UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI SCIENZE BIOMEDICHE

INDIRIZZO: FARMACOLOGIA DI GENERE

Ciclo XXIV

Ruolo dei recettori della dopamina nella valutazione della ricompensa e nell'attivazione delle risposte finalizzate in una prospettiva di genere

Direttore:
Prof. EUSEBIO TOLU

Tutor:
Dott. PAOLO STEFANO D'AQUILA

Responsabile di indirizzo:
Prof.ssa FLAVIA FRANCONI

Tesi di dottorato di:
ADRIANA GALISTU

ANNO ACCADEMICO: 2010-2011

INDICE

1. INTRODUZIONE

- ✓ GENERE E MALATTIE PSICHIATRICHE. LA DOPAMINA **pag. 4**
- ✓ BIOLOGIA DELLA DOPAMINA **pag. 5**
- ✓ SISTEMI DOPAMINERGICI NEL SNC **pag. 6**
- ✓ DOPAMINA E REWARD **pag. 7**
- ✓ LA MICROSTRUTTURA DEL COMPORTAMENTO INGESTIVO: UNA FINESTRA SUI MECCANISMI DI VALUTAZIONE DELLA RICOMPENSA E DI ATTIVAZIONE DELLE RISPOSTE FINALIZZATE **pag. 9**
- ✓ SCOPO DEL LAVORO **pag. 11**

2. METODI

- ✓ANALISI DELLA MICROSTRUTTURA DEL LICKING **pag. 13**
- ✓FORCED SWIMMING TEST **pag. 14**

3. EFFETTO DELLA SVALUTAZIONE DELLA RICOMPENSA NELLA MICROSTRUTTURA DEL LICKING

- ✓ INTRODUZIONE **pag. 15**
- ✓ MATERIALI E METODI **pag. 15**
- ✓ RISULTATI **pag. 17**
- ✓ DISCUSSIONE **pag. 19**

4. EFFETTO DEGLI ANTAGONISTI D1-LIKE E D2-LIKE DELLA DOPAMINA NEL "FORCED SWIMMING TEST"

- ✓ INTRODUZIONE **pag. 23**
- ✓ MATERIALI E METODI **pag. 26**
- ✓ RISULTATI **pag. 27**
- ✓ DISCUSSIONE **pag. 34**

5. EFFETTO DEGLI ANTAGONISTI D1-LIKE E D2-LIKE DELLA DOPAMINA SULLA MICROSTRUTTURA DELL'INGESTIONE DI UNA SOLUZIONE ISOTONICA DI NaCl IN RATTI MASCHI E FEMMINE

- ✓ INTRODUZIONE **pag. 47**
- ✓ MATERIALI E METODI **pag. 48**
- ✓ RISULTATI **pag. 49**
- ✓ DISCUSSIONE **pag. 51**

6. EFFETTO DELLA SENSIBILIZZAZIONEALL'APPETITO PER IL SODIO SULLA MICROSTRUTTURA DELL'INGESTIONE DI UNA SOLUZIONE IPERTONICA DI NaCl

- ✓ INTRODUZIONE **pag. 55**
- ✓ MATERIALI E METODI **pag. 56**
- ✓ RISULTATI **pag. 58**
- ✓ DISCUSSIONE **pag. 61**

7. EFFETTO DELL'ANTAGONISTA D1-LIKE DELLA DOPAMINA NEI SOGGETTI MASCHI E FEMMINE SENSIBILIZZATI ALL'APPETITO PER IL SODIO

- ✓ INTRODUZIONE **pag. 66**
- ✓ MATERIALI E METODI **pag. 66**
- ✓ RISULTATI **pag. 67**
- ✓ DISCUSSIONE **pag. 69**

8. CONCLUSIONI **pag. 74**

9. BIBLIOGRAFIA **pag. 78**

10. RINGRAZIAMENTI **pag. 89**

1. INTRODUZIONE

✓ GENERE E MALATTIE PSICHIATRICHE. LA DOPAMINA

Sono note le differenze di genere associate alle patologie psichiatriche come depressione, ansia, schizofrenia, sindrome da deficit di attenzione/iperattività, abuso di sostanze, sindrome di Tourette e altre (Wittchen et al. 2011). Studi preclinici condotti su modelli animali ed evidenze cliniche mostrano delle differenze di genere rilevanti nella risposta allo stress. Queste differenze potrebbero avere importanti implicazioni nella spiegazione delle differenze di genere osservate nell'epidemiologia delle malattie psichiatriche correlate allo stress come la depressione e il disturbo post-traumatico da stress (PTSD). Tuttavia, diversi problemi minano la chiarezza del quadro che emerge da questi studi. Per esempio, dati relativi ai fattori ormonali e fisiologici raccolti in un gran numero di studi non riescono a dare conto del fatto che le donne sono più propense degli uomini a provare paura e ansia. Dal punto di vista preclinico, le differenze tra maschi e femmine osservate nei modelli animali basati sull'esposizione allo stress non sempre riflettono le differenze di genere osservate negli esseri umani. Alcuni fattori potrebbero contribuire a spiegare queste apparenti contraddizioni. Per esempio, le donne sperimentano eventi meno traumatici rispetto agli uomini, ma hanno una maggiore probabilità di incorrere in "eventi potenzialmente traumatici" (PTE), come lo stupro e la violenza domestica, associati con un'alta probabilità al PTSD o ad altri disturbi dell'ansia (McLean & Anderson 2009). D'altra parte, le differenze sessuali osservate in modelli animali di malattie psichiatriche potrebbero essere generate da fattori etologici specie-specifici e sesso-specifici, che non sono stati presi in considerazione durante lo sviluppo e la validazione dei modelli.

Sono numerose le evidenze sperimentali che mostrano alterazioni della neurotrasmissione dopaminergica associate ai disturbi neuropsichiatrici (Lyons et al. 1998; Wasilow-Mueller & Erickson 2001; Reicher-Rossler & Hafner 2000; Walters et al. 2001). La dopamina gioca un ruolo significativo nella

fisiopatologia della depressione, nel meccanismo d'azione degli antidepressivi (D'Aquila et al. 2000; Gershon et al. 2007; Porcelli et al. 2011) e nella risposta allo stress, che determina un incremento dei livelli di dopamina in diverse aree cerebrali (corteccia prefrontale in particolare) (Rodrigues et al. 2011; Cabib & Puglisi-Allegra 2011).

Esiste quindi un forte legame tra le malattie psichiatriche e le alterazione della neurotrasmissione dopaminergica. Da questo nasce l'importanza degli studi sul ruolo di questo neurotrasmettitore nel comportamento normale, al fine di poter interpretare la psicopatologia delle malattie a partire da eventi neurali.

✓ BIOLOGIA DELLA DOPAMINA

La dopamina (DA) è una catecolamina endogena sintetizzata all'interno delle terminazioni nervose dei neuroni dopaminergici a partire dalla tirosina, amminoacido trasportato attraverso la barriera ematoencefalica grazie ad un processo attivo. La biosintesi della dopamina avviene per azione sequenziale della tirosina idrossilasi, enzima chiave per la sintesi, che converte la L-tisosina nell'intermedio L-diidrossifenilalanina (L-DOPA) e della L-decarbossilasi che converte rapidamente la L-DOPA a DA. A livello della terminazioni nervose la DA viene immagazzinata all'interno di vescicole di deposito grazie ad una proteina che funge da trasportatore attivo (questo processo viene inibito dalla reserpina portando alla deplezione di DA). A seguito della depolarizzazione della membrana e all'ingresso di ioni Ca^{2+}, mediante un processo di esocitosi, avviene il rilascio della DA nello spazio intersinaptico. Qui l'azione della DA viene conclusa dalla ricaptazione attraverso un trasportatore di membrana (meccanismo antagonizzato dalla cocaina) con successivo trasporto nelle vescicole. In alternativa la DA viene degradata dall'azione delle monoammino-ossidasi (MAO) o delle catecol-O-metil tranferasi (COMT), portando alla formazione dei due metaboliti, acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC) e acido 3-metossi-4-idrossifenilacetico (HVA). Nell'uomo l'HVA è il prodotto primario del metabolismo della DA (Cooper et al. 1996).

Le attività della DA nel cervello sono mediate da una famiglia di proteine recettoriali che hanno in comune caratteristiche strutturali tra cui i sette domini transmembrana con struttura ad α-elica, che le include nella grande famiglia dei recettori che agiscono attraverso il legame con la proteina G. Sono cinque i recettori dopaminergici, che possono essere divisi in due gruppi sulla base delle proprietà strutturali e farmacologiche. I recettori D_1 e D_5 hanno una lunga catena C-terminale intracellulare e sono membri della classe definita farmacologicamente come D1-like. Essi stimolano la formazione di AMP ciclico e l'idrolisi di fosfatidilinositolo.

I recettori D_2, D_3 e D_4 hanno in comune la terza ansa intracellulare molto lunga e sono membri della classe definita farmacologicamente come D2-like. Essi riducono la formazione di AMP ciclico e modulano correnti di K^+ e Ca^{2+} Ciascuno dei cinque recettori dopaminergici ha una distribuzione anatomica distinta nel cervello. I recettori D_1 e D_2 sono abbondantemente espressi nello striato, i recettori D_4 e D_5 sono in gran parte al di fuori dello striato, mentre l'espressione del recettore D_3 è bassa nel caudato e nel putamen e più abbondante nel nucleus accumbens e nel tubercolo olfattorio.

✓ SISTEMI DOPAMINERGICI NEL SNC

I sistemi dopaminergici nel SNC sono rappresentati dal sistema nigro-striatale, sistema meso-limbico, sistema meso-corticale ed dal sistema tubercolo infundibolare.

I neuroni del sistema nigro-striatale hanno sede nella pars compacta della substantia nigra del mesencefalo e proiettano le loro terminazioni nel corpo striato (caudato e putamen) (Fuxe et al.1985). Il sistema dopaminergico nigro-striatale fa parte del sistema extrapiramidale e la sua funzione è quella di controllare il tono muscolare e la coordinazione motoria. Al blocco dei recettori dopaminergici nigro-striatali sono associati gli effetti extrapiramidali degli antipsicotici (Baldessarini & Tarazi 2006).

I neuroni del sistema meso-limbico sono localizzati per la maggior parte nell'area ventro-tegmentale del mesencefalo e in minor misura nella parte

mediale della substantia nigra. Le loro fibre vanno ad innervare il nucleus accumbens, il tubercolo olfattorio ed il nucleo interstiziale della stria terminale (Fuxe et al.1985). Questo sistema oltre a partecipare al controllo delle funzioni motorie, fa parte del sistema limbico ed è coinvolto nella regolazione dei comportamenti emotivi. Al blocco dei recettori dopaminergici di questo sistema viene attribuito l'effetto terapeutico degli antipsicotici. Viceversa, ad una sua iperattività si ritiene siano dovuti alcuni sintomi della schizofrenia e della mania, come il delirio e le allucinazioni (Baldessarini & Tarazi 2006).

Il sistema meso-corticale, come quello meso-limbico, origina principalmente nell'area ventro-tegmentale del mesencefalo e in piccola parte nella substantia nigra. I neuroni di questo sistema proiettano le loro fibre nervose al setto, soprattutto nel nucleo laterale, all'amigdala, all'ippocampo, e alla corteccia prefrontale. Si ritiene che questo sistema sia quello maggiormente implicato nel controllo delle funzioni cerebrali superiori e delle emozioni. Al blocco dei recettori dopaminergici di questo sistema viene attribuita l'esacerbazione dei sintomi negativi della schizofrenia (Baldessarini & Tarazi 2006).

I piccoli neuroni del sistema tubero-infundibolare originano nel nucleo arcuato dell'ipotalamo e arrivano all'eminenza mediana, dove liberano DA direttamente nei vasi del sistema portale ipofisario. La DA raggiunge così i recettori presenti nelle cellule mammmotrope dell'ipofisi anteriore, inibendo la secrezione di prolattina (Fuxe et al.1985). Il blocco della trasmissione dopaminergica a questo livello è responsabile dell'iperprolattinemia e dei disturbi ad essa associati in corso di terapia con antipsicotici (Baldessarini & Tarazi 2006).

✓ DOPAMINA E REWARD

La dopamina esercita un ruolo modulatorio chiave nel controllo dell'attività motoria, nei meccanismi associati al perseguimento di una ricompensa, e nel controllo delle emozione e dei processi cognitivi (Le Moal

1995). Tuttavia, quale sia il ruolo della dopamina in questi processi è, ancora oggi, oggetto di acceso dibattito.

Roy Wise, alla fine degli anni '70, ha ipotizzato un ruolo della dopamina (DA) come substrato neurobiologico del piacere, ("anhedonia hypotesis", Wise 1978, 1982). Wise, giunse a questa conclusione in seguito all'osservazione che gli antipsicotici riducevano la risposta operante (pressione di una leva) finalizzata all'ottenimento di cibo o di altre ricompense. Questa ipotesi fu però messa in discussione da studi successivi. Infatti fu osservato che nei ratti con lesioni dei neuroni dopaminergici del sistema mesolimbico, venivano abolite quasi completamente le risposte di approccio verso la ricompensa (reward), ma non venivano alterate le tipiche espressioni facciali ("fixed action patterns") in risposta all'infusione intraorale di soluzioni dolci, considerate indice di impatto edonico (Berridge et al. 1989). Sulla base di queste osservazioni, Berridge e coll., conclusero che, in contrasto con l'"anhedonia hypotesis" formulata da Wise, la dopamina non mediasse le proprietà gratificanti (edoniche) del cibo e dei rinforzi in generale. Berridge e Robinson proposero che la dopamina, piuttosto che mediare il piacere ("liking"), fosse coinvolta nel mediare il "wanting", ovvero la componente motivazionale. Più precisamente, suggerirono che la dopamina medi l'attribuzione della "salienza incentiva" agli stimoli associati alla ricompensa, e cioè la capacità di uno stimolo di essere rilevante e di indurre un comportamento di approccio. Più precisamente la salienza incentiva viene definita come la trasformazione di uno stimolo (percezione o memoria) associato alla ricompensa in un potente incentivo motivazionale (Berridge & Robinson 1998; Berridge 2007).

Ulteriori studi mostrarono che nei ratti privi di DA nel nucleus accumbens si mantiene inalterata la capacità di scegliere la ricompensa di maggior valore a condizione che il suo ottenimento non richieda uno sforzo aggiuntivo. Anche tale osservazione ha condotto ad escludere il coinvolgimento della DA nella valutazione della ricompensa e nel piacere e a suggerire un suo ruolo nella allocazione dello sforzo alle risposte finalizzate all'ottenimento di una ricompensa (Salamone et al. 2005, 2007). In coerenza con questa ipotesi,

topi knock-out dopamina-deficienti conservano la capacità di scegliere una soluzione dolce (rispetto all'acqua), nonostante si astengano da qualsiasi risposta di approccio che richieda un minimo sforzo (Cannon & Palmiter 2003).

Queste interpretazioni riconoscono un ruolo della dopamina nell'attivazione delle risposte finalizzate ad un obiettivo (Robbins & Everitt 2007), ma ignorano o addirittura negano, il possibile ruolo della dopamina nella valutazione della ricompensa e nel piacere. Tuttavia, l'osservazione che gli antagonisti della dopamina inducono un declino delle risposte strumentali simile a quello osservato dopo riduzione del valore della ricompensa ("extinction mimicry") (vedi Wise 2004, 2006), costituisce un serio problema per l'esclusione di un ruolo della dopamina nella valutazione della ricompensa. Infatti, Berridge, per conciliare questa evidenza sperimentale con la sua ipotesi, ha suggerito il concetto di "reboosting", un processo attraverso il quale il contatto con la ricompensa "ricarica" il livello di attribuzione di salienza incentiva agli stimoli associati (Berridge 2007). Questo costituisce, di fatto, il riconoscimento di un ruolo per la dopamina nella valutazione della ricompensa.

Si possono dunque identificare due correnti interpretative che attribuiscono un differente ruolo alla dopamina nel comportamento. La prima vede la dopamina implicata principalmente nel mediare un processo di valutazione della ricompensa e le attribuisce un ruolo nel mediare il piacere, "liking" (Wise); la seconda vede la dopamina implicata nell'attribuzione della salienza incentiva ("wanting") e nell'allocazione dello sforzo alla risposta, e dunque nell'attivazione comportamentale e nella motivazione (Berridge, Salamone).

- ✓ **LA MICROSTRUTTURA DEL COMPORTAMENTO INGESTIVO: UNA FINESTRA SUI MECCANISMI DI VALUTAZIONE DELLA RICOMPENSA E DI ATTIVAZIONE DELLE RISPOSTE FINALIZZATE**

I ratti che ingeriscono fluidi emettono delle leccate. Dall'analisi della distribuzione logaritmica degli inter-lick intervals, ossia degli intervalli temporali tra le successive leccate, è stato caratterizzato il bout, definito come una serie di leccate con intervalli non inferiori a 400ms (Davis 1989).

L'analisi della microstruttura del licking fornisce delle misure, dimensione e numero di bout di leccate, che possono rivelare, rispettivamente, la valutazione della ricompensa e l'attivazione comportamentale. Infatti, la dimensione dei bout è sensibile alla concentrazione della soluzione, mentre il numero dei bout è sensibile a stimoli diversi dal contatto diretto con la ricompensa, come gli stimoli post-ingestivi (Smith 2001). Gli antagonisti dei recettori D2-like della dopamina riducono la dimensione dei bout per una soluzione zuccherina (D'Aquila 2010; Genn et al. 2003; Liao & Ko 1995; Schneider et al. 1990), riproducendo l'effetto della diluizione dello zucchero e quindi della svalutazione della ricompensa (Schneider et al. 1990), mentre il blocco dei recettori D1-like della dopamina riduce selettivamente e direttamente il numero dei bout. Inoltre, il blocco dei recettori D2-like della dopamina induce, sul corso temporale del numero dei bout, un declino della risposta simile a quello osservato nel comportamento operante dopo trattamento con antipsicotici o dopo svalutazione della ricompensa. Sulla base di queste osservazioni, abbiamo suggerito che il livello di attivazione delle risposte associate alla ricompensa dipenda dalla stimolazione dei recettori D1-like della dopamina, e che il livello di tale attivazione venga aggiornato, o "reboosted", sulla base di un processo di valutazione mediato dalla stimolazione dei recettori D2-like della dopamina, che si verifica durante la transazione consumatoria con la ricompensa (D'Aquila 2010). Questo meccanismo di valutazione determina il "valore contingente" della ricompensa. Tale valore corrisponde al livello di attivazione delle risposte finalizzate all'ottenimento di una ricompensa e quindi al costo energetico congruo per quella particolare ricompensa in una data condizione fisiologica, psicologica e ambientale (D'Aquila 2010). Questa ipotesi si inserisce all'interno del quadro teorico che guarda al ruolo della dopamina in termini di analisi costo-beneficio e di allocazione dello sforzo alla risposta (Salamone et al. 2009).

✓ SCOPO DEL LAVORO

In questo lavoro ci siamo posti due obiettivi. Il primo è stato quello (a) di proseguire nella validazione dell'analisi della microstruttura del licking come metodo per studiare i meccanismi di attivazione delle risposte finalizzate e di valutazione della ricompensa, e (b) di testare l'ipotesi da noi proposta sul ruolo dei recettori D1-like e D2-like della DA nell'attivazione e nella valutazione, rispettivamente, in un altro tipo di comportamento finalizzato.

Perciò abbiamo studiato, per la prima volta, l'effetto della diluizione del saccarosio sul corso temporale del numero dei bout. La ragione di questo studio si basa sulle similitudini tra l'effetto generato dal blocco dei recettori D2-like della DA su questa misura sperimentale e gli effetti sia degli antipsicotici che della svalutazione della ricompensa sulla risposta strumentale per differenti ricompense (D'Aquila 2010, Wise 2004, Salamone 2009). Infatti, la dimostrazione che il numero dei bout è governato dagli stessi meccanismi che controllano le risposte strumentali, fornirebbe un'importante validazione di questa misura sperimentale come espressione di "attivazione comportamentale". Inoltre, abbiamo testato l'ipotesi da noi formulata sulla base dello studio dell'effetto degli antagonisti D1-like e D2-like della DA sulla microstruttura del licking (D'Aquila, 2010), nel "forced swimming test". Questo è un paradigma sperimentale che, come il licking, offre la possibilità di studiare i meccanismi di aggiornamento di una risposta finalizzata, ma con un diverso tipo di obiettivo, la fuga, e con un'emissione di risposte che richiedono un considerevole sforzo.

Il secondo obiettivo è stato quello di utilizzare il metodo in corso di validazione nel nostro laboratorio per studiare le differenze sessuali nei meccanismi dopaminergici che governano la motivazione, e in particolare l'attivazione comportamentale e la valutazione della ricompensa. Il chiarimento di questi meccanismi potrebbe avere importanti implicazioni per la comprensione del ruolo della DA nelle differenze di genere nelle malattie psichiatriche e nella risposta ai farmaci.

A questo scopo abbiamo deciso di analizzare la microstruttura del comportamento di ingestione di NaCl, in quanto (a) si tratta di un comportamento nella regolazione del quale è coinvolta la DA e (b) presenta dimorfismo sessuale (Morris et al. 2008). In particolare abbiamo prima testato gli effetti degli antagonisti D1-like e D2-like della DA, SCH23390 e raclopride rispettivamente, sulla microstruttura del licking per una soluzione isotonica di NaCl in ratti di entrambi i sessi. Successivamente, abbiamo studiato gli effetti della deplezione sodica e della sensibilizzazione a ripetuti episodi di deplezione sodica sulla microstruttura dell'ingestione di soluzioni ipertoniche di NaCl. La sensibilizzazione all'appetito per il sodio ha infatti delle impressionanti similitudini con la sensibilizzazione agli psicostimolanti, che è considerata un modello di psicosi. Pertanto, i risultati di questo studio potrebbero avere rilievo nella comprensione delle differenze di genere nel meccanismo d'azione dei farmaci antipsicotici e antimaniacali.

2. METODI

Gli esperimenti sono stati condotti nel rispetto della "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" 8th Edition (National Research Council of Academies, The National Academies Press, Washington DC, 2011), e nel rispetto delle norme di legge dello Stato Italiano (D.L. 116, 1992), che autorizza gli esperimenti su animali da laboratorio, previa presentazione di un progetto di ricerca alle autorità competenti.

✓ ANALISI DELLA MICROSTRUTTURA DEL LICKING

Il test comportamentale è stato eseguito attraverso un'apparecchiatura (HABITEST, COULBOURN INSTRUMENTS; U.S.A.) costituita da quattro stazioni periferiche collegate ad un computer, tramite un'interfaccia elettronica. Ciascuna stazione è costituita da una gabbia in metallo (30x26x32), con la parete anteriore e posteriore in plexiglass. Sul lato sinistro viene posta una bottiglia con beccuccio contenente la soluzione a cui l'animale ha accesso grazie a un'apertura praticata nella parete. Ogni singolo movimento della lingua (lick) viene rilevato da una fotocellula posta in prossimità del beccuccio della bottiglia, con una risoluzione temporale di 50 o 20 msec. I dati grezzi sono stati analizzati attraverso il software Graphic State 3.2 software (Coulbourn Instruments, USA) e i parametri microstrutturali che si ottengono sono dati dal numero delle leccate (lick number), numero di bout, durata dei bout, tempo di latenza alla prima leccata. La durata media dei bout (mean bout duration), il numero di lick per bout e l'intra-bout lick rate (lick/sec durante i bouts), vengono calcolati successivamente. I dati vengono raggruppati in time bins di 3 min in sessioni di 30 minuti. Inoltre, viene misurata il tempo di latenza tra il momento in cui l'animale viene posto all'interno della stazione e la prima leccata, con un tempo di "cut-off" di 180 secondi. Un bout viene definito come una serie di almeno 4 leccate con intervalli non superiori ai 400ms. Tale criterio è stato adottato sulla base di uno studio citato da Higgs & Cooper (1998) dove

si mostra che questo intervallo è appena più lungo del break point della distribuzione logaritmica degli inter-lick intervals (intervalli tra le leccate) (Morris 1993).

- ✓ **FORCED SWIMMING TEST**

I ratti sono stati introdotti individualmente in cilindri di plexiglas (altezza 40 cm e diametro 18 cm), contenenti 25 cm di acqua alla temperatura di 25°C, per 15 minuti (sessione I), e a distanza di 24 ore, per 5 minuti (sessione II). Gli esperimenti sono stati filmati con una videocamera posizionata ad una distanza di circa 2 metri dai cilindri. I filmati sono stati analizzati da osservatori ignari del trattamento farmacologico a cui i ratti sono stati sottoposti, utilizzando la procedura del "time sampling" o campionamento temporale (Cryan et al. 2005; Detke et al. 1995; Detke & Lucki 1996). Tale procedura prevede la determinazione, ogni 5 secondi, del comportamento dell'animale per un totale di 180 o 60 rilevazioni a seconda della durata della sessione. I comportamenti mutuamente esclusivi che è possibile_rilevare sono quattro:

1. Immobility: il ratto svolge i movimenti necessari per mantenere le narici sopra il livello dell'acqua e quindi per rimanere a galla.
2. Swimming: il ratto nuota e nel movimento gli arti superiori ed inferiori non emergono dalla superfice dell'acqua .
3. Climbing: il ratto cerca di arrampicarsi con le zampe anteriori alle pareti del cilindro.
4. Diving: il ratto è completamente immerso nell'acqua.

Inoltre, viene misurata la latenza al primo episodio di immobilità. Gli esperimenti sono stati condotti tra le ore 14.30 e 17.30.

3. EFFETTO DELLA SVALUTAZIONE DELLA RICOMPENSA NELLA MICROSTRUTTURA DEL LICKING

✓ INTRODUZIONE

Il numero di bout di leccate si potrebbe considerare come una misura di attivazione, in quanto sensibile a stimoli diversi dal diretto contatto con la ricompensa (Smith 2001), al pari delle risposte strumentali, come per esempio il premere una leva. In linea con questa interpretazione, in un nostro precedente lavoro, abbiamo mostrato che l'effetto di raclopride sul corso temporale del numero di bout rassomiglia all'effetto degli antipsicotici o della svalutazione della ricompensa sul corso temporale di diverse risposte strumentali (D'Aquila 2010; Wise 2004). Tale questione è di rilievo in quanto su questa similitudine si fonda l'utilizzo dello studio della microstruttura del licking per investigare i meccanismi di attivazione comportamentale.

Per esplorare ulteriormente l'analogia suggerita tra il numero di bout e il comportamento strumentale, abbiamo studiato, per la prima volta, l'effetto della svalutazione della ricompensa (diluizione del saccarosio) sul corso temporale del numero dei bout in una sessione di 30 minuti, accompagnata dall'analisi delle altre misure microstrutturali del comportamento ingestivo.

✓ MATERIALI E METODI

SOGGETTI

Sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley (Harlan.Italia), di peso compreso tra i 250 e i 300 g, stabulati in numero di 2-3 per gabbia in condizioni ambientali controllate (temperatura 22-24°C, umidità 50-60%), con un ciclo di luce/buio di 12 ore, (illuminazione dalle ore 8:00 alle 20:00), e libero accesso ad acqua e cibo.

DISEGNO SPERIMENTALE

Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni di non deprivazione né di cibo né di acqua. I soggetti (N=40) sono stati esposti quotidianamente ad una soluzione di zucchero al 10% per 30 minuti. Il giorno 6 della seconda settimana, dopo aver ottenuto una baseline stabile, i soggetti sono stati divisi in due gruppi sperimentali (G1 e G2, n=20), "matched"secondo la dimensione dei bout. Il settimo giorno della seconda settimana (Trial I) il gruppo G1 è stato esposto ancora ad una soluzione zuccherina al 10%, mentre il gruppo G2 è stato esposto ad una soluzione zuccherina al 2%. L'esposizione degli animali ad una soluzione zuccherina è proseguita per due settimane, con entrambi i gruppi esposti alla soluzione al 2% al settimo giorno di ciascuna settimana (Trial II e Trial III) e ricevendo una soluzione al 10% tutti gli altri giorni. I dati di ciascun trial di svalutazione sono stati analizzati mettendoli a confronto con i dati del giorno precedente.

ANALISI STATISTICA

I risultati sono stati analizzati con l'ANOVA. L'analisi dei dati relativi al numero di lick e al numero di bout hanno coinvolto tre fattori intra-gruppo: *svalutazione* (su 2 livelli corrispondenti alle sessioni), *tempo* (su 10 livelli corrispondenti ai 10 time bins) e *trial* (su 3 livelli corrispondenti al numero di trials); e un fattore tra-gruppi: *gruppo* (su 2 livelli corrispondenti ai due gruppi G1 e G2). L'analisi del numero di lick per bout, e dell'intra- bout lick rate, è stata eseguita senza coinvolgere il fattore *tempo*. L'analisi Post hoc degli effetti principali è stata eseguita con il test a comparazioni multiple di Newman-Keuls. Quando presente una interazione significativa tra i fattori il confronto è stato eseguito con l'F-test per i contrasti. Le analisi sono state effettuate con STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.).

✓ RISULTATI

Numero di lick

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto del fattore *gruppo* [F(1,37)=1.28; n.s.] e del fattore *trial* [F(2,74)=1.90; n.s.], ma ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *svalutazione* [F(1,37)=293.78; $P<10^{-6}$] e del fattore *tempo*[F(9,333)=205.71; $P<10^{-6}$]. Inoltre, l'ANOVA ha mostrato una interazione statisticamente significativa tra i quattro fattori [*gruppo x trial x svalutazione x tempo* F(18,666)=2.53; P=0.0004]. Gli F-test per i contrasti hanno mostrato delle differenze sul numero di lick totale nel Trial I, nel gruppo G2, dovuta ad una riduzione del numero di lick statisticamente significativa nei primi 18 minuti della sessione di svalutazione. Simili risultati sono stati osservati nel trial II e III per entrambi i gruppi (Fig. 1).

Numero di bout

L'ANOVA non ha mostrato un effetto significativo del fattore *gruppo* [F(1,37)=2.74; n.s.], mentre ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *trial* [F(2,74)=3.70; P=0.029], del fattore *svalutazione* [F(1,37)=14.17; P=0.0005], e del fattore *tempo* [F(9,333)=137.82; $P<10^{-6}$], con una interazione statisticamente significativa tra i quattro fattori [*gruppo x trial x svalutazione x tempo* F(18,666)=1.98; P=0.008]. Gli F- test per i contrasti hanno mostrato delle differenze sul numero di bout totale nel Trial I, nel gruppo G2, dovute ad una riduzione del numero di bout statisticamente significativa dal 9° al 18° minuto della sessione di svalutazione. Nel trial II il gruppo G2 presenta una riduzione significativa del numero totale di bout dovuta ad un decremento del numero di bout dal 6° al 15° minuto della sessione di svalutazione. Nel trial III il numero totale di bout non risulta essere significativamente differente nella sessione di svalutazione rispetto a quella precedente, ma dal corso temporale del numero dei bout si evince un decremento significativo nei primi 6 minuti e nel 15° minuto. Nel trial II, nel gruppo G1 si presenta una differenza significativa sul corso temporale del

numero dei bout al 9° e al 12° minuto, ma non nel numero di bout totale, mentre nel trial III è significativa la riduzione del numero totale di bout nella sessione di svalutazione , dovuta ad un decremento nei primi 12 minuti (Fig 2). In sintesi, dopo ogni episodio di svalutazione si è osservata una riduzione del numero dei bout che ha avuto luogo dopo diversi minuti di intenso contatto con la ricompensa, come avviene nel corso temporale delle risposte strumentali o dopo svalutazione della ricompensa o dopo trattamento con antipsicotici.

Numero di lick per bout

L'ANOVA non ha mostrato un effetto significativo del fattore *gruppo* [$F(1,37)=0.07$; n.s.] né del fattore *trial* [$F(2,74)=2.32$; n.s.], mentre ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *svalutazione* [$F(1,37)=87.81$; $P<10^{-6}$], con una interazione statisticamente significativa *gruppo x trial x svalutazione* [$F(2,74)=8.26$; $P=0.0005$]. Gli F-test per i contrasti hanno mostrato decrementi statisticamente significativi in tutti i trials e in entrambi i gruppi quando esposti alla soluzione al 2% (Fig. 3)

Intra-bout lick rate

L'ANOVA non ha mostrato un effetto significativo del fattore *gruppo* [$F(1,37)=2.33$; n.s.] né del fattore *trial* [$F(2,74)=0.27$; n.s.], mentre ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *svalutazione* [$F(1,37)=6.58$; $P=0.014$], dovuto ad un lieve incremento nelle sessioni in cui i gruppi sono stati esposti ad una soluzione al 2%, senza nessuna interazione significativa tra i tre fattorie [*gruppo x trial x svalutazione* $F(2,74)=1.08$; n.s.] (Fig. 3).

Latenza

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto statisticamente significativo.

✓ DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano la capacità della diluizione dello zucchero di ridurre la dimensione dei bout. Inoltre, quando gli animali vengono esposti alla soluzione diluita si osserva una riduzione del numero dei bout che ha luogo solo dopo un prolungato contatto con la ricompensa, come da noi precedentemente osservato dopo trattamento con raclopride (D'Aquila 2010). Questo pattern di risposta è lo stesso che si osserva nel comportamento strumentale dopo svalutazione della ricompensa o dopo trattamento con antipsicotici. Questo suggerisce che l'emissione dei bout e le risposte strumentali, come la pressione di una leva, siano governate dagli stessi meccanismi e supporta l'idea che il numero dei bout sia una misura di attivazione comportamentale.

Lavori precedenti (Gramling et al. 1984; Gramling & Fowler 1986) avevano cercato di dimostrare, ma senza successo, la similitudine tra l'effetto degli antipsicotici e la svalutazione della ricompensa sulla microstruttura del licking. Tuttavia, in questi studi non sono stati esaminati né il numero né la dimensione dei bout, ma solo il corso temporale delle leccate.

La coerenza di questi risultati con i risultati ottenuti in diversi paradigmi sperimentali, la somiglianza degli effetti degli antagonisti D2-like della dopamina sul numero di bout e i suoi effetti sulla risposta strumentale per ricompense diverse, supportano l'importanza dello studio della microstruttura del licking e del presente risultato per la comprensione non solo dei comportamenti ingestivi o per l'appetibilità, ma anche per lo studio delle risposte finalizzate in termini più generali. Inoltre la ripetuta esposizione alla svalutazione della ricompensa (diluizione dal 10% al 2%), ha dato come effetto un anticipato decremento del numero di bout nel corso della sessione, che potrebbe essere interpretato come un più rapido aggiornamento del livello di attivazione comportamentale in risposta alla svalutazione della ricompensa, probabilmente dovuto alle esperienze precedenti.

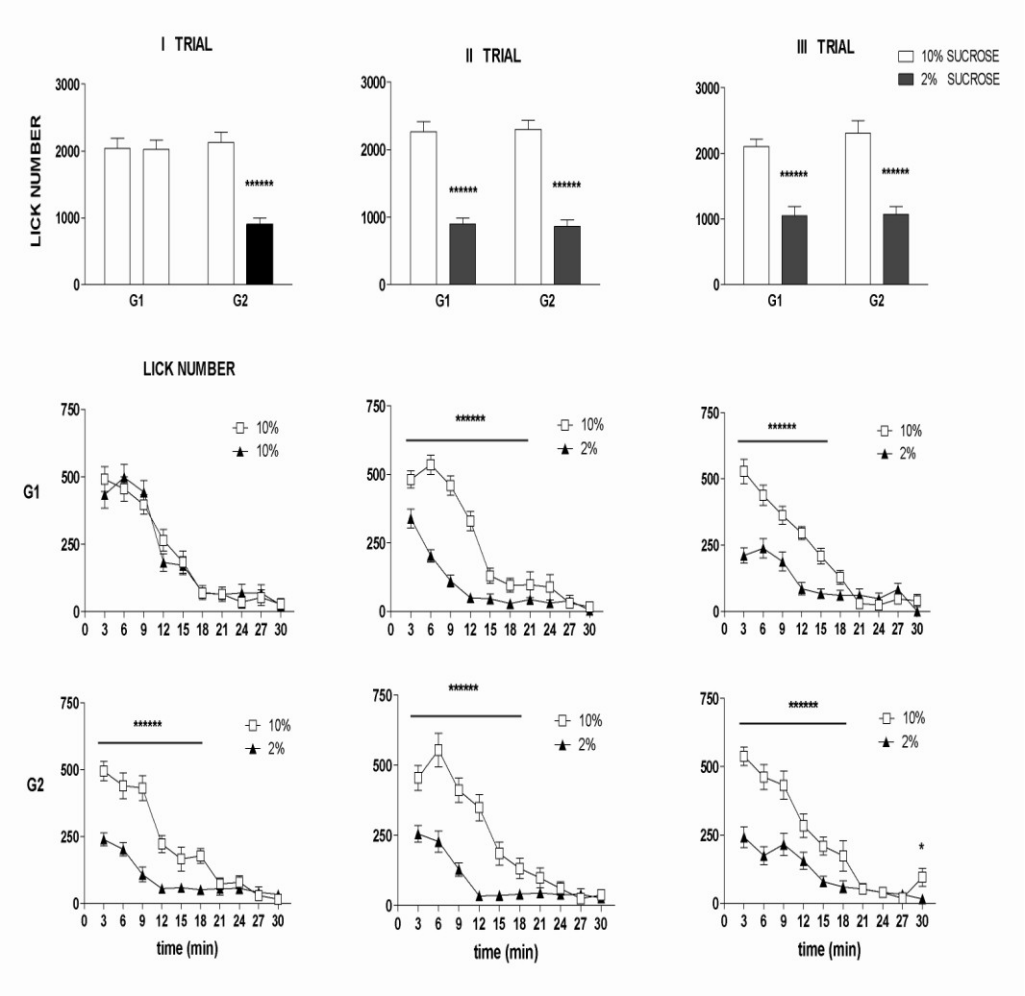

Figura 1. Effetto della svalutazione della ricompensa sul numero di lick totale e sul corso temporale, nei gruppi G1 e G2, nei TRIAL I, II, III. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 20 soggetti. *P<0.05; *****P<10^{-6} (ANOVA seguita dall'F test per i contrasti).

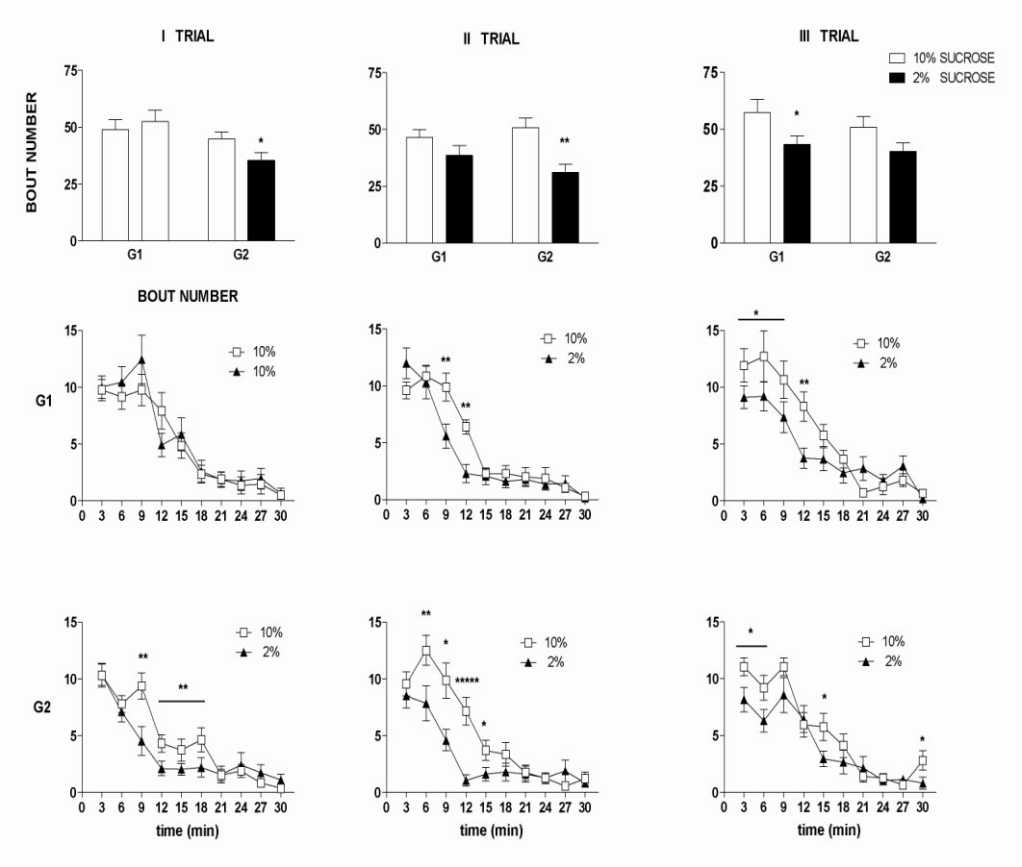

Figura 2. Effetto della svalutazione della ricompensa sul numero di bout totale e sul corso temporale, nei gruppi G1 e G2, nei TRIAL I, II, III. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 20 soggetti. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 20 soggetti. *P<0.05; **P<0.01; ****P<0.0001 (ANOVA seguita dall'F-test per i contrasti).

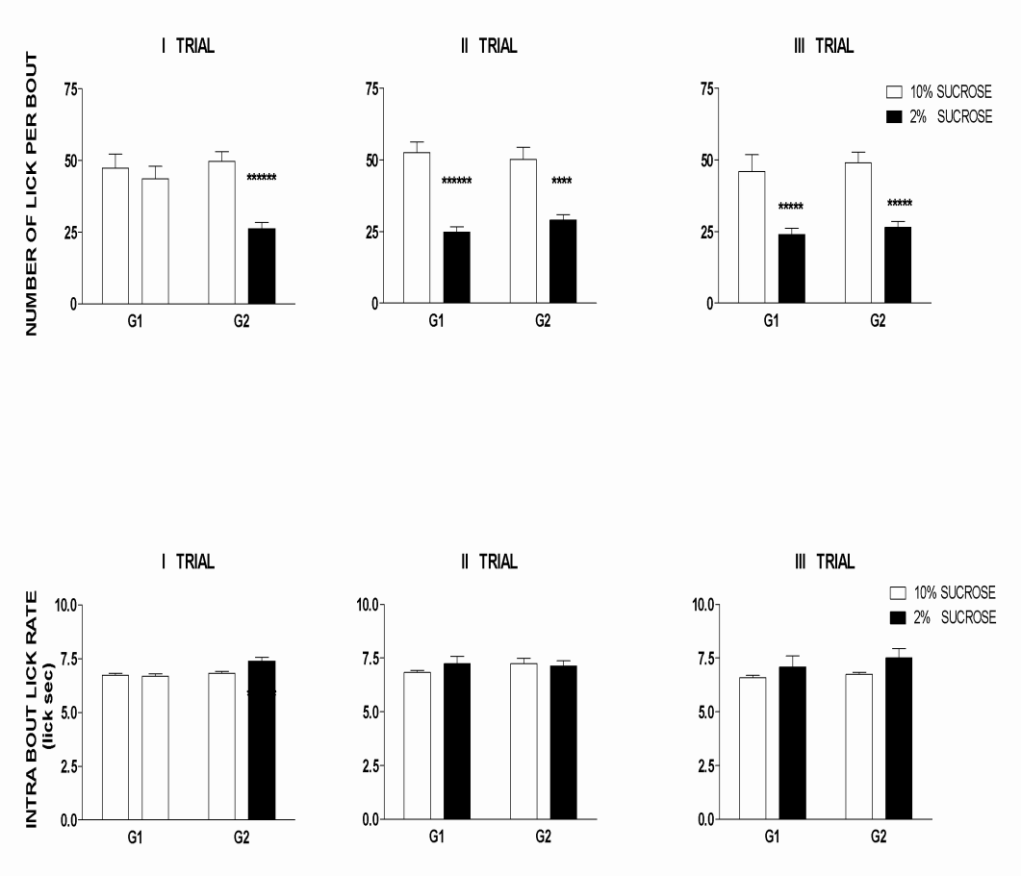

Figura 3. Effetto della svalutazione della ricompensa sul numero di lick per bout e sull' intra-bout lick rate, nei gruppi G1 e G2, nei TRIAL I, II, III. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 20 soggetti. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 20 soggetti. *****$P<10^{-6}$ (ANOVA seguita dal Newman-Keuls test)

4. EFFETTO DEGLI ANTAGONISTI D1-LIKE E D2-LIKE DELLA DOPAMINA NEL "FORCED SWIMMING TEST"

✓ INTRODUZIONE

FORCED SWIMMING TEST

Il forced swimming test (FST), originariamente proposto come "behavioural despair test" (Porsolt et al.1977), è il modello animale più utilizzato per lo screening dei farmaci antidepressivi, e consiste nell'immergere i ratti (o topi) in un cilindro pieno d'acqua dal quale è impossibile scappare. Gli animali rispondono inizialmente con una attività vigorosa che consiste nel cercare di arrampicarsi alle pareti del cilindro, nel nuotare e nell'immergersi. Questi comportamenti possono essere interpretati come tentativi di fuga. Successivamente, il livello di attività declina e gli animali compiono solamente i movimenti necessari per tenere la testa al di sopra del livello dell'acqua. Quando gli animali vengono testati 24 ore dopo, si osserva una riduzione del livello di attività. I farmaci antidepressivi, generalmente somministrati tra le due sessioni di "forced swimming test", riducono l'immobilità ed incrementano il comportamento attivo nella seconda sessione. Nonostante abbia un buon valore predittivo sull'effetto degli antidepressivi, il significato di questo paradigma comportamentale in termini psicologici o semplicemente in termini comportamentali è ancora dibattuto, e deve essere ancora ricercata un'interpretazione accettabile che leghi il comportamento alla psicopatologia. A prescindere dalle interpretazioni del "FST" come "disperazione comportamentale" (Porsolt et al. 1977, 1978, 1979), diverse evidenze sperimentali mostrano che la risposta al FST è determinata da tratti ereditabili che potrebbero avere un ruolo nella depressione e potrebbe essere un marker di uno stato che è favorito da condizioni fisiologiche che incrementano il rischio di depressione nell'uomo. A livello comportamentale, il FST potrebbe essere interpretato come una condizione sperimentale dove gli animali devono fare un

bilancio tra i rischi e i benefici raggiungibili con due strategie alternative: comportamento attivo, che può portare alla fuga ma che comporta il rischio di esaurimento delle forze; un comportamento di immobilità, che può prolungare la sopravvivenza ma può portare, in mancanza di soccorso, ad annegamento. Così, il passaggio da una infruttuosa strategia di coping attivo a una passiva potrebbe essere considerato come una risposta adattativa finalizzata ad aumentare le probabilità di sopravvivenza (vedi Cryan et al. 2005).

Tra i tanti substratti neurochimici studiati, diversi dati mostrano che la trasmissione dopaminergica sia coinvolta nell'espressione degli effetti dei farmaci antidepressivi in questo test. Infatti, sia gli antagonisti dei recettori D1-like che D2-like della dopamina antagonizzano gli effetti degli antidepressivi con diversi meccanismi d'azione,con alcuni trattamenti più sensibili al blocco dei recettori D1-like e altri più sensibili al blocco dei recettori D2-like (Asakura et. 1994; Baamonde et al. 1992; Borsini et al. 1988; D'Aquila et al. 1994, 2010; Maj et al. 1992; Nikulina et al. 1991; Shimazu et al. 2005; Yamada et al. 2004; Vaugeois et al. 1996). Tuttavia, una interpretazione funzionale in termini comportamentali del ruolo della dopamina, e dei suoi sottotipi recettoriali D1-like e D2-like, sull'effetto del FST *per se* o sull'effetto degli antidepressivi in questo test, è ancora carente.

SCOPO

Come descritto nell'introduzione, sulla base degli effetti degli antagonisti dei recettori D1-like e D2-like della dopamina sulla microstruttura del licking, abbiamo suggerito che l' attivazione delle risposte associate alla ricompensa dipendano dalla stimolazione dei recettori D1-like della dopamina, e che il livello di tale attivazione venga aggiornato, o "reboosted", sulla base di un processo di "valutazione contingente" mediato dalla stimolazione dei recettori D2-like della dopamina che si verifica durante la transazione consumatoria con la ricompensa (D'Aquila 2010). Questa ipotesi si inserisce all'interno del quadro teorico che guarda al ruolo della dopamina in termini di analisi costo-beneficio e di "allocazione dello sforzo alla risposta" (Salamone et al. 2009). Tuttavia, lo studio della microstruttura del licking (i) non fornisce

misure particolarmente adatte ad essere interpretate in termini di analisi costo-beneficio, poiché lo sforzo richiesto per una leccata è molto basso, e (ii) si occupa solo di un tipo di risposte finalizzate, come la ricompensa di soluzioni dolci, mentre il ruolo della dopamina nell'attivazione comportamentale potrebbe essere importante non solo nelle risposte finalizzate all'ottenimento di una ricompensa ma anche in altri comportamenti finalizzati (Canon & Palmiter 2003; Salamone et al. 2005, 2007, 2009).

Lo scopo di questo studio è quello di testare l'ipotesi in un paradigma sperimentale che potrebbe essere interpretato in termini di comportamento finalizzato (come la fuga), che richiede una risposta vigorosa e faticosa, e che mostra un aggiornamento dell'output motorio sia durante le sessioni che tra le sessioni. Il FST sembra avere questi requisiti. Per testare la nostra ipotesi in questo test, dove non viene data nessuna ricompensa agli animali, suggeriamo che il processo di valutazione rivelato dalla dimensione dei bout, proporzionale alla concentrazione dello zucchero, possa essere considerato anche come una valutazione dell'efficacia della risposta, dato che il gusto dolce rivela il valore calorico della soluzione: più dolce è la soluzione, maggiore sarà l'efficacia della leccata in termini di analisi costo-beneficio. In questo modo, il concetto di valutazione dell'efficacia della risposta può essere opportunamente utilizzato per descrivere sia il caso del licking per il saccarosio, sia il caso del FST, in cui i soggetti riducono il loro output comportamentale dopo aver percepito che i loro sforzi non hanno (e non possono) portare ad un esito positivo, cioè valutano il loro tentativo di fuga come inefficace. Perciò abbiamo esaminato (i) gli effetti degli antagonisti dei recettori D1-like and D2-like della dopamine SCH 23390 (Iorio et al. 1983) e raclopride (Köhler et al. 1985), rispettivamente, somministrati 30 minuti prima dell'esposizione al FST, e (ii) l'effetto degli stessi trattamenti in una seconda sessione a distanza di 24 ore. Infine , abbiamo condotto due esperimenti per verificare i possibili effetti dei trattamenti farmacologici 24 ore dopo la somministrazione, senza pre-esposizione alla condizione del nuoto forzato.

✓ MATERIALI E METODI

SOGGETTI E TRATTAMENTI

Sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley (Harlan, Italia), di peso compreso tra i 250 e i 300 g. L'antagonista dei recettori D2-like della dopamina , raclopride [S(-)-raclopride-L-tartrate] e l'antagonista D1-like della dopamina, SCH 23390 [R(+)-7-cloro-8-idrossi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetraidro-1H-3-benzazepina cloridrato] (Sigma, St. Louis,USA), sono stati solubilizzati in acqua distillata e somministrati per via sottocutanea ad un volume di 1mg/ml. Le dosi sono state le stesse utilizzate nel precedente studio sulla microstruttura del licking (D'Aquila, 2010): 0.01, 0.02 e 0.04 mg/kg per SCH23390 e 0.025, 0.125, 0.250 mg/kg per raclopride. Il trattamento con veicolo ha comportato la somministrazione di 1ml/kg di acqua distillata. L'intervallo di tempo tra il trattamento farmacologico, o il trattamento con veicolo, e la sessione sperimentale è stato di 30 minuti.

DISEGNO SPERIMENTALE

In un primo set di esperimenti, due diversi gruppi di soggetti (n=60) sono stati suddivisi in 4 gruppi (n=15) e sono stati sottoposti al trattamento con veicolo e tre dosi di SCH 23390 (ESPERIMENTO 1) o raclopride (ESPERIMENTO 2). I farmaci o il veicolo sono stati somministrati 30 minuti prima dell'inizio della prima sessione sperimentale (Sessione I) della durata di 15 minuti. Dopo 24 ore i gruppi sono stati sottoposti alla seconda sessione sperimentale (Sessione II) della durata di 5 minuti. In un secondo set di esperimenti due differenti gruppi di soggetti (n=40) sono stati suddivisi in 4 gruppi (n=10), e sono stati sottoposti al trattamento con veicolo e tre dosi di SCH 23390 (ESPERIMENTO 3) o raclopride (ESPERIMENTO 4), ma sono stati testati in una singola sessione sperimentale di 5 minuti eseguita 24 ore dopo i trattamenti farmacologici. Nella seconda sessione dell'Esperimento 2 sono stati persi i dati relativi a due soggetti, uno appartenente al gruppo dei soggetti trattati con veicolo e l'altro al gruppo trattato con 0.250 mg/Kg di raclopride.

ANALISI STATISTICA

I dati basati sulla procedura del time sampling sono stati raccolti in rilevazioni di un minuto, fornendo in tal modo il corso temporale della risposta comportamentale. L'analisi statistica è stata eseguita con l'ANOVA, con un fattore tra-gruppi quale: *trattamento* (con 4 livelli corrispondenti alle dosi) e, quando appropriato, il fattore intra-gruppi *tempo* (con 15 o 5 livelli corrispondenti alle rilevazioni da 1 minuto). Nelle due sessioni sperimentali, la latenza al primo episodio di immobilità e il time sampling nei primi 5 minuti delle due sessioni, sono stati sottoposti all' ANOVA a misure ripetute, coinvolgendo, oltre al fattore *trattamento*, il fattore *sessione* (2 livelli). L'analisi Post hoc degli effetti principali del fattore *trattamento* è stata eseguita con il test a comparazioni multiple di Newman-Keuls. Quando emerge una interazione significativa tra i due fattori il confronto viene eseguito con l'F-test per i contrasti. I dati relativi al diving non sono stati sottoposti ad analisi statistica data la rarità di questo comportamento. Le analisi sono state effettuate con STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.).

✓ RISULTATI

Esperimento 1: Effetto di SCH 23390 somministrato 30 minuti prima della prima delle due sessioni sperimentali.

Climbing

Nella prima sessione, l'ANOVA ha rivelato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [$F(3,56)=6.29$; $P<0.001$], dovuto ad una riduzione dose-dipendente del climbing dopo trattamento con SCH 23390 (Fig 1A), e del fattore *tempo* [$F(14,784)=106.29$; $P<0.001$], dovuto ad alti livelli di climbing all'inizio della sessione (fig. 1B, 1C, 1D). Inoltre, è presente una interazione significativa tra i due fattori [$F(42,784)=4.43$; $P<0.001$], dovuta al differente corso temporale tra le dosi. Nel trattamento con veicolo è stato osservato un ripido declino del climbing nei primi 5 minuti della sessione. Il trattamento con SCH 23390 ha comportato una riduzione significativa del

climbing evidente nel secondo minuto alla dose più bassa (fig. 1B), nei primi due minuti alla dose media (fig. 1C) e nei primi tre minuti alla dose più alta (fig. 1 D).

Nella seconda sessione, l'ANOVA ha rivelato un effetto statisticamente significativo del fattore *tempo* [F (4,224)=105.42; P<0.001], dovuto ad un maggior livello di climbing all'inizio della sessione (fig. 1F, 1G, 1H). E' inoltre presente un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,56)=2.83; P<0.05], ma, nonostante i valori medi del climbing siano più elevati dopo il trattamento con tutte e tre le dosi di SCH 23390 rispetto al trattamento con veicolo, il test di Newman-Keuls non ha mostrato nessuna differenza significativa (Fig. 1E). Tuttavia, è presente una interazione altamente significativa tra i due fattori [F(12,224)=3.28; P <0.001]. Gli animali trattati con veicolo hanno mostrato un declino costante dell'attività di climbing nel corso della sessione. Il trattamento con SCH 23390 ha generato un aumento dose-dipendente del climbing rispetto al veicolo nei primi minuti della sessione (fig. 1F, 1G, 1H).

Il confronto tra i dati delle due sessioni non ha mostrato un effetto significativo del fattore *trattamento* [F(3,56)=1.34, n.s.], ma ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *sessione* [F (1,56)=10.31; P<0.01] e una interazione significativa tra i due fattori [F(3,56)=10.09; P<0.001]. L' F-test per i contrasti ha rivelato che nei primi cinque minuti della prima sessione il trattamento con SCH23390 alle dosi più alte ha ridotto il climbing, mentre nella seconda sessione non si è verificata nessuna riduzione dovuta al trattamento. Tuttavia, è stato osservato un aumento molto significativo del climbing nella seconda sessione rispetto alla prima, nel gruppo trattato con la dose più elevata di SCH 23390 (fig. 7A).

Swimming

Nella prima sessione l'ANOVA non ha rivelato nessun effetto del fattore *trattamento* [F(3,56)=1.46; n.s.] (fig. 2A). Sì è osservato invece un effetto statisticamente significativo del fattore *tempo* [F(14.784)=10.81; P<0.001] ed una interazione significativa tra i due fattori [F(42,784)=2.3; P<0.001]. Dopo trattamento con veicolo il livello di swimming ha mostrato un incremento,

durante il corso temporale, che tocca livelli massimi nei primi 3 minuti della sessione. Il trattamento con SCH 23390 ha generato una riduzione del swimming nella seconda metà della sessione, fenomeno più marcato alla dose più bassa, limitata ad un singolo time point (9° minuto) alla dose più alta (fig. 2B, 2C, 2D). Inoltre, è stato osservato un aumento del swimming alla dose più alta di SCH 23390 rispetto al trattamento con veicolo nel primo minuto (fig. 2D). Nella seconda sessione l'ANOVA ha rivelato un effetto altamente significativo del fattore *tempo* [$F(4,224)=48.47$; $P<0.001$], dovuto ad un aumento del swimming nel corso della sessione. L'effetto del fattore *trattamento* [$F(3,56)=2.11$; n.s.] e l'interazione tra i due fattori non sono risultati statisticamente significativi [$F(12,224)=0.4$; n.s.] (fig. 2, pannelli a destra). Il confronto tra i dati delle due sessioni non ha rivelato nessun effetto statisticamente significativo [*trattamento*: $F(3,56)=0.81$; n.s.; *sessione*: $F(1,56)=0.62$, n.s.; interazione: $F(3,56)=2.07$; n.s.] (fig. 7B).

Immobilità

Nella prima sessione l'ANOVA non ha rivelato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [$F(3,56)=1,6$; n.s.] (fig. 3A), ma ha rivelato un effetto significativo del fattore *tempo* [$F(14,784)=26,87$; $P<0.001$] e una interazione significativa tra *tempo* e *trattamento* [$F(42,784)=1.82$; $P<0.01$]. Nel gruppo trattato con veicolo è stato osservato un aumento dell'immobilità nel tempo. Alle due dosi più basse di SCH 23390 si è verificato un aumento dell'immobilità nella seconda metà della sessione, mentre la dose più alta non ha prodotto nessun effetto.

Nella seconda sessione l'ANOVA non ha rivelato un effetto significativo nè del fattore *trattamento* [$F(3,56)=0.72$; n.s.] (fig. 3A) nè del fattore *tempo* [$F(4,224)=1.34$; n.s.]. Tuttavia, l'analisi statistica ha evidenziato una interazione significativa tra i due fattori [$F(12,224)=2.97$; $P<0.001$]. Il trattamento con veicolo ha determinato una lieve diminuzione dell'immobilità nel tempo, mentre nel gruppo trattato con la dose più elevata rispetto al veicolo, il trattamento con SCH 23390 ha prodotto un andamento opposto (fig. 3F, 3G), portando ad un livello significativamente ridotto di immobilità all'inizio della sessione e ad un aumento significativo alla fine della sessione (fig. 3H).

Il confronto tra i dati delle due sessioni non rivela nessun effetto statisticamente significativo [*trattamento*: F (3,56)=0.48; n.s.; *sessione*: F(1,56)=0.25; n.s; interazione: F(3,56)=0.76; n.s.] (fig. 7C).

Latenza

L'ANOVA dei dati relativi alla latenza delle due sessioni ha rivelato un effetto significativo del fattore *sessione* [F(1,56)=9.77; P<0.01], a causa del decremento nella seconda sessione rispetto alla prima, senza nessun effetto significativo del fattore *trattamento* [F(3,56)=0.21; n.s.] e senza interazione tra i due fattori [F(3,56)=1.56; n.s.] (fig. 7D).

Esperimento 2: Effetto di raclopride somministrato 30 minuti prima della prima delle due sessioni sperimentali

Climbing

Nella prima sessione, l'ANOVA ha rivelato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,56)=5.60; P<0.01], dovuto ad un incremento dose-dipendente del climbing dopo trattamento con raclopride (Fig 4A), e del fattore *tempo* [F(14,784)=30.48; P<0.001], dovuto ad alti livelli di climbing all'inizio della sessione. Inoltre, è presente una interazione significativa tra i due fattori [F(42,784)=4.393; P<0.001]. Nei soggetti trattati con veicolo è stato osservato un ripido declino del climbing nei primi 5 minuti della sessione, come osservato nell'Esperimento 1. Il trattamento con raclopride ha ridotto il climbing all'inizio della sessione in modo dose-dipendente (fig 4B, 4C, 4D). Inoltre nei soggetti trattati con le due dosi più alte si ha un appiattimento della curva del corso temporale: gli animali iniziano con bassi livelli di climbing, e dopo una piccola riduzione nei primi 3 minuti, il loro livello di attivazione non si riduce sino alla fine della sessione, rimanendo significativamente più alto rispetto al gruppo trattato con il veicolo (fig 4C, 4D).

Nella seconda sessione, l'ANOVA ha rivelato un effetto statisticamente significativo del fattore *tempo* [F(4,216)=31.15; P<0.001], dovuto ad un maggior livello di climbing all'inizio della sessione. Né l'effetto del fattore

trattamento [F(3,54)=0.98; n.s.], nè l'interazione tra i due fattori [F(12,216)=1.04; n.s.] sono risultati essere significativi (fig 4, pannelli a destra).

Il confronto tra i dati delle due sessioni ha mostrato un effetto significativo del fattore sessione [F (1,54)=20.36; P<0.001], dovuto ad una riduzione del climbing nella seconda sessione, senza nessun effetto del fattore *trattamento* [F(3,54)=1.20, n.s.], e una interazione non significativa tra i due fattori [F(3,54)=1.47; n.s.] (fig 7E).

Swimming

Nella prima sessione l'ANOVA ha rivelato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,56)=25.06; P<0.001] dovuto ad un decremento dose-dipendente dello swimming dopo trattamento con raclopride (fig. 5A), e del fattore *tempo* [F(14,784)=7.83; P<0.001], dovuto ad un incremento dello swimming nel corso della sessione, accompagnato da una interazione significativa tra i due fattori [F(42,784)=3.48; P<0.001]. Il gruppo trattato con veicolo ha mostrato un incremento dello swimming che si verifica nei primi 5 minuti della sessione, raggiungendo un livello che rimane costante sino alla fine della sessione. Tale effetto è stato antagonizzato in modo dose-dipendente dal trattamento con raclopride (fig. 5B, 5C, 5D).

Nella seconda sessione l'ANOVA ha rivelato un effetto altamente significativo del fattore *tempo* [F(4,216)=31.73; P<0.001], dovuto ad un aumento del swimming nel corso della sessione. L'effetto del fattore *trattamento* [F(3,54)=1.63; n.s.] e l'interazione tra i due fattori [F(12,216)=0.98; n.s.] non sono risultati statisticamente significativi (fig. 5, pannelli a destra).

Il confronto tra i dati delle due sessioni ha rivelato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,54)=3.04; P<0.05] e *sessione* [F(1,54)=40.67; P<0.001], accompagnato da una interazione significativa tra i due fattori [F(3,54)=7.73; P<0.01]. L'F-test per i contrasti ha mostrato che nei primi 5 minuti della prima sessione raclopride, alle due dosi più alte, ha ridotto lo swimming, mentre non è stato osservato un effetto dovuto al trattamento nella seconda sessione. Tuttavia è stato osservato un incremento

significativo dello swimming nel gruppo trattato con la dose più alta di raclopride (fig. 7F).

Immobilità

Nella prima sessione l'ANOVA ha rivelato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,56)=4.05; P<0.05] (fig. 6A), dovuto ad un incremento dose dipendente dopo trattamento con raclopride, e un effetto significativo del fattore *tempo* [F(14,784)=2,84; P<0.001], dovuto ad un incremento dell'immobilità nel corso della sessione. L'interazione tra tempo e trattamento non è stata significativa [F(42,784)=0.48; P <0.01] a causa di un andamento parallelo del corso temporale alle differenti dosi (fig. 6B, 6C, 6D).

Nella seconda sessione l'ANOVA non ha rivelato nessun effetto significativo [*tempo*: F(4,216)=1.17; n.s.; *trattamento*: F(3,54)=0.70; n.s.; *tempo x trattamento*: F(12,216)=0.60; n.s.] (fig. 6, panelli a destra).

Il confronto tra i dati delle due sessioni non ha rivelato nessun effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F (3,54)=1.32; n.s.], e del fattore *sessione* [F(1,54)=2.30; n.s.]. Tuttavia l'interazione tra i due fattori è stata significativa [F(3,54)=3.10; P<0.05]. L'F-test per i contrasti ha mostrato un incremento statisticamente significativo dell'immobilità nella prima sessione, con la bassa e l'alta dose di raclopride , mentre con la dose media non sono stati riportati effetti significativi. Nella seconda sessione il trattamento con raclopride non ha generato nessun effetto significativo. Tuttavia è stato osservato un decremento dell'immobilità nella seconda sessione rispetto alla prima nel gruppo trattato con la dose più alta di raclopride (fig. 7G).

Latenza

L'ANOVA dei dati relativi alla latenza delle due sessioni non ha rivelato un effetto significativo del fattore *sessione* [F(1,54)=0.39; n.s.] e del fattore *trattamento* [F(3,56)=0.21; n.s.], ma l'interazione tra i due fattori è stata significativa [F(1,54)=5.61; P<0.01]. L'F-test per i contrasti ha mostrato un decremento dose-dipendente della latenza nella prima sessione senza nessun effetto di raclopride nella seconda sessione. Tuttavia, nel gruppo trattato con veicolo si è manifestata una riduzione della latenza tra le sessioni, mentre un

incremento tra le sessioni è stato osservato nel gruppo trattato con la dose più alta di raclopride (fig. 7H).

Effetto di SCH 23390 (ESPERIMENTO 3) e raclopride (ESPERIMENTO 4) somministrati 24 ore prima di una singola sessione della durata di 5 minuti.

Climbing

In entrambi gli esperimenti l'ANOVA ha rivelato un effetto statisticamente significativo del fattore *tempo* [SCH 23390: F(4,144)=44.99; P<0,001; raclopride: F(4,144)=41.32; P<0,001], dovuta alla riduzione del climbing nel tempo, senza nessun effetto del fattore *trattamento* [SCH 23390: F (3,36)=0,36; n.s.; raclopride: F(3,36)=1.49; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori [SCH 23390: F(12,144)=1.15; n.s.; raclopride: F(12,144)=0.73; n.s.] (dati non riportati).

Swimming

In entrambi gli esperimenti l'ANOVA ha rivelato un effetto significativo del fattore *tempo* [SCH 23390: F(4,144)=23,42; P<0.001; raclopride: F(4,144)=15.89; P<0.001] dovuto all'incremanto dello swimming nel tempo, nessun effetto del fattore *trattamento* [SCH 23390: F(3,36)=0.74; n.s.; raclopride: F(3,36)=0.37; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori [SCH 23390: F(12,144)=1.53; n.s.; raclopride: F(12,144)=0.45; n.s.;] (dati non riportati).

Immobilità

In entrambi gli esperimenti l'ANOVA ha rivelato un effetto significativo del fattore *tempo* [SCH 23390:F(4,144)=8.23; P<0.001; raclopride: F(4,144)=8.86; P<0.001], dovuto all'incremento dell'immobilità nel tempo, nessun effetto del fattore *trattamento* [SCH 23390: F(3,36)=0.19; n.s.; raclopride: F(3,36)=0.43; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori [SCH 23390: F(12,144)=0.86; n.s.; raclopride: F(12,144)=0.59; n.s.;] (dati non riportati).

Latenza

In entrambi gli esperimenti l'ANOVA non ha rivelato un effetto significativo del fattore *trattamento* [SCH 23390: $F(3,36)=0.30$; n.s.; raclopride: $F(3,36)=1.60$; n.s.] (dati non riportati).

✓ DISCUSSIONE

I risultati da noi ottenuti sono coerenti con i precedenti risultati sugli effetti dell'esposizione al test del nuoto forzato. Infatti, gli animali del gruppo trattato con veicolo presentano una intensa attività all'inizio della prima sessione, dovuta ad alti livelli di climbing, cioè la risposta comportamentale che richiede il massimo sforzo, accompagnata da bassi livelli di swimming e immobilità, comportamenti che richiedono un minor grado di sforzo. Il livello di attività declina nel tempo, con un ripido declino del climbing accompagnato da uno speculare incremento dell'immobilità e dello swimming (Lino-de-Oliveira et al. 2005). In contrasto con precedenti lavori (Porsolt et al. 1977, 1978, 1979), non si osservano incrementi di immobilità tra le sessioni, tuttavia il livello globale di attività risulta essere ridotto nella seconda sessione, come dimostrato dal decremento statisticamente significativo del climbing tra le due sessioni (vedi fig. 7). Tuttavia, in accordo con precedenti osservazioni, la latenza al primo episodio di immobilità è stata ridotta significativamente nella seconda sessione (vedi Lino-de-Oliveira et al. 2005).

Sulla base delle nostre conoscenze, questo è il primo studio che mira ad indagare l'effetto degli antagonisti dei recettorI D1-like e D2-like della dopamina nel forced swimming test nei ratti. Un precedente studio ha indagato gli effetti degli antagonisti dei recettori D1-like e D2-like della dopamina nei topi (Nikulina et al., 1991, vedi dopo). Tutti i lavori precedenti hanno studiato l'effetto degli antagonisti selettivi dei recettori della dopamina sulla risposta ai farmaci antidepressivi.

I risultati di questi studi mostrano la capacità del blocco dei recettori D1-like e D2-like di ridurre i livelli di attivazione comportamentale e di incrementare l'immobilità, un' osservazione che è più o meno coerente con i

dati relativi ai primi cinque minuti della prima sessione del presente esperimento. Nonostante questa superficiale somiglianza, limitata al livello complessivo di attività nei primi cinque minuti della prima sessione, gli effetti di SCH 23390 e di raclopride sono stati molto diversi.

Infatti, SCH 23390 ha generato una evidente diminuzione nell'output motorio nella prima sessione, che si riflette nella riduzione dose-dipendente del climbing, comportamento che coinvolge il più alto livello di sforzo e quello più facilmente interpretabile come un tentativo di fuga dal cilindro, che ha avuto luogo nei primi cinque minuti. E 'importante notare che gli animali trattati con SCH 23390 hanno mostrato, all'inizio della sessione, un livello ridotto di climbing rispetto al gruppo trattato con veicolo, seguito da un declino nel corso della sessione, simile a quello osservato negli animali trattati con veicolo. Nel quadro dell'ipotesi proposta si potrebbe suggerire che il blocco dei recettori D1-like della dopamina abbia portato ad una riduzione del livello di attivazione comportamentale, ma il processo di valutazione dell'efficacia della risposta, sulla base del quale gli animali ridurrebbero i loro tentativi di fuga dopo una serie di risposte senza successo, è rimasto inalterato. Coerente con questa interpretazione potrebbe essere l'osservazione che nella seconda sessione, eseguita 24 ore dopo, gli animali trattati con SCH 23390 mostrano, in modo dose-dipendente, un livello maggiore di climbing rispetto al gruppo trattato con veicolo all'inizio della sessione, seguito, ancora una volta, da un declino nel corso della sessione simile a quello osservato nel gruppo di controllo. Noi suggeriamo che questo effetto possa essere spiegato come una conseguenza di una incrementata percezione dell'efficacia della risposta all'inizio della sessione, dovuta al fatto che la seconda esperienza di nuoto forzato viene fatta senza il "freno"del blocco dei recettori D1-like, che limita direttamente il livello massimo raggiungibile di attivazione comportamentale nella prima sessione. In altre parole, in questa nuova condizione, non essendo sotto l'effetto degli antagonisti dei recettori D1-like della dopamina, è come se la stima della distanza dal goal (cioè lo sforzo supplementare stimato necessario per uscire dal cilindro) sia stata ridotta rispetto alla condizione della prima sessione. Tuttavia, poiché i tentativi di fuga sono stati comunque inefficaci nonostante le

condizioni vantaggiose rispetto alla sessione precedente, i livelli di climbing diminuiscono sin dal secondo minuto sino a raggiungere il livello del gruppo trattato con veicolo. Gli alti livelli di climbing osservati alle due dosi più alte di SCH 23390 all'inizio della seconda sessione sono parallele ad un decremento del livello di immobilità, che raggiunge un livello statisticamente significativo solo alla dose più alta. A prescindere dall'interpretazione da noi proposta, la mancanza di effetto della stessa dose di SCH 23390 somministrata 24 ore prima di una singola sessione sperimentale di 5 minuti, dimostra che gli effetti osservati nella seconda sessione sono strettamente dipendenti dall'esperienza della prima sessione sotto l'effetto del trattamento farmacologico.

Sorprendentemente, l'effetto di SCH 23390 nella seconda metà della prima sessione, cioè quando il gruppo trattato con veicolo manifesta alti livelli di immobilità e di swimming, è stato un incremento del primo e una riduzione del secondo in modo inverso rispetto alla dose. Questa osservazione suggerisce che, in queste condizioni sperimentali, la sola risposta comportamentale che sembra essere sotto il controllo diretto della stimolazione dei recettori D1-like è il climbing. Questa osservazione può essere in contrasto con i risultati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio che mostrano la capacità del trattamento con SCH 23390 di ridurre in modo dose-dipendente i livelli di swimming (D'Aquila et al. 2010). Tuttavia, probabilmente a causa di (i) ripetute esposizioni alla condizione di nuoto forzato prima del test con i farmaci (che, come visto in questo lavoro, può ridurre il climbing) e (ii) temperatura dell'acqua più elevata (30°C vs 25°C nel presente studio), i livelli di climbing osservati nel gruppo trattato con veicolo erano molto bassi, e pertanto lo swimming era la risposta al quale gli animali allocavano la maggior parte dello sforzo. Questo potrebbe suggerire che i recettori D1-like della dopamine sono coinvolti nell'allocazione dello sforzo alla risposta piuttosto che nel controllo di specifiche risposte comportamentali. Questa interpretazione è supportata anche dalla capacità di SCH 23390 di ridurre lo swimming in differenti ceppi di topo (Nikulina et al. 1991).

D'altra parte, raclopride ha ridotto l'attività nei primi cinque minuti della prima sessione, in conseguenza di un incremento dell'immobilità e di un

decremento dello swimming e, in misura minore, del climbing. Infatti è stato osservato un decremento dose-dipendente dei livelli di climbing limitato ai primi minuti della sessione. Tuttavia, gli animali trattati con le due dosi più alte di raclopride non mostrano nessun declino del climbing per il resto della sessione, mostrando, in maniera dose-dipendente, alti livelli di climbing rispetto al gruppo trattato con veicolo negli ultimi 10 minuti della sessione, mentre i livelli di swimming e di immobilità rimangono a livelli significativamente più bassi e più alti, rispetto al veicolo, rispettivamente, sino alla fine della sessione. Infatti, per la maggior parte della sessione gli animali trattati con raclopride, specialmente alle alte dosi, passano la maggior parte del tempo alternando i comportamenti di immobilità e di climbing con bassi livelli di swimming, come se volessero cercare continuamente di scappare dal cilindro, prendendo un po' di riposo tra i tentativi di fuga. Nel quadro dell'ipotesi proposta, suggeriamo che bloccando i recettoti D2-like della dopamina si ha una compromissione del normale processo di valutazione dell'efficacia della risposta, che porta (durante la sessione di 15 minuti) ad un persistere della risposta molto costosa ma inutile. Le presenti evidenze sperimentali supportano l'idea che la risposta di climbing (in queste condizioni sperimentali) sembra dipendere direttamente dalla stimolazione dei recettori D1-like della dopamina. In questo quadro interpretativo possiamo suggerire che i persistenti alti livelli di climbing osservati dopo trattamento con raclopride possono essere spiegati da un incremento della stimolazione dei recettori D1-like della dopamina, dovuto ad un incremento dei livelli di dopamina in seguito al blocco degli auto recettori D2-like della dopamina (vedi Langer 1997).

Non è stata osservata nessuna differenza nella seconda sessione, tra il gruppo trattato con raclopride e quello trattato con veicolo, né gli stessi trattamenti effettuati 24 ore prima di una singola sessione di 5 minuti (Esperimento 4), hanno mostrato un effetto significativo. Questi risultati sono coerenti con l'ipotesi che i recettori D2-like della dopamina sono coinvolti in un processo di valutazione dell'efficacia della risposta, mente escludono un loro ruolo nell'attivazione delle risposte finalizzate.

I risultati sono coerenti con l'ipotesi che i recettori D1-like della dopamina sono coinvolti nel processo di attivazione delle risposte finalizzate e nell'allocazione dello sforzo alla risposta, e che il livello di tale attivazione venga aggiornato, o "reboosted" , sulla base della valutazione dell'efficacia della risposta. Questa ipotesi è una riformulazione dell'ipotesi basata sullo studio condotto nel nostro laboratorio che esaminava gli effetti degli antagonisti D1-like e D2-like della dopamina sulla microstruttura del licking per il saccarosio (D'Aquila 2010, vedi introduzione), dove il concetto di "valutazione contingente della ricompensa" viene sostituito dal concetto di "valutazione dell'efficacia della risposta", che ci permette di generalizzare l'ipotesi a tutte le forme di comportamento finalizzati ad un obiettivo. Infatti, i risultati di questo studio mostrano similitudini tra gli effetti degli antagonisti della dopamina sulle misure comportamentali più facilmente interpretabili come "attivazione comportamentale" (vedi Robbins & Everitt 2007), cioè l'attivazione del bout di leccate nel caso del licking, e l'attivazione del climbing nei presenti esperimenti. Da una parte, entrambe le misure vengono direttamente ridotte dal trattamento con gli antagonisti D1-like della dopamina. D'altra parte, gli effetti del blocco dei recettori D2-like della dopamina su queste misure sono molto più complessi e meno diretti, ma in entrambi i casi possono essere descritti come un fallimento di una corretta valutazione dell'efficacia della risposta. Infatti, nel caso del licking, gli animali riducono l'attivazione comportamentale a seguito del contatto con una ricompensa ad alto valore, cioè a dispetto di una risposta con una normale efficacia. Nel caso riportato in questo lavoro nel test del nuoto forzato, gli animali falliscono nel ridurre il livello di risposta ad elevato sforzo nonostante il persistente fallimento nel raggiungimento dell'obiettivo, cioè rispetto ad una risposta inefficace. Secondo lo schema interpretativo proposto, gli animali potrebbero valutare l'efficacia delle loro risposte tenendo conto di diversi fattori, come il valore del goal (valore calorico della soluzione nel caso del licking e fuga da una potenziale situazione di pericolo nel caso del FST), la stima dello sforzo massimo raggiungibile (in relazione al valore del goal), e la "distanza" dal goal, cioè la stima dello sforzo aggiuntivo richiesto per raggiungere il goal. Se la "distanza" dal goal è

sufficientemente piccola , come nel caso di lievi svalutazioni della ricompensa, la risposta inefficace può essere corretta con un incremento del tasso di risposta. Se la distanza dal goal è molto grande, come nel caso di una drastica svalutazione della ricompensa o nel caso del FST, la risposta inadeguata si estingue, poiché lo sforzo addizionale richiesto per compensare la risposta inefficace viene stimato come superiore al massimo sforzo raggiungibile (in relazione al valore del goal). Questa interpretazione si inserisce all'interno del contesto teorico che guarda al ruolo della dopamina in termini di analisi costo-beneficio e di allocazione dello sforzo alla risposta (Nyv et al. 2005; Phillips et al. 2007; Salamone et al. 2005, 2007, 2009) ed è coerente con l'idea che la dopamina, piuttosto che essere coinvolta specificamente nei comportamenti associati alla ricompensa possa avere un ruolo nell'attivazione dei comportamenti finalizzati ad un goal in termini più generali (Canon & Palmiter 2003; Salamone et al. 2007; Robbins & Everitt 2007).

Sono stati osservati differenti effetti di SCH 23390 e raclopride sulla latenza al primo episodio di immobilità: raclopride, ma non SCH 23390, riduce questo parametro nella prima sessione in modo dose dipendente, mentre entrambi i trattamenti non hanno dato effetti nella seconda sessione o nella singola sessione di 5 minuti effettuata 24 ore dopo il trattamento farmacologico. Diversi studi suggeriscono che la latenza al primo episodio di immobilità è particolarmente sensibile agli effetti degli antidepressivi, che tendono a ridurre questa misura a dosi inferiori a quelle necessarie per influenzare gli altri parametri, come l'immobilità, il climbing e lo swimming (Castagné et al. 2009). Dunque, i presenti risultati possono essere considerati coerenti con le evidenze che attribuiscono ai recettori D2-like della dopamina un ruolo preponderante nel mediare l'effetto degli antidepressivi nel FST (Asakura et. 1994; Borsini et al. 1988; D'Aquila et al. 2010; Maj et al. 1992; Vaugeois et al. 1996; ma vedi Baamonde et al. 1992; D'Aquila et al. 1994; Shimazu et al. 2005).

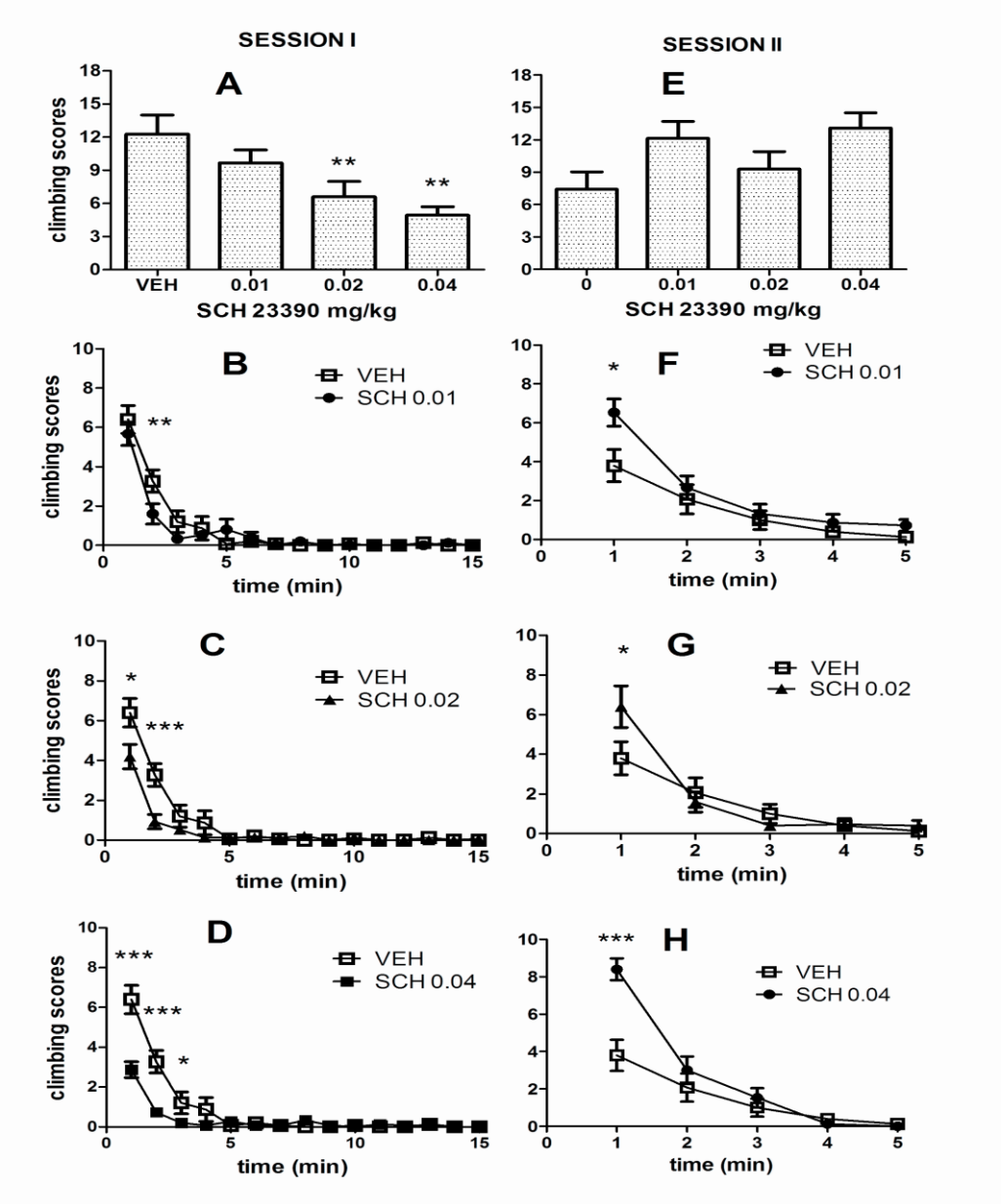

Figura. 1. Effetto di SCH 23390 sul climbing. Sulla sinistra sono riportati i risultati della prima sessione di 15 minuti e sulla destra sono riportati i risultati della seconda sessione di 5 minuti, eseguita 24 ore dopo. Sulla parte superiore sono riportati i grafici relativi ai valori totali, seguiti, sotto, dai grafici relativi al corso temporale di ciascuna dose rispetto al veicolo. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 15 soggetti. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (ANOVA seguita dal Newman-Keuls test e F-test per i contrasti)

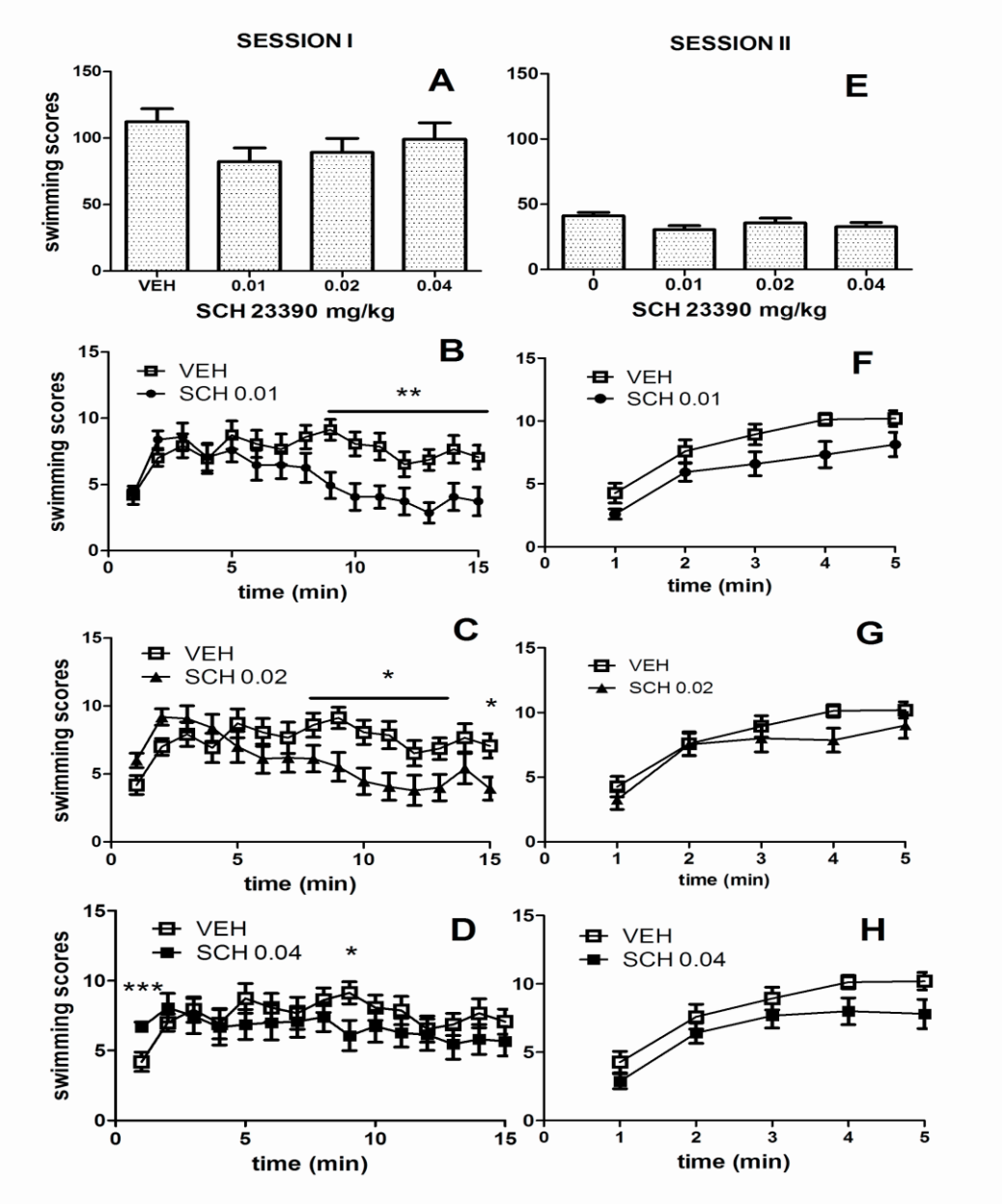

Figura 2. Effetto di SCH 23390 sul swimming. Sulla sinistra sono riportati i risultati della prima sessione di 15 minuti e sulla destra sono riportati i risultati della seconda sessione di 5 minuti, eseguita 24 ore dopo. Sulla parte superiore sono riportati i grafici relativi ai valori totali, seguiti, sotto, dai grafici relativi al corso temporale di ciascuna dose rispetto al veicolo. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 15 soggetti. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (ANOVA seguita dal Newman-Keuls test e F-test per i contrasti; le line continue indicano i contrasti che hanno coinvolto più time bins consecutivamente)

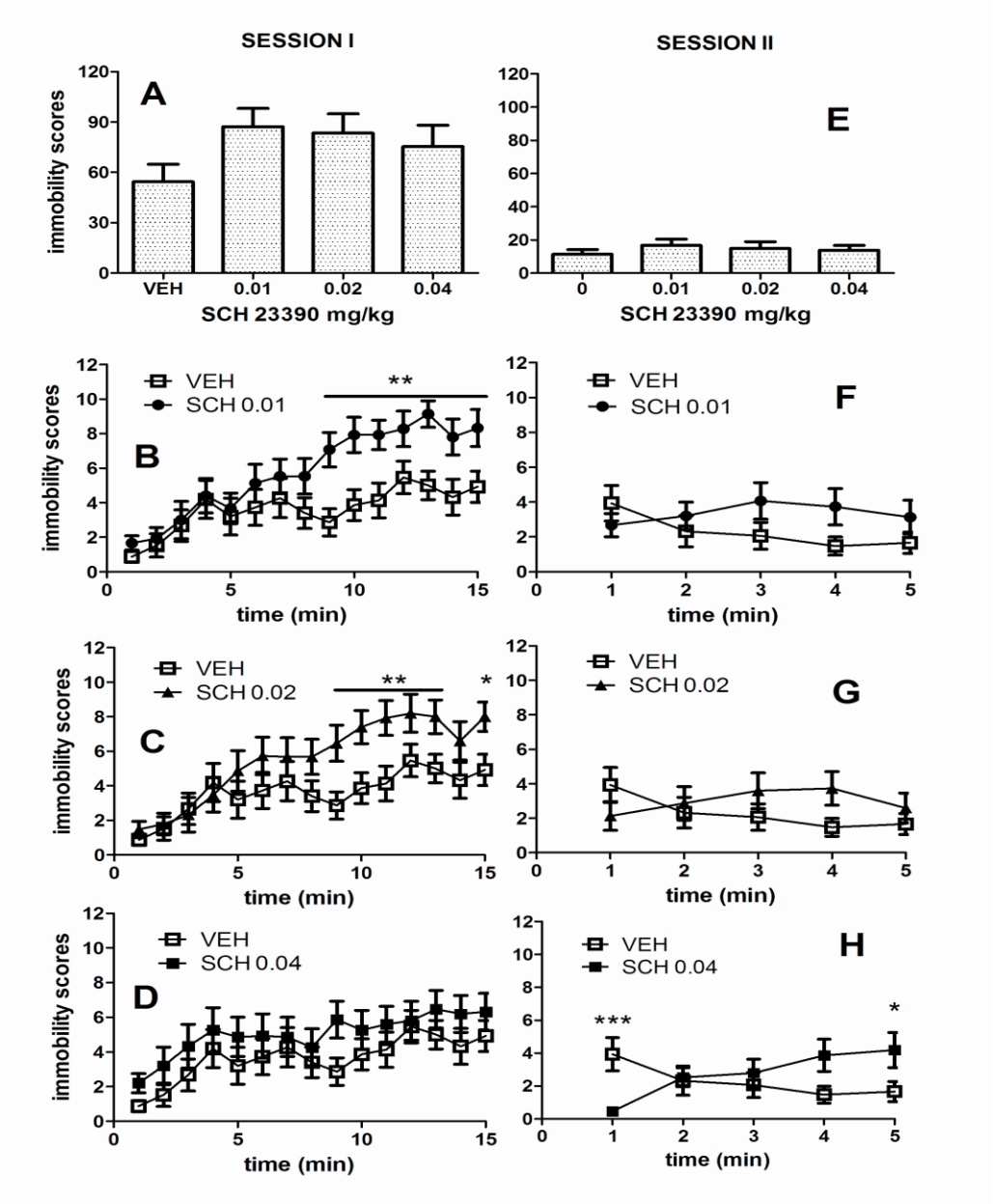

Figura 3. Effetto di SCH 23390 sull'immobilità. Sulla sinistra sono riportati i risultati della prima sessione di 15 minuti e sulla destra sono riportati i risultati della seconda sessione di 5 minuti, eseguita 24 ore dopo. Sulla parte superiore sono riportati i grafici relativi ai valori totali, seguiti, sotto, dai grafici relativi al corso temporale di ciascuna dose rispetto al veicolo. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 15 soggetti. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (ANOVA seguita dal Newman-Keuls test e F-test per i contrasti; le line continue indicano i contrasti che hanno coinvolto più time bins consecutivamente)

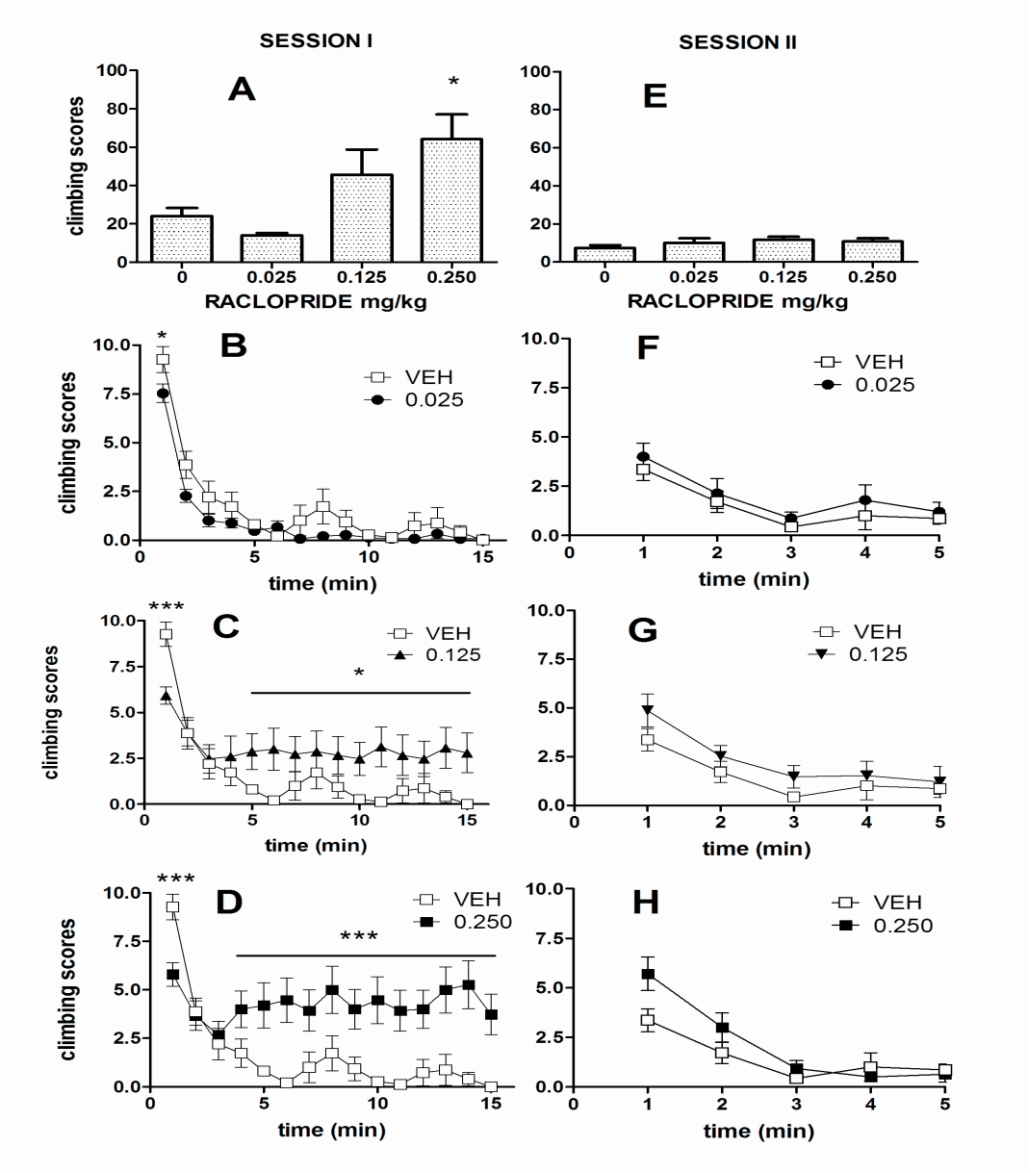

Figura 4. Effetto di raclopride sul climbing. Sulla sinistra sono riportati i risultati della prima sessione di 15 minuti e sulla destra sono riportati i risultati della seconda sessione di 5 minuti, eseguita 24 ore dopo. Sulla parte superiore sono riportati i grafici relativi ai valori totali, seguiti, sotto, dai grafici relativi al corso temporale di ciascuna dose rispetto al veicolo. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 15 soggetti. (sessione I) e 14-15 soggetti (session II). *P<0.05; ***P<0.001 (ANOVA seguita dal Newman-Keuls test e F-test per i contrasti; le line continue indicano i contrasti che hanno coinvolto più time bins consecutivamente).

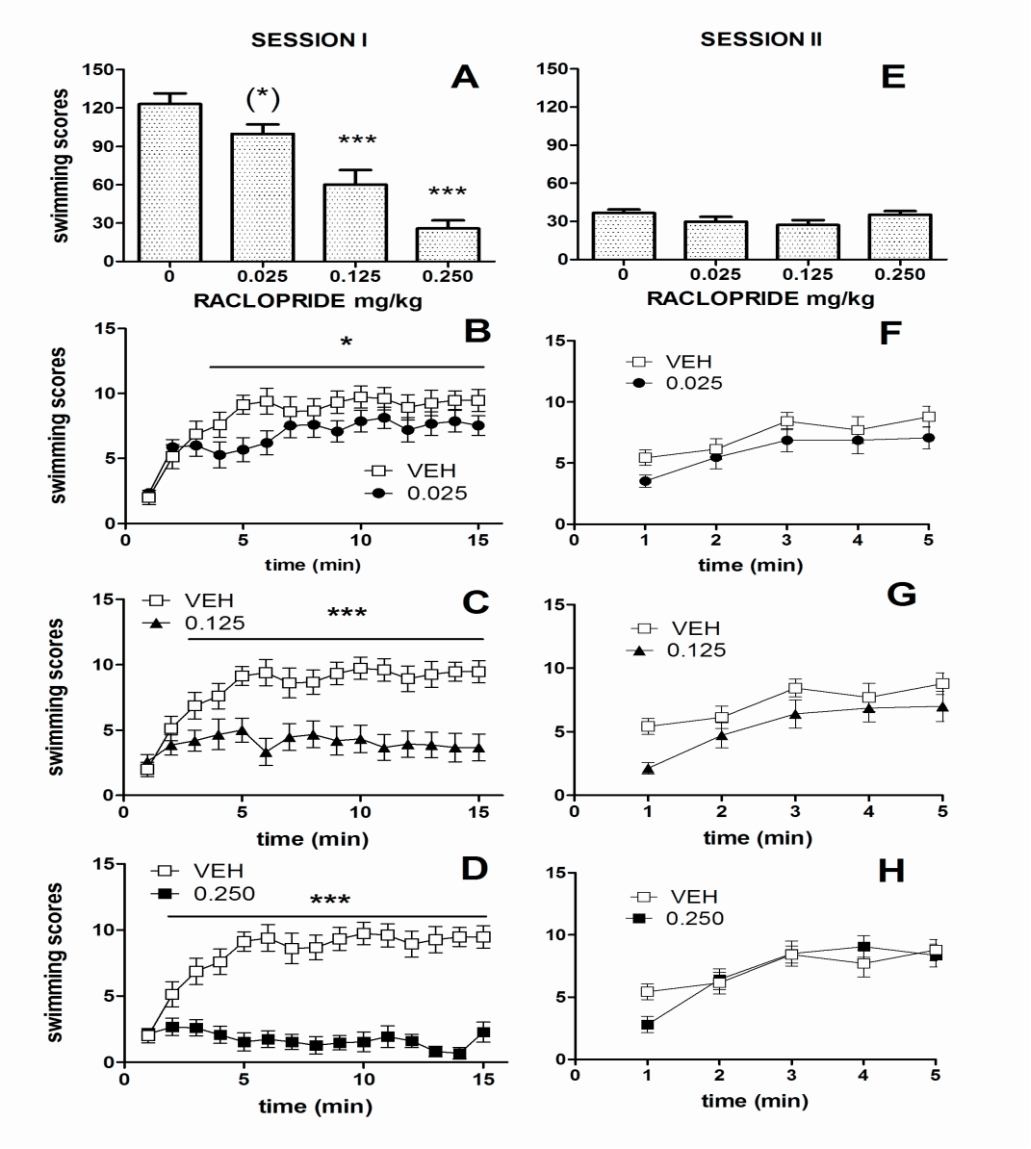

Figura 5. Effetto di raclopride sullo swimming. Sulla sinistra sono riportati i risultati della prima sessione di 15 minuti e sulla destra sono riportati i risultati della seconda sessione di 5 minuti, eseguita 24 ore dopo. Sulla parte superiore sono riportati i grafici relativi ai valori totali, seguiti, sotto, dai grafici relativi al corso temporale di ciascuna dose rispetto al veicolo. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 15 soggetti. (sessione I) e 14-15 soggetti (session II). (*) $P<0.1$ (molto vicino alla significatività statistica); *$P<0.05$; ***$P<0.001$ (ANOVA seguita dal Newman-Keuls test e F-test per i contrasti; le line continue indicano i contrasti che hanno coinvolto più time bins consecutivamente).

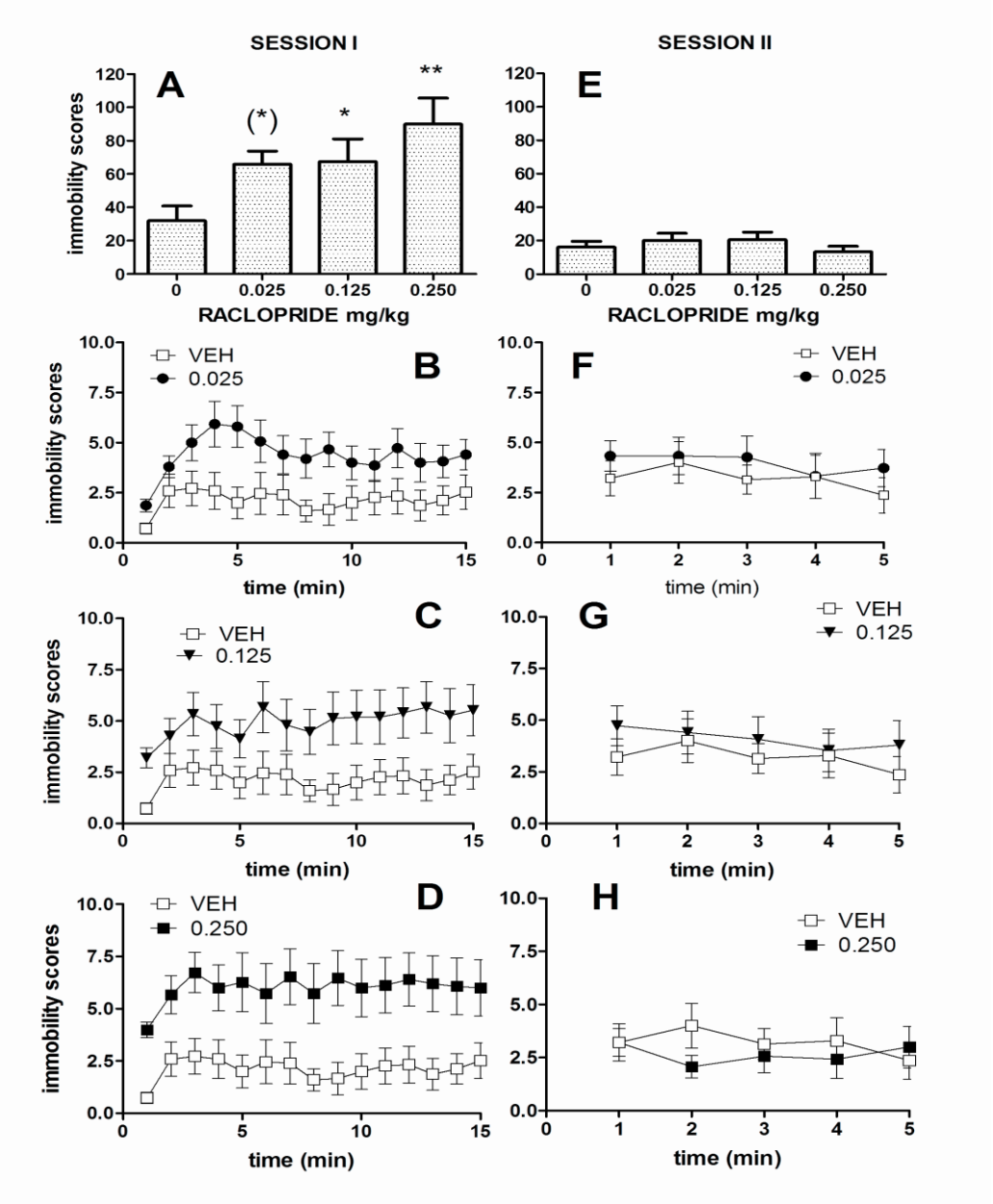

Figura 6. Effetto di raclopride sull'immobilità. Sulla sinistra sono riportati i risultati della prima sessione di 15 minuti e sulla destra sono riportati i risultati della seconda sessione di 5 minuti, eseguita 24 ore dopo. Sulla parte superiore sono riportati i grafici relativi ai valori totali, seguiti, sotto, dai grafici relativi al corso temporale di ciascuna dose rispetto al veicolo. I valori rappresentano molto vicino alla significatività statistica. (sessione I) e 14-15 soggetti (session II). (*) P<0.1 (molto vicino alla significatività statistica); *P<0.05; **P<0.01; (ANOVA seguita dal Newman-Keuls test)

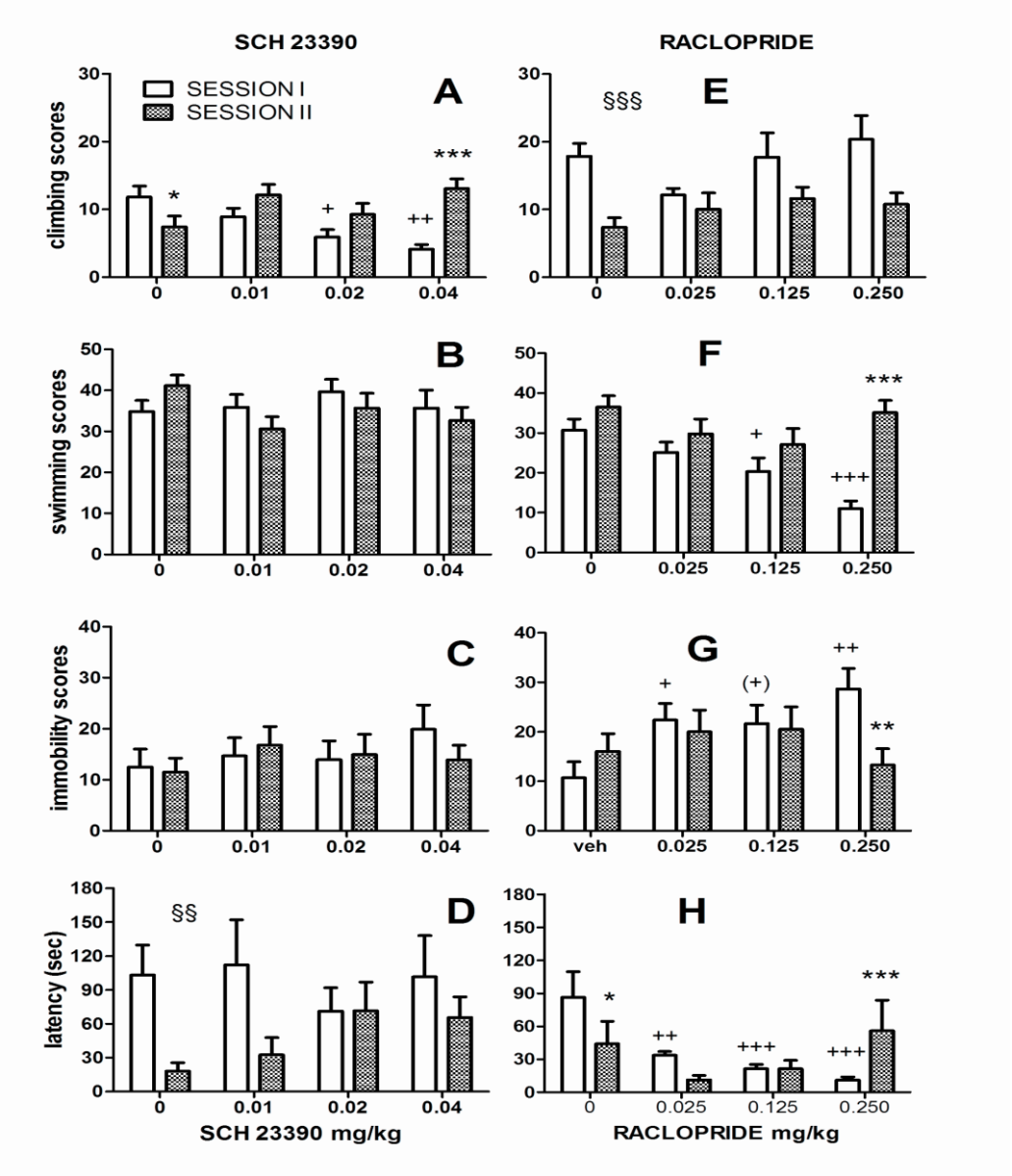

Figura 7. Effetto di SCH 23390 (pannelli a sinistra) e di raclopride (pannelli a destra) sul climbing, swimming, immobilità e latenza al primo episodio di immobilità: confronto tra i primi 5 minuti delle due sessioni. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 15 (SCH 23390) e 14-15 (raclopride) soggetti. Effetto di *sessione*: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; Effetto di *trattamento*: (+) P<0.1 (molto vicino alla significatività statistica); +P<0.05; ++P<0.01; +++P<0.001; effetto principale di *sessione*: §§P<0.01; §§§P<0.001 ((ANOVA seguita da F-test per i contrasti).

5. EFFETTO DEGLI ANTAGONISTI D1-LIKE E D2 LIKE DELLA DOPAMINA SULLA MICROSTRUTTURA DELL'INGESTIONE DI UNA SOLUZIONE ISOTONICA DI NaCl IN RATTI MASCHI E FEMMINE

✓ INTRODUZIONE

Il sistema dopaminergico mesolimbico è coinvolto nell'ingestione di soluzioni di NaCl. Infatti, nei ratti in deplezione sodica l'assunzione di una soluzione ipertonica di NaCl è accompagnata da un incremento dei livelli di dopamina nel nucleus accumbens (Frankmann et al. 1994). Studi di ibridazione in situ e di ligand binding, suggeriscono un coinvolgimento di questo sistema nell'incremento dell'appetito per il sale nei ratti dopo deplezione sodica (Lucas et al. 2003) o dopo trattamento con il mineralcorticoide deossicorticosterone acetato (Lucas et al. 2000). Inoltre, l'antagonista dei recettori D1-like della dopamina, SCH 23390, riduce l'assunzione di acqua e di soluzioni isotoniche e ipotoniche di NaCl (Gilbert & Cooper 1987), incrementando l'assunzione di soluzioni ipertoniche, che, all'opposto, viene ridotta dalla somministrazione degli agonisti dei recettori D1-like della dopamina (Gilbert & Cooper, 1989). Nelle stesse condizioni sperimentali, l'antagonista dei recettori D2-like della dopamina, sulpiride, incrementa l'assunzione di acqua e di soluzioni isotoniche e ipotoniche di NaCl (Gilbert & Cooper, 1987).

Lo studio della microstruttura del licking per l'ingestione di NaCl, ha dato dei risultati compatibili con la nostra ipotesi (vedi D'Aquila 2010): il blocco del recettore D2-like della dopamina ha generato una riduzione della dimensione dei bout in modo dose-dipendente (Canu et al. 2010), a differenza di quanto è accaduto con il blocco dei recettori D1-like della dopamina (Galistu & D'Aquila 2011), il quale ha determinato solo ed unicamente una riduzione del numero dei bout. Pertanto confermiamo che il blocco dei recettori D1-like e D2-like, influenzano, rispettivamente, le misure di attivazione e di valutazione.

Sulla base del fatto che la preferenza per le soluzioni salate presenta un dimorfismo sessuale (Morris et al. 2008), abbiamo testato gli effetti degli antagonisti D1-like e D2-like della dopamina, SCH23390 e raclopride rispettivamente, sulla microstruttura del licking per una soluzione isotonica di NaCl in ratti maschi e femmine.

✓ MATERIALI E METODI

SOGGETTI E TRATTAMENTI

Sono stati utilizzati ratti maschi e femmine del ceppo Wistar (Harlan, Italia), di peso compreso tra i 250 e i 300 g. L'antagonista dei recettori D2-like della dopamina, raclopride [S(-)-raclopride-L-tartrate] e l'antagonista D1-like della dopamina, SCH 23390 [R(+)-7-cloro-8-idrossi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetraidro-1H-3-benzazepina cloridrato] (Sigma, St. Louis,USA), sono stati solubilizzati in acqua distillata e somministrati per via sottocutanea ad un volume di 1mg/ml. Le dosi sono state le stesse utilizzate nel precedente studio sulla microstruttura del licking (D'Aquila, 2010): 10, 20 e 40 μg/kg per SCH23390 e 25, 125, 250 μg/kg per raclopride. Il trattamento con veicolo ha comportato la somministrazione di 1ml/kg di acqua distillata. L'intervallo di tempo tra il trattamento farmacologico, o il trattamento con veicolo, e la sessione sperimentale è stato di 15 minuti per i soggetti trattati con SCH 23390 e 30 minuti per i soggetti trattati con raclopride.

DISEGNO SPERIMENTALE

Le quattro sessioni sperimentali sono state precedute da una fase di training della durata di otto giorni, nella quale ciascun soggetto (20 maschi e 20 femmine) è stato abituato alle condizioni sperimentali avendo libero accesso ad una soluzione isotonica (0.9% NaCl) per 30 minuti al giorno. Al nono giorno, dopo aver ottenuto una baseline stabile, i soggetti di ciascun sesso sono stati divisi in due gruppi sperimentali (n=9); un gruppo è stato sottoposto al trattamento con SCH 23390 (n=9 femmine; n=10 maschi) e l'altro (n=10femmine; n=10 maschi), al trattamento con raclopride secondo un

disegno a misure ripetute, nelle quattro sessioni sperimentali. Le sessioni sperimentali sono state precedute dalla deprivazione di acqua per 12 ore circa. L'ordine delle somministrazioni, per ciascun soggetto di ogni gruppo, è stato determinato secondo uno schema a quadrato latino modificato.

ANALISI STATISTICA

I risultati sono stati analizzati con l'ANOVA seguita, in caso di interazioni significative, dall'F-test per i contrasti e, in caso di effetti principali, dal test di Newman-Keuls. In particolare l'analisi ha coinvolto due fattori quali *sesso* (2 livelli: maschio e femmina), e *trattamento* (4 livelli corrispondenti alle quattro dosi di SCH23390 o raclopride).

✓ RISULTATI

Numero di lick

SCH 23390

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [$F(3,48)=7.27$; $P=0.0004$], dovuta ad una riduzione dose-dipendente del numero di lick, senza nessun effetto del fattore *sesso* [$F(1,16)=3.38$; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori [$F(3,48)=0.68$; n.s.]. Il test di Newman-Keuls per il fattore *trattamento* ha rivelato una riduzione significativa del numero di lick alle dosi di 20 e 40 µg/Kg di SCH 23390 (Fig.1).

RACLOPRIDE

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [$F(3,54)=33.92$; $P<10^{-6}$], dovuta ad una riduzione dose-dipendente del numero di lick, senza nessun effetto del fattore *sesso* [$F(1,18)=0.15$; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori[$F(3,54)=0.28$; n.s.]. Il test di Newman-Keuls per il fattore *trattamento* ha rivelato una riduzione significativa del numero di lick alle dosi di 125 e 250 µg/Kg di raclopride (Fig.2).

Numero di bout

SCH 23390

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,48)=7.31; P=0.0003], dovuta ad una riduzione dose-dipendente del numero di bout, senza nessun effetto del fattore *sesso* [F(1,16)=0.41; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori [F(3,48)=0.13; n.s.]. Il test di Newman-Keuls per il fattore *trattamento* ha rivelato una riduzione significativa del numero di bout alle dosi di 20 e 40 μg/Kg di SCH 23390 (Fig.1).

RACLOPRIDE

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,54)=4.15; P=0.01], senza nessun effetto del fattore *sesso* [F(1,18)=0.21; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori [F(3,54)=0.38; n.s.]. Il test di Newman-Keuls per il fattore *trattamento* non ha mostrato nessuna differenza tra il veicolo e le tre dosi di raclopride (Fig.2).

Numero di lick per bout

SCH 23390

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto statisticamente significativo (Fig.1)

RACLOPRIDE

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,54)=17.97; $P<10^{-6}$], dovuto ad una riduzione dose-dipendente del numero di lick per bout, senza nessun effetto del fattore *sesso* [F(1,18)=1.19; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori [F(3,54)=1.37; n.s.]. Il test di Newman-Keuls per il fattore *trattamento* ha rivelato una riduzione significativa del numero di lick per bout alle dosi di 125 e 250 μg/Kg di raclopride (Fig.2).

Intra-bout lick rate

SCH 23390

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *sesso* [F(3,15)=5.08; P=0.039], dovuto ad un maggior livello dell'intra-bout lick rate nelle femmine, senza nessun effetto del fattore *trattamento* [F(3,45)=0.41; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori [F(3,45)=2.05; n.s.] (Fig.1).

RACLOPRIDE

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto statisticamente significativo (Fig.2).

Latenza

SCH 23390

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(1,48)=6.08; P=0.001], dovuta ad un incremento della latenza alla dose più alta di SCH 23390, senza nessun effetto del fattore *sesso* [F(1,16)=1.29; n.s.], e nessuna interazione significativa tra i due fattori [F(3,48)=0.93; n.s.]. Il test di Newman-Keuls per il fattore *trattamento* ha rivelato un incremento significativo della latenza alla dose di 40 μg/Kg di SCH 23390 (Fig.1).

RACLOPRIDE

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto statisticamente significativo (Fig.2).

✓ DISCUSSIONE

I risultati ottenuti sono coerenti con la nostra ipotesi (vedi D'Aquila 2010): l'antagonista D1-like della dopamina genera una riduzione de lnumero di lick della soluzione isotonica di NaCl dovuta ad una riduzione del numero di bout. Tale effetto non è accompagnato da una riduzione della dimensione dei bout, che non subisce l'influenza del farmaco. Questo conferma l'effetto generato dal blocco dei recettori D1-like sulla misura di attivazione senza

nessun effetto sulla misura di valutazione. SCH 23390 genera un effetto anche sulla latenza alla prima leccata, misura di attivazione, con un incremento alla dose più elevata. Queste evidenze supportano l'ipotesi del coinvolgimento dei recettori D1-like della dopamina nel mediare un processo di attivazione comportamentale. Il trattamento con SCH 23390 non ha mostrato nessun effetto sull'intra-bout lick rate, escludendo, in questo modo, una compromissione motoria dovuta al trattamento. Infine, sono stati osservati livelli più elevati di intra-bout lick rate nelle femmine rispetto ai maschi.

Il trattamento con raclopride ha generato una riduzione del numero di lick dovuta ad una riduzione della dimensione dei bout. L'antagonista dei recettori D2-like della dopamina non ha generato nessun effetto sull'intra-bout lick rate e sulla latenza. I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che i recettori D2-like della dopamina siano coinvolti nel processo di valutazione contingente della ricompensa, e che, sulla base di questa valutazione, si aggiorni il livello di attivazione (D'Aquila 2010).

In conclusione, questi dati supportano l'ipotesi proposta: il livello di attivazione delle risposte associate alla ricompensa dipendono dalla stimolazione dei recettori D1-like della dopamina, e il livello di tale attivazione viene aggiornato, o "reboosted", sulla base di un processo di valutazione mediato dalla stimolazione dei recettori D2-like della dopamina che si verifica durante la transazione consumatoria con la ricompensa (D'Aquila 2010).

Da questo studio non sono emerse differenze tra i sessi.

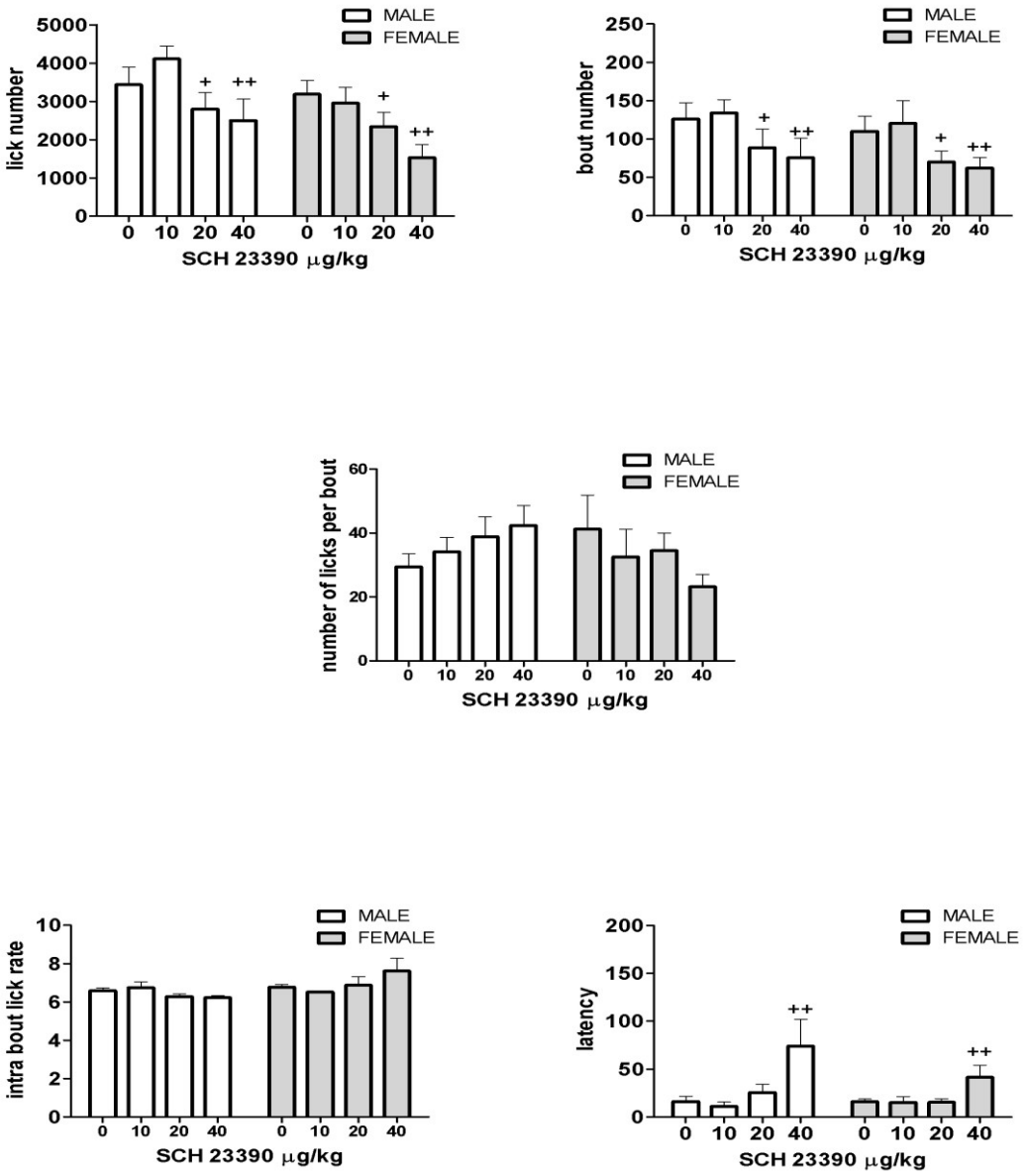

Figura 1. Effetto del trattamento con l'antagonista D1-like della dopamina, SCH 23390, sul numero di lick (in alto a sinistra), numero di bout (in alto a destra), numero di lick per bout (al centro), latenza (in basso a sinistra) e intra-bout lick rate (in basso a destra), nel gruppo dei maschi e delle femmine. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 9 soggetti; +P<0.05; ++P<0.01 (ANOVA seguita dal Newman-Keuls test).

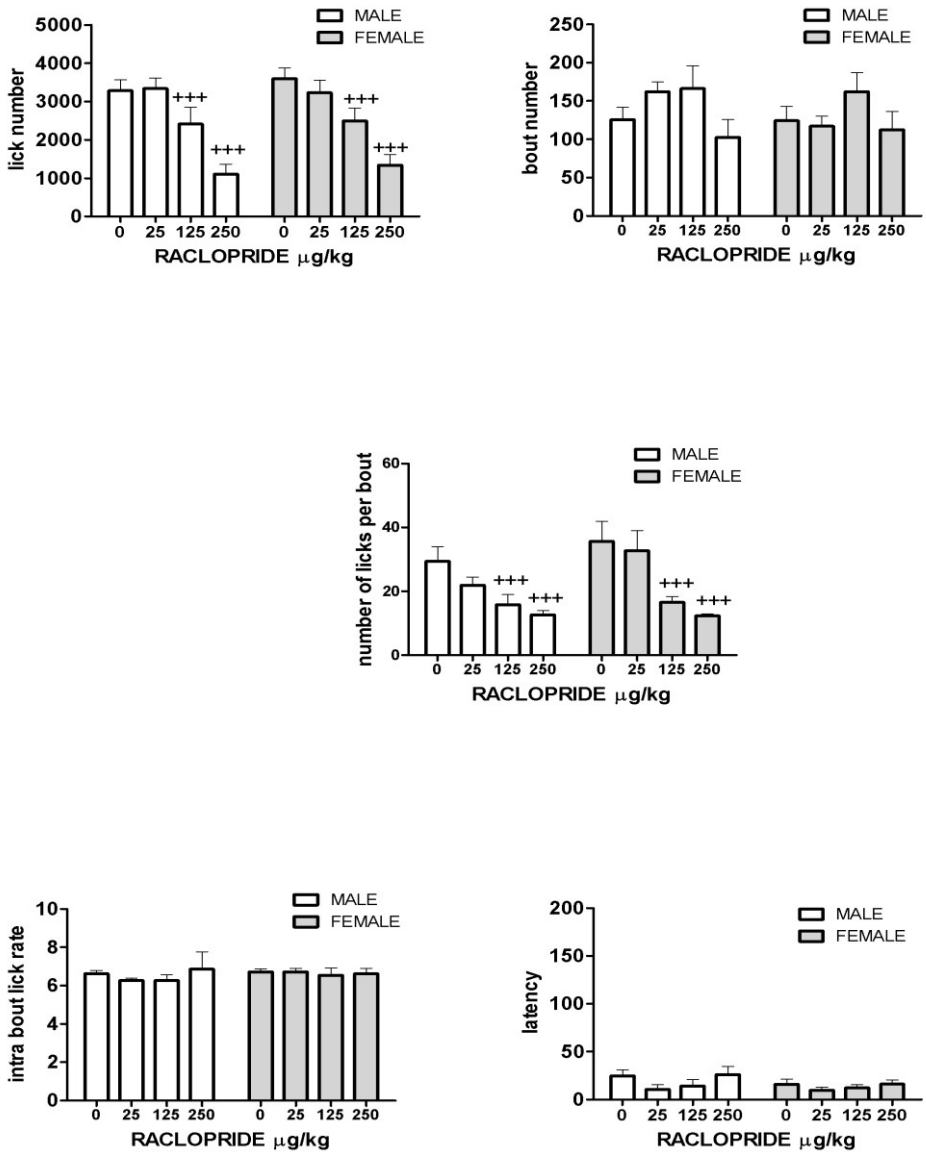

Figura 2. Effetto del trattamento con l'antagonista D2-like della dopamina, raclopride, sul numero di lick (in alto a sinistra), numero di bout (in alto a destra), numero di lick per bout (al centro), latenza (in basso a sinistra) e intra-bout lick rate (in basso a destra), nel gruppo dei maschi e delle femmine. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 10 soggetti; +++ $P<0.001$. (ANOVA seguita dal Newman-Keuls test).

6. EFFETTO DELLA SENSIBILIZZAZIONEALL'APPETITO PER IL SODIO SULLA MICROSTRUTTURA DELL'INGESTIONE DI UNA SOLUZIONE IPERTONICA DI NaCl

✓ INTRODUZIONE

Il sistema dopaminergico mesolimbico è implicato in diverse condizioni psichiatriche, come mania (Jimerson 1987), schizofrenia (Kapur 2003), e depressione (D'Aquila et al. 2000; Gershon et al. 2007), nonché nel meccanismo d'azione di farmaci utilizzati nella terapia di queste condizioni, come gli antipsicotici (Baldessarini & Tarazi , 2006) e gli antidepressivi (D'Aquila et al. 2000; Gershon et al. 2007). Gli psicostimolanti come cocaina e amfetamina inducono sensibilizzazione ai loro effetti "gratificanti" e stimolanti correlata a modificazioni morfologiche e funzionali del sistema dopaminergico mesolimbico (Robinson & Kolb 2004). Inoltre, la sensibilizzazione agli psicostimolanti è utilizzata nella ricerca preclinica come modello di schizofrenia (Featherstone et al. 2007) (per sensibilizzazione si intende un persistente incremento della risposta ad un trattamento dopo ripetute somministrazioni, Stewart & Badiani 1993). Questo sistema neurale, oltre ad essere importante negli effetti degli psicostimolanti e di altre sostanze d'abuso, è coinvolto nella mediazione dei comportamenti finalizzati alle ricompense naturali, come cibo, sesso e sale (NaCl) in ratti sottoposti a deplezione sodica (Kelley & Berridge 2002). I ratti in stato di deplezione sodica consumano avidamente delle soluzioni saline ipertoniche che normalmente evocano avversione, e sono disposti a compiere delle risposte costose in termini di sforzo per ottenerle (McCutcheon & Levy 1971). Gli effetti della deplezione sodica hanno delle impressionanti similitudini con l'effetto degli psicostimolanti. Infatti, ratti in deplezione sodica mostrano un incremento del rilascio di dopamina (DA) nel nucleus accumbens (NAc) in seguito a

ingestione di sale (Frankmann et al 1994); ripetuti episodi di deplezione sodica inducono sensibilizzazione dell'appetito per NaCl, caratterizzata da un persistente incremento dell'ingestione di soluzioni saline ipertoniche (Sakai et al. 1987); tale sensibilizzazione è associata a modificazioni morfologiche dei "medium spiny neurons" del NAc simili a quelle indotte dagli psicostimolanti (Roitman et al. 2002); infine, ripetuti episodi di deplezione sodica e trattamento con amfetamina inducono "sensibilizzazione crociata" (Robinson & Kolb 2004). Tra i substrati molecolari della sensibilizzazione agli effetti degli psicostimolanti (Vezina & Stewart 1989) e della deplezione sodica (Clark & Bernstein 2006) giocano un ruolo chiave i recettori D2 della dopamina, localizzati nelle aree di proiezione del sistema dopaminergico mesolimbico e in particolare nel NAc (Kelly et al. 1975, Willner et al. 1991). L'analisi della microstruttura del comportamento ingestivo in ratti sensibilizzati all'appetito per il sodio, potrebbe fornire un modello utile a interpretare secondo categorie psicologiche l'effetto su questo modello di farmaci usati nella terapia di malattie psichiatriche, come gli antipsicotici e gli antimaniacali. A tal fine, abbiamo studiato gli effetti della deplezione sodica e della sensibilizzazione a ripetuti episodi di deplezione sodica sulla microstruttura dell'ingestione di soluzioni ipertoniche di NaCl. Inoltre, poiché è stata mostrata una differenza di appetito per il sodio tra maschi e femmine tanto nel ratto quanto nell'uomo (Morris et al. 2008), per gli esperimenti abbiamo usato soggetti di entrambi i sessi.

✓ MATERIALI E METODI

SOGGETTI E TRATTAMENTI

Sono stati utilizzati ratti maschi e femmine del ceppo Wistar (Harlan, Italia). Il trattamento farmacologico con il diuretico dell'ansa, furosemide (Hexal), è stato somministrato in acuto per via intraperitoneale alla dose di 10 mg per ratto, 24 ore prima dell'inizio del test.

DISEGNO SPERIMENTALE

Prima dell'inizio dell'induzione della sensibilizzazione (fase sperimentale) gli animali sono stati abituati all'apparato per 5 giorni consecutivi dove hanno avuto accesso ad una soluzione salina allo 0.9% (fase di training). Ottenute baseline stabili per il numero di lick, i soggetti sperimentali, ratti Wistar di entrambi i sessi (20 maschi e 20 femmine), sono stati divisi in 4 gruppi: 2 gruppi "controllo" e 2 gruppi "sensibilizzazione", un gruppo per ciascun sesso. Durante la fase sperimentale tutti i soggetti sono stati esposti alla soluzione ipertonica nell'apparato per la rilevazione della microstruttura ingestiva 2 volte alla settimana, cioè ogni 3 o 4 giorni, una volta in stato di deplezione e una volta in stato di replezione (cioè in stato di normale equilibrio idrosalino, il quale si ripristina velocemente non appena l'animale ha accesso alla soluzione salina ipertonica, Clark & Bernstein 2006, Morris et al. 2008).Per l'induzione della deplezione sodica sono stati asportati dalle gabbie degli animali cibo e acqua (normalmente disponibili ad libitum). Gli animali sono stati pesati e hanno ricevuto un'iniezione di furosemide alla dose di 10 mg/soggetto (o veicolo per i gruppi di controllo). Dopo la pesata, gli animali del gruppo "sensibilizzazione" hanno avuto a disposizione nelle loro gabbie acqua distillata, mentre il gruppo di controllo ha avuto il cibo da laboratorio e l'acqua potabile abitualmente disponibile (Nozaki et al. 2002). Dopo 5 settimane (10 test di cui 5 in stato di deplezione, per il gruppo "sensibilizzazione") anche il gruppo "controllo" è stato testato in condizioni di deplezione.

ANALISI STATISTICA

I risultati sono stati analizzati con l'ANOVA. Sono state eseguite tre analisi statistiche separate.

La prima analisi statistica è stata eseguita mettendo a confronto i gruppi "controllo" con i gruppi "sensibilizzazione" nella prima sessione sperimentale coinvolgendo due fattori tra-gruppi: *sesso* (su 2 livelli, maschi e femmine), e

gruppo (su 2 livelli corrispondenti al gruppo "controllo" e al gruppo "sensibilizzazione"); e un fattore intra-gruppo: *sessione* (su 2 livelli).

La seconda analisi statistica è stata eseguita mettendo a confronto i gruppi "controllo" con i gruppi "sensibilizzazione" nella quinta sessione sperimentale, coinvolgendo due fattori tra-gruppi: *sesso* e *gruppo* e un fattore intra-gruppo: *deplezione* (su 2 livelli corrispondenti allo stato di replezione e di deplezione).

La terza analisi statistica eseguita è stata un'analisi intra-gruppo, mettendo a confronto i dati della prima e della quinta sessione sperimentale nei gruppi "sensibilizzazione", al fine di valutare l'effetto delle ripetute deplezioni sodiche, e quindi della sensibilizzazione all'appetito per il sodio. Questa analisi ha coinvolto un fattore tra gruppi: *sesso*; e due fattori intra-gruppo: *deplezione* e *sensibilizzazione* (su 2 livelli corrispondenti al gruppo "deplezione" alla prima e alla quinta esperienza di deplezione sodica).

L'analisi Post hoc degli effetti principali è stata eseguita con il test a comparazioni multiple di Newman-Keuls. Quando presente una interazione significativa tra i fattori il confronto è stato eseguito con l'F-test per i contrasti. Le analisi sono state effettuate con STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.).

✓ RISULTATI

EFFETTO DELLA DEPLEZIONE SODICA NELLA PRIMA SESSIONE SPERIMENTALE

Numero di lick

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *sesso* [$F(1,32)=5.35;P=0.027$] dovuto ad elevati livelli del numero di lick nelle femmine rispetto ai maschi, del fattore *gruppo* [$F(1,32)=29.64$; $P<10^{-5}$] dovuto ad elevati livelli del numero di lick nei gruppi sottoposti a deplezione sodica, e del fattore *sessione* [$F(1,32)=36.05$; $P<10^{-5}$], senza nessuna interazione statisticamente significativa tra i fattori (Fig. 1).

Numero di bout

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *sesso* [F(1,32)=4.56;P=0.04] dovuto ad elevati livelli del numero di bout nelle femmine rispetto ai maschi, del fattore *gruppo* [F(1,32)=29.02; $P<10^{-5}$], dovuto ad elevati livelli del numero di bout nei gruppi sottoposti a deplezione sodica, e del fattore *sessione* [F(1,32)=46.76; $P<10^{-6}$], senza nessuna interazione statisticamente significativa tra i fattori (Fig. 1).

Numero di lick per bout

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto significativo (Fig. 1).

Intra-bout lick rate

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto significativo (Fig. 1).

Latenza

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto significativo (Fig. 1).

EFFETTO DELLA SENSIBILIZZAZIONE. CONFRONTO TRA GRUPPI

Numero di lick

L'ANOVA ha mostrato un effetto del fattore *sesso* [F(1,33)=4.48;P=0.041] dovuto a più elevati livelli del numero di lick nelle femmine, e del fattore *deplezione* [F(1,33)=120.43; $P<10^{-6}$] dovuto a maggiori livelli del numero di lick in stato di deplezione sodica, senza nessuna interazione statisticamente significativa tra i fattori (Fig. 2).

Numero di bout

L'ANOVA ha mostrato un effetto del fattore *deplezione* [F(1,33)=104.93; $P<10^{-6}$] dovuto ad elevati livelli del numero di bout in stato di deplezione sodica (Fig. 2).

Numero di lick per bout

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto significativo (Fig. 2).

Intra-bout lick rate

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto significativo (Fig. 2).

Latenza

L'ANOVA ha mostrato un effetto del fattore *sesso* [F(1,33)=11.14;P=0.002], dovuta a tempi di latenza superiori nei maschi rispetto alle femmine, del fattore *gruppo* [F(1,33)=24.74;P=0.00002] dovuto a tempi di latenza minori nei gruppi sensibilizzati, e del fattore *deplezione* [F(1,33)=48.65; $P<10^{-6}$], dovuto ad una riduzione del tempo di latenza in stato di deplezione sodica, senza nessuna interazione statisticamente significativa tra i fattori (Fig. 2).

EFFETTO DELLA SENSIBILIZZAZIONE. CONFRONTO TRA LA PRIMA E LA QUINTA SESSIONE NEI RATTI SENSIBILIZZATI

Numero di lick

L'ANOVA ha mostrato un effetto del fattore *deplezione* [F(1,13)=73.53;$P<10^{-5}$], e del fattore *sensibilizzazione* [F(1,13)=5.89; P=0.03], e una interazione statisticamente significativa tra i tre fattori [*sesso x deplezione x sensibilizzazione* F(1,13)=5.13; P=0.041]. In stato di replezione sodica gli F-test per i contrasti hanno mostrato una differenza statisticamente significativa nel gruppo delle femmine (P=0.01), con un incremento del numero di lick nelle femmine sensibilizzate, e una differenza significativa tra maschi e femmine sensibilizzate con alti livelli nelle seconde rispetto ai primi. In stato di deplezione sodica è stato osservato un incremento del numero di lick nei maschi dovuto alla sensibilizzazione. Non emerge nessuna differenza nelle femmine in deplezione sodica forse per un ceiling effect (Fig. 3).

Numero di bout

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *deplezione* [F(1,13)=70.65;$P<10^{-5}$] dovuto ad elevati livelli del numero di bout in stato di deplezione sodica (Fig.3).

Numero di lick per bout

L'ANOVA ha mostrato un effetto del fattore *deplezione* [F(1,10)=11.69; P=0.006] dovuto ad un decremento del numero di lick per bout in stato di deplezione sodica (Fig.3).

Intra-bout lick rate

L'ANOVA non ha mostrato nessun effetto significativo (Fig. 3).

Latenza

L'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *deplezione* [F(1,13)=18.5;P=0.008] dovuto ad una riduzione del tempo di latenza in stato di deplezione sodica, e del fattore *sensibilizzazione* [F(1,13)=5.47; P=0.03] dovuto a tempi di latenza minori nei gruppi sensibilizzati, senza nessuna interazione statisticamente significativa tra i fattori (Fig. 3).

✓ DISCUSSIONE

I dati relativi alla prima sessione in stato di replezione non hanno mostrato nessuna differenza tra i gruppi sottoposti a sensibilizzazione e quelli di controllo. Già alla prima esperienza di deplezione sodica emerge l'incremento del numero di lick nei gruppi di entrambi i sessi (fig. 1), dovuto ad un incremento del numero di bout senza nessun effetto significativo sulla dimensione dei bout. Quindi l'effetto della deplezione sodica si manifesta sulla misura attivatoria e non su quella valutativa. Dal confronto tra i gruppi sottoposti ad un unico episodio di deplezione e i gruppi esposti a ripetuti episodi di deplezione sodica, è emerso che la sensibilizzazione manifesta i suoi effetti sul parametro indice di attivazione quale la latenza, generando una riduzione di quest'ultimo nei gruppi sensibilizzati indipendentemente dallo stato di replezione o deplezione. Tale parametro presenta delle differenze sessuali, con tempi di latenza inferiori nelle femmine rispetto ai maschi, che si confermano nei gruppi sensibilizzati. Per quanto riguarda il numero di lick, questo parametro presenta delle differenze tra i sessi dovuta ad un maggior numero di lick nelle femmine rispetto ai maschi e ancor più marcata nelle femmine sensibilizzate rispetto ai maschi sensibilizzati. Gli incrementi del numero di lick sono dovuti a incrementi nel numero di bout, senza nessun effetto sulla loro dimensione. Dall'analisi del confronto dei parametri microstrutturali tra la prima e la quinta sessione di deplezione sodica, nei gruppi sensibilizzati, è emerso che la sensibilizzazione manifesta i suoi effetti

in modo significativo sulla latenza, generandone un decremento che non presenta differenze tra i sessi. Tuttavia, è emersa una differenza tra i sessi dall'analisi del numero di lick con livelli maggiori nelle femmine rispetto ai maschi in stato di sensibilizzazione.

Questi dati mostrano delle differenze di genere negli effetti della sensibilizzazione all'appetito per il sodio, con una maggiore suscettibilità delle femmine rispetto ai maschi agli effetti dei ripetuti episodi di deplezione sodica. Inoltre in coerenza con i risultati di studi precedenti (Clark & Bernstein 2006), i presenti dati suggeriscono che gli effetti della sensibilizzazione all'appetito per il sodio siano mediati da un incremento dell'attivazione comportamentale piuttosto che da un incremento della valutazione della ricompensa.

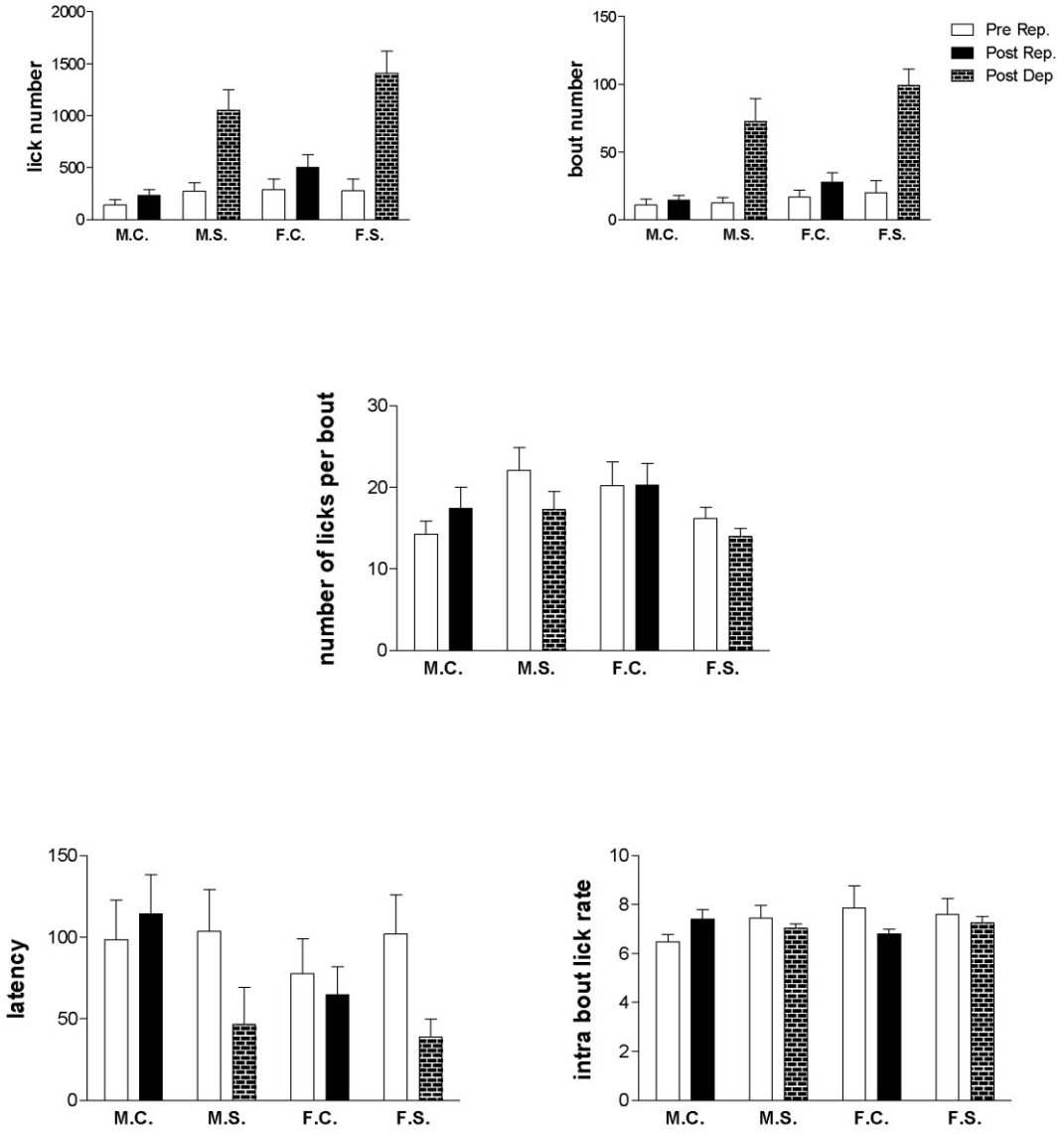

Figura 1. Numero di lick, numero di bout, numero di lick per bout, latenza e intra-bout lick rate, nei gruppi "controllo e nei gruppi "sensibilizzazione" (M=maschi; F=femmine; C "controllo"; S= "sensibilizzazione") nella prima sessione sperimentale: confronto tra la prima sessione in stato di replezione (PRE REP.) e la seconda sessione in stato di replezione (POST REP.) o deplezione sodica (POST DEP.). I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 10 soggetti.

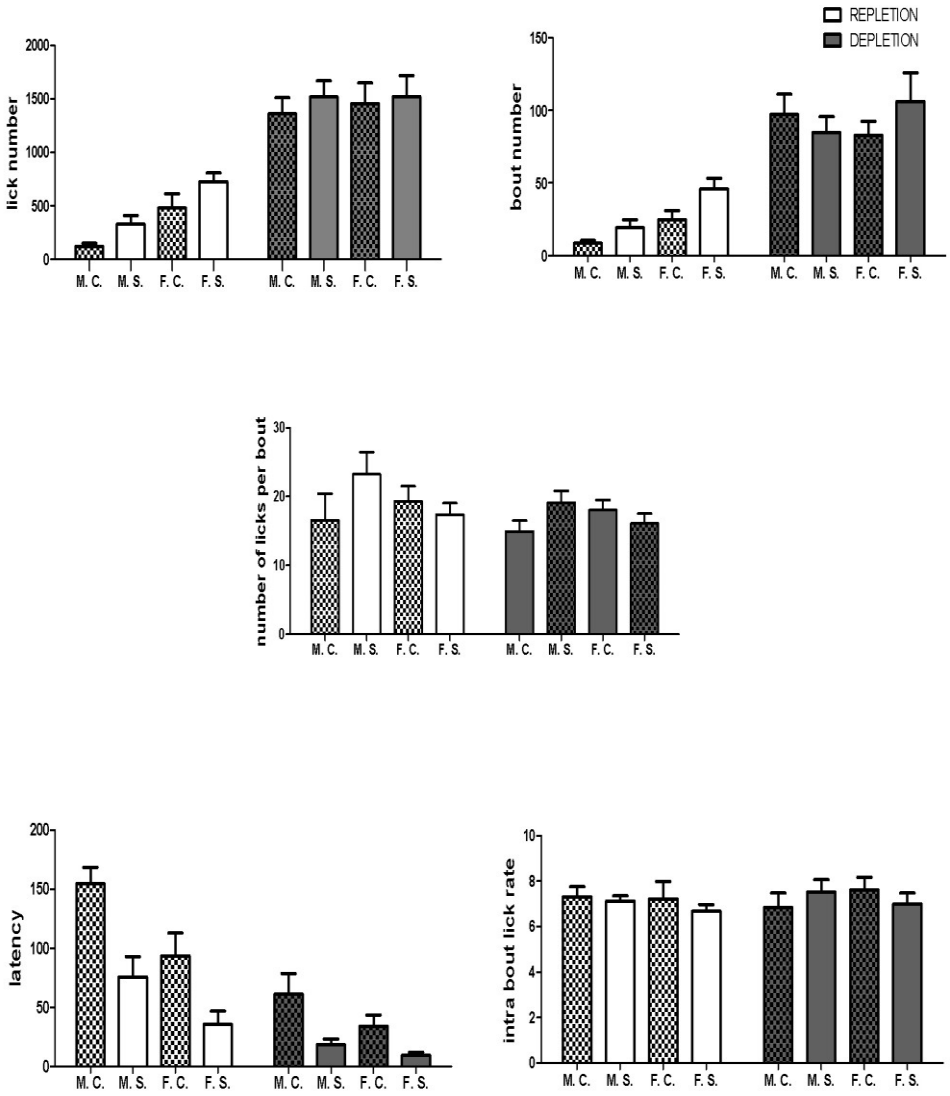

Figura 2. Numero di lick, numero di bout, numero di lick per bout, latenza e intra-bout lick rate, nei gruppi "controllo e nei gruppi "sensibilizzazione" (M=maschi; F=femmine; C "controllo"; S= "sensibilizzazione") alla quinta sessione sperimentale, in stato di replezione e deplezione sodica. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 10 soggetti.

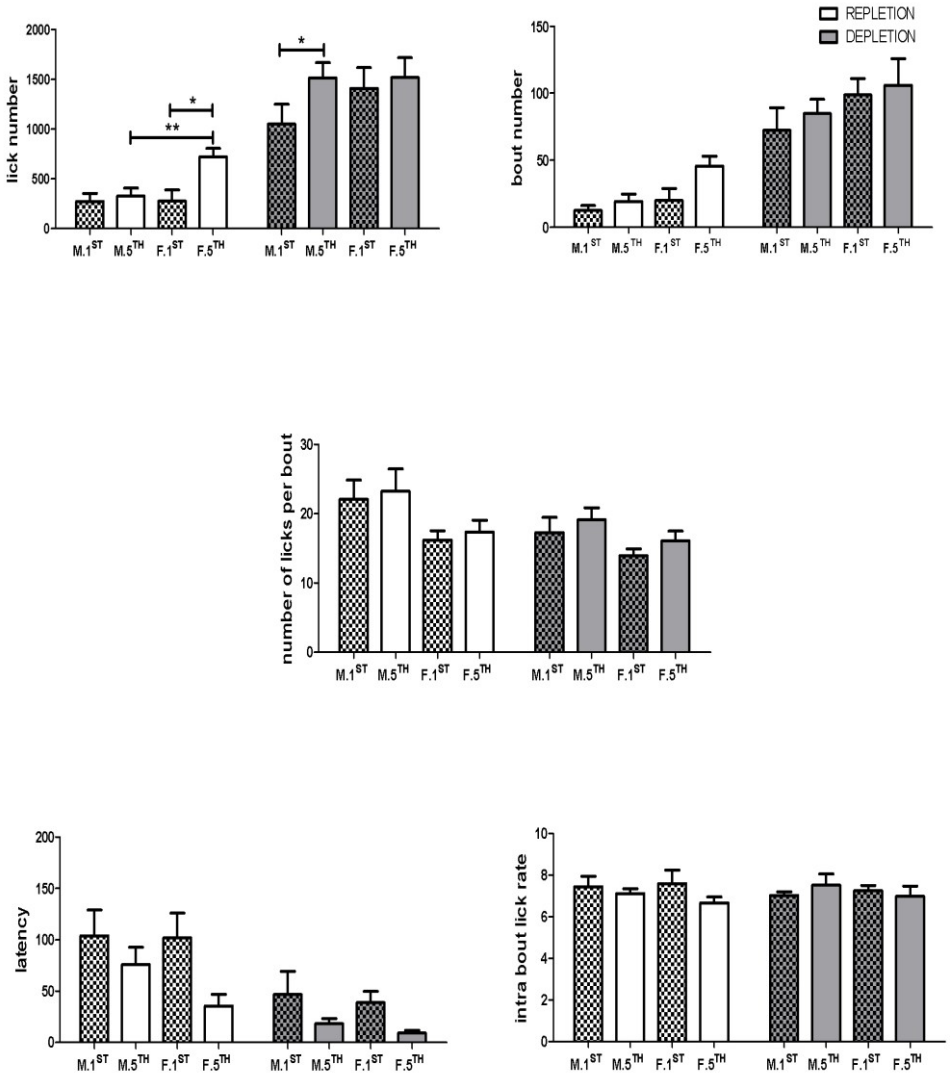

Figura 3. Numero di lick, numero di bout, numero di lick per bout, latenza e intra-bout lick rate, nei gruppi "controllo e nei gruppi "sensibilizzazione" (M. =maschi; F.=femmine; 1st= prima sessione sperimentale; 5th= quinta sessione sperimentale) nella prima e nella quinta sessione sperimentale. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 10 soggetti. *=P<0.05; **P<0.01 (ANOVA seguita dall'F-test per i contrasti).

7. EFFETTO DELL'ANTAGONISTA D1-LIKE DELLA DOPAMINA NEI SOGGETTI MASCHI E FEMMINE SENSIBILIZZATI ALL'APPETITO PER IL SODIO

✓ INTRODUZIONE

I risultati esposti nel precedente capitolo, in coerenza con studi precedenti (Clark & Bernstein 2006), mostrano che la sensibilizzazione all'appetito per il sodio è sostenuta da un incremento dell'attivazione comportamentale. Poiché, abbiamo suggerito che l'attivazione comportamentale sia mediata dalla stimolazione dei recettori D1-like della dopamina, abbiamo deciso di studiare l'effetto del blocco D1-like della dopamina su ratti di entrambi i sessi sensibilizzati all'appetito per il sodio.

✓ MATERIALI E METODI

SOGGETTI E TRATTAMENTI

Sono stati utilizzati ratti maschi e femmina del ceppo Wistar (Harlan, Italia), del peso medio di 300-350 g. L'antagonista dei recettori D1-like della dopamina, SCH 23390 cloridrato (Sigma, St. Louis), [R(+)-7-cloro-8-idrossi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetraidro-1H-3-benzazepina cloridrato] (Sigma, St. Louis,USA), è stato solubilizzato in acqua distillata e somministrato per via sottocutanea ad un volume di 1ml/Kg. Le dosi sono state le stesse utilizzate nel precedente studio sulla microstruttura del licking (D'Aquila, 2010): 10, 20 e 40 µg/kg di SCH 23390. Il trattamento con veicolo ha comportato la somministrazione di 1ml/kg di acqua distillata. L'intervallo di tempo tra il trattamento farmacologico, o il trattamento con veicolo, e la sessione sperimentale è stato di 30 minuti.

DISEGNO SPERIMENTALE

I soggetti (n=20 maschi; n=20 femmine), sono stati sottoposti a nove sessioni di deplezione sodica nel corso di nove settimane, ottenendo in questo

modo uno stato di sensibilizzazione all'appetito per il sodio nei soggetti presi in esame.

Dalla sesta alla nona sessione sperimentale, sono stati studiati gli effetti dell'antagonista D1- like della dopamina SCH 23390, secondo un disegno a misure ripetute, in modo da poter esaminare gli effetti delle tre dosi di farmaco, più il relativo trattamento con il veicolo, con l'ordine delle somministrazioni per ciascun soggetto determinato secondo uno schema a quadrato latino modificato.

ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati con l'ANOVA. E' stata eseguita una prima analisi generale che ha coinvolto tre fattori, quali: *deplezione* (2 livelli corrispondenti allo stato di replezione e deplezione), *sesso* (2 livelli corrispondenti ai due sessi) e *trattamento* (4 livelli corrispondenti alle quattro dosi di SCH 23390). Successivamente, è stata eseguita un'analisi separata dei dati relativi allo stato di deplezione e replezione, coinvolgendo due fattori a misure ripetute quali *sesso* e *trattamento*, seguita, in caso di interazioni significative, dagli F-test per i contrasti e, nel caso di effetti principali, dal test di Newman-Keuls. Dall'analisi statistica sono stati eliminati i dati relativi alla dose di 40 μg/Kg di SCH233390, per il numero di lick per bout e per l'intra-bout lick rate, data la scarsità dei soggetti che hanno leccato a seguito di questo trattamento.

✓ RISULTATI

Numero di lick

L'analisi generale ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *deplezione* [$F(1,17)=173.8$; $P<10^{-6}$], dovuto ad un incremento del numero di lick in stato di deplezione sodica.

In stato di replezione l'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *sesso* [$F(1,17)=12.73$; $P=0.002$], dovuto ad un aumento del numero di lick nelle femmine rispetto ai maschi, e del fattore *trattamento*

[F(3,51)=27.92; P=<10^{-6}] dovuto ad una riduzione dose-dipendente del numero di lick in entrambi i sessi, senza nessuna interazione tra i due fattori.

In stato di deplezione l'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,51)=8.44; P=<0.0001] dovuto ad un decremento del numero di lick alla dose più elevata di SCH 23390, confermata dall'analisi Post-Hoc con il test di Newman-Keuls (Fig.1).

Numero di bout

L'analisi generale ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *deplezione* [F(1,17)=89.8; P<10^{-6}] dovuto ad un incremento del numero di bout in stato di deplezione sodica.

In stato di replezione l'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *sesso* [F(1,17)=10.96; P=0.004] dovuto al numero di bout maggiore nelle femmine, e del fattore *trattamento* [F(3,51)=28.64; P=<10^{-6}], dovuto, ad una riduzione dose-dipendente del numero di bout in entrambi i sessi. Inoltre si è verificata una interazione statisticamente significativa tra i due fattori [F(3,51)=3.56; P=0.02] dovuta ad una maggiore sensibilità delle femmine al trattamento con SCH 23390.

In stato di deplezione l'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *trattamento* [F(3,51)=9.14; P=<0.00006] dovuto ad una riduzione del numero di bout alla dose più elevata, confermata dall'analisi Post-Hoc con il test di Newman-Keuls (Fig. 1).

Numero di lick per bout

In stato di replezione l'ANOVA non ha mostrato nessun effetto statisticamente significativo dei due fattori mentre in stato di deplezione l'ANOVA ha mostrato un effetto significativo del fattore *trattamento* [F(2,34)=3.48; P=<0.041], dovuto ad un incremento di questo parametro alla dose di 20 μg/Kg, confermata dall'analisi Post-Hoc con il test di Newman-Keuls (Fig. 1).

Intra-bout lick rate

In stato di replezione e di deplezione l'ANOVA non ha mostrato nessun effetto statisticamente significativo (Fig. 2).

Latenza

L'analisi generale ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *deplezione* [F(1,17)=23.39; P<10-3] dovuto ad una riduzione della latenza in stato di deplezione sodica. In stato di replezione l'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *sesso* [F(1,17)=1.86; P=0.003], dovuto ad una riduzione della latenza nelle femmine. In stato di deplezione l'ANOVA ha mostrato un effetto statisticamente significativo del fattore *sesso* [F(1,17)=8.93; P=0.008] e del fattore *trattamento* [F(3,51)=12.42; P=$<10^{-5}$] ed una interazione statisticamente significativa tra i due fattori [F(3,51)=2.85; P=0.04]. I successivi test-F per i contrasti hanno mostrato che il trattamento con SCH23390 incrementa la latenza nei maschi e non nelle femmine (Fig.2).

✓ DISCUSSIONE

La deplezione sodica ha indotto un incremento del numero di lick dovuto esclusivamente all'incremento del numero dei bout, mentre non ci sono state variazioni della dimensione dei bout e dell'intra bout lick rate. Inoltre ha provocato una riduzione della latenza alla prima leccata. Nel quadro dell'ipotesi che il numero dei bout rappresenti una misura di attivazione del comportamento (wanting), questi risultati sono coerenti con l'osservazione che gli effetti della sensibilizzazione al sodio sono dovuti a un incremento dell'attribuzione di salienza incentiva, "wanting", ma non del "liking" (Clark & Bernstein 2006).

I risultati inoltre hanno mostrato una maggiore ingestione di soluzione ipertonica nelle femmine rispetto ai maschi, ma soltanto in replezione. Tale differenza è attribuibile esclusivamente a un incremento del numero dei bout ma non della loro dimensione. Questo suggerisce che il maggiore appetito per il sodio mostrato dalle femmine in condizione di replezione sodica è anch'esso spiegabile come un incremento del "wanting" e non del "liking". In accordo con questa interpretazione le femmine in stato di replezione hanno mostrato una ridotta latenza.

Il trattamento con SCH 23390 ha ridotto il numero di lick nei maschi e nelle femmine sensibilizzati all'appetito per il sodio, soltanto in stato di replezione, e tale riduzione è dovuta esclusivamente alla riduzione del numero dei bout ma non della loro dimensione. Questa osservazione è coerente con i risultati dei precedenti studi effettuati nel nostro laboratorio che mostrano l'incapacità del blocco D1 di ridurre la dimensione dei bout, così fornendo un ulteriore supporto all'ipotesi da noi suggerita, che i recettori D1 sono coinvolti specificamente nell' attivazione comportamentale.

Le femmine in stato di replezione hanno mostrato una maggiore sensibilità agli effetti dell'antagonista D1-like, SCH 23390, sul numero dei bout. Un'altra differenza tra maschi e femmine è stata osservata in condizione di deplezione: il trattamento con SCH23390 ha infatti incrementato la latenza soltanto nei maschi. Questa osservazione suggerisce che la differenza tra maschi e femmine osservata nell'appetito per il sodio in stato di sensibilizzazione sia dovuta a modificazioni della trasmissione dopaminergica sulla via dei recettori D1. Precedenti studi hanno mostrato differenze, tra maschi e femmine, nella densità dei recettori D1-like in varie aree cerebrali (Andersen et al. 1997; Heijtz et al. 2002).

I nostri risultati mostrano che l'antagonista dei recettori D1-like SCH23390 non ha modificato l'intra-bout lick rate, che è un indice molto sensibile agli effetti motori dei farmaci. Questo ci consente di escludere che gli effetti da noi osservati sugli altri parametri microstrutturali siano dovuti ad una incapacità dei soggetti a eseguire i movimenti necessari all'ingestione.

Sia nei maschi che nelle femmine in stato di deplezione sodica il trattamento con SCH23390 ha indotto un incremento della dimensione dei bout. Recentemente è stato dimostrato che il valore edonico di una ricompensa aumenta in proporzione allo sforzo necessario per il suo conseguimento (Johnson & Gallagher 2011). Nel quadro dell'ipotesi che la stimolazione dei recettori D1 sia responsabile del meccanismo di "allocazione dello sforzo alla risposta", la presente osservazione potrebbe essere spiegata dal fatto che in presenza dei recettori D1 bloccati i ratti debbano compiere un maggiore sforzo,

portando così a un incremento dell'attribuzione di valore edonico alla ricompensa.

In conclusione, questo studio fornisce ulteriore supporto all'ipotesi da noi suggerita che i recettori D1 siano coinvolti nell'attivazione comportamentale, e mostra delle differenze di sensibilità agli effetti del blocco dei recettori D1 in condizione di sensibilizzazione, sia in stato di deplezione che di replezione sodica, tra maschi e femmine.

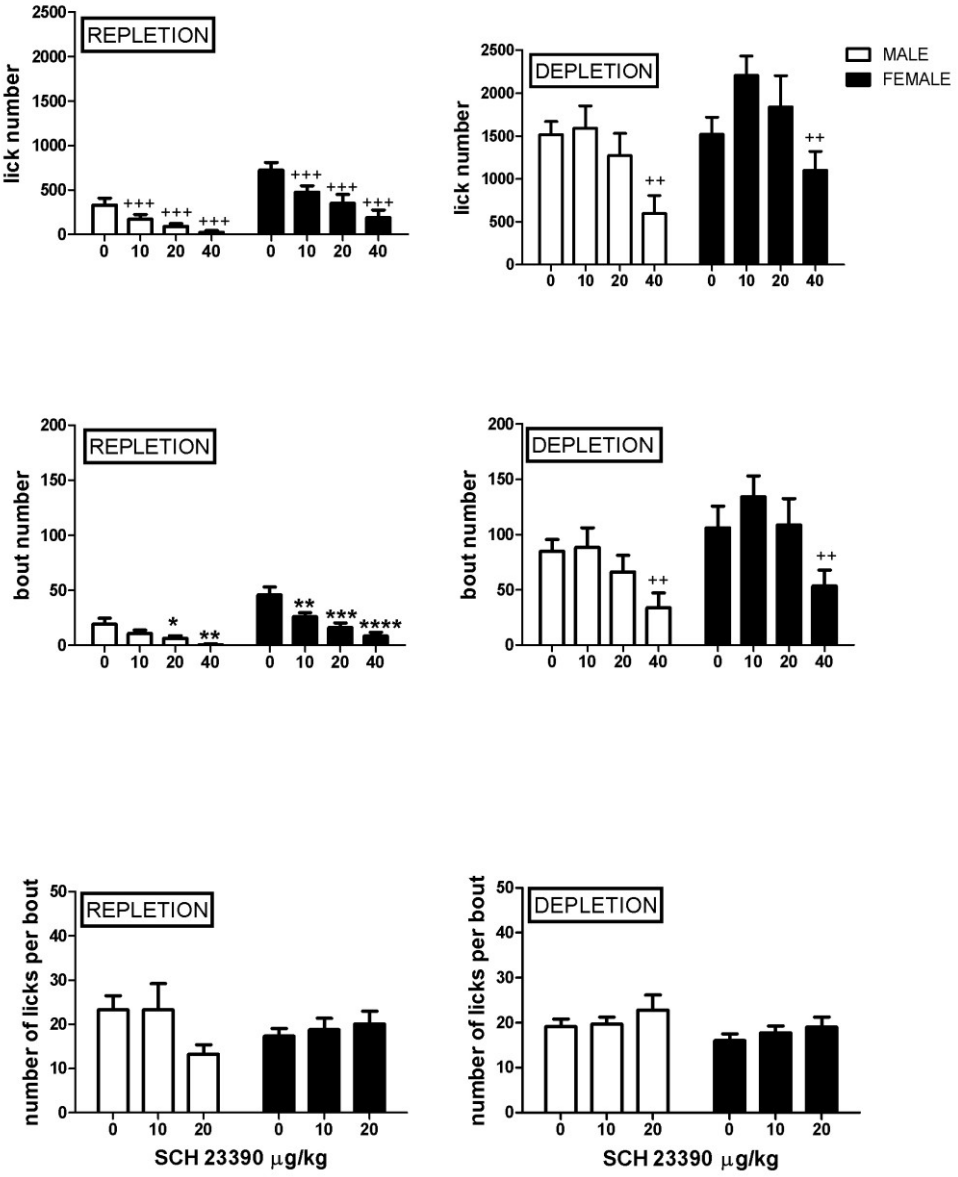

Figura 1. Effetto dell'antagonista dei recettori D1-like della dopamina, SCH 23390, sul numero di lick, numero di bout, numero di lick per bout, nei gruppi "sensibilizzazione", maschi e femmine, in stato di replezione e deplezione sodica. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 10 soggetti. F-test: *=P<0.05; **P<0.01;***P<0.001; ****P<0.0001. Newman-Kaul test: ++ P<0.01;+++ P<0.001.(ANOVA seguita dal Newman-Keuls test e F-test per i contrasti).

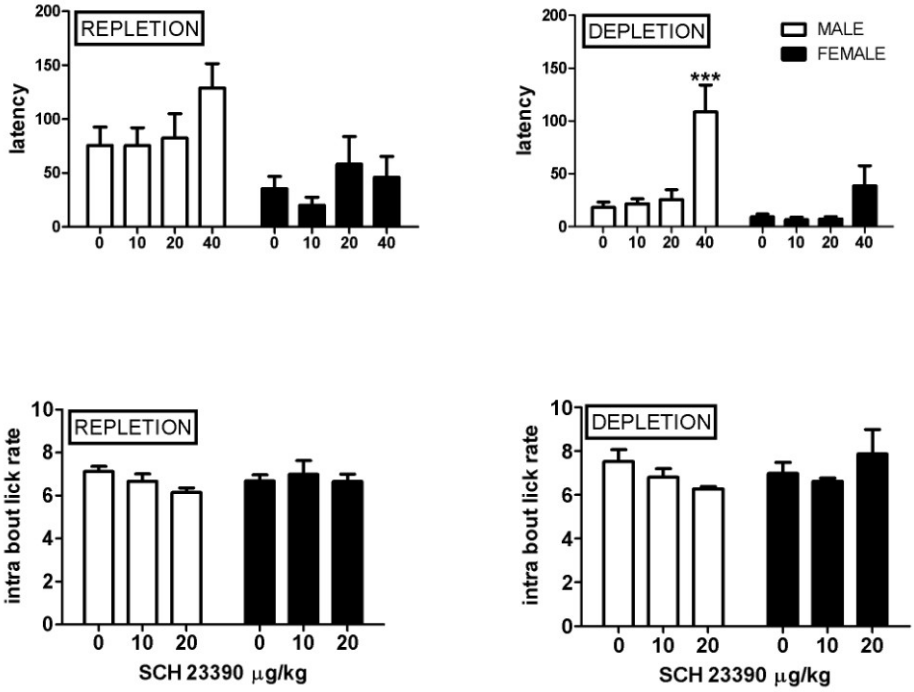

Figura 2. Effetto dell'antagonista dei recettori D1-like della dopamina, SCH 23390, sulla latenza e intra-bout lick rate, nei gruppi "sensibilizzazione", maschi e femmine, in stato di replezione e deplezione sodica. I valori rappresentano la media ± S.E.M. di 10 soggetti. F-test: ***P<0.001 (ANOVA seguita dall'F-test per i contrasti).

8. CONCLUSIONI

Nonostante la mole di evidenze sperimentali che suggeriscono un legame tra la dopamina da una parte, e condizioni psichiatriche (e farmaci utilizzati nella loro terapia) dall'altra, ancora non esistono spiegazioni soddisfacenti che leghino le conoscenze sul ruolo della dopamina nel comportamento normale alla psicopatologia. Un tentativo di superare questo limite è stato fatto da Kapur (Kapur 2003), che, combinando l'osservazione di un incremento dei livelli di dopamina nei gangli della base in pazienti schizofrenici in stato delirante (Abi-Dargham et al. 2000), con la proposta che la dopamina medi l'attribuzione di salienza motivazionale agli "stimoli" (percezioni o memorie) (Berridge 2007), ha suggerito che il processo psicopatologico che porta al delirio parta da una attribuzione di salienza aberrante a detti stimoli. Il delirio sarebbe, dunque, un resoconto narrativo della mutata percezione della realtà conseguente a questa aberrante attribuzione di salienza. Questa ipotesi combina dati neurochimici con dati comportamentali interpretati secondo categorie psicologiche, e rende conto anche degli aspetti culturali (il resoconto del paziente risente della sua cultura di appartenenza). Il valore "traslazionale" di questo approccio teorico-sperimentale è potenzialmente immenso. Per esempio, consentirebbe di scoprire criteri razionali nell'associazione tra psicoterapie e trattamenti farmacologici. Tuttavia, ancora non c'è consenso su quale sia il ruolo svolto dalla dopamina nel comportamento, e quindi, nella psicologia che lo sottende. In questa prospettiva, il lavoro presentato in questa tesi ha perseguito due obiettivi. Il primo, è stato quello di esplorare un'ipotesi precedentemente formulata dal nostro gruppo di ricerca sul ruolo della dopamina nell'attivazione comportamentale e nella valutazione della ricompensa, per meglio chiarire i termini del significato del ruolo della dopamina nel comportamento normale. Il secondo è stato quello di applicare il metodo da noi proposto -lo studio della microstruttura ingestiva- nell'esplorazione delle differenze di sesso nei meccanismi comportamentali controllati dalla dopamina.

L'ipotesi da noi formulata suggerisce che il livello di attivazione comportamentale finalizzato all'ottenimento di una ricompensa, ascrivibile alla categoria psicologica della motivazione, sia dovuto alla stimolazione dei recettori D1-like della dopamina; e che il livello di tale attivazione sia dovuto al processo di valutazione contingente della ricompensa, ascrivibile alla categoria psicologica del piacere, mediato dalla stimolazione dei recettori D2-like della dopamina. Tale ipotesi è stata formulata sulla base dell'analisi degli effetti degli antagonisti della dopamina sulla microstruttura del licking. Infatti, il trattamento con un antagonista dei recettori D1-like della dopamina riduce esclusivamente il numero dei bout, che è una misura di attivazione comportamentale, mentre il blocco dei recettori D2-like riduce la dimensione dei bout, che è una misura di valutazione, e produce sul corso temporale del numero dei bout un effetto simile a quello osservato nella risposta operante sia dopo trattamento con antipsicotici sia dopo svalutazione della ricompensa.

In questo lavoro abbiamo prima di tutto affrontato lo studio dell'effetto generato dalla svalutazione della ricompensa sul corso temporale del numero dei bout (capitolo 3). I risultati da noi ottenuti hanno mostrato che, come da noi suggerito precedentemente, anche nel caso del corso temporale del numero dei bout, si osserva una similitudine tra gli effetti del blocco dei recettori D2-like della dopamina e gli effetti della svalutazione della ricompensa. Questa osservazione rafforza il nostro schema interpretativo fornendo un'evidenza del fatto che il numero di bout sia una misura di attivazione comportamentale al pari della risposta operante.

Perseguendo l'idea che la nostra ipotesi non sia limitata alla regolazione del comportamento ingestivo ma che sia generalizzabile a tutte le forme di comportamento finalizzato, abbiamo studiato l'effetto degli antagonisti dopaminergici su un comportamento finalizzato alla fuga, il modello sperimentale di depressione "forced swimming test" (capitolo 4). In questo paradigma comportamentale gli animali vengono confinati in un cilindro pieno d'acqua dal quale è impossibile fuggire. Gli animali rispondono inizialmente con una intensa attività (fase di "attivazione") che declina nel corso della

sessione sperimentale. Tale declino potrebbe essere legato alla valutazione della inefficacia dei tentativi di fuga. I nostri risultati hanno mostrato che il blocco dei recettori D1-like riduce l'attivazione, mentre il blocco dei recettori D2-like induce una persistenza della risposta di fuga, che abbiamo interpretato come una compromissione del meccanismo che valuta l'efficacia della risposta. In conclusione, questi risultati sono coerenti con l'ipotesi proposta ma ne impongono una riformulazione. I recettori D2-like della dopamina sarebbero coinvolti in un processo di percezione dell'efficacia della risposta sulla base del quale viene determinato il livello di attivazione mediato dalla stimolazione dei recettori D1-like della dopamina (D'Aquila et al. 2010), sia nel caso della risposta finalizzata alla ricompensa (licking per lo zucchero) che nel caso della risposta finalizzata alla fuga (risposta nel forced swimming test) e, presumibilmente, in tutte le forme di comportamento finalizzato. Inoltre, questi risultati suggeriscono che il meccanismo di allocazione dello sforzo (Salamone et al. 2007, 2009) basato sulla valutazione dell'efficacia della risposta potrebbe avere un ruolo cruciale nella scelta tra strategie di coping attive e passive in questo test. Infine, questi risultati forniscono una possibile chiave di lettura nell'interpretazione del ruolo della dopamina negli effetti dei farmaci antidepressivi in questo test, in termini significativi da un punto di vista comportamentale. Questo potrebbe essere un ulteriore passo avanti verso una interpretazione del forced swimming test in termini psicopatologici, incrementando la potenzialità del valore traslazionale di questo modello.

Dunque, in relazione al primo obiettivo di questo lavoro, possiamo concludere che i risultati ottenuti suggeriscono che l'ipotesi da noi proposta abbia una validità generale in relazione ai meccanismi che controllano i comportamenti finalizzati, e che lo studio della microstruttura del licking possa costituire un modello per lo studio del comportamento finalizzato. Inoltre, abbiamo suggerito una precisazione delle categorie utilizzate nell'interpretazione delle diverse dimensioni del comportamento finalizzato, suggerendo l'esistenza di una dimensione attivatoria mediata dai recettori D1-like, e di una dimensione di valutazione di efficacia della risposta mediata dai recettori D2-like.

Il secondo obiettivo di questo lavoro, lo studio delle differenze di genere nei meccanismi di attivazione delle risposte finalizzate (capitolo 5, 6, 7), si è avvalso della metodica e della chiave interpretativa da noi approfondita nella prima parte di questa tesi. In particolare, abbiamo esaminato gli aspetti microstrutturali dell'ingestione di soluzioni di NaCl dopo sensibilizzazione all'appetito per il sodio, una condizione molto simile alla sensibilizzazione agli psicostimolanti, e dunque di potenziale rilievo nello studio del meccanismo d'azione dei farmaci antipsicotici.

Questi risultati, in coerenza con precedenti studi (Clark & Bernstein 2006), mostrano che gli effetti della sensibilizzazione si manifestano con un incremento dell'attivazione. Inoltre, anche le differenze tra maschi e femmine negli effetti della sensibilizzazione riguardano misure sperimentali di attivazione. In coerenza con questa osservazione, sono emerse delle differenze di sesso nella sensibilità agli effetti del blocco dei recettori D1-like della dopamina (capitolo 7), che, secondo la nostra ipotesi, mediano l'attivazione comportamentale. Questi risultati sono coerenti con la precedente osservazione che i ratti maschi, in condizioni normali, sono meno sensibili delle femmine agli effetti stimolatori degli agonisti dei recettori D1-like (Heijtz et al. 2002). Quindi i nostri risultati suggeriscono che i recettori D1-like potrebbero essere un importante substrato delle differenze di sesso nella sensibilizzazione all'appetito per il sodio, come già precedentemente dimostrato nella sensibilità agli effetti stimolatori della cocaina (Festa et al. 2006).

La dimostrazione di differenze di sesso nella sensibilità agli effetti di un antagonista dopaminergico in una condizione sperimentale che si caratterizza per la sua similitudine a un importante modello di psicosi, come la sensibilizzazione agli psicostimolanti, associata a un paradigma interpretativo che mette in relazione eventi neurali e dimensioni psicologiche, potrebbe portare alla messa a punto di un modello sperimentale per lo studio delle differenze di genere nel meccanismo d'azione dei farmaci antipsicotici, e per una interpretazione di queste differenze in termini psicopatologici.

9. BIBLIOGRAFIA

Abi-Dargham A., Rodenhiser J., Printz D., Zea-Ponce Y., Gil R., Kegeles L.S., Weiss R., Cooper T.B., Mann J.J., Van Heertum R.L., Gorman J.M., Laruelle M., 2000. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(14):8104-9.

Andersen S.L., Rutstein M., Benzo J.M., Hostetter J.C., Teicher M.H., 1997. Sex differences in dopamine receptor overproduction and elimination. Neuroreport. 8(6):1495-8.

Asakura W., Matsumoto K., Ohta H., Watanabe H., 1994. Involvement of dopamine D2 receptor mechanism in the REM sleep deprivation-induced increase in swimming activity in the forced swimming test. Pharmacol. Biochem. Behav. 48, 43-46.

Baamonde A., Dauge V., Ruiz-Gayo M., Fulga I.G., Turcaud S., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P., 1992. Antidepressant-type effects of endogenous enkephalins protected by systemic RB 101 are mediated by opioid delta and dopamine D1 receptor stimulation. Eur. J. Pharmacol. 216, 157-166.

Baldessarini & Tarazi, 2006. Pharmacotherapy of psychosis and mania. In: Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L. (Eds.), Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, eleventh ed. McGraw-Hill, New York, pp. 461-500.

Berridge K.C., 2007. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. Psychopharmacol. 191, 391-431.

Berridge K.C., Robinson T.E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? Brain Res Rev. 28(3):309-69.

Berridge K.C., Venier I.L., Robinson T.E., 1989. Taste reactivity analysis of 6-hydroxydopamine-induced aphagia: implications for arousal and anhedoniahypotheses of dopamine function. Behavioral Neuroscience. 103, 36-45.

Borsini F., Lecci A., Mancinelli A., D'Aranno V., Meli A., 1988. Stimulation of dopamine D-2 but not D-1 receptors reduces immobility time of rats in the forced swimming test: implication for antidepressant activity. Eur. J. Pharmacol. 148, 301-307.

Cabib S., Puglisi-Allegra S., 2012. The mesoaccumbens dopamine in coping with stress.Neurosci Biobehav Rev. 36(1):79-89. [Epub 2011 May 4].

Canon C.M., Palmiter R.D., 2003. Reward without dopamine. J. Neurosci. 23, 10827-10831.

Canu M.E., Carta D, Murgia E, Serra G, D'Aquila PS., 2010. Dopamine on D2-like receptors is involved in reward evaluation in water-deprived rats licking for NaCl and water. Pharmacol Biochem Behav. 96:194-7.

Castagné V., Porsolt R.D., Moser P., 2009. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. Eur. J. Pharmacol. 616, 128-33.

Clark J.J., Bernstein I.L., 2006. Sensitization of salt appetite is associated with increased "wanting" but not "liking" of a salt reward in the sodium-deplete rat. Behav Neurosci. 120:206-10.

Cooper J.R., Bloom F.E., Roth H.R., eds. 1996. The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 7th ed. New York, Oxford University Press.

Cryan J.F., Valentino R.J., Lucki I., 2005. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. Neurosci. Biobehav. Rev. 29, 547-69.

D'Aquila P.S., Collu M., Gessa G.L., Serra G., 2000. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. European Journal of Pharmacology. 405; 365–373.

D'Aquila P.S., Collu M., Pani L., Gessa G.L., Serra G., 1994. Antidepressant-like effect of selective dopamine D1 receptor agonists in the behavioural despair test model of depression. Eur. J. Pharmacol. 262, 107-111.

D'Aquila P.S., 2010. Dopamine on D2-like receptors "reboosts" dopamine D1-like receptor mediated behavioural activation in rats licking for sucrose. Neuropharmacol. 58, 1085-1096.

D'Aquila P.S., Canu S., Sardella M., Spanu C., Serra G., Franconi F., 2010. Dopamine is involved in the antidepressant-like effect of allopregnanolone in the forced swimming test in female rats. Behav. Pharmacol. 21, 21-28.

Davis J.D., 1989. The microstructure of ingestive behavior. Annals of the New York Academy of Sciences 575, 106-121.

Detke M.J., Lucki I. 1996. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. Behav. Brain Res. 73, 43-46.

Detke M.J., Rickels M., Lucki I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. Psychopharmacol. 121, 66-72.

Featherstone R.E., Kapur S., Fletcher P.J., 2007. The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 31(8): 1556-71.

Festa E.D., Jenab S., Weiner J., Nazarian A., Niyomchai T., Russo S.J., Kemen L.M., Akhavan A., Wu H.B., Quinones-Jenab V., 2006. Cocaine-induced sex differences in D1 receptor activation and binding levels after acute cocaine administration.Brain Res Bull. 68(4):277-84.

Frankmann S.P, Broder L., Dokko J.H., Smith G.P., 1994. Differential changes in central monoaminergic metabolism during first and multiple sodium depletions in rats. Pharmacol Biochem Behav. 47:617-24.

Fuxe K., Agnati L., Kalia M., Goldstain M., Andersson K., HarfstrandA., 1985. Dopaminergic systems in the brain pituitary. In: Basic and Clinical aspects of Neuroscience, E. Fluckiger, E.E. Muller, M.O. Thorner (eds), pp. 11-25. Springer-Verlag, Berlin.

Galistu A., D'Aquila P.S., 2011. Effect of the dopamine D1-like receptor antagonist SCH 23390 on the microstructure of ingestive behaviour in water-deprived rats licking for water and NaCl solutions. Physiol Behav. 105(2):230-233.

Genn R.F., Higgs S., Cooper S.J., 2003. The effects of 7-OH-DPAT, quinpirole and raclopride on licking for sucrose solutions in the non-deprived rat. Behav. Pharmacol. 14, 609-617.

Gershon A.A., Vishne T., Grunhaus L., 2007. Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. Biol Psychiatry. 61(2):145-53.

Gilbert D.B., Cooper S.J., 1987. Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 and the D-2 antagonist sulpiride on saline acceptance-rejection in water-deprived rats. Pharmacol Biochem Behav. 26:687-91.

Gilbert D.B., Cooper S.J., 1989. Opposite effects of SK&F 38393, a dopamine D-1 agonist, and SCH 23390, a dopamine D-1 antagonist, in tests of salt preference/aversion in the rehydrating rat. Pharmacol Biochem Behav. 32:945-8.

Gramling S.E., Fowler S.C., 1986. Some effects of pimozide and of shifts in sucrose concentration on lick rate, duration, and interlick interval. Pharmacology Biochemistry & Behavior 25, 219-222.

Gramling S.E., Fowler S.C., Collins K.R., 1984. Some effects of pimozide on nondeprived rats licking sucrose solutions in an anhedonia paradigm. Pharmacology Biochemistry & Behavior 21, 617-624.

Heijtz R.D., Beraki S., Scott L., Aperia A., Forssberg H., 2002.Sex differences in the motor inhibitory and stimulatory role of dopamine D1 receptors in rats.Eur J Pharmacol. 445(1-2):97-104.

Iorio L.C., Barnett A., Leitz F.H., Houser V.P., Korduba C.A., 1983. SCH 23390, a potential benzazepine antipsychotic with unique interactions on dopaminergic systems. J. Pharmacol. Exp. Ther. 226, 462-468.

Jhonson A.W., Gallagher M., 2011. Greater effort boosts the affective taste properties of food. Proc. R. Soc. B. 278:1450-1456.

Jimerson D.C., 1987. Role of dopamine mechanism in affective disorders. In: Meltzer H.Y. (Ed), Psychopharmacology: The Third Generation of progress. Raven Press, New York, pp. 505-11.

Kapur S., 2003. Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. American Journal of Psychiatry. 160, 13-23.

Kelley A.E., Berridge K.C., 2002. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs.J Neurosci. 22(9):3306-11.

Kelly P.H., Seviour P.W., Iversen S.D., 1975. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum.Brain Res. 94(3):507-22.

Köhler C., Hall H., Ogren S.O., Gawell L., 1985. Specific in vitro and in vivo binding of 3Hraclopride. A potent substituted benzamide drug with high affinity for dopamine D-2 receptors in the rat brain. Biochem. Pharmacol. 34, 2251-2259.

Langer S.Z., 1997. 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. Trends Pharmacol. Sci. 18, 95-99.

Le Moal M., 1995. Mesocorticolimbic dopaminergic neurons: functional and regulatory roles. In: Bloom, F.E., Kupfer, D.J. (Eds.), Psychopharmacology the Fourth Generation of Progress. Raven Press, New York, NY, pp. 283-294.

Liao R.M., Ko M.C., 1995. Chronic effects of haloperidol and SCH23390 on operant and licking behaviors in the rat. Chin. J. of Physiol. 38, 65-73.

Lino-de-Oliveira C., De Lima T.C., de Pádua Carobrez A., 2005. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. Behav. Brain. Res. 158, 243-250.

Lucas L.R., Grillo C.A., McEwen B.S., 2003. Involvement of mesolimbic structures in shortterm sodium depletion: in situ hybridization and ligand-binding analyses. Neuroendocrinology. 77:406-15.

Lucas L.R., Pompei P., McEwen B.S., 2000. Salt appetite in salt-replete rats: involvement of mesolimbic structures in deoxycorticosterone-induced salt craving behavior. Neuroendocrinology. 71:386-95.

Lyons K.E., Hubble J.P., Troster A.I., Pahwa R., Koller W.C., 1998. Gender differences in Parkinson's disease. Clin. Neuropharmacol. 21,118–121.

Maj J., Rogoz Z., Skuza G., Sowinska H., 1992. The effect of CGP 37849 and CGP 39551, competitive NMDA receptor antagonists, in the forced swimming test. Pol. J. Pharmacol. Pharm. 44, 337-346.

McCutcheon B., Levy C., 1971. Relationship between NaCl rewarded bar-pressing and duration of sodium deficiency. Physiol Behav. 8(4):761-3.

McLean C.P., Anderson E.R.2009. Brave men and timid women? A review of the gender differences in fear and anxiety. Clin Psychol Rev. 29(6):496-505.

Morris M.J., Na E.S., Johnson A.K., 2008. Salt craving: the psychobiology of pathogenic sodium intake Physiol Behav. 94(5):709-21.

Nikulina E.M., Skrinskaya J.A., Popova N.K., 1991. Role of genotype and dopamine receptors in behaviour of inbred mice in a forced swimming test. Psychopharmacol. 105, 525-529.

Niv Y., Daw N.D., Dayan P., 2005. How fast to work: response vigor, motivation and tonic dopamine. In: Weiss Y., Schölkopf B., Platt J. (Eds.), Advances in Neural Information Processing Systems. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 1019-1026.

Nozaki P.N., Pereira D.T., Moura F.V., Menani J.V., De Luca L.A.,2002. Ingestion of hypertonic NaCl vs. palatable drinks by sodium-depleted rats. Physiol Behav. 75:443-48.

Phillips P.E.M., Walton M.E., Jhou T.C., 2007. Calculating utility: preclinical evidence for cost–benefit analysis by mesolimbic dopamine. Psychopharmacol. 191, 483-495.

Porcelli S., Drago A., Fabbri C., Serretti A., 2011. Mechanism of antidepressant action: An integrated dopaminergic parspective. Progin in Neuro Psycopharmacology & Biological Psychiatry 35 : 1532-1543.

Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur. J. Pharmacol. 47,379-391.

Porsolt R.D., Deniel M., Jalfre M., 1979. Forced swimming in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine. Eur. J. Pharmacol. 57,431-436.

Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature. 266,730-732.

Riecher-Rossler A, Hafner H., 2000. Gender aspects in schizophrenia: bridging the border between social and biological psychiatry. Acta Psychiatr Scand. 102 (Suppl. 407): 58-62.

Robbins T.W., Everitt B.J., 2007. A role for mesencephalic dopamine in activation: commentary on Berridge (2006) Psychopharmacol. 191, 433–437.

Robinson TE, Kolb B., 2004. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. Neuropharmacology. 47 Suppl 1:33-46.

Rodrigues A.J., Leão P., Carvalho M., Almeida O.F., Sousa N., 2011. Potential programming of dopaminergic circuits by early life stress.Psychopharmacology (Berl).214(1):107-20.

Roitman M.F., Na E., Anderson G., Jones T.A., Bernstein I.L., 2002. Induction of salt appetite alters dendritic morphology in nucleus accumbens and sensitizes rats to amphetamine. J Neurosci. 22(11):RC225.

Sakai R.R., Fine W.B., Epstein A.N., 1987. Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. Behav Neurosci. 101:724–31.

Salamone J.D., Correa M., Farrar A., Mingote S.M., 2007. Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. Psychopharmacol. 191, 461-482.

Salamone J.D., Correa M., Mingote S.M., Weber S.M., 2005. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. Current Opinion in Pharmacology. 5, 34-41.

Salamone J.D., Correa M., Farrar A.M., Nunes E.J., Pardo M., 2009. Dopamine, behavioral economics, and effort. Front. Behav. Neurosci. 3,13.

Schneider L.H., Davis J.D., Watson C.A., Smith G.P., 1990. Similar effect of raclopride and reduced sucrose concentration on the microstructure of sucrose sham feeding. Eur. J. Pharmacol. 186, 61-70.

Shimazu S., Minami A., Kusumoto H., Yoneda F., 2005. Antidepressant-like effects of selegiline in the forced swim test. Eur. Neuropsychopharmacol. 15, 563-571.

Smith, G.P., 2001. John Davis and the meanings of licking. Appetite. 36, 84-92.

Stewart J., Badiani A., 1993. Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs.Behav Pharmacol. 4(4):289-312.

Vaugeois J.M., Pouhe D., Zuccaro F., Costentin J., 1996. Indirect dopamine agonist's effects on despair test: dissociation from hyperactivity. Pharmacol. Biochem. Behav. 54, 235-239.

Vezina P., Stewart J, 1989.The effect of dopamine receptor blockade on the development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine. Brain Res. 499(1):108-20.

Walters J.R., Ruskin D.N., Baek D., Allers K.A., Bergstrom D.A., 2001. Cognitive function paradigms: implications of neurophysiological studies of dopamine stimulants for Tourette syndrome and comorbid attention-deficit hyperactivity disorder. Adv. Neurol. 85, 133-149.

Wasilow-Mueller, S., Erickson, C.K., 2001. Drug abuse and dependency: understanding gender differences in etiology and management. J. Am.Pharm. Assoc. 41, 78-90.

Willner et al. 1991, The mesolimbic dopamine system. In: Willner & Scheel-Krűger Eds, The Mesolimbic Dopamine System: from Motivation to Action. Wiley, Chichester, UK, pp. 3-15. Willner P, Klimek V, Golembiowska K, Muscat R (1991) Changes in mesolimbic dopamine may explain stress-induced anhedonia. Psychobiology. 19 : 79-84

Wise R.A., 1982. Common neural basis for stimulation reward, drug reward and food reward. In: Hoebel, B.G., Novin, D. (Eds.), The Neural Basis of Feeding and Reward. Haer Institute for Electrophysiological Research, Brunswick, ME, pp. 445-454.

Wise R.A., 2004. Dopamine, learning and motivation. Nat. Rev. Neurosci. 5, 483-494.

Wise R.A., 2006. Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 361, 1149-1158.

Wise R.A., Spindler J., deWit H., Gerberg G.J., 1978. Neuroleptic-induced "anhedonia" in rats: pimozide blocks reward quality of food. Science 201,262-264.

Wittchen H.U., Jacobi F., Rehm J., Gustavsson A., Svensson M., Jönsson B., Olesen J., Allgulander C., Alonso J., Faravelli C., Fratiglioni L., Jennum P., Lieb R., Maercker A., van Os J., Preisig M., Salvador-Carulla L., Simon R., Steinhausen H.C., 2011. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010.Eur Neuropsychopharmacol. 21(9):655-79.

Yamada J., Sugimoto Y., Yamada S., 2004. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. Eur. J. Pharmacol. 504, 207-211.

10. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Dott. Paolo S. D'Aquila per avermi dato la possibilità di acquisire nuove conoscenze nel campo della psicofarmacologia.

Ringrazio la Prof.ssa Flavia Franconi per avermi dato la possibilità di acquisire nuove conoscenze nel campo della farmacologia di genere.

Ringrazio la mia famiglia e i miei amici per il sostegno datomi in questi anni.