

Per questo esperimento sono stati utilizzati 19 animali allenati a discriminare AMF 0,5 da FIS. Dopo aver raggiunto un criterio stabile di discriminazione gli animali sono stati saggiati. Le prove di test venivano effettuate al mattino, il mercoledì e il venerdì, mentre negli altri giorni della settimana veniva continuato l'allenamento alla discriminazione come prova di controllo. Gli animali che nei due giorni precedenti il

test mostravano un valore di F.R.F. >19 non potevano essere saggiati ma eseguivano il normale allenamento. Prima del test gli animali ricevevano una 1° iniezione con FIS o BCF (1) e una 2° iniezione con FIS o AMF alle varie dosi (0,06; 0,12; 0,25; 0,50) dopo 15' dalla prima. Dopo un intervallo di tempo di altri 15' gli animali venivano posti nelle gabbie sperimentali. I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante una analisi della varianza applicata ad un disegno a due fattori (trattamenti, dose) e riportati in **figura 13**.



**Figura 13:** scelta della leva in ratti allenati a discriminare AMF da FIS dopo somministrazione di diverse dosi di AMF da sola (grafico A) o associata a BCF (grafico B) ed effetti medi dei due trattamenti (grafico C). I valori rappresentano la media di 12-19 animali  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo di controllo (FIS+AMF): \*\*P<0,01.

Come evidente dal grafico, il BCF, quando somministrato singolarmente non generalizza con l'AMF, dal momento che la % di battute effettuate sulla leva del farmaco dagli animali trattati con il BCF in associazione con FIS è analoga a quella effettuata dagli animali trattati con la sola FIS. Per quanto riguarda invece la co-somministrazione di BCF e AMF l'ANOVA mette in evidenza una differenza significativa tra i trattamenti ( $F=9,84$ ; g.l. 1/120;  $P<0,01$ ) e tra le dosi ( $F=32,86$ ; g.l. 3/120;  $P<0,01$ ), mentre non è significativa l'interazione "trattamenti x dose" ( $F=1,46$ ; g.l. 3/120; NS). Questo mostra come il **BCF riduca efficacemente la capacità degli animali di discriminare AMF**, in maniera omogenea per tutte le dosi di AMF.

#### **Esperimento 6B: effetto di un trattamento ripetuto con baclofen sulle proprietà discriminative dell'amfetamina.**

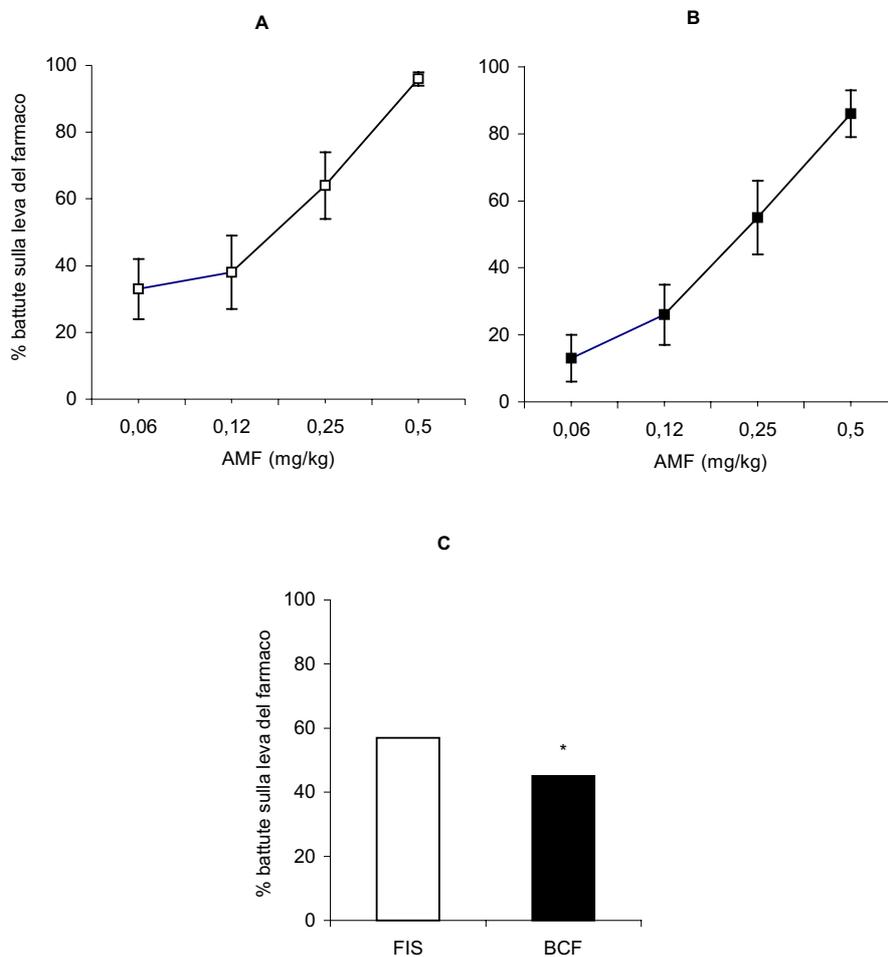
Per questo esperimento sono stati utilizzati 20 animali allenati a discriminare AMF 0,5 da FIS, suddivisi in due gruppi da 10 animali ciascuno, denominati A e B. Una volta raggiunto un criterio stabile di discriminazione sui soli animali appartenenti al gruppo A è stato condotto un **esperimento preliminare** allo scopo di verificare la validità della procedura sperimentale poi utilizzata nell'esperimento (vedi discussione).

Gli animali di entrambi i gruppi hanno poi ricevuto un primo trattamento cronico con FIS della durata di 10 giorni. Durante il trattamento è stato sospeso l'allenamento alla discriminazione. Alla conclusione del trattamento cronico sono state eseguite le prove test. In questo caso si è usata una procedura differente da quella descritta per l'esperimento precedente: le prove sono state condotte per 4 giorni consecutivi e senza allenamenti intermedi. Prima del test gli animali hanno ricevuto una iniezione con AMF (0,06; 0,125; 0,25; 0,50) e sono stati posti nelle gabbie sperimentali per 15' al fine di costruire una curva di generalizzazione della AMF. Dopo due settimane di ri-allenamento gli animali hanno ricevuto, con le stesse modalità del trattamento precedente, un secondo trattamento cronico con BCF (2). Al termine di esso è stata costruita una nuova curva di generalizzazione della AMF, secondo le modalità

precedentemente descritte. Lo schema sottostante riassume tempi e trattamenti per l'esperimento:

<b>Gruppo</b>	<b>10 gg</b>	<b>4 gg</b>	<b>10 gg</b>	<b>10 gg</b>	<b>4 gg</b>
<b>A</b>	FIS	TEST1	All	BCF	TEST2
<b>B</b>	FIS	TEST1	All	BCF	TEST2

I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante una analisi della varianza applicata ad un disegno a 3 fattori (gruppo, trattamento, dose) e riportati in **figura 14**.



**Figura 14:** scelta della leva in funzione delle diverse dosi di AMF in ratti allenati a discriminare AMF da FIS. TEST 1 dopo trattamento cronico con FIS (grafico A), TEST 2 dopo trattamento cronico con BCF (grafico B) e effetti medi dei due trattamenti (grafico C). I valori rappresentano la media di 17-20 animali  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo (FIS): \* $P < 0,05$ .

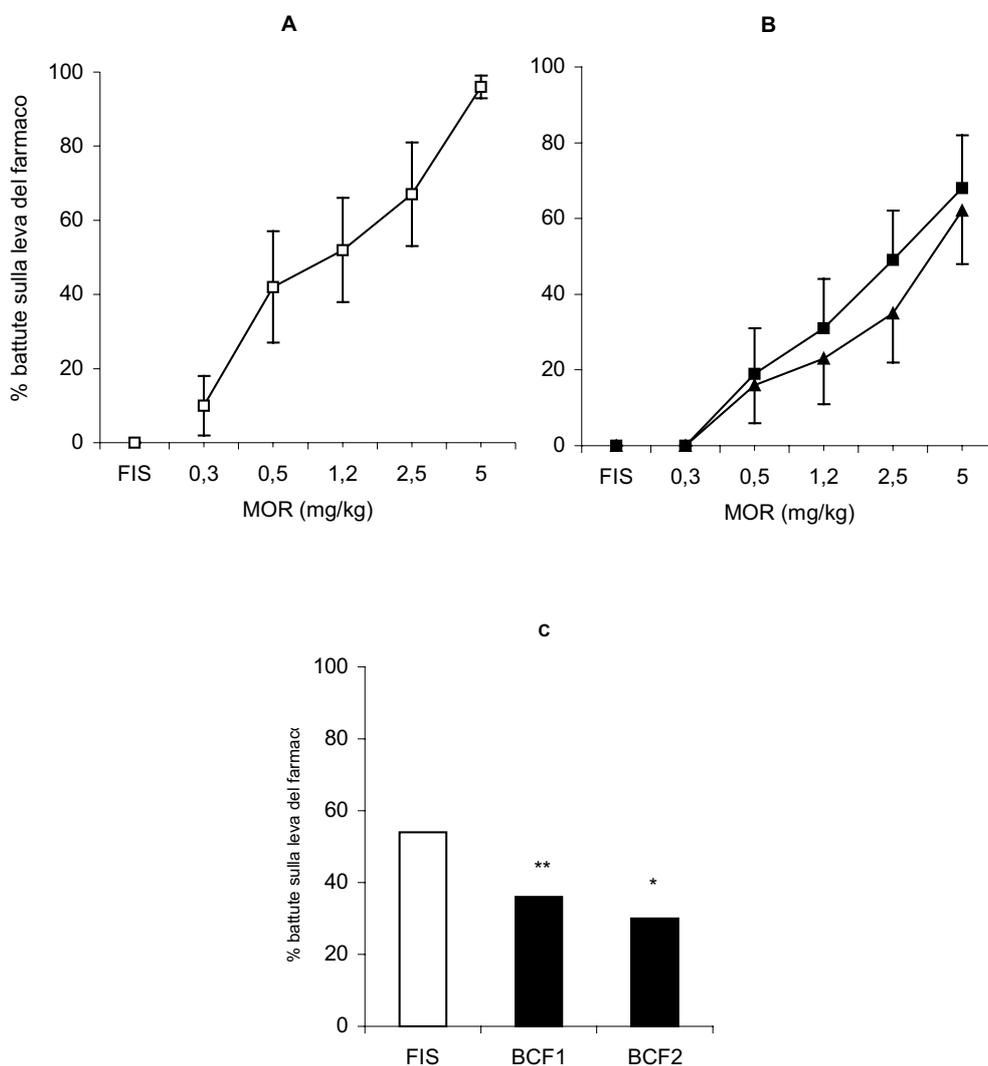
La ANOVA mostra un aumento delle battute effettuate sulla leva del farmaco all'aumentare della dose di AMF ( $F=23,51$ ; g.l. 3/137;  $P < 0,01$ ) e una **diminuzione nella capacità degli animali di discriminare AMF in seguito del trattamento ripetuto con BCF** ( $F=3,66$ ; g.l. 1/137;  $P=0,05$ ). Non è invece significativa l'interazione "dose x trattamento" ( $F < 1$ ); pertanto l'effetto del trattamento con

l'agonista GABA<sub>B</sub> non varia al variare delle dosi di psicostimolante somministrato. Non esiste inoltre una differenza significativa fra gli animali appartenenti ai due gruppi ( $F < 1$ ), né sono significative le interazioni "gruppo x dose" ( $F = 1$ ), "gruppo x trattamento" ( $F < 1$ ), "gruppo x dose x trattamento" ( $F = 1,21$ ; g.l. 3/137; NS).

**Esperimento 7A: effetto della co-somministrazione di baclofen sulle proprietà discriminative della morfina.**

Per questo esperimento sono stati utilizzati 14 animali allenati a discriminare MOR 5 da FIS, i quali sono stati saggiati dopo aver raggiunto un criterio stabile di discriminazione. Per la procedura si veda esperimento 6A.

Prima del test gli animali ricevevano una 1° iniezione con FIS o BCF (1-2) e una 2° iniezione con FIS o MOR alle varie dosi (0,3; 0,6; 1,25; 2,5, 5) dopo 15' dalla prima. Dopo un intervallo di tempo di 30', durante il quale i ratti sono stati posti nelle loro gabbie di stabulazione, gli animali sono stati testati per 30' nelle gabbie sperimentali. I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante una analisi della varianza applicata ad un disegno a due fattori (trattamenti, dose) e successivi confronti effettuati con il  $t$  di Dunnett e riportati in **figura 15**.



**Figura 15:** scelta della leva in ratti allenati a discriminare MOR da FIS dopo somministrazione di diverse dosi di AMF da sola (grafico A) o associata a due dosi di BCF (grafico B: ■ 1mg/kg; ▲ 2mg/kg) ed effetti medi dei tre trattamenti (grafico C). I valori rappresentano la media di 8-14 animali  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo di controllo (FIS) : \*  $P < 0,05$  - \*\* $P < 0,01$ .

Come evidente dal grafico, il BCF, quando somministrato singolarmente, non generalizza con la MOR, dal momento che la % di battute effettuate sulla leva del farmaco dagli animali trattati con il BCF associato a FIS è analoga a quella effettuata

dagli animali trattati con FIS. Per quanto riguarda invece la co-somministrazione di BCF e MOR l'ANOVA mette in evidenza una differenza significativa tra i trattamenti ( $F=6,50$ ; g.l. 2/179;  $P<0,01$ ) e tra le dosi ( $F=15,56$ ; g.l. 5/179;  $P<0,01$ ), mentre non è significativa l'interazione "trattamenti x dose" ( $F<1$ ). Questo mostra come l'effetto della co-somministrazione di BCF si presenti in maniera omogenea per tutte le dosi di MOR; per questo motivo le successive analisi sono state condotte sul totale delle dosi e hanno mostrato come il **BCF riduca efficacemente, e in maniera dose-dipendente, la capacità degli animali di discriminare MOR**, dal momento che per entrambe le dosi di farmaco si assiste ad una riduzione significativa della scelta della leva del farmaco che appare però più marcata per la dose maggiore (BCF(1)  $t= 2,31$ ; g.l. 179;  $P<0,05$  – BCF(2)  $t= 3,48$ ; g.l. 179;  $P<0,01$ ).

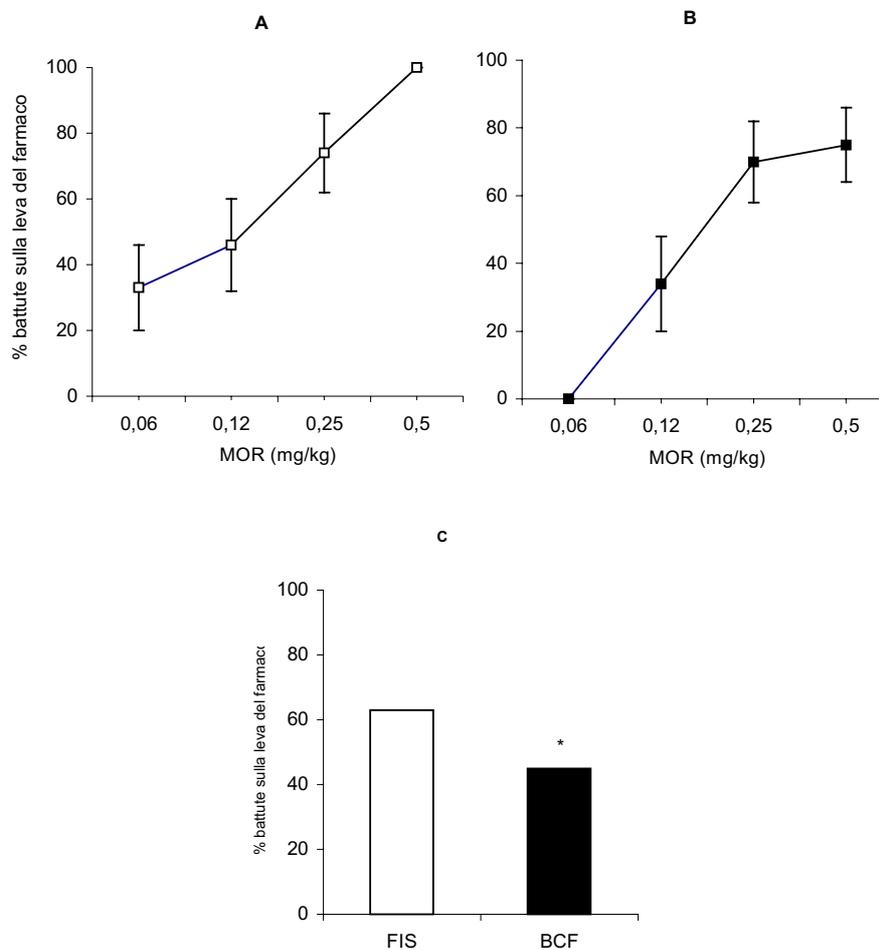
#### **Esperimento 7B: effetto di un trattamento ripetuto con baclofen sulle proprietà discriminative della morfina.**

Per questo esperimento sono stati utilizzati 14 animali allenati a discriminare MOR 5 da FIS, suddivisi in due gruppi da 7 animali ciascuno, denominati A e B. Una volta raggiunto un criterio stabile di discriminazione sui soli animali appartenenti al gruppo A è stato condotto un **esperimento preliminare** allo scopo di verificare la validità della procedura sperimentale poi utilizzata nell'esperimento (vedi discussione).

Gli animali di entrambi i gruppi hanno poi ricevuto un primo trattamento cronico con soluzione fisiologica della durata di 10 giorni. Alla conclusione del trattamento cronico sono state eseguite le prove test. Per la procedura si veda esperimento 7B. Prima del test gli animali hanno ricevuto una iniezione con MOR (0,6; 1,25; 2,5; 5) e sono stati posti nelle gabbie sperimentali per 30' al fine di costruire una curva di generalizzazione della morfina. Dopo due settimane di ri-allenamento gli animali hanno ricevuto, con le stesse modalità del trattamento precedente, un secondo trattamento cronico con BCF (2). Al termine di esso è stata costruita una nuova curva di generalizzazione della MOR. Lo schema sottostante riassume tempi e trattamenti per l'esperimento:

Gruppo	10 gg	4 gg	10 gg	10 gg	4 gg
A	FIS	TEST1	All	BCF	TEST2
B	FIS	TEST1	All	BCF	TEST2

I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante una analisi della varianza applicata ad un disegno a 3 fattori (gruppo, trattamento, dose) e riportati in **figura 16**.



**Figura 16:** scelta della leva in funzione di diverse dosi di MOR in ratti allenati a discriminare MOR da FIS in due diverse prove: TEST 1 dopo trattamento cronico con FIS (grafico A), TEST 2 dopo trattamento cronico con BCF (grafico B) ed effetti medi dei due trattamenti (grafico C). I valori rappresentano la media di 10-13 animali  $\pm$  ES. Statisticamente differente dal gruppo (FIS): \*P<0,05.

I dati che presentavano contemporaneamente valori di F.R.F. > 17 e percentuali di risposta sulla leva selezionata < 99 sono stati omessi dall'analisi.

La ANOVA mostra un aumento delle battute effettuate sulla leva del farmaco all'aumentare della dose di MOR (F=15,22; g.l. 3/81; P<0,01) e una **diminuzione nella capacità degli animali di discriminare MOR in seguito del trattamento ripetuto con BCF** (F=4,32; g.l. 1/81; P<0,05). Non è invece significativa l'interazione "dose x trattamento" (F<1); pertanto l'effetto del trattamento con l'agonista GABA<sub>B</sub> non varia al variare delle dosi di psicostimolante somministrato. Non esiste inoltre una differenza significativa fra gli animali appartenenti ai due gruppi (F=2,93; g.l. 1/81; NS) né sono significative le interazioni "gruppo x dose" (F<1), "gruppo x trattamento" (F<1), "gruppo x dose x trattamento" (F<1).

### Discussione

I risultati ottenuti con la nostra ricerca hanno evidenziato che una facilitazione della trasmissione GABAergica è in grado di antagonizzare le proprietà discriminative dell'amfetamina e della morfina nel ratto, bloccandone l'espressione.

Nello specifico la somministrazione dell'agonista GABA<sub>B</sub> baclofen, in associazione a diverse dosi di amfetamina, determina uno spostamento significativo verso destra della curva dose-risposta del farmaco, indice di una diminuzione degli effetti soggettivi dell'amfetamina percepiti dall'animale.

L'effetto del farmaco è da ricercarsi probabilmente in un antagonismo diretto del B sull'A, che impedisce all'animale di riconoscere la sostanza a cui è allenato. Tale effetto è presumibilmente correlato con la riduzione nel rilascio di DA dovuta alla stimolazione GABAergica a livello mesolimbico. Numerosi studi indicano un ruolo modulatore del GABA a livello della trasmissione dopaminergica mesolimbico, dal momento che neuroni a trasmissione GABAergica presenti nel NA e nel pallido ventrale proiettano verso la ATV realizzando un sistema di feedback inibitorio (60).

L'antagonismo prodotto dal baclofen potrebbe essere determinato dalla stimolazione dei recettori GABA<sub>B</sub> presenti sui corpi cellulari dei neuroni dopaminergici nell'ATV,

con conseguente diminuzione del rilascio di DA nel NA. Microiniezioni di baclofen (<100ng) nella ATV si sono infatti dimostrate più efficaci nel ridurre i livelli di DA rispetto a quelle praticate direttamente nel NA e nello striato (32).

Numerose evidenze sperimentali sanciscono il coinvolgimento della trasmissione dopaminergica mesolimbica nelle proprietà discriminative della amfetamina; anche le proprietà discriminative della morfina sarebbero, almeno in parte, conseguenti all'attivazione della trasmissione dopaminergica in quest'area (99); lo dimostra il fatto che lo stimolo discriminativo indotto dall'oppiaceo viene potenziato dall'amfetamina, che può essere considerata un agonista dopaminergico indiretto (39). In particolare la somministrazione diretta nella ATV di una dose di morfina 1000 volte inferiore a quella somministrata in maniera sistemica produce una completa generalizzazione con essa, indice di un coinvolgimento diretto di quest'area nella mediazione degli effetti discriminativi dell'oppiaceo (99).

In maniera del tutto analoga a quanto visto con l'amfetamina, anche la somministrazione di baclofen in associazione a diverse dosi di morfina determina un significativo spostamento verso destra della curva dose-risposta, indice di una riduzione significativa della capacità di discriminare l'oppiaceo. L'effetto è dose-dipendente, dal momento che risulta più marcato per la dose di 2mg/kg. D'altra parte evidenze bibliografiche dimostrano che il baclofen limita, con un effetto dose-dipendente, anche l'aumento dei livelli extracellulari di dopamina che fa seguito alla somministrazione di morfina (36).

Il BCF non generalizza né con l'amfetamina, né con la morfina. Quando somministrato da solo il farmaco produce nel ratto uno stato interno diverso da entrambe le sostanze; l'animale risponde premendo la leva corrispondente alla fisiologica e non quella del farmaco di allenamento. Il dato è in accordo con quanto riportato da Munzar (79) in ratti allenati a discriminare metamfetamina da soluzione fisiologica. Infatti, anche in quel caso, il baclofen non dimostrò, a dosi paragonabili a quelle da noi utilizzate, alcun effetto metamfetamino-simile.

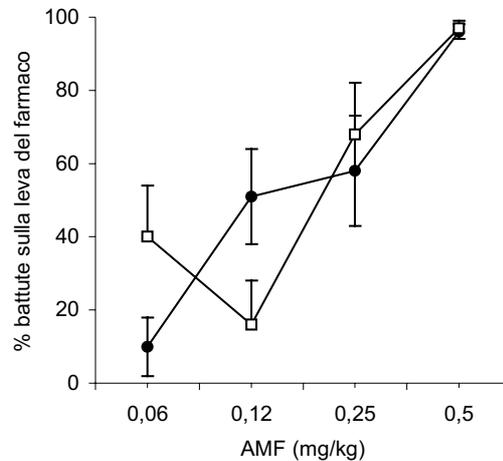
Se questi studi permettono di avere chiaro un primo effetto del farmaco oggetto di studio, e cioè la sua capacità antagonizzante nei confronti degli effetti indotti da una

co-somministrazione di amfetamina o morfina, gli esperimenti 6B e 7B hanno una maggiore valenza dal punto di vista applicativo, data dallo studio del ruolo del farmaco nella modulazione dei neuroadattamenti che si verificano in seguito alla dipendenza dovuta all'esposizione ripetuta ad una sostanza.

L'esperimento 6B ha dimostrato che, in animali allenati a riconoscere gli effetti soggettivi dell'amfetamina, la sospensione per un periodo di 10 giorni dall'assunzione del farmaco di allenamento e il contemporaneo trattamento con il BCF riduce la sensibilità degli animali agli effetti soggettivi dello psicostimolante: il farmaco sembra quindi essere in grado di agire anche in assenza di amfetamina.

La procedura da noi seguita per l'esperimento 6B, e poi riproposta per il 7B, è analoga a quella utilizzata da Barret (7) e da Young (133) per valutare gli effetti di un trattamento cronico sulle proprietà discriminative di un farmaco. Diversamente dal modo classico di operare, utilizzato per valutare gli effetti di una co-somministrazione, nel quale i tests vengono eseguiti 2 volte a settimana, alternati e sessioni di allenamento, le prove test sono state condotte in 4 giorni consecutivi, ed eseguite dopo un periodo di trattamento cronico durante il quale l'allenamento era sospeso.

Al fine di verificare la validità di questo metodo abbiamo eseguito un test preliminare sulla metà degli animali (gruppo A) per i quali è stata ottenuta, utilizzando la "nuova procedura", una curva di generalizzazione dell'amfetamina dopo un trattamento cronico con soluzione fisiologica per un periodo di 10 giorni durante i quali è stato sospeso il normale allenamento.



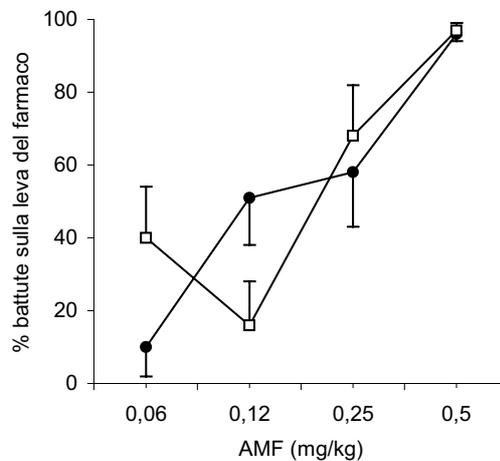
**Figura 17:** curva di generalizzazione della AMF ottenuta con la “nuova procedura” in ratti allenati a discriminare AMF da FIS. I valori rappresentano la media di 8 animali  $\pm$  ES.

La curva presenta l'andamento di una normale curva di generalizzazione dell'amfetamina, analoga a quella ottenuta con l'esperimento 6A, condotto utilizzando il metodo classico, e in accordo con quanto ottenuto in precedenza nel nostro (40) e in altri (132) laboratori. All'aumentare delle dosi di amfetamina corrisponde, infatti, un lineare aumento delle battute effettuate sulla leva del farmaco e quando si raggiunge la dose di allenamento la totalità degli animali riconosce il farmaco. Ciò conferma che la sospensione dell'allenamento e la mancanza di allenamenti tra le prove test non deteriora le capacità discriminative dell'animale(133). Un allenamento alla discriminazione sembra invece essere necessario nel periodo che precede l'esposizione ad un nuovo trattamento cronico (11).

Si potrebbe obiettare che la ripetizione della procedura (cronico, test) deteriori la capacità discriminativa dell'animale nonostante il ri-allenamento e che sia questo il motivo per cui si osserva una riduzione della scelta della leva della amfetamina, piuttosto che un reale effetto del trattamento con il baclofen. E' stata pertanto

condotta una analisi sugli animali del solo gruppo A, per i quali è stata confrontata la curva ottenuta per il test preliminare con quella ottenuta nel TEST 1.

Gruppo	10 gg	4 gg	10 gg	4 gg	10 gg	10 gg	4 gg
A	FIS	TEST preliminare	FIS	TEST1	All	BCF(2)	TEST2



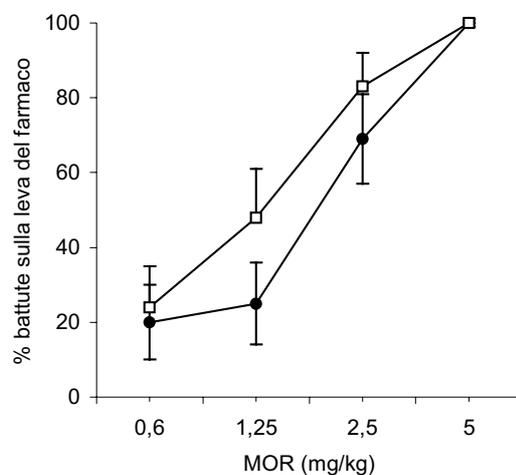
**Figura 18:** scelta della leva in ratti allenati a discriminare AMF da FIS: ● TEST-preliminare; □ TEST 1. I valori rappresentano la media di 8-10 animali  $\pm$  ES.

Dall'analisi non emerge una differenza significativa fra le due prove test ( $F < 1$ ); ciò conferma che il ripetersi della procedura e il tempo trascorso non influenzano le capacità discriminative degli animali e che lo spostamento verso destra della curva osservato nell'esperimento è dovuto esclusivamente all'effetto farmacologico del trattamento ripetuto con BCF.

Come già sottolineato, animali allenati a riconoscere gli effetti soggettivi dell'amfetamina ricevono il farmaco 2-3 volte a settimana per diverse settimane; ciò potrebbe determinare modificazioni neuroadattative a livello del sistema mesolimbico, come si ritiene accada nei soggetti tossicodipendenti. E' quindi

possibile che la somministrazione ripetuta di baclofen agisca su tali circuiti riportandoli “alla normalità”. L’azione del baclofen potrebbe essere dovuta anche in questo caso all’attivazione di recettori GABA<sub>B</sub> presenti sui corpi cellulari dei neuroni dopaminergici nella ATV, con conseguente inibizione di tali neuroni e diminuzione del rilascio di dopamina nel NA (36). Tale riduzione prolungata della trasmissione dopaminergica potrebbe essere in grado quindi di ripristinare condizioni basali, alteratesi durante l’allenamento alla discriminazione. D’altra parte, sia dati di letteratura che gli esperimenti di motilità descritti nel CAP. 1 suggeriscono un ruolo modulatore del baclofen laddove vi sia un’alterazione significativa dell’attività dopaminergica (9, 10).

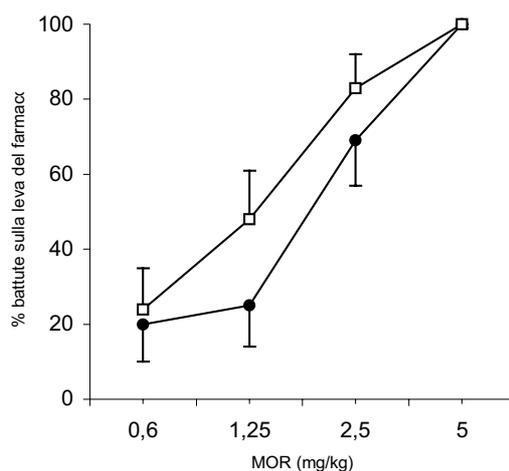
Analogamente all’esperimento 6B anche per il 7B si è svolta una parte preliminare per la validazione della procedura sperimentale. Anche se amfetamina e morfina sembrano agire attraverso gli stessi circuiti non è infatti scontato che il modello da noi utilizzato possa essere valido per entrambe. Al fine di verificare la validità di questo metodo abbiamo eseguito anche in questo caso e analogamente a quanto riportato per l’esperimento 6B, un test preliminare sulla metà degli animali (gruppo A) per i quali è stata ottenuta, utilizzando la “nuova procedura”, una curva di generalizzazione dopo un trattamento cronico con soluzione fisiologica per un periodo di 10 giorni durante i quali è stato sospeso l’allenamento.



**Figura 19:** curva di generalizzazione della MOR ottenuta con la “nuova procedura” in ratti allenati a discriminare MOR da FIS. I valori rappresentano la media di 7 animali  $\pm$  ES.

La curva presenta l'andamento di una normale curva di generalizzazione della morfina, analoga a quella ottenuta con l'esperimento 6B, condotto utilizzando il metodo classico. Anche in questo caso all'aumentare delle dosi di morfina corrisponde un lineare aumento delle battute effettuate sulla leva del farmaco e quando si raggiunge la dose di allenamento la totalità degli animali riconosce il farmaco. Ciò conferma che, anche in animali allenati a discriminare morfina, la sospensione dell'allenamento e la mancanza di allenamenti tra le prove test non deteriora le capacità discriminative dell'animale. Anche in questo caso è stata condotta un'ulteriore analisi sugli animali del solo gruppo A, per i quali è stata confrontata la curva ottenuta in un test preliminare con quella ottenuta nel TEST 1 per escludere che la ripetizione della procedura possa essere responsabile della perdita della capacità di discriminare da parte degli animali.

Gruppo	10 gg	4 gg	10 gg	4 gg	10 gg	10 gg	4 gg
A	FIS	TEST preliminare	FIS	TEST1	All	BCF(2)	TEST2



**Figura 20:** scelta della leva in ratti allenati a discriminare MOR da FIS: ● TEST-preliminare; □ TEST 1. I valori rappresentano la media di 7 animali  $\pm$  ES.

L'analisi conferma come questa curva non differisca da quella ottenuta con il metodo classico ( $F < 1$ ). Ciò conferma la validità della procedura utilizzata anche in animali allenati a discriminare morfina.

I risultati della nostra ricerca evidenziano che l'esposizione cronica al baclofen, somministrato per 10 giorni alla dose di 2 mg/kg, è in grado di attenuare le proprietà discriminative della morfina. Anche in questo caso la somministrazione ripetuta di baclofen potrebbe agire sui circuiti alterati nel corso dell'allenamento riportandoli a livelli di "normalità", in accordo con quanto osservato nel CAP.1 in prove di motilità, nelle quali un trattamento ripetuto con il farmaco si è dimostrato efficace nel "desensibilizzare" animali precedentemente sensibilizzati alla morfina.

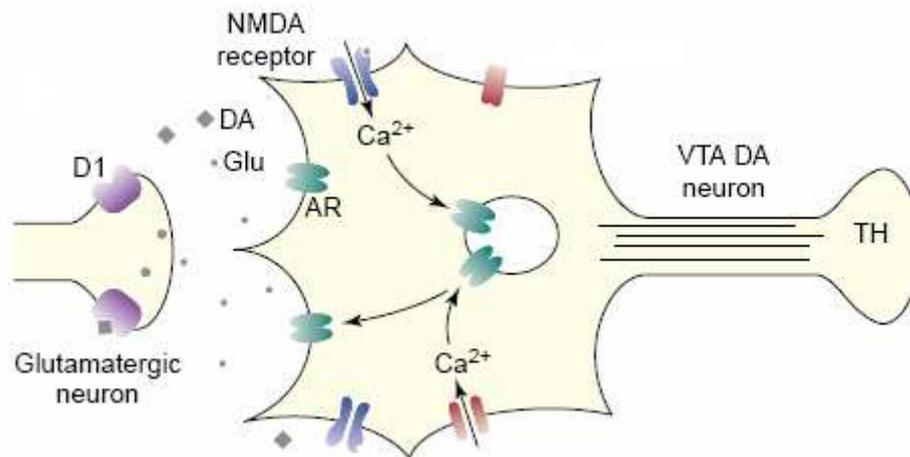
A questo si aggiunge il fatto che il BCF si è dimostrato in grado di riequilibrare la densità dei recettori oppioidi di tipo  $\mu$  che risulta alterata a seguito di una

esposizione ripetuta all'oppiaceo. Infatti sembra che la risposta dell'organismo alla crisi d'astinenza, simulata in laboratorio tramite somministrazione di naloxone, sia di aumentare il numero dei recettori  $\mu$  per facilitare il legame con la morfina. Il trattamento con il baclofen previene questo adattamento dell'organismo (30), rendendolo di fatto meno sensibile ad un successivo contatto con l'oppiaceo.

## **CAP.4: MODULAZIONE GLUTAMMATERGICA DELLE PROPRIETA' DISCRIMINATIVE DELL' AMFETAMINA**

### Introduzione

Della capacità dell'amfetamina di influire anche sulla trasmissione glutammatergica abbiamo già discusso (vedi CAP.2). Quello che sembra importante chiarire è che il coinvolgimento del glutammato appare fondamentale sia nell'apprendimento dello stimolo discriminativo associato ad una sostanza che nella sua espressione, a causa sia del suo ruolo modulatorio sullo stimolo dopaminergico, che per i suoi effetti dopamino-indipendenti. La capacità di imparare ad eseguire un determinato comportamento in presenza di uno specifico stimolo, che costituisce l'evento principale della discriminazione, può essere classificata come un tipo di apprendimento stimolo-risposta e, come tale, si origina in seguito a cambiamenti nei circuiti neuronali responsabili della percezione dello stimolo, del movimento effettuato in risposta allo stimolo stesso e di quelli di connessione. Tali cambiamenti sono dipendenti dal glutammato e chiamano in causa i fenomeni di LTP e LTD. La LTP è un incremento a lungo termine dei potenziali post-sinaptici eccitatori dei neuroni e richiede che simultaneamente vi siano l'attivazione delle sinapsi e la depolarizzazione di tali neuroni. La LTD è, invece, una diminuzione a lungo termine della eccitabilità di un neurone per un particolare input sinaptico, causata dalla stimolazione del bottone terminale mentre la membrana post-sinaptica è iperpolarizzata o debolmente polarizzata. Un modello semplificato del meccanismo prevede che la combinazione fra depolarizzazione post-sinaptica e attivazione dei recettori NMDA incrementi l'ingresso del  $Ca^{2+}$  all'interno della cellula. Questo, attraverso una cascata di secondi messaggeri, determina l'inserimento sul neurolemma di recettori AMPA, rendendo il neurone più sensibile al glutammato e generando un potenziale post-sinaptico più ampio (29).



AR= recettore AMPA

*TRENDS in Neurosciences* Vol.25 No.12 December 2002

Questi fenomeni sono alla base dei processi cognitivi, dell'apprendimento e della memoria, processi che chiaramente sono alla base, come ampiamente dimostrato da evidenze bibliografiche (41), anche dell'espressione dello stimolo discriminativo associato agli effetti di una sostanza. Appare quindi evidente come l'effetto che l'amfetamina ha di aumentare la trasmissione glutammatergica trovi una applicazione anche per spiegare la capacità di questo farmaco di generare uno stimolo discriminativo e sembra logico presupporre che sostanze agenti sulla trasmissione glutammatergica possano modulare tale stimolo.

Studi recenti hanno dimostrato che l'effetto della DCS sulle proprietà discriminative dell'amfetamina comporta una attenuazione di queste ultime quando il farmaco viene somministrato in acuto, in combinazione con diverse dosi di amfetamina. Ciò può suggerire che la DCS, a seguito della facilitazione della trasmissione glutammatergica da essa determinata, vada ad interferire con lo stimolo discriminativo indotto dall'amfetamina co-somministrata (40).

Il nostro studio si è proposto di valutare il possibile impiego della DCS come intervento terapeutico mirato al trattamento della tossicodipendenza, il quale richiederebbe un trattamento ripetuto con il farmaco, somministrato in assenza della

sostanza abusata, e implicherebbe la capacità del farmaco di agire sui neuroadattamenti instauratisi a livello sinaptico e responsabili della dipendenza.

### Scopo dell'esperimento

- Valutare gli effetti di un trattamento cronico con DCS sulla capacità di discriminare amfetamina (**esperimento 8**).

### Materiali e metodi

#### *Animali*

(vedi capitolo 3)

#### *Farmaci*

d-amfetamina solfato

d-cicloserina

somministrati ip dopo dissoluzione in soluzione fisiologica.

Le dosi riportate sono sempre espresse in mg/kg.

#### *Apparato e procedura*

(vedi capitolo 3)

### Risultati

#### **Esperimento 8: effetto di un trattamento ripetuto con D-cicloserina sulle proprietà discriminative dell'amfetamina.**

Per questo esperimento sono stati utilizzati 18 animali allenati a discriminare AMF 0,5 da soluzione fisiologica suddivisi in due gruppi da 8-10 animali ciascuno, denominati A(controllo) e B (trattamento).

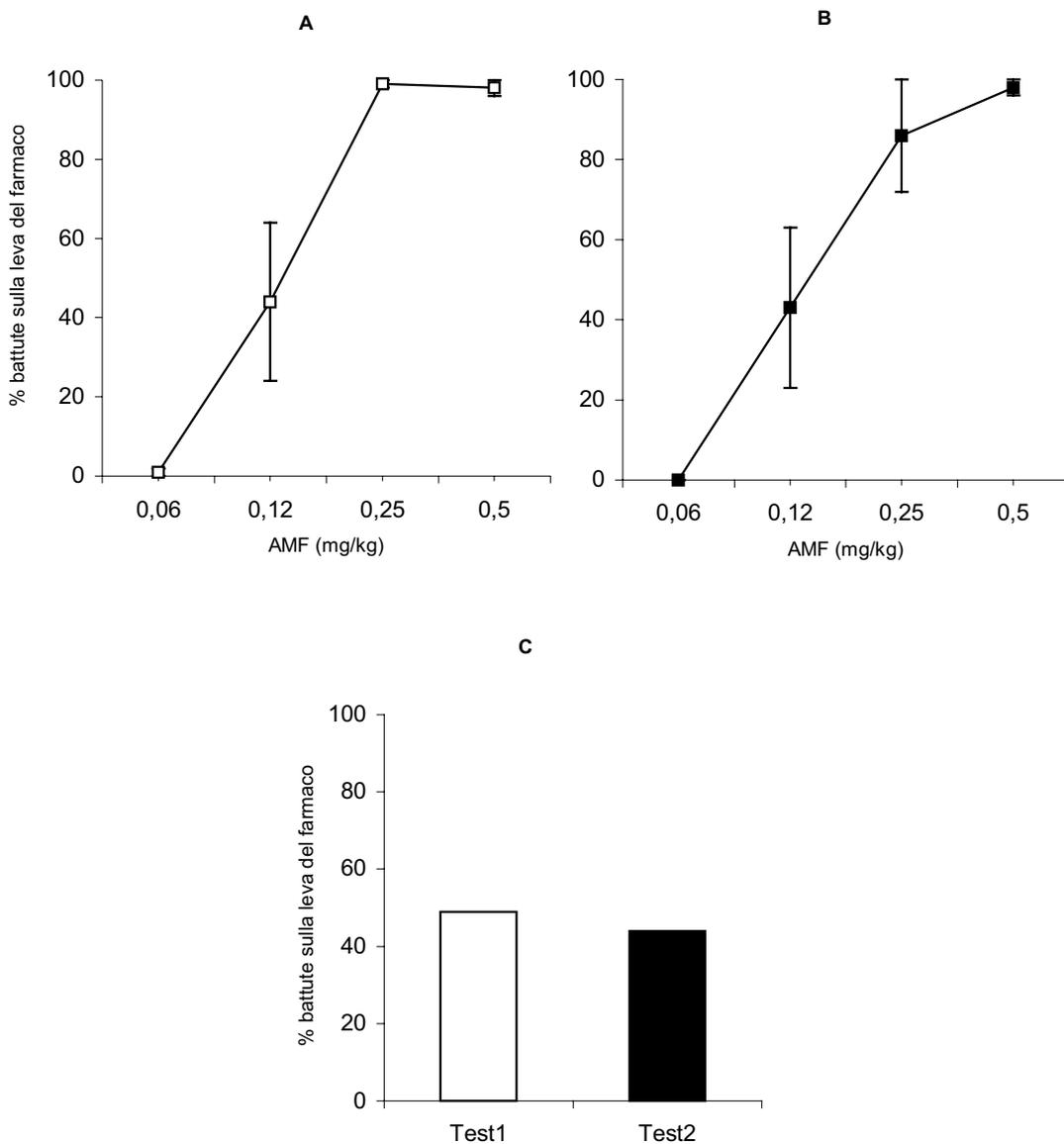
Una volta raggiunto un criterio stabile di discriminazione gli animali di entrambi i gruppi hanno ricevuto un primo trattamento cronico con soluzione fisiologica della durata di 10 giorni. Alla conclusione del trattamento cronico sono state eseguite le prove test. Per la procedura si veda esperimento 7B.

Prima del test gli animali hanno ricevuto una iniezione con AMF (0,06; 0,125; 0,25; 0,50) o FIS e sono stati posti nelle gabbie sperimentali per 15' al fine di costruire una

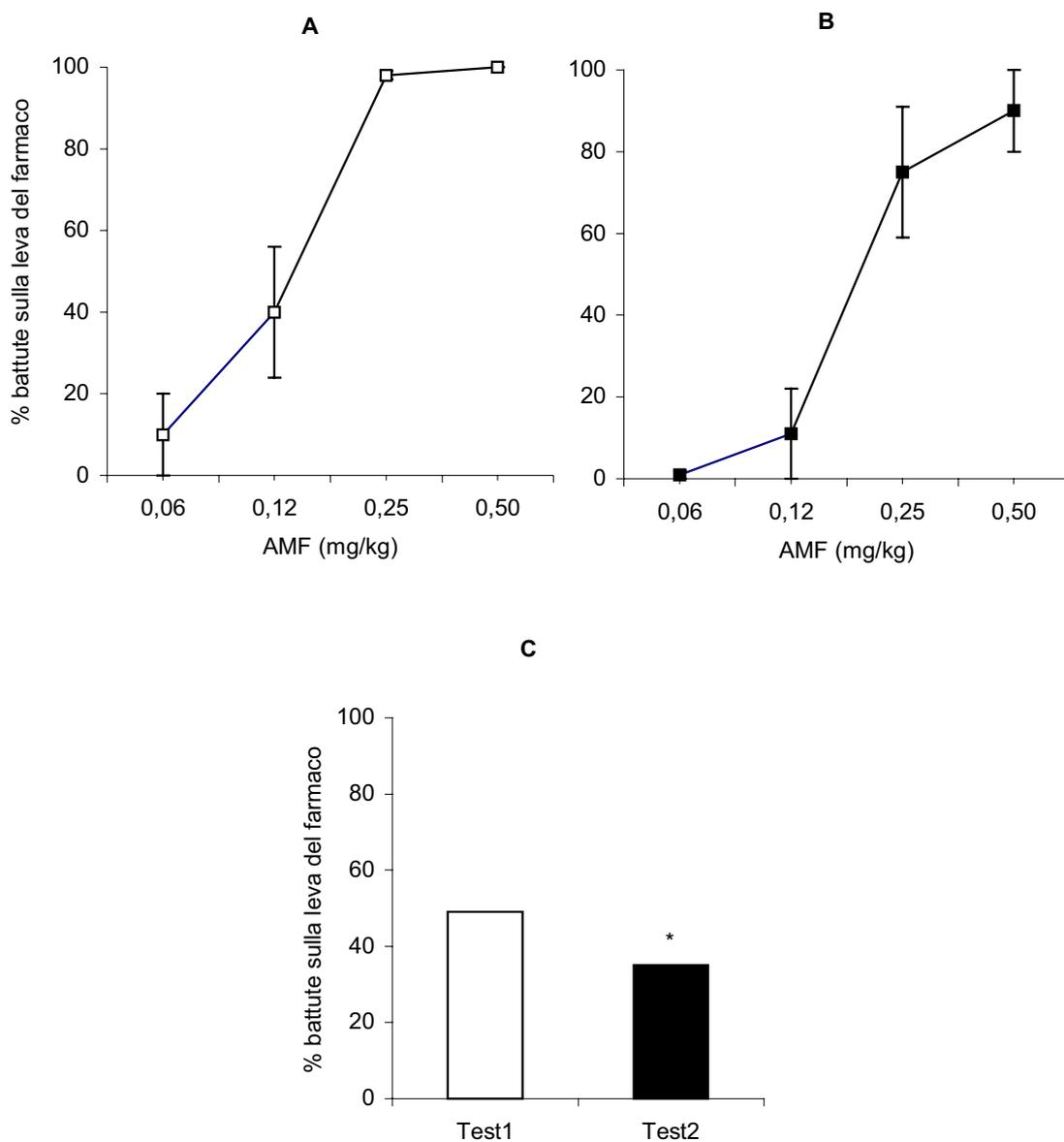
curva di generalizzazione della amfetamina. Dopo tre settimane di ri-allenamento gli animali hanno ricevuto, con le stesse modalità del trattamento precedente, un secondo trattamento cronico con FIS (controllo) o DCS (6) (trattamento). Al termine di esso è stata costruita una nuova curva di generalizzazione della amfetamina. Lo schema sottostante riassume tempi e trattamenti per l'esperimento:

<b>Gruppo</b>	<b>10gg</b>	<b>5gg</b>	<b>15gg</b>	<b>10gg</b>	<b>5gg</b>
<b>A</b>	FIS	TEST1	All	FIS	TEST2
<b>B</b>	FIS	TEST1	All	DCS	TEST2

I risultati ottenuti sono stati analizzati, all'interno di ciascun gruppo, mediante una analisi della varianza applicata ad un disegno a 2 fattori (test, dose) e riportati nelle **figure 20 e 21**.



**Figura 20:** scelta della leva in funzione di diverse dosi di AMF in ratti allenati a discriminare AMF da FIS prima (TEST1) (grafico A) e dopo (TEST2) (grafico B) il trattamento cronico con FIS ed effetti medi dei due test (grafico C). I valori sono la media di 7-8 animali  $\pm$  ES.



**Figura 21:** scelta della leva in funzione di diverse dosi di AMF in ratti allenati a discriminare AMF da FIS prima (TEST1) (grafico A) e dopo (TEST2) (grafico B) il trattamento cronico con DCS ed effetti medi dei due test (grafico C). I valori sono la media di 8-10 animali  $\pm$  ES. Significativamente differente dal TEST 1: \* $P < 0,05$ .

Per quanto riguarda il gruppo di animali che hanno ricevuto il trattamento cronico con FIS la ANOVA mostra un aumento delle battute effettuate sulla leva del farmaco all'aumentare della dose di AMF ( $F=41,02$ ; g.l. 3/53;  $P<0,01$ ) e **nessun effetto** sulla scelta leva **a seguito del trattamento ripetuto con FIS** ( $F<1$ ). Non è altresì significativa l'interazione "dose x trattamento" ( $F<1$ ); pertanto possiamo dire che la sospensione dell'allenamento per un periodo di 10 giorni e l'esecuzione delle prove tests in giorni consecutivi e senza allenamenti intermedi non modificano la capacità degli animali di discriminare il farmaco di allenamento.

Per quanto riguarda il gruppo di animali cronicamente trattati con DCS, l'ANOVA mostra un aumento delle battute effettuate sulla leva del farmaco all'aumentare della dose di AMF ( $F=39,60$ ; g.l. 3/68;  $P<0,01$ ) e **una diminuzione nella capacità degli animali di discriminare AMF a seguito del trattamento ricevuto** ( $F=6,17$ ; g.l. 1/68;  $P<0,05$ ). Non è invece significativa l'interazione "dose x trattamento" ( $F<1$ ); pertanto l'effetto del trattamento con DCS non varia al variare delle dosi di psicostimolante somministrato.

### Discussione

I risultati ottenuti con la nostra ricerca hanno evidenziato che il trattamento ripetuto con la DCS riduce la sensibilità degli animali agli effetti soggettivi della amfetamina. L'effetto dell'agonista per il sito della glicina del recettore NMDA non si realizza quindi solo quando esso viene somministrato in associazione all'amfetamina (40), ma anche quando lo psicostimolante non è più presente.

La DCS sembra essere in grado di agire sulle modificazioni neuroadattative che si realizzano a livello mesolimbico a seguito del contatto ripetuto con l'amfetamina durante la fase di allenamento alla discriminazione.

Il glutammato esercita un'azione regolatoria complessa sul rilascio di dopamina a livello mesolimbico. Nello specifico il glutammato endogeno esercita un controllo tonico sul rilascio di DA stimolo-indipendente (quando il recettore NMDA è occupato da agonisti si ha una promozione del rilascio di DA, quando è occupato da antagonisti si ha una inibizione di tale rilascio), mentre esercita un controllo fasico

sul rilascio di DA stimolo-dipendente (quando si ha un aumento nella secrezione di DA dovuto ad uno stimolo, per esempio alla somministrazione di amfetamina, la presenza di glutammato inibisce la secrezione della DA stessa), al fine di mantenere il corretto equilibrio fisiologico fra i neurotrasmettitori. La somministrazione di un promotore della trasmissione glutammatergica come la DCS in soggetti in cui è presente un incremento della secrezione di DA dipendente dalla AMF potrebbe quindi potenziare questo meccanismo endogeno e, inibendo in parte il rilascio di dopamina, determinare una riduzione della sensibilità degli animali alla amfetamina e una conseguente riduzione della loro capacità di discriminarla (130).

D'altra parte, sia i dati di letteratura che gli esperimenti di motilità descritti nel CAP.2 suggeriscono un ruolo modulatorio della DCS laddove vi sia un'alterazione significativa dell'attività dopaminergica e la capacità di un trattamento ripetuto con il farmaco di agire a livello dei sistemi neuronali inducendo a sua volta neuroadattamenti che contrastano e annullano quelli causati dall'assunzione dello psicostimolante, ripristinando il normale stato fisiologico.

Possiamo ipotizzare che la somministrazione di DCS sia in grado di indurre dei neuroadattamenti nei circuiti neuronali coinvolti nella LTP, in particolare l'amigdala e l'ippocampo. Studi in vitro hanno dimostrato che la DCS è in grado, nonostante la sua attività di agonista NMDA, di ridurre la trasmissione glutammatergica AMPA-mediata (88), facilitando l'internalizzazione del recettore e riducendo l'incremento del potenziale sinaptico. Studi clinici e pre-clinici hanno rivelato una buona efficacia della DCS nei test di estinzione di comportamenti condizionati, i quali forniscono un metodo per valutare la capacità del soggetto di "disimparare" a riconoscere uno stimolo al quale era stato abituato. Somministrazioni sistemiche (o intra-amigdala) di DCS sono in grado di facilitare l'estinzione della place-preference indotta da cocaina nel ratto (13); allo stesso modo, analoghe somministrazioni del farmaco si sono dimostrate efficaci nel facilitare anche l'estinzione della paura condizionata sia nel ratto (114) che nell'uomo (46). La DCS sembra agire, non cancellando la memoria precedentemente instauratasi, ma dando luogo ad un nuovo apprendimento che in pratica impedisce l'espressione della memoria originale. Proprio questo fa

presupporre che, in un esperimento di discriminazione, la DCS faciliti in qualche modo, intervenendo sui circuiti che regolano l'apprendimento, la perdita della capacità di discriminare, che si traduce in una mancata espressione delle proprietà discriminative del farmaco.

Nel presente esperimento l'attendibilità della procedura è confermata dal fatto che gli animali del gruppo di controllo non mostrano alcuna modificazione nella scelta della leva dopo il trattamento ripetuto con la soluzione fisiologica. Questo conferma che la sospensione dell'allenamento durante il trattamento e la mancanza di allenamenti tra le prove test (133) non deteriora le capacità discriminative dell'animale, come per altro già discusso nel CAP 3.

Un'altra possibile interpretazione di questi risultati è data dal fatto che la somministrazione intermittente e per un periodo prolungato di amfetamina che si verifica durante l'allenamento fa sì che vi sia la possibilità che si instauri una sensibilizzazione nei confronti delle proprietà stimolo-discriminative del farmaco.

La sensibilizzazione alle proprietà discriminative non è un'evento facilmente dimostrabile, tuttavia è stato recentemente verificato che la somministrazione di metamfetamina nelle due settimane antecedenti l'allenamento alla discriminazione determina un significativo spostamento a sinistra della curva di generalizzazione del farmaco, indice dell'instaurarsi di una sensibilizzazione, che ha una durata di almeno sei mesi e comporta neuroadattamenti a lungo termine nel SNC. Nel presente esperimento gli animali non ricevono un trattamento ripetuto con amfetamina prima dell'allenamento e non è possibile dimostrare l'avvenuta sensibilizzazione, tuttavia è ragionevole ipotizzarla, vista la modalità di somministrazione del farmaco.

Tenendo conto che la componente di sensibilizzazione rivesta un ruolo importante negli effetti soggettivi che portano l'animale a discriminare la sostanza durante il test, possiamo supporre che il trattamento ripetuto con DCS, che in precedenza si è dimostrato efficace nel desensibilizzare animali sensibilizzati alla AMF (vedi CAP 2) vada a bloccare tale componente, riducendo in maniera significativa la capacità degli animali di riconoscere gli effetti soggettivi del farmaco.

## CONCLUSIONI

BACLOFEN		
	Trattamento combinato	Trattamento cronico
Sensibilizzazione locomotoria	↓ induzione ↓ espressione	<u>Non</u> previene induzione Desensibilizzazione
Proprietà discriminative	↓ espressione	Desensibilizzazione

La tabella riassume quelli che sono i risultati ottenuti con la somministrazione di baclofen, sia in associazione con amfetamina o morfina, sia cronicamente in assenza della sostanza di abuso.

Riassumendo, possiamo affermare che il trattamento combinato del baclofen con amfetamina o morfina si è dimostrato efficace nel bloccare l'induzione e l'espressione della sensibilizzazione locomotoria. In maniera analoga la somministrazione di baclofen in associazione ai due farmaci è in grado di ridurre efficacemente l'espressione delle proprietà discriminative di amfetamina e morfina.

Questi dati sono certamente interessanti, in quanto forniscono una migliore comprensione dei neuroadattamenti e dei meccanismi coinvolti nell'instaurarsi e nel mantenimento di una farmacodipendenza, quello che però appare più utile dal punto di vista applicativo è la capacità del baclofen di desensibilizzare, a seguito di un trattamento ripetuto, animali precedentemente sensibilizzati, con un effetto che si presenta prolungato, se non permanente, nel tempo. Dal momento che l'evento della sensibilizzazione contribuisce allo sviluppo di fenomeni compulsivi come il "drug-taking" e il "drug-craving", che hanno un ruolo fondamentale nell' "addiction", l'efficacia del baclofen nella modulazione della sensibilizzazione comportamentale suggerisce un possibile impiego clinico del farmaco. I dati positivi ottenuti con le prove di discriminazione, per le quali il baclofen si è dimostrato efficace nel ridurre, a seguito di una esposizione cronica, la capacità degli animali di discriminare il farmaco di allenamento, determinando, di fatto, la desensibilizzazione nei confronti

delle proprietà discriminative della sostanza, sono una ulteriore conferma del possibile impiego clinico del farmaco nel recupero del soggetto tossicodipendente.

Che la modulazione del tono gabaergico possa esercitare un ruolo di primo piano nel trattamento della dipendenza è un fatto noto: da anni i promotori della trasmissione gabaergica, ed in particolare i modulatori allosterici dei recettori GABA<sub>A</sub>, come le benzodiazepine, hanno trovato applicazione nel trattamento di soggetti tossicodipendenti. Tuttavia l'efficacia d'azione di questi farmaci sembra ricondursi principalmente alla loro capacità sedativa, che ne suggerisce l'impiego per limitare l'ansia che accompagna le crisi di astinenza, più che ad un effetto specifico sui meccanismi neuronali responsabile dell'instaurarsi e del manifestarsi delle dipendenze e delle ricadute. A questo si aggiunge che queste sostanze possono dare esse stesse marcata dipendenza, accompagnata da sindromi astinenziali in caso di sospensione del trattamento (37).

Il baclofen, invece, per il suo effetto specifico di agonista dei recettori GABA<sub>B</sub>, alle dosi da noi utilizzate e scelte sulla base della letteratura, non causa sedazione a livello centrale, come appare evidente anche dagli studi di motilità discussi nel CAP.1. Questo sembra essere riconducibile alla più specifica localizzazione neuronale dei recettori GABA<sub>B</sub>, che sono localizzati soprattutto a livello delle aree mesolimbiche, con una concentrazione pari all'80% della popolazione sinaptica del NA (91).

Il baclofen è un farmaco di norma ben tollerato, tuttavia mostra alcuni effetti collaterali a carico del SNC, come emicrania e vertigini, e del sistema gastroenterico, come nausea e diarrea. La permanenza della desensibilizzazione, anche dopo un trattamento di soli 10 giorni con il farmaco, fa comunque presupporre che il trattamento non debba essere eccessivamente prolungato o ripetuto frequentemente. Esso è comunque già in fase di sperimentazione clinica in soggetti alcolisti (1) e dipendenti da cocaina (71) e nicotina (25), ed i risultati preliminari sembrano dare un esito positivo (24).

Questo farmaco, pur modulando efficacemente, riducendolo, lo stimolo dopaminergico indotto dalla somministrazione di sostanze, non interferisce con

stimoli fisiologici come il rinforzo associato al cibo o lo stimolo sessuale (73). Questo trova conferma anche nei nostri esperimenti, poiché il baclofen si è dimostrato efficace laddove vi siano delle modificazioni neuroadattative, dovute alla sovrastimolazione esercitata a seguito dell'assunzione di sostanze, ma non dove ci sia un quadro non patologico ma fisiologico. Il baclofen, infatti, non si è dimostrato utile nella prevenzione della sensibilizzazione e della ri-sensibilizzazione, né alla morfina né alla amfetamina. Questo fenomeno, però, può avere una duplice chiave di lettura, e ne evidenzia un limite nell'utilizzo, dal momento che non sembra proteggere, a lungo termine, da eventuali fenomeni di ricaduta.

Sotto questa prospettiva appaiono più incoraggianti i risultati ottenuti con l'agonista parziale ad elevata efficacia per il sito della glicina posto sul recettore NMDA D-cicloserina, i cui risultati sono riassunti nella tabella sottostante:

D-CICLOSERINA		
	Trattamento combinato	Trattamento cronico
Sensibilizzazione	↓ induzione	Previene induzione
locomotoria	↓ espressione	Desensibilizzazione
Proprietà discriminative	↓ espressione	Desensibilizzazione

La DCS si è dimostrata efficace nel bloccare l'induzione e l'espressione della sensibilizzazione all'amfetamina quando co-somministrata in associazione con essa, nel desensibilizzare animali precedentemente sensibilizzati, ma anche nel prevenire l'instaurarsi della sensibilizzazione, sia in animali "naive" allo psicostimolante, sia in animali ex-dipendenti. Risultati analoghi si sono ottenuti anche con prove di discriminazione, dove la co-somministrazione di DCS in associazione con amfetamina si è rivelata in grado di ridurre la capacità degli animali di discriminare l'amfetamina e il trattamento ripetuto con DCS è risultato efficace nel desensibilizzare gli animali nei confronti delle proprietà discriminative della amfetamina, bloccandone l'espressione. I risultati ottenuti sembrano quindi essere incoraggianti, e suggerire un possibile impiego terapeutico del farmaco non solo nel

recupero di soggetti tossicodipendenti, ma anche nella prevenzione delle ricadute in soggetti ex-dipendenti e della dipendenza in soggetti a rischio. Questo farmaco presenta infatti il vantaggio, rispetto agli antagonisti glutammatergici finora proposti, di non dare origine essa stessa a fenomeni di dipendenza (22). Tuttavia la DCS è un farmaco dal meccanismo complicato. Certamente anche per questo composto ben si conoscono gli effetti collaterali, dal momento che è stato utilizzato per anni nel trattamento della tubercolosi, per poi essere sostituito da antibiotici più efficaci e selettivi. Essi sono soprattutto a carico del SNC e si manifestano come sonnolenza, emicrania, tremori, vertigini, che scompaiono alla sospensione del trattamento, fino a patologie più serie, come stati confusionali, irritabilità, reazioni paranoiche e tendenze suicide in caso di intossicazione in soggetti predisposti (44). Dai nostri studi non emerge alcun effetto del farmaco, sulla motilità o sulla capacità discriminativa dell'animale, quando somministrato da solo. Tuttavia la capacità di agire sui recettori NMDA da agonista o da antagonista a seconda delle dosi ed il fatto che il coinvolgimento del glutammato nell' "addiction" non sia ancora del tutto chiarito e soprattutto coinvolga fenomeni complessi come la memoria emozionale e l'apprendimento condizionato, fanno sì che nonostante gli incoraggianti risultati ottenuti ci sia bisogno ancora di una lunga sperimentazione prima di poter passare all'utilizzo clinico della sostanza.

I dati da noi presentati chiariscono ulteriormente, pur senza entrare nel merito dei meccanismi molecolari che li sottendono, il coinvolgimento del glutammato e del GABA nei meccanismi della dipendenza e come la modulazione specifica di questi sistemi costituisca la base per lo studio di farmaci utili nella terapia del tossicodipendente. Tali farmaci, a differenza di quelli normalmente proposti per alleviare i disturbi collegati alla sindrome di astinenza, possono intervenire dove si sono verificate alterazioni di tipo patologico, ripristinando la normale funzionalità neuronale. L'obiettivo principale della ricerca in questo campo, infatti, non è quello di sostituire una dipendenza con un'altra, ma di affrontarla come una qualsiasi altra patologia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Addolarato G, Caputo F, Caprisco E, Janiri L, Bernardi M, Agabio R, Colombo G, Gessa GL, Gasbarrini G. Rapid suppression of alcohol withdrawal syndrome by baclofen. *Am J Med* 112, 226-229 (2002).
2. Aked J, Coizet V, Clark D, Overton PG. Local injection of a glutamate uptake inhibitor into the ventral tegmental area produces sensitization to the behavioural effects of d-amphetamine. *Neuroscience* 134, 361-367 (2005).
3. Auclair A, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP. Role of serotonin<sub>2A</sub> receptors in the d-amphetamine-induced release of dopamine : comparison with previous data on  $\alpha$ 1ergic receptors. *J Neurochem* 91, 318-326 (2004).
4. Babbini M, Davis WM. Time-dose relationship for locomotory activity effects of morphine after acute or repeated treatment. *Br J Pharmacol* 46, 213-224 (1972).
5. Baker DA, McFarland K, Lake RW, Shen H, Tang XC, Toda S, Kalivas PW. Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat neurosci* 6, 743-749 (2003).
6. Bardo MT. Neuropharmacological mechanisms of drug reward beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol* 12, 37-67 (1998).
7. Barret RJ, White DK. Tolerance, withdrawal and supersensitivity to dopamine mediated cues in a drug-drug discrimination. *Psychopharmacology* 109, 63-67 (1992).
8. Bartlett E, Hallin A, Chapman B, Angrist B. Selective sensitization to the psychosis-inducing effects of cocaine: a possible marker for addiction relapse vulnerability? *Neuropsychopharmacol* 16, 77-82 (1997).
9. Bartoletti M, Gubellini C, Ricci F, Gaiardi M. The GABA<sub>B</sub> agonist baclofen blocks the expression of sensitisation to the locomotor stimulant effect of amphetamine. *Behav Pharmacol* 15, 397-401 (2004).

10. Bartoletti M, Gubellini C, Ricci F, Gaiardi M. Baclofen blocks the development of sensitisation to the locomotor stimulant effect of amphetamine. *Behav Pharmacol* 16, 553-558 (2005).
11. Beshpalov AY, Balstrier R, Beardsley PM. N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonists and the development of tolerance to the discriminative stimulus effects of morphine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 20-27 (1999).
12. Bisaga A, Popik P. In search of a new pharmacological treatment for drug and alcohol addiction: N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists. *Drug alcohol dependen* 59, 1-15 (2000).
13. Boutreau F, Paolone G, Stewart J. D-cycloserine facilitates extinction of a cocaine-induced conditioned place preference. *Behav Brain Res*, 172, 173-178 (2006).
14. Bowery NG, Enna SJ.  $\gamma$ -aminobutyric acid-B receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 2-7 (2000).
15. Brauer LH, Goudie AJ, De Wit H. Dopamine ligands and the stimulus effects of amphetamine: animal model versus human laboratory data. *Psychopharmacology* 130, 2-13 (1997).
16. Cascella NG, Macciardi F, Cavallini C, Smeraldi E. D-cycloserine adjuvant therapy to conventional neuroleptic treatment in schizophrenia: an open-label study. *J Neural Transm Gen Sect* 95, 105-111 (1994).
17. Cattaneo L. *Compendio di anatomia umana*. Ed. Monduzzi (bologna) (1981)
18. Churchill L, Swanson CJ, Urbina M, Kalivas PW. Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit level in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioural sensitization. *J Neurochem* 72, 2397-2403 (1999).
19. Civelli O. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33, 281-308 (1993).

20. Colpaert FC. Drug discrimination: behavioural, pharmacological and molecular mechanism of discriminative drug effects. In: Goldberg SR, Stolerman IP. *Behavioural analysis of drug dependence*, 161-193 (1986)
21. Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 205-237 (1997).
22. Corbett D. Possible abuse potential of the NMDA antagonist MK-801 *Behav Brain Res* 34; 239-246 (1989)
23. Cornish JL, Kalivas PW. Cocaine sensitization and craving: differing roles for dopamine and glutamate in the nucleus accumbens. *J Addict Dis* 20, 43-54 (2001).
24. Cousins MS, Roberts DCS, De Wit H. GABA-B receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings. *Drug Alcohol Depen* 65, 209-220 (2002).
25. Cousins MS, Stamat HM, De Wit H. Effect of a single dose of baclofen on self-reported subjective effects and tobacco smoking. *Nicotine Tob Res* 3, 123-129 (2001).
26. Dackis CA, Kampman KM, Lynch KG, Pettinati HM, O'Brien C. A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for cocaine dependence. *Neuropsychopharmacol* 30; 205-211 (2005)
27. Dall'Olio R, Gandolfi O. The NMDA positive modulator D-cycloserine potentiates the neuroleptic activity of D1 and D2 dopamine receptor blockers in the rat. *Psychopharmacology* 110, 165-168 (1993).
28. Dall'Olio R, Rimondini R, Gandolfi O. The NMDA modulator D-cycloserine inhibits dopamine-mediated behaviours in the rat. *Neuropharmacology* 33, 55-59 (1994).
29. De Gennaro L, Guariglia C. *Fondamenti di Psicologia Fisiologica*, Ed Piccin (2003).
30. Diaz SL, Kemmling AK, Bonavita CD, Rubio CM, Balerio GN. Baclofen reestablished  $\mu$ -opioid receptor levels modified by morphine withdrawal syndrome in either sex. *Synapse* 54, 24-29 (2004).

31. Di Chiara G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the prospective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend* 38, 95-137 (1995).
32. Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamina concentration in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci* 85, 5274-5278 (1988).
33. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7-61 (1999).
34. Eisch AJ, Harburg GC. Opiates, psychostimulanta, and adult hippocampal neurogenesis: addiction and stem cell biology. *Hippocampus* 16, 271-286 (2006).
35. Emzadeh MB, Nelason LC, Lu XY, Kalivas PW. Neuroadaptations in ionotropic and metabotropic glutamate receptors by chronic cocaine. *J Neurochem* 72, 157-165 (1999).
36. Fadda P, Scherma M, Fresu A, Collu M, Fratta W. Baclofen antagonizes nicotine-, cocaine-, and morphine-induced-induced dopamine release in the nucleus accumbens of rat. *Synapse* 50, 1-6 (2003).
37. Finlay JM, Damsma G, Fibiger HC. Benzodiazepine-induced decreases in extracellular concentrations of dopamine in the nucleo accumbens after acute and repeated administration. *Psychopharmacology* 106, 202-208 (1992).
38. Fitzgerald LW, Ortiz J, Hamedani AG, Nestler EJ. Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: Common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci* 16, 274-282 (1996).
39. Gaiardi M, Bartoletti M, Gubellini C, Bacchi A, Babbini M. Modulation of the stimulus effects of morphine by d-amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 59, 249-253 (1998).
40. Gaiardi M, Gubellini C, Dall'Olio R, Gandolfi O, Bartoletti M. Effects of N-methyl-D-aspartate agonists and antagonists in rats discriminanting amphetamine. *Behav Pharmacol* 12, 317-324 (2001).

41. Gargiulo PA, Acerbo MJ, Krug I, Delius JD. Cognitive effects of dopaminergic and glutamatergic blockade in nucleus accumbens in pigeons. *Pharmacol Biochem Behav* 81, 732-739 (2005).
42. Geisler S, Berod A, Zahm DS, Rostene W. Brain neurotensin, psychostimulants, and stress-emphasis on neuroanatomical substrates. *Peptides* 27, 2364-84 (2006)
43. Giorgetti M, Hotsenpiller G, Froestl W, Wolf ME. In vivo modulation of ventral tegmental area dopamine and glutamate efflux by local GABA<sub>B</sub> receptors is altered after repeated amphetamine treatment. *Neuroscience* 109, 585-595 (2002).
44. Godman Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics. VIII ed. (1985).
45. Gorelik DA, Gardner EL, Xi ZX. Agents in development for the management of cocaine abuse. *Drugs* 64, 1473-1547 (2004).
46. Guastella AJ, Lovibond PF, Dadds MR. A randomized controlled trial of the effect of D-cycloserine on extinction and fear conditioning in humans. *Behav Res Ther* 45, 663-672 (2007).
47. Haney M, Kosten TR. Therapeutic vaccines for substance dependence. *Expert Rev Vaccines* 3, 11-18 (2004).
48. Heidbreder C. Novel pharmacotherapeutic targets for the management of drug addiction. *Eur J Pharmacol* 526, 101-112 (2005).
49. Henry DJ, Green MA, White FJ. Electrophysiological effects of cocaine parallels enhanced inhibition system: repeated administration. *J Pharmacol Exp Ther* 251, 833-839 (1989).
50. Herz A. Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse? *Can J Physiol Pharmacol* 76, 252-258 (1998).
51. Holtzman SG. Discriminative stimulus effects of drugs: relationships to potential for abuse, in *Modern Methods in Pharmacology 6: Testing and Evaluation of Drugs of Abuse*, Spector S and Back N eds, pp 193-210, Liss, New York (1990).

52. Hood W, Compton RP, Monahan JB. D-cycloserine: a ligand for the N-methyl-D-aspartate coupled glycine receptor has partial agonist characteristics. *Neurosci Lett* 98, 91-95 (1989).
53. Humeniuk RE., White JM, Ong J. The role of GABA-B receptor in mediating the stimulatory effects of ethanol in mice. *Psychopharmacology* 111, 219-214 (1993).
54. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Pharmacol Rev* 72, 165-229 (1992).
55. Javitt DC. Glycine modulators in schizophrenia. *Curr Opin Investig Drugs* 3, 1067-1072 (2002).
56. Jones S, Bonci A. Synaptic plasticity and drug addiction. *Curr Opin Pharmacol* 5, 20-25 (2005).
57. Kalivas PW. Glutamate system in cocaine addiction. *Curr Opin Pharmacol* 4, 23-29 (2004).
58. Kalivas PW, Alesdatter JE. Involvement of NMDA receptor stimulation in the VTA and amygdale in behavioural sensitization to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 486-495 (1993).
59. Kalivas PW, Duffy P. D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 15, 5379-5388 (1995).
60. Kalivas PW, Duffy P, Eberhardt H. Modulation of A10 dopamine neurons by gamma-aminobutyric acid agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 858-866 (1990).
61. Kalivas PW, Nakamura M. Neural systems for behavioural activation and reward. *Curr Opin Neurobiol* 9, 223-227 (1999).
62. Kalivas PW, Stewart J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress- induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev* 16, 223-224 (1991).
63. Kenny PJ, Markou A. The ups and downs of addiction : role of metabotropic glutamate receptors. *Trends Pharmacol Sci* 25, 265-272 (2004).

64. Klodzinska A, Chojnacka-Wojcik E. Anticonflict effect of the glycineB receptor partial agonist, d-cycloserine, in rats. Pharmacological analysis. *Psychopharmacology* 152, 224-228 (2000).
65. Koob GF. The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* 101, 23-30 (2006)
66. Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278, 52-57 (1997).
67. Kuczenski R. Biochemical actions of amphetamine and other stimulants. In Creese, I. Ed., *Stimulants: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives*. Raven Press, New York 31-61, (1983).
68. Leberer MR, Fowler SC. Drug discrimination and generalization in pigeons. *Pharm Biochem Behav* 7: 483-486 (1977)
69. Leite-Morris KA, Fukudome EY, Shoeb MH, Kaplan GB. GABA-B receptors activation in the ventral tegmental area inhibits the acquisition and expression of opiate-induced motor sensitization. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 667-678 (2004).
70. Lett BT. Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarq effects of amphetamine,morphine and cocaine. *Psychopharmacology* 98, 357-362, (1989).
71. Ling W, Shoptaw S, Majewska D. Baclofen as a cocaine anti-craving medication: a preliminary clinical study. *Neuropsychopharmacol* 18, 403-404 (1998)
72. Malgorzata F. The serotonergic system and its role in cocaine addiction. *Pharmacol Rep* 57, 685-700 (2005).
73. Malizia E, Borgo S. *Le droghe*. Ed. Newton Compton (2006).
74. Mao SC. Extinction training in conjunction with a partial agonist of the glycine site on the NMDA receptor erases memory trace. *J Neurosci* 26, 8892-8899 (2006)

75. McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW: Prefrontal glutamate release into the core of nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behaviour. *J Neurosci* 23, 3531-3537 (2003)
76. Mead AN, Stephens DN. AMPA-receptors are involved in the expression of amphetamine-induced behavioural sensitisation, but not in the expression of amphetamine-induced conditioned activity in mice. *Neuropharmacology* 37, 1131-1138 (1998).
77. Meijler MM, Wirsching P, Janda KD. Development of immunopharmacotherapy against drugs of abuse. *Curr Drug Discov Technol* 1, 77-89 (2004).
78. Minami M., Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* 23, 121-45 (1995).
79. Munzar P, Kutkat SW, Miller CR, Goldberg ST. Failure of baclofen to modulate discriminative-stimulus effects of cocaine or methamphetamine in rats. *Eur J Pharmacol* 408, 169-174 (2000).
80. Nencini P. *Il controllo farmacologico del comportamento*. Ed. UTET (1992).
81. Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278, 58-63 (1997).
82. Parolaro D. Endocannabinoids and drug dependence. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4, 643-55 (2005).
83. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Stimolanti del SNC e farmaci psicotomimetici. In: *Farmacologia*. Casa Editrice Ambrosiana. (2005).
84. Reid MS, Berger SP. Evidence for sensitization of cocaine-induced nucleus accumbens glutamate release. *Neuroreport* 7, 1325-1329 (1996).
85. Robinson TE, Becker JB. Enduring changes in brain and behaviour produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res Rev* 11, 157-198 (1986).
86. Robinson TE, Berridge KC. Addiction. *Annu Rev Psychol* 54, 25-53 (2003).
87. Ron D, Janak PH. GDNF and addiction. *Rev Neurosci* 16, 277-85 (2005).

88. Rouaud E, Billard JM. D-cycloserine facilitates synaptic plasticity but impairs glutamatergic neurotransmission in rat hippocampal slice. *Br J Pharmacol* 140, 1051-1056 (2003).
89. Rutter JL. Symbiotic relationship of pharmacogenetics and drug of abuse. *AAPS J* 24, 174-184 (2006)
90. Salomon L, Lanteri C, Glowinski J, Tassin JP. Behavioural sensitization to amphetamine results from uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 7476-7481 (2006)
91. Schechter MD. Apomorphine increases ethanol discrimination. *Pharmacol Biochem Behav* 22, 179-182 (1985).
92. Schenk S, Valadez A, McNamara C, House DT, Higley D, Bankson MG, Gibbs S, Horger BA. Development and expression of sensitization to cocaine's reinforcing properties: role of NMDA receptors. *Psychopharmacology* 111, 332-338 (1993).
93. Shannon EE. Discriminative stimulus effects of ethanol in mice lacking the gamma-aminobutyric acid type A receptor delta subunit. *Alcohol Clin Exp Res* 28, 906-913 (2004)
94. Shoaib M, Spanagel R. Mesolimbic sites mediate the discriminative effects of morphine. *Eur J Pharmacol* 252, 69-75 (1994).
95. Shoaib M, Swanner LS, Beyer CE, Golberg SR, Schindler CW. The GABA<sub>B</sub> agonist baclofen modifies cocaine self-administration in rats. *Behav Pharmacol* 9, 195-206 (1998).
96. Shoblock JR, Sullivan EB, Maisonneuve IM, Glick SD. Neurochemical and behavioral difference between d-methamphetamine and d-amphetamine in rats. *Psychopharmacology* 165, 359-369 (2003).
97. Slattery DA, Markou A, Froestl W, Cryan JF. The GABA<sub>B</sub> receptor-positive modulator GS39783 and the GABA<sub>B</sub> receptor agonist baclofen attenuate the reward-facilitating effects of cocaine: intracranial self-stimulation studies in the rat. *Neuropsychopharmacol* 30, 2065-2072 (2005).

98. Smolders I, De Klippel N, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Tonic GABAergic modulation of striatal dopamine release studies by in vivo microdialysis in the freely moving rat. *Eur J Pharmacol* 284, 83-91 (1995).
99. Spanagel R, Shoaib M. Mesolimbic sites mediate the discriminative stimulus effects of morphine. *Eur J Pharmacol* 252, 69-75 (1994).
100. Stewart J, Badiani A. Tolerance and sensitization to the behavioural effects of drugs. *Behav Pharmacol* 4, 289-312 (1993).
101. Stolerman I. Drugs of abuse: behavioural principles, methods and terms. *Trends Pharmacol Sci* 13, 170-176 (1992).
102. Tao R, Auberach SB. Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. *J Pharmacol* 14, 100-113 (2000).
103. Tao R, Auberach SB. GABAergic and glutamatergic afferents in the dorsal raphe nucleus mediate morphine-induced increases in serotonin efflux in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 704-710 (2002).
104. Tjon GHK, De Vries TJ, Ronken E, Hogenboom F, Warden G, Mulder AH, Schoffemeer ANM. Repeated and chronic morphine administration causes differential long-lasting changes in dopaminergic neurotransmission in rat striatum without changing its  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptor regulation. *Eur J Pharmacol* 252, 205-212 (1994).
105. Torres-Escalante JL, Barral JA, Ibarra-Villa MD, Perez-Burgos A, Gongora-Alfaro JL, Pineda JC. 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, and GABAB receptors interact to modulate neurotransmitter release probability in layer 2/3 somatosensory rat cortex as evaluated by paired pulse protocol. *J Neurosci Res* 78, 268-278 (2004).
106. Tzschentke TM, Schmidt WJ. Glutamatergic Mechanism in addiction. *Mol Psychiatry* 8, 373-382 (2003).
107. Uchimura N. Baclofen and adenosine inhibit synaptic potentials mediated by GABA and glutamate release in rats nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 258, 663-668 (1991).

108. Ungless MA. Single cocaine exposure *in vivo* induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411, 583–587 (2001).
109. Vanderschuren L, Kalivas PW. Alteration in dopaminergic and glutamatergic transmission the induction and expression of behavioural sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 151, 99-120 (2000).
110. Van Ree JM, Gerrits MAFM, Vanderschuren L. Opioids, reward and addiction: an encounter of biology, psychology and medicine. *Pharmacol Rev* 51, 341-396 (1999).
111. Van Ree JM, Gerrits MAFM, Vanderschuren L: Endogenous opioids and reward. *Eur J Pharmacol* 405, 89-101 (2000).
112. Vezina P, Queen AL. Induction of locomotor sensitization by amphetamine requires the activation of NMDA receptors in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology* 151; 184-191 (2000)
113. Vocci F, Ling W. Medications development: Successes and challenges. *Pharmacol Ther* 108, 94-108 (2005).
114. Walker WDL, Ressler KJ, Lu KT; Davis M. Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *J Neurosci* 22, 2343-2351 (2002)
115. West WB, Van Groll BJ, Appel JB. Stimulus effects of d-amphetamine II : DA, NE, and 5-HT mechanism. *Behav Pharmacol* 13, 623-631 (1993).
116. White FJ, Kalivas PW. Neuroadaptation involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* 51, 141-153 (1998).
117. Wisden W, Seeburg PH. GABAA receptors channels: from subunits to functional entities. *Curr Opin Neurobiol* 22, 263-268 (1992).
118. Wise RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 6, 243-251 (1996).
119. Wise R, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94, 469-492 (1978).

120. Wolf ME, Jeziorski M. Coadministration of MK-801 with amphetamine, cocaine or morphine prevents rather than transiently masks the development of behavioural sensitization. *Brain Res.* 613, 291-294 (1993).
121. Wolf ME, Khansa MR. Repeated administration of MK-801 produces sensitization to its own locomotor stimulant effects but blocks sensitization to amphetamine. *Brain Res* 562, 164-168 (1991).
122. Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47, 61-79 (2004).
123. Wolf ME., Mangiavacchi S., Sun X. Mechanism by which dopamine receptors may influence synaptic plasticity. *Ann NY Acad Sci* 1003, 241-249 (2003).
124. Wong LS, Eshel G, Dreher J, Ong J, Jackson DM. Role of dopamine and GABA in the control of motor activity elicited from the rat nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 38, 829-835 (1991)
125. Wood DM, Emmett-Oglesby MW. Mediation in the Nucleus Accumbens of the discriminative stimulus produced by cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 33, 453-457 (1998).
126. Wu Y, Pearl SM, Zigmond MJ, Michael AC. Inhibitory glutamatergic regulation of evoked dopamine release in striatum. *Neuroscience* 96, 65-72 (2000).
127. Xiao ZW, Cao CY, Wang ZX, Lia HY, Zang XX. Changes of dopamine transporter function in striatum during acute morphine addiction and its abstinence in rhesus monkey. *Chin Med J* 119, 1802-1807 (2006).
128. Young R, Glennon RA. Discriminative stimulus properties of amphetamine and structurally related phenalkylamines. *Med Res Rev* 6, 99-130 (1986).
129. Young AM, Kapitsopoulos G, Makhay MM. Tolerance to morphine-like stimulus effects of mu opioid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 257, 795-805 (1991).
130. Zhang X F, Hu XT, White FJ, Wolf ME. Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration

of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 281, 699-706 (1997).

131. Zhang K, Tarazi FI, Campbell A, Baldasserini RJ. GABA<sub>B</sub> receptors: altered coupling to G-proteins in rats sensitized to amphetamine. *Neuroscience* 101, 5-10 (2000).