



Unione europea  
Fondo sociale europeo



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



FSE 2007-2013  
obiettivo competitività regionale e occupazione



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

## CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

*Coordinatore del Corso: Prof. Andrea Fausto Piana*

### CURRICULUM IN MEDICINA DI GENERE DELL'UOMO DELLA DONNA E DEL BAMBINO

*Responsabile Curriculum: Prof. Giampiero Capobianco*

#### XXIX CICLO

*“Differenze di genere  
in un modello di auto-somministrazione  
di una bevanda al gusto di cioccolato:  
evidenze comportamentali e neurochimiche”*

**Coordinatore:**

Prof. Andrea Fausto Piana

**Co-Tutor**

Prof. Antonio Argiolas

**Tutor:**

Prof. Flavia Franconi

**Tesi di dottorato del:**

Dott. Andrea Contini

**Anno Accademico 2015 - 2016**

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito del Corso di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2013/2014 – XXIX ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

*"Simplicity  
is the final achievement.  
After one as played  
quantity of notes and more notes,  
it is simplicity that emerges  
as the crowning reward of art"*  
*-Frederic Chopin*

<b>1</b>	<b>Introduzione .....</b>	<b>1</b>
1.1	Disordini legati all'assunzione di sostanze d'abuso e cibo. ....	2
1.2	Motivazione.....	3
1.3	La ricerca della gratificazione.....	4
1.4	Differenze di genere nei disturbi legati all'assunzione di cibo .....	5
1.5	Ciclo mestruale e ciclo estrale .....	7
1.6	Influenza degli ormoni sessuali sul comportamento alimentare.....	9
1.7	Ruolo della trasmissione dopaminergica nei comportamenti motivati .....	11
	1.7.1 Anatomia del sistema dopaminergico.....	11
	1.7.2 Dopamina e motivazione .....	14
1.8	Apprendimento .....	16
	1.8.1 Il condizionamento .....	16
1.9	Modelli animali di auto-somministrazione.....	17
1.10	Auto-somministrazione operante di cioccolato .....	18
1.11	Microdialisi intracerebrale .....	19
<b>2</b>	<b>Scopo della ricerca.....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Materiali e Metodi .....</b>	<b>24</b>
3.1	Animali e Stabulazione .....	25
3.2	Apparati sperimentali .....	25
3.3	Bevanda al gusto di cioccolato .....	25
3.4	Procedura di addestramento degli animali .....	26
3.5	Ovariectomia bilaterale .....	27
3.6	Chirurgia stereotassica .....	27
3.7	Microdialisi intracerebrale .....	28
3.8	Determinazione delle concentrazioni di DA e DOPAC nei campioni di dializzato ottenuti dal NAcc Shell. ....	29
3.9	Istologia.....	29
3.10	Esperimenti.....	30
	3.10.1 Differenze di genere nell'acquisizione della procedura di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato.....	30
	3.10.2 Differenze di genere nell'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato durante la fase di mantenimento.....	30
	3.10.3 Differenze di genere nella motivazione degli animali verso la bevanda al gusto di cioccolato.....	31
	3.10.4 Effetto del ciclo estrale sul comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni di mantenimento a FR10. ....	31
	3.10.5 Effetto del ciclo estrale sulla motivazione degli animali verso la bevanda al gusto di cioccolato.....	33
	3.10.6 Misurazione delle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulari nel NAcc Shell durante la sessione di auto-somministrazione operante a FR10. ....	34
	3.10.7 Analisi statistica.....	35
<b>4.</b>	<b>Risultati.....</b>	<b>38</b>
4.1	Differenze di genere nell'acquisizione della procedura di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato.....	39
4.2	Differenze di genere nell'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato durante le sessioni a FR10. ....	39
4.3	Differenze di genere nella motivazione degli animali durante le sessioni di Progressive Ratio (PR). ....	41

<b>4.4</b>	<b>Effetto del ciclo estrale sul comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni di mantenimento a FR10.</b> -----	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Effetto dell’ovariectomia sul comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni a FR10.</b> -----	<b>45</b>
<b>4.6</b>	<b>Effetto del ciclo estrale sul comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni di PR.</b> -----	<b>48</b>
<b>4.7</b>	<b>Misurazione delle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulari nel NAcc Shell durante la sessione di auto-somministrazione operante a FR10.</b> -----	<b>49</b>
	4.7.1 Concentrazioni basali di DA e DOPAC extracellulare.....	49
	4.7.2 Differenze di genere nelle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulari misurate durante la sessione di auto-somministrazione a FR10. ....	50
	4.7.3 Effetto del ciclo estrale sulle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulare misurate durante la sessione di auto-somministrazione a FR10: confronto con le femmine ovariettomizzate .....	52
<b>5.</b>	<b>Discussione .....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>Direzioni Future.....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>Referenze Bibliografiche.....</b>	<b>74</b>

## Abstract

Gender differences in food-related disorders have repeatedly been described, with females appearing to be more vulnerable than males. The present study investigated gender differences in neurochemical (dopamine activity in the nucleus accumbens by intracerebral microdialysis) and behavioral (acquisition and maintenance) features in a rat model of operant self-administration of a chocolate-flavored beverage (CFB), the latter possessing strong reinforcing properties and being avidly consumed by rats.

Comparison of male and female rats revealed a similar behavioral profile of CFB self-administration; microdialysis showed an increase – of comparable magnitude in male and female rats – in extracellular dopamine mainly during the appetitive phase of CFB self-administration. However, CFB self-administration profile in female rats changed across the estrus cycle, reaching its nadir during the estrus phase. Accordingly, microdialysis showed lower dopaminergic outputs during proestrus/estrus than diestrus/metestrus phases. No change was recorded in ovariectomized rats. These results suggest that CFB self-administration in female rats is influenced by sexual hormones, possibly interfering with mesolimbic dopamine. This study confirms the importance of (i) gender as a factor to be carefully considered in animal models of drug and food self-administration, and (ii) estrus cycle hormonal changes as a source of variability between males and females.

## **Abbreviazioni**

AC: Adenilato ciclasi

AMPC: Adenosina monofosfato ciclica

AUC: Area under the curve

BP: Break point

DA: Dopamina

DAT: Dopamine transporter

f RMI: Risonanza magnetica funzionale

FR: Fixed ratio

FSH: Ormone follicolo-stimolante

GnRH: Ormone di rilascio delle gonadotropine

GPCRs: Recettori accoppiati a proteine G

LH: Ormone luteinizzante

NA: Noradrenalina

Nacc Core: Nucleus accumbens Core

NAcc Shell: Nucleus accumbens Shell

NAcc: Nucleus accumbens

OFC: Corteccia orbito-frontale

PET: Tomografia ad emissione di positroni

PFC: Corteccia prefrontale

PKA: Protein chinasi A

PR: Progressive ratio

# 1 Introduzione

## 1.1 Disordini legati all'assunzione di sostanze d'abuso e cibo.

Da molti anni, la ricerca pre-clinica si sta dedicando a studiare i disordini legati all'utilizzo di sostanze d'abuso e molti hanno dimostrato come questi siano caratterizzati dall'adattamento neurobiologico dei circuiti neuronali coinvolti nella percezione degli effetti di gratificazione di un rinforzo nonché nei processi di apprendimento dei comportamenti motivati e in quelli implicati nella formazione della memoria. Nonostante lo studio dell'abuso di sostanze come l'eroina, la cocaina, la nicotina e l'alcol ricopra un ruolo centrale nello studio delle dipendenze, la ricerca sta rivolgendo interesse anche nei confronti di comportamenti compulsivi come quelli legati all'assunzione di cibo **(Di Segni et al., 2014)**.

La dipendenza da sostanze d'abuso è una patologia neuropsichiatrica caratterizzata da episodi di assunzione cronica, astinenza e ricaduta, in cui l'individuo che ne soffre mostra (1) comportamenti compulsivi mirati alla ricerca e all'assunzione della sostanza, (2) perdita di controllo nel limitare l'assunzione e (3) insorgenza di uno stato emotivo negativo durante i periodi di astinenza **(DSM V; Koob & Le Moal, 1997)**.

Il cibo è un potente rinforzo ed è in grado di innescare processi di apprendimento associativo per mezzo di meccanismi di condizionamento simili a quelli che si verificano con le sostanze d'abuso **(Volkow et al., 2011)**.

Avena e collaboratori furono fra i primi a sostenere che il cibo, soprattutto quando ricco di zuccheri e ad alto contenuto calorico, può indurre una dipendenza che può avere caratteristiche analoghe a quella di una dipendenza da sostanze d'abuso, infatti in un loro studio hanno dimostrato che sottoponendo dei ratti ad un protocollo sperimentale di accesso intermittente, usato generalmente per riprodurre un modello animale di dipendenza dall'alcol, una soluzione zuccherina mostra un potenziale d'abuso in grado di indurre consumi elevati nei ratti **(Avena et al., 2008; Wise, 1973)**.

A sostegno di questa ipotesi, uno studio ha mostrato che il naloxone, farmaco antagonista dei recettori degli oppioidi endogeni, è in grado di indurre, in ratti sottoposti ad un regime ciclico di glucosio, una sindrome d'astinenza dalle caratteristiche simili a quella che si verifica in individui dipendenti da oppiacei **(Colantuoni et al., 2002)**. Inoltre, dallo stesso studio è emerso che, privando i ratti della soluzione zuccherina a cui sono stati sottoposti in maniera ciclica, essi manifestano i segni tipici dell'astinenza da oppiacei: tremori della testa, delle zampe e sfregamento dei denti.



Come riportato in precedenza, la dipendenza da sostanze stupefacenti si manifesta con una perdita di controllo nell'uso della sostanza che permane nonostante le conseguenze avverse che ne derivano. Oswald e collaboratori hanno dimostrato, attraverso l'utilizzo di un modello animale di assunzione compulsiva di cibo, che questa caratteristica può essere riprodotta negli animali da laboratorio. Infatti, nel loro studio, i ratti abituati a consumare un cibo ricco di grassi e ad elevato contenuto calorico non si astengono nella ricerca e nel consumo nonostante l'accesso al cibo sia associato a leggere scariche elettriche (Oswald et al., 2011).

Anche nell'ambito della ricerca clinica, molti studi hanno evidenziato la stretta analogia che esiste fra i comportamenti compulsivi legati all'assunzione di cibo e quelli legati all'utilizzo di sostanze stupefacenti. Ad esempio, studi di *brain imaging* condotti utilizzando la tomografia ad emissione di positroni (PET) hanno rivelato che i pazienti obesi, come gli individui dipendenti da cocaina, mostrano non solo una ridotta densità recettoriale dei recettori dopaminergici D2 nel nucleus accumbens (NAcc) e nello striato dorsale (Wang et al., 2001; Volkow et., 2005), ma anche un'eccessiva attivazione delle aree coinvolte nella motivazione [NAcc, corteccia orbito-frontale (OFC), amigdala e ippocampo] a seguito dell'esposizione a stimoli visivi in grado di rievocare un cibo o una sostanza d'abuso (Wang et al., 2003; ).

Studi di risonanza magnetica funzionale (fMRI) hanno invece mostrato che gli individui obesi mostrano un'attivazione minore, rispetto a controlli non obesi, delle aree cerebrali deputate alla percezione degli effetti gratificanti a seguito dell'assunzione di un cibo e che questa differenza è riscontrabile anche in soggetti dipendenti da cocaina (Stice et al., 2008, Volkow & Wise, 2005).

## 1.2 Motivazione

I disturbi alimentari e così quelli legati all'abuso di sostanze d'abuso scaturiscono da un'alterazione di quei comportamenti finalizzati all'assunzione di un cibo o di una sostanza d'abuso, che non mostrano di per sé caratteristiche patologiche ma, a seconda di come e con che frequenza si manifestano, possono rappresentare un grave problema per l'individuo. Alla base di questi comportamenti ci sarebbe quindi un'alterazione di quei processi strettamente legati con la motivazione di un organismo e al fine di comprendere meglio questo aspetto è necessario soffermarsi su che cosa sia la motivazione e in che modo questa si manifesta.

La motivazione è un processo attraverso cui un organismo risponde a degli stimoli, mettendo in atto comportamenti di approccio o di allontanamento, sulla base delle conseguenze che gli stimoli stessi determinano, sia in termini di sopravvivenza dell'organismo che della specie stessa.

I comportamenti motivati possono essere innati, qualora derivino dall'abilità intrinseca di un organismo di codificare la valenza biologica di uno stimolo, oppure acquisiti, qualora derivino da precedenti forme di apprendimento. L'accoppiamento sessuale e il nutrimento rappresentano forme di comportamenti motivati innati poiché scaturiscono da stimoli incondizionati, come l'odore di un partner o la vista e il sapore di un cibo. Questi comportamenti esistono a prescindere dall'esperienza in quanto sono frutto dell'evoluzione spontanea di una specie.

Invece, l'esecuzione di un compito, come la pressione di una leva per ottenere del cibo o il completamento di un percorso per giungere ad una sostanza d'abuso, rappresentano forme di comportamenti motivati appresi in quanto derivano dall'esperienza di un organismo (**Ikemoto, 1999; Di Chiara, 2002; Becker & Koob, 2016**). I comportamenti motivati appresi si distinguono in comportamenti orientati ad un obiettivo (*goal-directed behavior*) e comportamenti abituali (*habits behavior*). Il principale criterio che distingue queste due forme di comportamento è la valenza motivazionale dello stimolo nel momento in cui l'azione viene compiuta.

I comportamenti *goal-directed* sono sensibili al valore dello stimolo, quindi, qualora questo perdesse salienza o fosse svalutato dall'organismo stesso, la risposta comportamentale cesserebbe di esistere e quindi si estinguerebbe (**Dickinson & Balleine, 1995, Tolman 1959**). I comportamenti abituali, invece permangono a prescindere dalla valenza motivazionale dello stimolo in quanto "stampati" nella memoria e seguito dell'esauritiva esperienza di comportamenti *goal-directed* (**Dolan & Dayan, 2013; Dickinson, 1994**).

### 1.3 La ricerca della gratificazione

I comportamenti motivati, soprattutto quelli orientati ad un obiettivo, sono ampiamente diffusi nel genere umano. L'uomo sin dalle origini si è sempre cimentato in attività mirate a raggiungere un senso di gratificazione. Si faccia ad esempio riferimento alle attività sportive o a quelle legate alla musica, si considerino le migliaia di persone che si riuniscono intorno ad un campo di calcio o quelle che si recano ad una mostra d'arte o al cinema. Si considerino il tempo e le energie impiegate nelle attività sessuali e in quelle alimentari. Tutto è incentrato attorno ad un unico obiettivo, trarre gratificazione dall'attività che si sta svolgendo, una gratificazione che può assumere diverse forme:

può essere il piacere sessuale, la percezione del sapore di un cibo o la sensazione di orgoglio che deriva dal vincere un incontro sportivo.

Tuttavia, le attività mirate alla ricerca della gratificazione non sempre presentano caratteristiche innocue e salutari, ma possono rappresentare un grave problema non solo per il singolo individuo ma per l'intera società.

Si faccia riferimento, ad esempio, alle persone che fanno uso di sostanze stupefacenti, inizialmente per spirito di curiosità o per ricercare effetti farmacologici in grado di indurre benessere, sollievo dall'ansia o dallo stress, nel tempo possono sperimentare le conseguenze della dipendenza psicologica e fisica con gravi ripercussioni sulla propria salute e sul benessere sociale dell'ambiente circostante.

Non è da considerarsi differente una persona che cade in comportamenti alimentari scorretti o dannosi per la salute. Le proprietà organolettiche di cibi ricchi di grassi e zuccheri, infatti, sono in grado di indurre un'intensa gratificazione e l'assunzione compulsiva e frequente di questi cibi può nel lungo periodo essere causa di patologie gravi, come l'obesità che si stima colpire circa 600 milioni di individui nel mondo (**Uhl & Grow, 2004; Volkow, 2013**).

Quindi, lo studio dei comportamenti motivati e delle proprietà di rinforzo di numerosi stimoli, sia naturali che di sintesi, rappresenta una sorgente indispensabile per una miglior conoscenza di psicopatologie profondamente radicate nella nostra società e in progressivo aumento (**Piazza 2013**).

#### 1.4 Differenze di genere nei disturbi legati all'assunzione di cibo

Secondo una stima effettuata a livello mondiale, il genere rappresenta un fattore di rischio nell'insorgenza di patologie come obesità e *binge-eating disorder* (BED), quest'ultimo definito come un disturbo del comportamento alimentare caratterizzato da episodi ricorrenti di assunzione di elevate quantità di cibo (**Obesity & Overweight, 2010**).

Uno dei principali fattori in grado di stimolare l'assunzione di cibo e di conseguenza l'aumento del peso corporeo è quello che in inglese viene definito "*craving*", ossia un intenso desiderio nei confronti di un cibo o una sostanza d'abuso. Il *craving* può essere tonico o indotto da stimoli sensoriali o ambientali. Il *craving* tonico si manifesta in assenza di stimoli ambientali e può insorgere spontaneamente, determinando un aumento del senso di fame e quindi comportamenti

mirati alla ricerca di cibo, soprattutto quando un organismo si trova in condizioni di carenze caloriche (diete ipocaloriche).

Il *craving* indotto da stimoli, invece, è innescato da stimoli ambientali e sensoriali (visivi, olfattivi e gustativi) associati ad un particolare cibo, che sono in grado di indurre risposte comportamentali come aumento della salivazione, della frequenza cardiaca, della sensazione di fame e della conduttività cutanea (**Hallam et al., 2016; Boswell & Kober, 2016**).

La differente percezione o intensità del *craving* negli uomini e nelle donne potrebbe avere rilevanza clinica ed essere una delle cause nel determinare una più alta percentuale di disturbi alimentari nella popolazione femminile anziché in quella maschile.

Infatti, è stato dimostrato che le donne, rispetto agli uomini, sono soggette più frequentemente ad episodi di *craving* per il cibo e riportano sensazioni di desiderio più intense e difficili da controllare, soprattutto nei confronti di cibi dolci e a base di cioccolato (**Zellner et al., 1999; Weingarten et al., 1991**).

Del Parigi e collaboratori furono fra i primi a condurre uno studio clinico mirato a valutare se vi fossero differenze nell'attività cerebrale di uomini e donne in risposta al senso di fame e di sazietà. In particolare, è stato osservato che gli uomini presentano un'attività cerebrale maggiore nei lobi temporali in risposta al senso di fame e, in condizioni di digiuno, una maggiore attivazione della corteccia prefrontale. Le donne hanno mostrato invece una maggior attività cerebrale nei lobi occipitali in risposta al senso di sazietà. Questo ha portato ad ipotizzare che gli uomini percepiscono in maniera più gratificante gli effetti derivanti dall'assunzione di cibo e dal senso di sazietà rispetto alle donne che invece sono più sensibili agli effetti negativi del digiuno (**Del Parigi et al., 2002**).

Un ulteriore studio, condotto da Uher e collaboratori, ha mostrato che le donne sono più reattive a stimoli sensoriali in grado di rievocare cibi dolci e salati e più sensibili, rispetto agli uomini, alle sensazioni negative indotte dal senso di fame, come suggerito da una maggior attivazione delle aree corticali in presenza di stimoli gustativi ed olfattivi in grado di innescare il ricordo di un cibo particolarmente appetibile (**Uher et al., 2006**).

Wang e collaboratori, infine, attraverso studi di PET, hanno mostrato che le aree limbiche associate alla motivazione e agli stati emotivi che si manifestano in presenza di stimoli associati a rinforzi positivi, come cibi appetibili, si attivano in maniera analoga sia nelle donne che negli uomini. Tuttavia, le donne hanno riportato una ridotta capacità di auto-controllo sul senso di fame e una maggior attivazione metabolica delle aree limbiche quando incoraggiate esplicitamente a controllare il senso di fame innescato da stimoli condizionati (**Wang, 2006**).

## 1.5 Ciclo mestruale e ciclo estrale

Quando si studiano le differenze di genere, è indispensabile considerare l'impatto che i fattori biologici, ambientali e sociali hanno sul comportamento umano.

Da un punto di vista biologico, ad esempio, è importante considerare che, rispetto ad un individuo maschile, quelli di sesso femminile sono caratterizzati da un profilo ormonale differente che subisce delle variazioni cicliche in grado di determinare delle modificazioni riscontrabili anche a livello comportamentale.

Il ciclo ormonale nella donna dura all'incirca 28 giorni e può essere suddiviso in due macro fasi: una fase follicolare ed una fase luteale.

Generalmente si considera, come punto d'inizio della fase follicolare, il primo giorno delle mestruazioni, durante il quale le concentrazioni sieriche degli estrogeni, fra cui l'estradiolo, e del progesterone sono relativamente basse. Al termine delle mestruazioni i livelli di estrogeni aumentano e per mezzo di meccanismi di *feedback*, stimolano la sintesi e il rilascio degli ormoni follicolo-stimolante (FSH) e luteinizzante (LH) che, a circa metà del ciclo (14-17 giorni) determinano l'inizio della fase ovulatoria.

Successivamente all'ovulazione si ha l'inizio della fase luteale, durante la quale aumentano le concentrazioni sieriche di progesterone che a sua volta esercita un effetto inibente sugli ormoni estrogeni. Al termine di questa fase, il progesterone ritorna ai valori di base ed ha inizio la mestruazione (**Hallam, 2016**), fase caratterizzata dallo sfaldamento dello strato superficiale dell'endometrio e conseguente sanguinamento vaginale.

La mestruazione è una caratteristica peculiare del ciclo ormonale di pochi mammiferi in natura, fra cui, oltre agli individui femminili del genere umano, vi sono le scimmie appartenenti al parvordine dei *Catarrini* (gorilla, oranghi e scimmie del nuovo mondo) e i mammiferi della famiglia *Macroscelididae* (**Emera et al., 2012**).

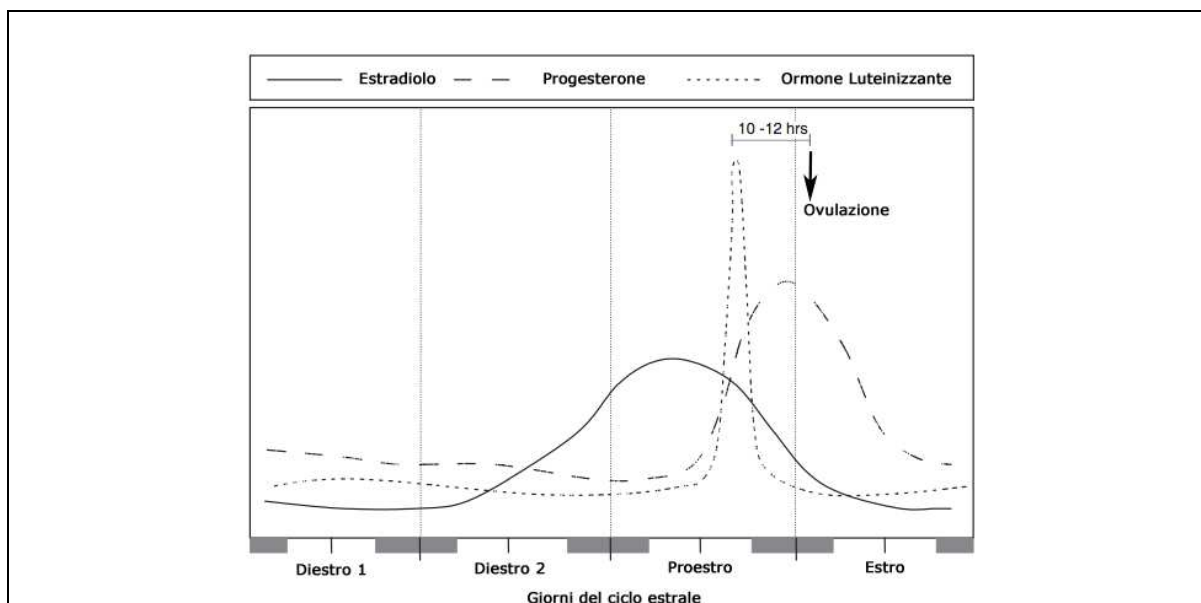
Invece, nella maggior parte delle specie animali, fra cui i roditori, si parla di ciclo estrale in quanto non si ha una fase mestruale bensì una fase denominata *estro*, una parola che trova origine dal greco "oïstros" e che significa "calore". Il termine *estro* indica la fase di ricettività sessuale dell'animale ed è caratterizzata da segni riscontrabili a livello fenotipico fra cui l'apertura spontanea dell'orifizio vaginale e l'aumento delle secrezioni. Inoltre, durante questa fase, e in presenza di un partner, la femmina mostra segni comportamentali tipici finalizzati a stimolare il comportamento sessuale nel

maschio come ad esempio lordosi, movimento delle orecchie e piccoli saltelli che servono a regolare la frequenza di monte e intromissioni nel partner. (Brandling-Bennett et al., 1998).

Nei roditori, il ciclo estrale dura 4-5 giorni ed è costituito da 4 fasi che in ordine cronologico sono Diestro, Proestro, Estro e Metestro.

Durante la fase di Diestro, che rappresenta per convenzione l'inizio del ciclo estrale ed è il corrispettivo della fase follicolare negli umani, si ha un lento incremento della concentrazione serica di estradiolo, che raggiunge il picco nella fase di Proestro. L'aumento dei livelli serici di estradiolo stimola il rilascio dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) da parte dell'ipotalamo, che agendo sulla porzione anteriore della ghiandola ipofisi, determina il rilascio di LH che porta i follicoli ovarici e gli ovociti a maturazione completa.

A questo punto si ha l'incremento dei livelli serici di progesterone che raggiunge il picco di concentrazione durante l'ovulazione ed ha inizio la fase di estro, che avviene circa 10-12 ore dopo l'incremento dei livelli di LH. Durante la fase estrale, i livelli di estrogeno e progesterone ritornano ai valori di base e attraverso meccanismi di *feedback* negativo che regolano l'asse ipotalamo-ipofisi si ha un'inibizione nel rilascio di gonadotropine e l'inizio di un nuovo ciclo estrale (Goldman et al, 2007) (Fig. 1).



**Figura 1.** Rappresentazione schematica del ciclo estrale del ratto in cui sono mostrate le variazioni delle concentrazioni seriche di estradiolo, progesterone e ormone luteinizzante nel tempo. L'ovulazione ha generalmente inizio nelle prime ore dell'estro, circa 10-12 ore dopo l'aumento delle concentrazioni plasmatiche dell'ormone luteinizzante. (Goldman J. L. et al., 2007).

## 1.6 Influenza degli ormoni sessuali sul comportamento alimentare

Una delle prime evidenze scientifiche ad aver messo in luce l'influenza degli ormoni estrogeni sul comportamento alimentare proviene dall'osservazione che nei primati non umani la fase luteale corrisponde al momento del ciclo mestruale in cui gli animali consumano più cibo, mentre la fase ovulatoria è invece quella caratterizzata da consumi inferiori. Come descritto in precedenza, queste due fasi sono caratterizzate da un quadro ormonale che vede la prevalenza del progesterone in fase luteale e degli estrogeni in fase ovulatoria (**Dye & Blundell, 1997**).

L'effetto anoressizzante degli estrogeni, ed in particolare dell'estradiolo, è emerso per la prima volta da uno studio che ha dimostrato come la somministrazione di estradiolo valerato produce, sia nei primati che nei roditori, un ridotto consumo di cibo, che si ripercuote anche sul peso corporeo, mentre la somministrazione di progesterone è risultata inefficace in entrambi (**Czaja & Goy, 1975; Hirschberg, 2012**).

A supporto di ciò, è stato osservato che la somministrazione di estradiolo secondo un regime farmacologico in grado di mimarne il *pulse* fisiologico, è in grado, in organismi che hanno subito resezione chirurgica delle ovaie (ovariectomia), di riportare il peso corporeo e i consumi di cibo ai valori precedenti alla chirurgia. Infatti, la deplezione della componente ormonale tramite ovariectomia, produce aumento del peso corporeo e dei consumi di cibo (**Asarian & Geary, 2002; Geary et al., 1995; Hrupka et al., 1996**).

L'estradiolo ha mostrato, inoltre, efficacia nell'inibire i consumi di cibi anche quando altamente appetibili e caratterizzati da proprietà organolettiche tali da stimolare l'appetito anche in assenza di esigenze caloriche da parte dell'organismo (**Butera et al., 2010**).

Secondo uno studio condotto da Clarke e collaboratori, l'estradiolo sembra essere coinvolto anche nella percezione di gusto derivante dall'assunzione di cibi appetibili. Infatti, attraverso un paradigma comportamentale di reattività al gusto, che permette di misurare le risposte edoniche oro-facciali e quindi il grado di apprezzamento di un animale verso una particolare sostanza, è stato mostrato che la percezione di gratificazione derivante dalla somministrazione intra-orale di una soluzione zuccherina varia in relazione alle fasi del ciclo ormonale, risultando superiore nelle fasi caratterizzate da elevati livelli di estradiolo (**Clarke et al., 1998**).

Nell'ambito della ricerca clinica è stato mostrato che, anche negli esseri umani, il comportamento alimentare è soggetto a variazioni, che sembrano essere connesse con le oscillazioni ormonali durante il ciclo mestruale. Ad esempio Rozin e collaboratori hanno mostrato l'esistenza di una

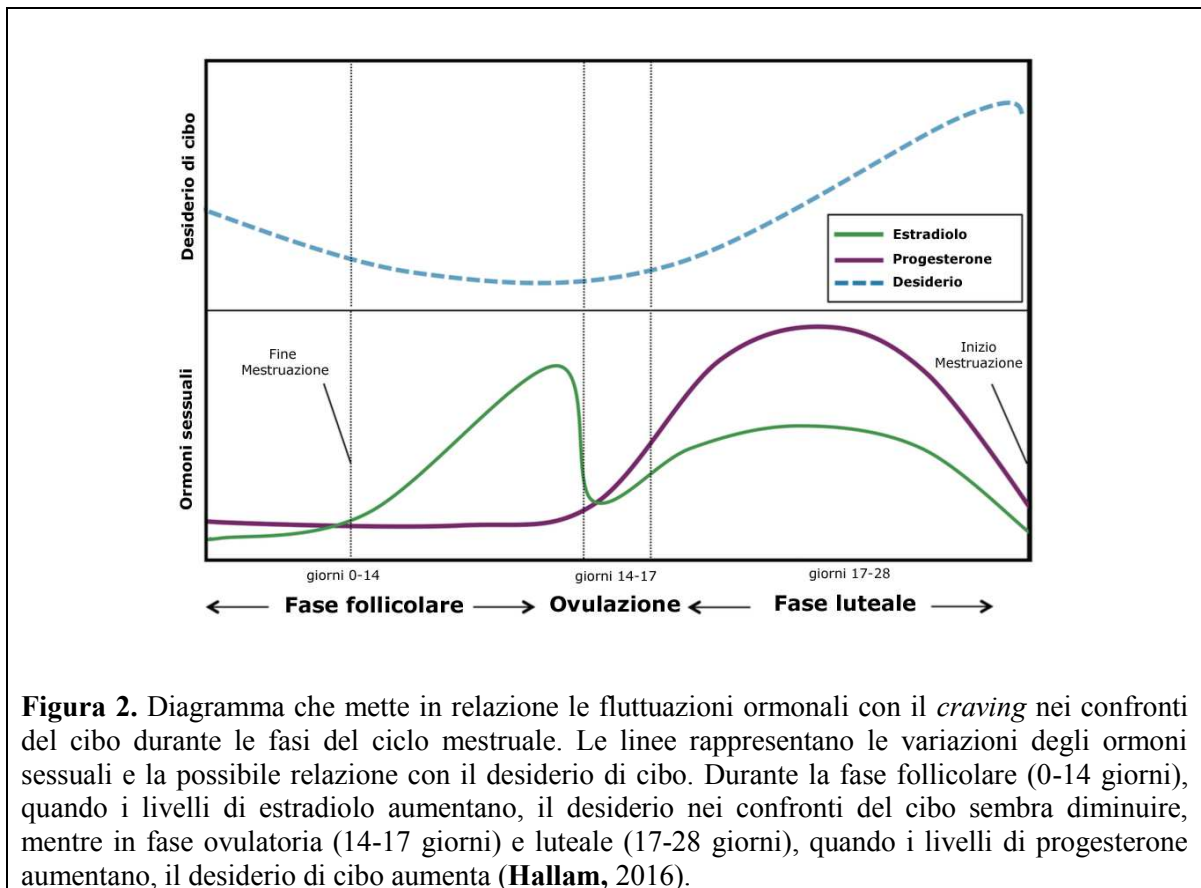
correlazione fra desiderio di cibo e fase mestruale; infatti nel loro studio, le donne esaminate riportano non solo episodi di *craving* più frequenti, ma anche una maggior difficoltà a resistere al desiderio di cibo durante le fasi pre-mestruali del ciclo, ovvero durante la fase luteale (**Rozin et al., 1991**).

A confermare questi risultati, successivi studi hanno mostrato come, nella maggior parte dei casi, le donne siano più propense al consumo di cibo durante le fasi pre-mestruali del ciclo rispetto a quelle peri-ovulatorie in cui le concentrazioni plasmatiche di estradiolo sono elevate (**Kammoun et al., 2016; Bryant, et al., 2006**).

Studi di fMRI hanno invece mostrato che le aree meso-cortico limbiche, fra cui la corteccia prefrontale, in presenza di stimoli condizionati in grado di rievocare cibi appetibili, si attivano maggiormente durante la fase follicolare del ciclo rispetto a quanto osservato durante la fase luteale (**Frank et al., 2010**).

Quindi, sia in ambito clinico che pre-clinico, la letteratura scientifica è in accordo sul fatto che, durante il ciclo ormonale, il comportamento alimentare di un organismo femminile subisce delle modificazioni che sono strettamente connesse con le variazioni delle concentrazioni degli ormoni estrogeni circolanti.





## 1.7 Ruolo della trasmissione dopaminergica nei comportamenti motivati

### 1.7.1 Anatomia del sistema dopaminergico

Nel cervello, i neuroni dopaminergici [che contengono la dopamina (DA) come principale neurotrasmettitore] rappresentano un gruppo eterogeneo di cellule localizzate nel mesencefalo, diencefalo e nel bulbo olfattivo e la maggior parte di essi risiede nella porzione ventrale del mesencefalo. I neuroni dopaminergici del mesodiencefalo costituiscono la parte compatta della Sostanza Nera (SNc), l'Area Ventrale del Tegmento (VTA) e il campo retrorubrale.

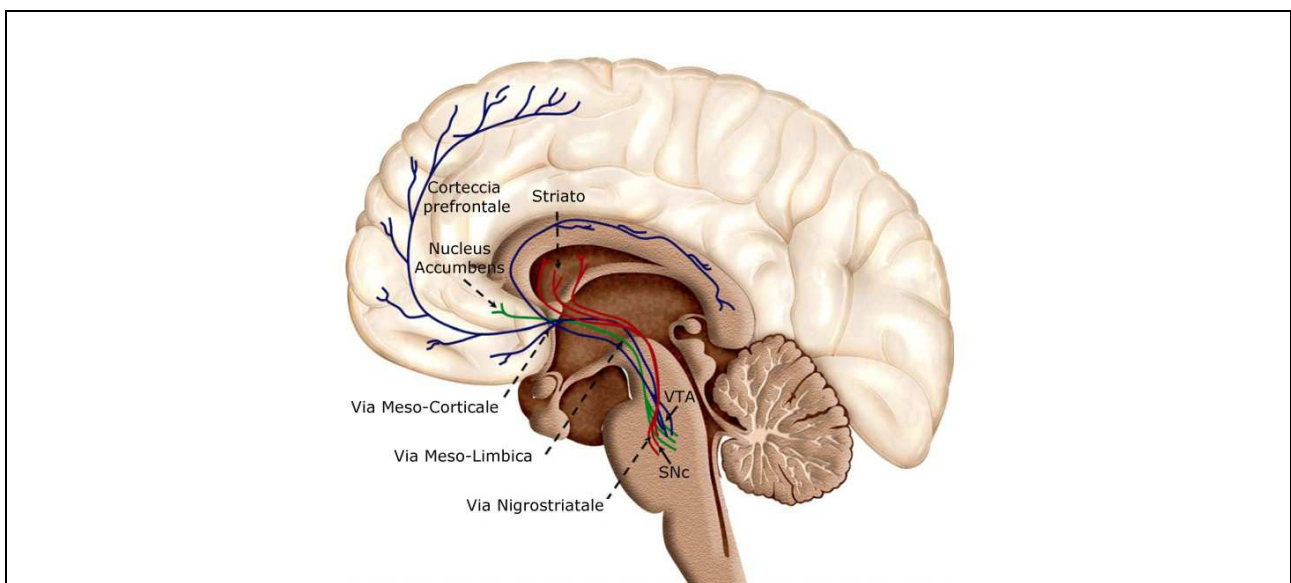
La via nigro-striatale, che ha origine dalla SNc, proietta fasci di terminazione efferenti al nucleo del caudato-putamen e gioca un ruolo fondamentale nel controllo del movimento volontario (Smith et al., 2008).

Oltre alla via nigro-striatale, il sistema dopaminergico comprende i neuroni che costituiscono le vie mesocorticali e mesolimbiche, che originano dalla VTA.

Le vie del sistema mesolimbico originano quindi dalla VTA e proiettano principalmente al NAcc, al tubercolo olfattorio, all'amigdala e all'ippocampo, mentre i fasci che costituiscono il sistema mesocorticale proiettano alla corteccia prefrontale (PFC), alla corteccia cingolata e alla corteccia peririnale (**Wise, 2005**).

Il NAcc è un nucleo localizzato nella porzione ventrale dello striato e può essere suddiviso, anatomicamente e funzionalmente, in due sotto aree di cui una ventromediale definita Shell (NAcc Shell) ed una dorsolaterale definita Core (NAcc Core). Il NAcc Shell invia fasci efferenti all'amigdala, all'area laterale preottica, all'ipotalamo laterale, al nucleo entopeduncolare, alla VTA, alla porzione mediodorsale della SNc, alla formazione reticolare mesopontina e alla sostanza grigia periacqueduttale. Il NAcc Core, invece, invia fasci di proiezioni al nucleo entopeduncolare, alla porzione laterale della VTA, alla parte reticolata della sostanza nera (SNr) e al pallido ventrale.

Il NAcc riceve invece input da diverse aree del cervello fra cui la PFC, l'amigdala, l'ippocampo e il talamo oltre che da aree mesopontine come il nucleo dorsale del rafe e la formazione reticolare mesopontina (**Arias-Carrion et al., 2010**).

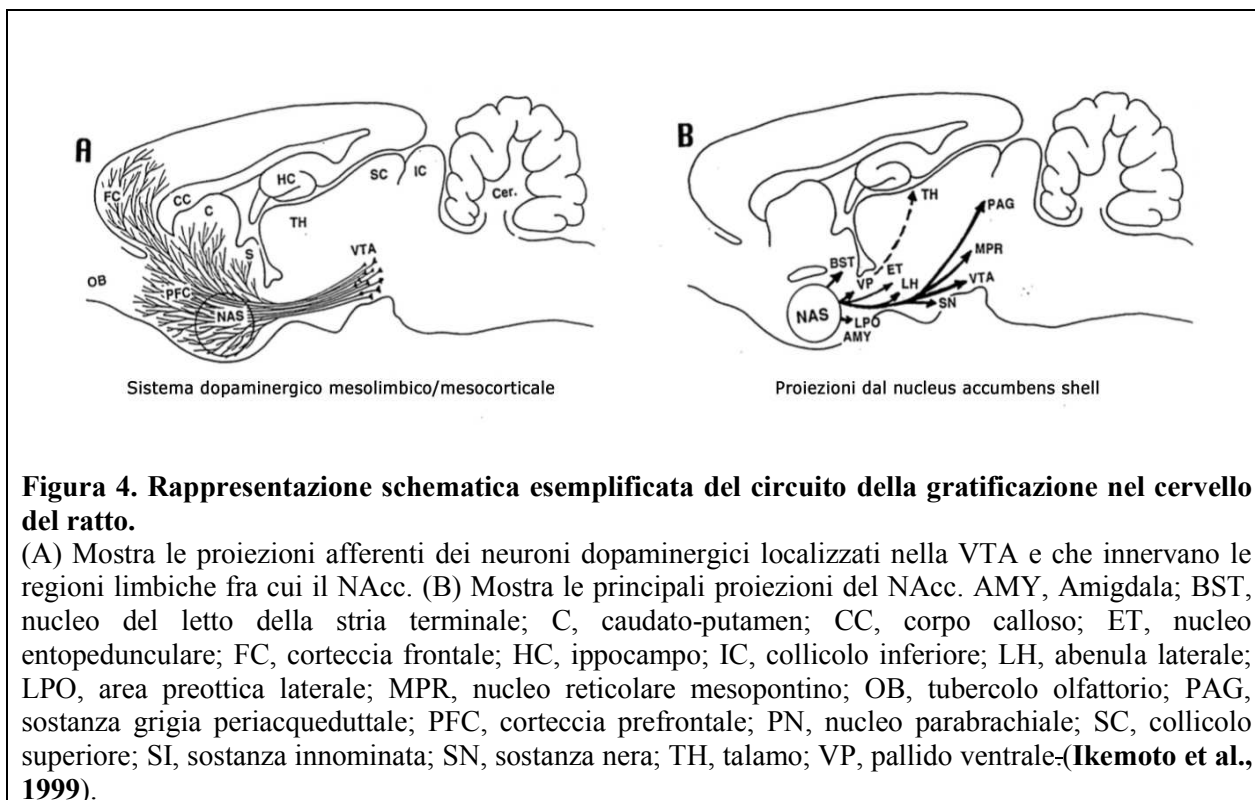


**Figura 3. Rappresentazione schematica esemplificata del circuito della gratificazione nel cervello umano.**

I neuroni dopaminergici, localizzati nelle strutture mesencefaliche della pars compacta della sostanza nera (SNc) e dell'area ventrale del tegmento (VTA), proiettano i loro assoni allo striato (nucleo caudato-putamen e striato ventrale, che comprende il NAcc nucleo accumbens) e alla corteccia prefrontale, dorsale e ventrale. Ulteriori strutture coinvolte sono i nuclei subtalami dei gangli della base, la corteccia cingolata e peririnale. (**Arias-Carrion et al., 2010**).

Quando la DA viene rilasciata dalla terminazione pre-sinaptica dei neuroni dopaminergici, diffonde nello spazio extracellulare dove, oltre a subire un lento processo di rimozione da parte di proteine trasportatrici (*dopamine transporter*, DAT) localizzate a livello pre-sinaptico e di sistemi enzimatici di degradazione intra-sinaptici (monoamino ossidasi, MAO), interagisce con una classe di recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) e in particolare con gli isotipi recettoriali delle famiglie D1 e D2. La famiglia dei recettori D1 comprende gli isotipi D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>, mentre la famiglia D2 comprende gli isotipi D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>.

Gli isotipi recettoriali della famiglia D1 sono localizzati esclusivamente a livello post-sinaptico e sono associati a proteine G<sub>s</sub> in grado di stimolare l'attivazione dell'adenilato ciclasi (AC) e indurre sintesi di adenosina-mono-fosfato ciclica (AMP<sub>c</sub>) e conseguente fosforilazione della protein-chinasi A (PKA). Al contrario gli isotipi recettoriali della famiglia D2 sono localizzati sia a livello post-sinaptico che a livello pre-sinaptico e sono associati a proteine G<sub>i</sub> e G<sub>o</sub>, che inibiscono l'attività dell'AC e riducono la sintesi di AMP<sub>c</sub> con conseguente riduzione nell'attivazione della PKA (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).



### 1.7.2 Dopamina e motivazione

Viste le implicazioni cliniche che la deplezione dei neuroni dopaminergici nigro-striatali induce nei pazienti affetti dal morbo di Parkinson, la DA è stata considerata per anni il neurotrasmettitore del controllo volontario del movimento (**Mogenson et al., 1980; Wise, 2004**).

Tuttavia, solamente a seguito degli studi di Ungerstedt sugli effetti della deplezione dopaminergica nei comportamenti mirati all'assunzione di acqua e cibo, si è cominciato a valutare il ruolo della DA, ed in particolare della trasmissione mesolimbica dopaminergica, nei comportamenti mediati da rinforzi (**Ungerstedt, 1971; Wise, 2006**).

Alcune fra le evidenze scientifiche ad aver creato la connessione dopamina-rinforzo sono derivate dalla realizzazione di modelli animali di auto-somministrazione operante. Infatti, la possibilità di addestrare animali ad auto-somministrarsi, per via sistemica e locale, farmaci ad attività agonista del sistema dopaminergico ha portato i ricercatori ad ipotizzare che la DA potesse essere coinvolta nei processi di rinforzo di questi comportamenti [per referenze fare riferimento a **Ikemoto & Panksepp, 1999; Olds, 1958**].

Infatti, secondo quanto emerso da studi di microdialisi intracerebrale, che hanno mostrato come le sostanze d'abuso, il comportamento sessuale e l'assunzione di cibo sono in grado di attivare il sistema dopaminergico determinando il rilascio di DA extracellulare nello shell del NAcc, i ricercatori hanno ipotizzato l'esistenza di un legame fra la DA e i processi di gratificazione derivanti dall'esperienza di un rinforzo positivo, naturale o di sintesi (**Imperato & Di Chiara et al., 1989; Hernandez & Hoebel, 1988; Volkow, 2005; Hajnal et al., 2003; Bassareo et al., 2002; Wilson et al 1995; Wise, 2006; Melis et al, 2007; Rada et al., 2005; Yokel & Wise, 1973; Wise, 1978; McFarland & Ettenberg, 1995; Pfaus et al., 1990, Sanna et al., 2015**).

Inizialmente questa teoria fu supportata da ulteriori studi che hanno mostrato come la lesione o l'inattivazione farmacologica del sistema mesolimbico della dopamina determina una soppressione del comportamento di auto-somministrazione operante di cocaina, eroina, nicotina e amfetamina (**Willhun et al., 2010**).

Tuttavia, in seguito, si dimostrò che la soppressione del comportamento di auto-somministrazione indotta dagli antagonisti della trasmissione dopaminergica è legata ad aspetti che risiedono a monte del comportamento di auto-somministrazione e che sono strettamente legati alla motivazione anziché alla gratificazione. Infatti, diversi studi hanno dimostrato che la somministrazione dei neurolettici non altera le risposte edoniche oro-facciali positive di animali sottoposti ad infusione intra-orale di una soluzione zuccherina (**Gray & Wise, 1980; Phillips & Fibiger, 1978; Berridge**

**et al., 1989; Wivell & Berridge, 2000; Kaczmarek & Kiefer, 2000; Sienkiewicz-Jarosz, et al., 2005; Evans, et al., 2006).**

Inoltre, nei modelli di auto-somministrazione operante di cibo è stato osservato che la deplezione della DA, o l'inattivazione farmacologica della trasmissione dopaminergica a livello del NAcc, determina, negli animali, uno *shift* motivazionale verso comportamenti che richiedono un minor sforzo a discapito di quelli più impegnativi in grado di garantire l'ottenimento di rinforzi più gratificanti (**Salamone & Correa, 2002**).

Infine, studi provenienti dalla clinica hanno evidenziato che i pazienti affetti dal morbo di Parkinson non riportano variazioni nel senso di gusto o di gratificazione ma mostrano, al contrario, comportamenti compulsivi come gioco d'azzardo e abuso di sostanze ad attività dopamino-agonista (**Peciña et al., 1997**).

A seguito di queste evidenze sperimentali si è cominciato ad indagare sul ruolo della trasmissione dopaminergica negli aspetti che regolano i comportamenti motivati e sono stati condotti numerosi studi che hanno cercato di attribuire alla DA un ruolo univoco.

Alcuni studi ad esempio hanno mostrato come la trasmissione dopaminergica ha un ruolo nello "stampare" nella memoria le relazioni causali che esistono fra due stimoli, o fra uno stimolo e una risposta comportamentale, innescando processi di apprendimento associativi.

Infatti, Di Chiara e colleghi, attraverso esperimenti di microdialisi, hanno mostrato che uno stimolo è in grado di determinare un aumento delle concentrazioni di DA extracellulare nel NAcc Shell solamente alla prima esposizione, portando quindi all'ipotesi secondo cui la trasmissione dopaminergica in quest'area serve ad un organismo per conferire salienza a stimoli totalmente nuovi (**Di Chiara et al., 2002; Bassareo & Di Chiara, 1999; Bassareo et al., 2010; Wise, 2004**).

Inoltre, da altri studi è emerso che il rilascio di DA extracellulare nel NAcc Shell di animali sottoposti all'apprendimento dell'auto-somministrazione operante di cibo è maggiore durante le prime fasi di addestramento anziché in quelle successive, quando il compito è ormai acquisito (**Segovia et al., 2011; Sokolowsky & Salamone, 1998; Cheng & Feenstra, 2003**).

A supportare questi risultati vi sono studi che hanno dimostrato come la modulazione farmacologica della trasmissione dopaminergica sia in grado di rafforzare o indebolire l'instaurarsi di quelle associazioni che regolano i processi di apprendimento (**Phillips et al. 1994; Spyraky et al., 1982**).

Ulteriori studi hanno invece mostrato come la DA sia coinvolta anche negli aspetti che precedono l'ottenimento di un rinforzo e come la trasmissione dopaminergica nel NAcc risponda in maniera contingente alla presenza di stimoli condizionati. Infatti, Schultz e collaboratori hanno dimostrato

che gli stimoli condizionati e predittivi di un rinforzo primario sono in grado di attivare la trasmissione dopaminergica e indurre un rilascio di DA nel NAcc anche in assenza del rinforzo stesso (Schultz et al., 1993; Phillips et al., 2003; Ito et al., 2002, Cheng et al., 2006).

Gli studi descritti finora risentono della procedura sperimentale utilizzata e per questo potrebbero aver condotto a risultati diversi e difficilmente interpretabili attraverso un'unica chiave di lettura.

Tuttavia, il controverso dibattito sul ruolo della trasmissione dopaminergica nel NAcc è stato riassunto in maniera univoca da Wise secondo cui la DA, “stampando” nella memoria l’associazione causale fra un comportamento ed un rinforzo primario, conferisce al rinforzo stesso la capacità di fornire salienza motivazionale ad uno stimolo ad esso associato (Wise, 2006).

## 1.8 Apprendimento

Come descritto in precedenza, i disordini legati al consumo di cibo, e così quelli legati all’abuso di sostanze stupefacenti, sono caratterizzati da comportamenti finalizzati all’assunzione di un cibo, o di una sostanza, che assume, per un organismo, una priorità assoluta in grado di ledere il suo stesso benessere psicofisico. Quindi, fra l’individuo e la sostanza si instaura un legame che scaturisce da precedenti forme di apprendimento che coinvolgono aspetti che sono intrinseci alla natura dell’organismo stesso.

### 1.8.1 Il condizionamento

La capacità di un organismo di saper riconoscere, predire e controllare gli eventi che si manifestano nell’ambiente circostante deriva dall’apprendimento associativo delle relazioni causali con cui gli eventi sono correlati fra loro e costituisce un indispensabile strumento con cui è in grado di garantire la propria sopravvivenza e quella della specie di appartenenza.

Questa forma di apprendimento viene definita, in psicologia, associativa e può essere studiata, da un punto di vista sperimentale, sottoponendo un soggetto ad eventi che sono correlati fra loro in maniera causale e contingente.

Esistono due tipi di apprendimento: quello pavloviano e quello strumentale, o operante.

L’apprendimento Pavloviano s’instaura quando uno stimolo inizialmente neutro viene associato ad un altro stimolo (incondizionato) caratterizzato da una valenza biologica in grado di generare risposte innate.

Ivan Pavlov, ad esempio, capì che il suono di una campanella (stimolo neutro) associato ripetutamente ad un cibo (stimolo incondizionato) era in grado di stimolare nel proprio cane una risposta comportamentale innata come la salivazione **(Pavlov, 1927)**.

Di conseguenza l'apprendimento pavloviano implica che le risposte comportamentali di un organismo siano controllate da eventi che precedono la risposta stessa.

Un'estensione di questa forma di apprendimento è rappresentata dall'apprendimento strumentale, anche definito operante.

Lo psicologo americano B.F. Skinner, nel suo libro "The behavior of organisms" del 1938, scrisse che il comportamento di un organismo è controllato dalle conseguenze che esse producono. In altre parole un organismo agisce sulla base della conoscenza di una relazione causale fra il comportamento messo in atto e il risultato che esso produce nello spazio e nel tempo.

Al fine di riprodurre in laboratorio le leggi che governano l'apprendimento operante, lo stesso Skinner progettò un particolare strumento denominato da allora "gabbia per il comportamento operante" (o, più colloquialmente, "gabbia operante" o "gabbia di Skinner"). Questo strumento è costituito da un opportuno box dotato di una leva, la cui pressione consente all'animale di laboratorio di ottenere un particolare stimolo denominato rinforzo, poiché è in grado di rinforzare l'associazione causale che c'è fra il comportamento emesso e le conseguenze che da esso derivano e quindi aumenta la probabilità che quel comportamento venga emesso nuovamente nel tempo **(Dickinson, 1981)**.

## 1.9 Modelli animali di auto-somministrazione

Al fine di studiare i processi di apprendimento associativi, quelli legati alla motivazione e quindi, in misura più ampia, le caratteristiche comportamentali tipiche dei disordini legati al consumo di cibo e all'abuso di sostanze stupefacenti, la ricerca preclinica si avvale dell'utilizzo di modelli animali di auto-somministrazione, in grado di modellare in vivo i comportamenti umani di ricerca e assunzione di uno stimolo naturale o di sintesi.

Questo modello, oltre che possedere un'ottima validità di costrutto, presenta il vantaggio che l'animale è in grado di procurarsi la sostanza oggetto di studio volontariamente, senza che vi siano interferenze da parte dello sperimentatore.

Infatti, sfruttando i principi che regolano l'apprendimento strumentale, si favorisce l'instaurarsi delle relazioni di contingenza fra uno stimolo ed una risposta comportamentale e quindi è possibile addestrare l'animale da laboratorio ad eseguire un compito per procurarsi quella sostanza.

Questa procedura consente di misurare diversi aspetti legati all'auto-somministrazione, infatti addestrando ad esempio un ratto a premere una leva per ottenere una particolare sostanza, è possibile misurare diversi parametri, fra cui la quantità di "lavoro" eseguito dall'animale per accedere alla sostanza oppure, manipolando variabili ambientali, è possibile studiare l'effetto dell'apprendimento Pavloviano sul comportamento operante ed avere una stima delle proprietà motivazionali e di rinforzo indotte dallo stimolo ricercato (**Deneau et al., 1968; Weeks et al., 1962; Sanchis-Segura & Spanagel, 2006**).

### 1.10 Auto-somministrazione operante di cioccolato

Come discusso in precedenza, il cibo, soprattutto quando ricco di zuccheri e grassi, è in grado di agire da rinforzo positivo del comportamento e innescare processi di apprendimento associativi e motivazione in un organismo.

Precedenti studi hanno mostrato che ratti esposti liberamente a due bottiglie, una contenente acqua e l'altra una bevanda al gusto di cioccolato, mostrano un comportamento polidipsico nei confronti della bevanda al gusto di cioccolato, arrivando ad assumerne circa 300 ml per kg di peso corporeo al giorno (**Gessa et al., 2006**).

Inoltre, quando addestrati a premere una leva per ottenere la bevanda in questione, gli animali mostrano un robusto comportamento di auto-somministrazione che si manifesta con un elevato numero di pressioni eseguite (circa 2000/60 minuti) e un ingente volume di bevanda assunto (50 ml/kg/60 min) (**Maccioni et al., 2008**).

Questo modello è inoltre sensibile alle procedure comportamentali di "estinzione" e "reinstatement" (**Calu et al., 2014**), generalmente utilizzate per modellare i comportamenti umani di ricaduta a seguito di periodi di astinenza e sono state oggetto di numerosi studi, di tipo farmacologico e comportamentale, che hanno messo in evidenza non solo le forti proprietà motivazionali e rinforzanti della bevanda al gusto di cioccolato ma anche le caratteristiche simil-compulsive del comportamento mostrato dai ratti nelle sessioni di auto-somministrazione (**Maccioni et al., 2008, Zaru et al., 2015; Zaru et al., 2016**)



Inoltre questo modello animale è risultato sensibile a manipolazioni farmacologiche di quei sistemi recettoriali che sono ampiamente studiati anche nel campo delle dipendenze da sostanze stupefacenti.

Ad esempio, uno studio condotto da Maccioni e collaboratori ha mostrato che la somministrazione sistemica di rimonabant, un farmaco che agisce da antagonista ed agonista inverso dei recettori CB<sub>1</sub> per gli endocannabinoidi, è in grado di inibire, nel ratto, l'auto-somministrazione di questa bevanda in maniera dose-dipendente agendo anche sulle proprietà motivazionali del rinforzo stesso, in maniera analoga a quanto osservato nei comportamenti di auto-somministrazione di oppioidi, cocaina, nicotina e alcol (**Maccioni et al., 2008**).

Anche la somministrazione sistemica di antagonisti dell'enzima beta-idrossilasi, in grado di determinare la conversione metabolica di DA in noradrenalina (NA), determina un'inibizione nei processi motivazionali che guidano il comportamento di auto-somministrazione della bevanda al cioccolato nel ratto (**Zaru et al., 2015; Zaru et al., 2016**).

Quindi, questo modello di auto-somministrazione possiede caratteristiche comportamentali in grado di riprodurre nel roditore i comportamenti umani di ricerca e assunzione di cibi ad elevato potere rinforzante, e rappresenta un valido strumento nello studio di quei disordini alimentari caratterizzati da assunzione eccessiva ed incontrollata di cibo.

### 1.11 Microdialisi intracerebrale

La microdialisi intracerebrale è una procedura sperimentale ampiamente utilizzata nel campo delle neuroscienze e costituisce un valido strumento per monitorare in un tessuto cerebrale la concentrazione nel tempo delle molecole oggetto di studio.

Questa tecnica prevede l'utilizzo di un *probe* da microdialisi, costituito alla sua estremità inferiore da una membrana semipermeabile caratterizzata da un *cutoff* in grado di consentire il passaggio di molecole con un peso molecolare specifico. Il *probe* viene perfuso con un liquido isoosmotico che consente il recupero delle sostanze presenti nel fluido extracellulare.

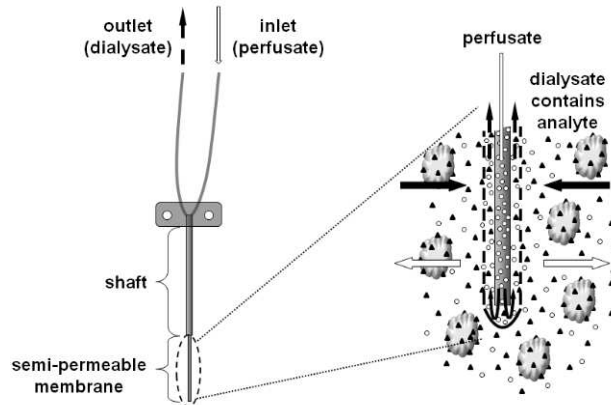
In particolare, questa tecnica misura la concentrazione dei neurotrasmettitori diffusi nello spazio extracellulare a seguito del rilascio da parte della terminazione nervosa ma non fornisce informazioni riguardo agli eventi che si verificano a livello sinaptico. Inoltre, poiché la microdialisi monitora le concentrazioni dei neurotrasmettitori ad intervalli di tempo lunghi (> 1 min) non consente di trovare una relazione causale diretta fra le variabili sperimentali e gli eventi che si

verificano a livello extracellulare, sebbene sia possibile relare i due eventi da un punto di vista temporale (**Di Chiara et al., 1996**).

Nell'ambito dello studio dei modelli animali di auto-somministrazione questa tecnica consente quindi di studiare le relazioni che esistono fra le variazioni nelle concentrazioni delle molecole esaminate con il comportamento messo in atto dall'animale e può rappresentare un valido strumento per studiare i meccanismi neurochimici alla base dei comportamenti mirati all'assunzione di un cibo o di una sostanza d'abuso.

Ad esempio, tramite questa tecnica, diversi studi hanno mostrato che l'assunzione di cibi appetibili è in grado di determinare un aumento delle concentrazioni di DA extracellulare nel NAcc Shell dei roditori (**Martel & Fantino, 1996; Melis et al., 2007**) ed ha inoltre favorito l'identificazione delle strette analogie che esistono fra cibi e sostanze d'abuso (**Haijnal et al., 2001; Rada et al., 2005**), soprattutto relativamente alla loro capacità di indurre attivazione del sistema dopaminergico.

Diversi gruppi di ricerca hanno inoltre sfruttato la versatilità della microdialisi intracerebrale per studiare, negli animali, il ruolo della trasmissione dopaminergica in diverse aree cerebrali mostrando, ad esempio, che la porzione ventro-mediale dello striato è maggiormente coinvolta nei comportamenti *goal-directed* rispetto a quella dorsale (**Everitt & Robbins, 2012**), a cui è stato invece attribuito un ruolo predominante nei comportamenti abituali, e così la corteccia prefrontale, in cui la trasmissione dopaminergica sembra avere un ruolo negli aspetti cognitivi che regolano i comportamenti motivati (**Devoto et al., 2014**).



**Figura 5.** L'immagine è una rappresentazione schematica del flusso del liquido di perfusione all'interno del probe da microdialisi. Il *probe*, costituito nella sua estremità inferiore da una membrana semipermeabile, viene impiantato in un tessuto biologico e perfuso con una soluzione isoosmotica. Le caratteristiche chimiche della soluzione isoosmotica consentono, a livello della membrana semipermeabile, lo scambio osmotico con il fluido extracellulare del tessuto impiantato. Quindi grazie all'applicazione di una pressione esterna, tramite un tubicino di entrata (*inlet*), la soluzione isoosmotica viene recuperata all'esterno tramite il tubicino di recupero (*outlet*). Il dializzato sarà in seguito sottoposto a separazione cromatografica accoppiata a sistemi di rilevamento elettrochimico.

## 2 Scopo della ricerca

Secondo quanto riportato in precedenza, il genere rappresenta un fattore che non può essere trascurato quando si studiano i disordini comportamentali legati al consumo di cibo o all'abuso di sostanze stupefacenti, in quanto questo potrebbe rappresentare una fonte di variabilità importante negli aspetti motivazionali e di rinforzo che regolano i comportamenti.

Il primo obiettivo di questo studio è quindi quello di caratterizzare, da un punto di vista comportamentale, gli aspetti motivazionali e di rinforzo che regolano il comportamento di auto-somministrazione operante di una bevanda al gusto di cioccolato nei ratti di sesso maschile e femminile e mettere in evidenza eventuali differenze di genere.

Inoltre, vista l'influenza del ciclo ormonale, sul controllo dei comportamenti alimentari, sia nell'uomo che nell'animale, e l'impatto che il ciclo estrale e mestruale hanno nei processi motivazionali che regolano l'assunzione di cibo, un ulteriore obiettivo di questo studio è quello di valutare l'effetto del ciclo estrale sul comportamento di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato e sui meccanismi motivazionali che lo regolano.

Come precedentemente riportato, la trasmissione dopaminergica mesolimbica, in particolare quella nel NAcc Shell, area localizzata nello striato ventromediale, è coinvolta nei processi motivazionali che regolano il comportamento di un organismo, quindi, in questo studio, sono stati condotti esperimenti di microdialisi finalizzati a monitorare le concentrazioni di DA extracellulare nel NAcc Shell durante l'auto-somministrazione della bevanda al gusto di cioccolato.

Anche in questo caso, l'effetto neurochimico dell'auto-somministrazione operante è stato valutato sia in ratti di sesso femminile che maschile, al fine di portare alla luce eventuali differenze legate al genere.

Inoltre, poiché l'attività dopaminergica del sistema mesolimbico risente delle fluttuazioni ormonali che avvengono durante il ciclo estrale delle femmine di ratto (**Becker, 1999; Yoest, et al., 2014**), in queste ultime gli esperimenti di microdialisi sono stati condotti tenendo in considerazione le fasi del ciclo estrale.

### 3 Materiali e Metodi

Le attività sperimentali condotte in questo studio sono state svolte in accordo alle linee guida della Direttiva della Comunità Europea del 22 settembre 2010 (2010/63/EU) e alla Legislazione Italiana (D. L. 4 Marzo, 2014, n 26), e sono state approvate dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale della Università di Cagliari.

### 3.1 Animali e Stabulazione

In questo studio sono stati utilizzati ratti adulti Wistar (Charles River Laboratories, Calco, Italia), di sesso maschile e femminile, rispettivamente del peso di 250-300 g e 180-200 g all'inizio degli esperimenti. I ratti dei due sessi sono stati stabulati singolarmente e in stanze separate, a ciclo invertito luce-buio di 12:12 h (luce accesa alle 19.00) e mantenuti in condizioni di temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidità relativa (60%) controllate e costanti, con cibo standard di laboratorio (Harlan<sup>®</sup>) e acqua ad libitum.

### 3.2 Apparati sperimentali

La procedura dell'auto-somministrazione operante prevede l'utilizzo di particolari strumentazioni denominate gabbie operanti. Ciascuna gabbia operante è provvista di un pannello equipaggiato con una leva retrattile, un foro collegato al beccuccio di una bottiglietta situata all'esterno della gabbia ed una luce collocata al di sopra della leva. Nella parte superiore al pannello opposto a quello appena descritto, è presente un segnale luminoso che indica l'inizio della sessione di auto-somministrazione (Med Associates<sup>®</sup>, Georgia, Vermont, USA).

La pressione della leva da parte dell'animale conduce all'esposizione, attraverso il foro, del beccuccio della bottiglietta contenente la bevanda al gusto di cioccolato e l'accensione della luce sopra la leva. Il beccuccio rimane esposto per 5 s per consentire all'animale di assumere la bevanda. Al termine di questo intervallo il beccuccio si ritrae e l'animale deve nuovamente premere la leva per avere accesso alla bevanda (Fig. 5).

### 3.3 Bevanda al gusto di cioccolato

La bevanda al gusto di cioccolato utilizzata in questo studio è stata preparata dissolvendo polvere di Nesquik<sup>®</sup> (Nestlé Italiana) in acqua di rubinetto alla concentrazione del 5% (p/v). La soluzione è

stata preparata ogni giorno e le bottigliette contenenti tale soluzione sono state agitate immediatamente prima dell'inizio di ciascuna sessione di auto-somministrazione per prevenire lo sviluppo di depositi.



**Figura 6. Gabbia per il comportamento operante.**

Fotografia di una gabbia operante utilizzata per l'auto-somministrazione della bevanda al gusto di cioccolato (A). La gabbia è costituita da un pannello frontale dotato di una leva retrattile, un foro da cui entra il beccuccio della bottiglietta contenente la bevanda al gusto di cioccolato e una luce bianca, al di sopra della leva, che funge da stimolo condizionato al rinforzo (B). La bottiglietta contenente la bevanda al gusto di cioccolato è montata esteriormente alla gabbia operante (C). Quando gli animali raggiungono il numero di pressioni stabilite dal valore di FR, il sistema su cui è montata la bottiglietta si attiva e il beccuccio subentra all'interno della gabbia tramite il foro.

### 3.4 Procedura di addestramento degli animali

A partire dal 45° giorno di vita, gli animali sono stati addestrati, durante la fase di buio, per un'ora al giorno, 5 giorni alla settimana (dal lunedì al venerdì) alla tecnica dell'auto-somministrazione operante attraverso un programma di allenamento definito *Fixed Ratio schedule of reinforcement* (FR) (Maccioni et al., 2008). Questo programma a rapporto fisso prevede che il numero di pressioni richieste all'animale per ottenere una singola esposizione del beccuccio rimanga costante durante tutta la sessione di auto-somministrazione.

L'addestramento degli animali è costituito da due fasi, una di acquisizione, o *shaping*, e una di mantenimento.

La fase di acquisizione consente agli animali di apprendere che la pressione della leva determina



l'esposizione, attraverso il foro, del beccuccio della bottiglietta contenente la bevanda al gusto di cioccolato ed è costituita da diversi *steps*, contraddistinti da un valore di FR, che indicano la quantità di pressioni richieste all'animale per ottenere una singola esposizione della bevanda. Il valore di FR viene incrementato gradualmente quando l'animale raggiunge un criterio minimo, ossia l'esecuzione di un numero di pressioni sufficienti ad ottenere 100 esposizioni del beccuccio, ovvero 100 rinforzi per due sessioni consecutive. Quindi, gli animali sono fatti progredire attraverso 5 *steps* che in ordine sequenziale sono: FR1, FR2, FR4, FR6.

Al fine di favorire l'acquisizione del comportamento, nelle prime sessioni di FR1, gli animali sono privati dall'acqua fino al raggiungimento del criterio stabilito in precedenza.

Quando gli animali completano l'ultimo *step* della fase di *shaping* (FR6), il valore di FR viene aumentato a 10 (FR10) ed ha inizio la fase di mantenimento.

Questa fase, necessaria affinché gli animali raggiungano e mantengano un comportamento stabile nel tempo, ha avuto una durata complessiva di 10 giorni e il valore di FR è mantenuto costante.

### 3.5 Ovariectomia bilaterale

Prima dell'inizio degli esperimenti, un gruppo di 12 ratti di sesso femminile è stato sottoposto ad ovariectomia bilaterale sotto anestesia con isoflurano [Vetflurane<sup>®</sup> (100 mg/g), Virbac] (5% per l'induzione dell'anestesia e 1.5% per il mantenimento dell'anestesia durante la chirurgia) mediante un'unica incisione eseguita a livello dell'addome. Al termine dell'operazione e nei 4 giorni successivi, gli animali sono stati trattati con un antibiotico [Baytril<sup>®</sup> (25 mg/ml), Bayer] e un antiinfiammatorio [Orudis<sup>®</sup> fiale (2mg/ml), Sanofi Aventis] per via sottocutanea al fine di limitare il rischio di infezioni e infiammazioni post-operatorie. Dopo una settimana dalla chirurgia gli animali sono stati trasferiti singolarmente nelle gabbie di stabulazione in stanza comune con i ratti di sesso femminile intatti.

### 3.6 Chirurgia stereotassica

Gli animali, dopo 10 giorni di fase di mantenimento all'auto-somministrazione della bevanda al gusto di cioccolato, sono stati sottoposti a chirurgia stereotassica (Stoelting<sup>®</sup> Co., Wood Dale, IL, USA) per l'impianto di cannule guida del diametro interno di 20 G (PlasticOne<sup>®</sup>, Roanoke, VA, USA).

Le cannule guida dirette al NAcc Shell (coordinate: 1.9 mm anteriore, 0.8 mm laterale rispetto alla linea mediana e 5.0 mm ventrale rispetto alla superficie del cranio) sono state impiantate su animali anestetizzati con isoflurano (5% per l'induzione dell'anestesia e 1.5% per il mantenimento dell'anestesia durante la chirurgia).

Al termine della chirurgia, gli animali sono stati riposti singolarmente nelle loro gabbie di stabulazione e lasciati a riposo per i 3 giorni successivi. In seguito, i ratti sono stati nuovamente sottoposti all'auto-somministrazione operante della bevanda al cioccolato per 7 giorni consecutivi in modo da consentire loro di riacquisire un comportamento stabile. Durante questi giorni, al fine di abituare gli animali alla procedura sperimentale, le sessioni di auto-somministrazione sono state condotte utilizzando strumenti in grado di mimare gli apparati utilizzati durante la sessione di microdialisi e quindi evitare, durante la sessione sperimentale, di introdurre stimoli nuovi in grado di turbare il comportamento di auto-somministrazione.

### 3.7 Microdialisi intracerebrale

La sera precedente all'esperimento di microdialisi, gli animali sono stati sottoposti ad una blanda anestesia con isoflurano per consentire l'inserimento, attraverso la cannula guida, di un *probe* da microdialisi costruito in laboratorio e costituito da una membrana dialitica, semipermeabile e con una finestra attiva, della lunghezza di 2.0 mm, in grado di consentire lo scambio osmotico a livello dell'area di interesse e quindi il recupero selettivo del neurotrasmettitore oggetto di studio.

Dopo l'inserimento e successivo fissaggio, il *probe* è stato collegato ad una siringa (Hamilton<sup>®</sup>) da 2,5 ml riempita con un soluzione Ringer (147 Mm NaCl, 3 Mm KCl, 1.2 Mm CaCl<sub>2</sub> e Ph 6.5) e montata su una pompa CMA/100 da micro infusione (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA).

In seguito l'animale è stato lasciato nella propria gabbia di stabulazione in perfusione ad un flusso costante di 0.2 µl/min per tutta la notte.

Il giorno successivo, il flusso è stato aumentato a 2 µl/min e lasciato costante per due ore affinché lo scambio osmotico attraverso la membrana dialitica divenisse stabile. Al termine di queste due ore ha avuto inizio l'esperimento di microdialisi e la raccolta dei campioni.

Ciascun campione del volume di 30 µl è stato raccolto ogni 15 minuti ed immediatamente analizzato attraverso cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) accoppiata ad un sistema di rilevamento elettrochimico.

Per ogni esperimento sono stati raccolti un totale di 12 campioni di cui: 6 campioni basali, quando l'animale è nella propria gabbia di stabulazione prima di essere trasferito nella gabbia operante; un campione durante la fase di attesa, quando l'animale si trova all'interno della gabbia operante ed è pertanto esposto a stimoli ambientali ed olfattivi che predicono l'inizio della sessione di auto-somministrazione; 4 campioni durante la sessione di auto-somministrazione; un campione al termine della sessione.

Al termine della sessione di microdialisi, la cannula da dialisi è stata rimossa dalla cannula guida e l'animale sacrificato per la rimozione del cervello.

### 3.8 Determinazione delle concentrazioni di DA e DOPAC nei campioni di dializzato ottenuti dal NAcc Shell.

La concentrazione della DA e dell'acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC, principale metabolita della DA) è stata misurata nelle aliquote di dializzato (volume di 20  $\mu$ l), mediante HPLC su una colonna cromatografica Supelcosil C18 (Supelco, Supelchem, Milano, lunghezza 7,5 cm, diametro interno 3.0 mm e porosità di 3  $\mu$ m) associata a rilevazione elettrochimica con una cella duale 4011 settata ad un potenziale di riduzione di +350 e -180 Mv e accoppiata ad un'interfaccia di acquisizione (Coulchem II, ESA, Cambridge, MA, USA). La fase mobile utilizzata era composta da tampone acetato/citrato 0.06 M e pH 4.2, 20% v/v metanolo, 0.1 mM EDTA, 1  $\mu$ M trietilamina e 0.03 mM sodio dodecil solfato. La fase mobile è stata mantenuta ad un flusso di 0.6 ml/min a temperatura ambiente. In queste condizioni la sensibilità di rilevamento della dopamina è di 0,125 pg, mentre quella del DOPAC è di 0.1 pg.

### 3.9 Istologia

Al termine dell'esperimento di microdialisi, gli animali sono stati sacrificati per la rimozione del cervello dalla scatola cranica. Il cervello è stato immediatamente posto in una soluzione di paraformaldeide al 4%, lasciato a riposo per una settimana e in seguito trasferito e lasciato overnight in una soluzione di sucrosio sciolto in acqua (30% p/v). Infine il cervello è stato congelato alla temperatura di -20°C e tagliato con un criostato in sezioni coronali dello spessore di 40  $\mu$ m. Le sezioni cerebrali raccolte su vetrini sono state in seguito colorate con colorante Rosso Neutro e ispezionate con microscopio a contrasto di fase per valutare il corretto posizionamento del probe da microdialisi.

La corretta posizione della cannula guida e del probe è stata identificata seguendo la traccia del probe e facendo riferimento all'atlante del cervello di ratto Paxinos & Watson (2004).

Per l'analisi dei risultati sono stati considerati solamente gli animali in cui l'ispezione istologica del cervello ha mostrato un corretto posizionamento del probe di microdialisi nell'area di interesse (NAcc).

### 3.10 Esperimenti

#### 3.10.1 Differenze di genere nell'acquisizione della procedura di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato.

Questo esperimento è stato condotto al fine di valutare il grado con cui gli animali apprendono l'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato e quindi valutare l'esistenza di eventuali differenze di genere nell'acquisizione del comportamento di auto-somministrazione.

Per questo scopo sono stati utilizzati ratti di sesso maschile (n = 16) e femminile (n = 12) che sono stati addestrati alla procedura di auto-somministrazione operante mediante le modalità descritte in precedenza.

Il confronto è stato effettuato sulla media del numero totale di sessioni necessarie ai due gruppi di animali per completare la fase di *shaping*.

#### 3.10.2 Differenze di genere nell'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato durante la fase di mantenimento.

Questo esperimento è stato condotto al fine di valutare l'esistenza di eventuali differenze di genere nei parametri comportamentali misurati durante le sessioni di auto-somministrazione a FR10.

Quindi, durante la fase di mantenimento, i ratti di sesso maschile (n = 16) e femminile (n = 12) sono stati confrontati sulla base di diversi parametri comportamentali: (1) il numero di pressioni eseguite, (2) i volumi di bevanda assunti (ml/sessione), (3) il tempo di latenza (s) alla prima pressione e (4) gli andamenti nel numero di pressioni eseguite sulla leva dagli animali ogni 5 min durante le sessioni di auto-somministrazione.

### 3.10.3 Differenze di genere nella motivazione degli animali verso la bevanda al gusto di cioccolato.

Al termine della fase di mantenimento, della durata di 10 giorni consecutivi, i ratti di sesso maschile (n = 16) e femminile (n = 12) sono stati sottoposti ad una singola sessione, della durata di 60 minuti, di *Progressive Ratio (PR) schedule of reinforcement*. Rispetto al programma FR, questo protocollo sperimentale è in grado di mettere maggiormente in risalto la motivazione degli animali verso un determinato rinforzo, in quanto l'ottenimento del rinforzo stesso è reso progressivamente più impegnativo (**Richardson and Roberts, 1995**). Infatti, questo protocollo sperimentale prevede che il numero di pressioni richieste all'animale per ottenere una singola esposizione della bevanda sia progressivamente incrementato durante la sessione stessa. Quindi, ogni volta che gli animali hanno ottenuto un rinforzo, il numero di pressioni richieste per ottenere il successivo è incrementato progressivamente secondo il seguente ordine: 10, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219 ecc. Il protocollo sperimentale in questione consente quindi di misurare le proprietà motivazionali e di rinforzo della bevanda al gusto di cioccolato tramite il valore di *Break Point (BP)*, che esprime il numero minimo di pressioni della leva che l'animale non è disposto a premere per ottenere il rinforzo. Quindi, quanto più è alto il valore di BP, tanto maggiore è la motivazione dell'animale a premere la leva per ottenere la bevanda al gusto di cioccolato.

I ratti dei due sessi sono stati confrontati sulla base di due parametri comportamentali: (1) i valori di BP e (2) il numero di pressioni della leva eseguite.

### 3.10.4 Effetto del ciclo estrale sul comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni di mantenimento a FR10.

Questo esperimento è stato condotto al fine di valutare se il comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni a FR10 varia in relazione alle fasi del ciclo estrale.

Per questo scopo sono stati utilizzati ratti femmina intatti (n = 22) che sono stati monitorati relativamente alla fase del ciclo estrale per 10 giorni consecutivi.

Ogni giorno, al termine della sessione di auto-somministrazione, sono state prelevate le secrezioni vaginali di ciascuno ratto con una pipetta riempita con 200 µl di soluzione salina (NaCl 0,9%) e inserita all'interno dell'orifizio vaginale ad una profondità di circa 2.0 mm. I fluidi vaginali sono

stati in seguito distribuiti sulla superficie di un vetrino e lasciati asciugare all'aria. Ad ogni prelievo, per ogni ratto, il puntale della pipetta e il vetrino di raccolta sono stati cambiati in modo da evitare contaminazioni (Marcondes et al., 2002; Cora et al., 2015).

Una volta asciutti, i vetrini sono stati colorati mediante colorante di May Grunwald-Giemsa e ispezionati con microscopio a contrasto di fase con ingrandimenti a 40x e 100x.

Le diverse fasi che compongono il ciclo estrale sono state riconosciute sulla base delle caratteristiche morfologiche dell'essudato vaginale e dalla presenza o meno dei seguenti 3 tipi di cellule: (1) cellule epiteliali pavimentose, caratterizzate da una forma circolare e dimensioni sufficientemente grandi da consentire l'individuazione del nucleo; (2) cellule cornificate prive di nucleo e grandi dimensioni, caratterizzate da una forma irregolare; (3) leucociti di aspetto granuloso e dimensioni tali da non consentire l'individuazione del nucleo.

Il rapporto fra questi 3 tipi di cellule ha consentito l'individuazione della fase del ciclo corrispondente (Long & Evans, 1992; Mandl, 1951) (Fig 7.):

- **Diestro**: caratterizzato prevalentemente da leucociti. Il preparato istologico è stato considerato Diestro anche in presenza di modeste quantità di cellule pavimentose, suggestive dell'inizio di un Proestro prossimo.
- **Proestro**: caratterizzato principalmente da cellule pavimentose raggruppate o meno a formare strati cellulari che può presentare, in percentuale inferiore, anche leucociti o cellule corneificate suggestive di un Proestro in fase iniziale o finale.
- **Estro**: Caratterizzato prevalentemente da cellule cornificate.
- **Metestro**: L'essudato vaginale mostra tutti e 3 i tipi di cellule in rapporto uguale fra loro.

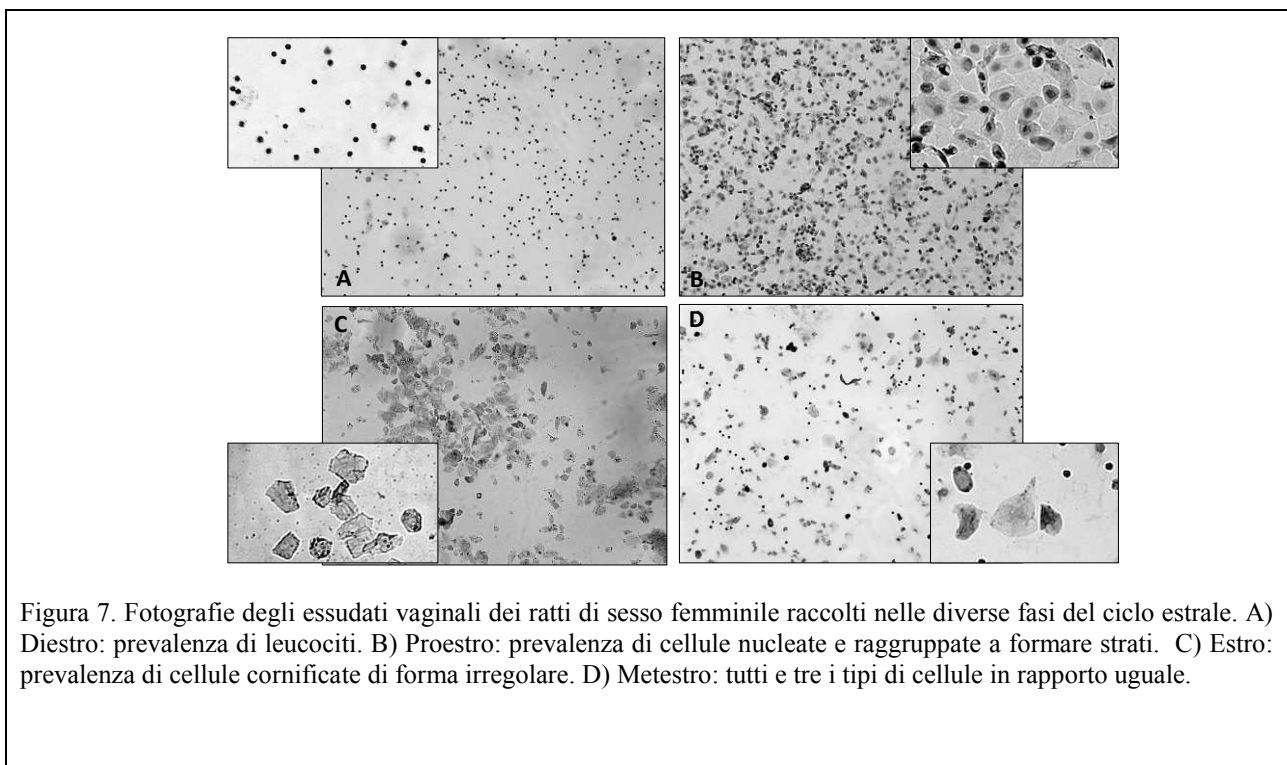
I valori delle risposte pressorie sulla leva eseguite ogni giorno sono stati raggruppati in base alla fase del ciclo corrispondente in modo da avere, per ogni animale, almeno due valori per fase. Al fine di favorire l'osservazione del fenomeno ed evitare interpretazioni soggettive, sono stati considerati solamente i vetrini il cui esame microscopico del preparato istologico rispondesse alle caratteristiche riportate in precedenza.

Per questo esperimento, oltre al numero di pressioni della leva, è stato registrato anche il consumo giornaliero della bevanda al gusto di cioccolato (ml/sessione).

Ulteriori variabili misurate sono state: (1) l'efficienza consumatoria dei ratti (volume di bevanda assunta/rinforzi), (2) il tempo di latenza alla prima pressione della leva (s) e (3) l'andamento cumulativo nel numero di risposte eseguite dai ratti ogni 5 minuti in ciascuna delle fasi del ciclo estrale.

Al fine di aver un controllo sul ciclo estrale, il comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni a FR10 è stato valutato anche su un gruppo di 12 femmine ovariectomizzate e addestrate attraverso lo stesso protocollo sperimentale descritto in precedenza.

I parametri comportamentali considerati sono stati: (1) il numero di pressioni della leva, (2) il volume di bevanda assunto, (3) l'efficienza consumatoria (volume di bevanda assunta/rinforzi), (4) il tempo di latenza alla prima pressione della leva (s) e (5) la frequenza nel numero di pressioni della leva eseguite ogni 5 minuti durante la sessione di auto-somministrazione.



### 3.10.5 Effetto del ciclo estrale sulla motivazione degli animali verso la bevanda al gusto di cioccolato.

Questo esperimento è stato mirato a valutare se la motivazione dei ratti di sesso femminile esposti a singola sessione di PR varia in relazione alle fasi del ciclo estrale.

Al termine della fase di mantenimento, della durata di 10 giorni consecutivi, i ratti sono stati sottoposti ad una singola sessione di PR nelle modalità descritte in precedenza.

Al termine della sessione di PR, i ratti sono stati sottoposti al prelievo dell'essudato vaginale per l'ispezione istologica come descritto nell'esperimento 4.

In seguito i ratti e le relative risposte comportamentali sono state suddivise in base alla fase del ciclo corrispondente.

Inoltre al fine di aver un controllo sul ciclo estrale, un gruppo (n = 12) di femmine ovariectomizzate è stato sottoposto a singole sessioni di PR attraverso le stesse modalità utilizzate per le femmine intatte.

I parametri comportamentali ottenuti nelle femmine ovariectomizzate sono stati confrontati con quelli ottenuti nelle femmine intatte e suddivisi in base alla fase del ciclo estrale.

Le variabili misurate durante questo esperimento sono stati: (1) i valori di BP e (2) il numero di pressioni della leva.

### 3.10.6 Misurazione delle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulari nel NAcc Shell durante la sessione di auto-somministrazione operante a FR10.

Il primo obiettivo di questo esperimento è stato quello di monitorare le concentrazioni di DA e DOPAC extracellulare nel NAcc Shell durante la sessione di auto-somministrazione a FR10. Per questo scopo sono stati utilizzati ratti di sesso maschile (n = 13), ratti di sesso femminile intatti (n = 25) e ratti di sesso femminile ovariectomizzati (n = 12).

Al fine di valutare l'esistenza di eventuali differenze di genere i risultati ottenuti nei ratti maschi sono stati confrontati con quelli ottenuti nei ratti femmina intatti.

Il secondo obiettivo di questo esperimento è stato quello di valutare se le concentrazioni di DA e DOPAC extracellulare misurate durante la sessione a FR10 subiscono delle variazioni correlate al ciclo estrale.

Quindi le femmine, al termine di ogni sessione di microdialisi, sono stati sottoposte a prelievo dell'essudato vaginale e i risultati relativi alle concentrazioni di DA e DOPAC sono stati suddivisi sulla base di due macrofasi definite Diestro/Metestro (D/M) e Proestro/Estro (P/E).

La scelta di questa suddivisione è stata effettuata sulla base della conoscenza delle variazioni ormonali che avvengono durante le fasi del ciclo estrale. Riunendo le fasi di Diestro e Metestro, infatti, si racchiude uno specchio temporale del ciclo in cui le concentrazioni sieriche degli ormoni sessuali sono a livelli minimi, mentre le fasi di Proestro ed Estro ricoprono quel periodo temporale in cui si ha l'aumento delle concentrazioni di progesterone ed estradiolo (**Goldman et al., 2007**).



Inoltre la suddivisione è stata fatta anche sulla base dei valori comportamentali ottenuti nell'esperimento 4.

Al fine di avere un controllo sul ciclo estrale, i risultati ottenuti sulle femmine intatte e suddivisi sulla base del ciclo estrale sono stati confrontati con quelli ottenuti sulle femmine ovariectomizzate.

### 3.10.7 Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche condotte in questo studio sono state eseguite mediante l'utilizzo di GraphPad®. Inoltre, le seguenti analisi statistiche sono state condotte dopo valutazione dell'ipotesi di normalità (test di D'Agostino and Person) e di omogeneità della varianza (Levine's test)

**Esperimento 1:** Le medie del numero di sessioni totali necessarie ai ratti maschi e femmina per completare la fase di *shaping* sono state confrontate mediante test *t* di Student. Inoltre, al fine di eseguire un'analisi più approfondita, per ognuno degli *steps* della fase di *shaping*, i ratti maschi e femmina sono stati confrontati sulla base del numero di sessioni necessarie a raggiungere il criterio di 100 rinforzi mediante ANOVA a due vie con il genere come fattore between subject.

**Esperimento 2:** Le medie del numero di pressioni della leva, dei volumi di bevanda al gusto di cioccolato assunti (ml/sessione; ml/kg), dei tempi di latenza alla prima pressione della leva e dell'efficienza consumatoria misurate nei ratti maschi e femmina sono state confrontate mediante test *t* di Student. Inoltre, le frequenze del numero di pressioni eseguite dai ratti maschi e femmina ad intervalli di 5 minuti sono state confrontate mediante ANOVA a due vie con il genere come fattore *between-subject*.

**Esperimento 3:** Le medie dei valori di BP e del numero di pressioni della leva misurate nei ratti maschi e femmine esposti a singola sessione di PR sono state confrontate mediante test *t* di Student.

**Esperimento 4:** L'ANOVA a una via per misure ripetute è stata utilizzata per confrontare il numero di pressioni della leva, i volumi di bevanda al gusto di cioccolato, l'efficienza consumatoria e i tempi di latenza mostrati dai ratti di sesso femminile durante le fasi del ciclo estrale.

L'analisi dell'andamento comportamentale, espresso in forma di frequenza assoluta del numero di pressioni della leva, è stata condotta confrontando le medie delle aree sotto le curve (AUC) tramite ANOVA a una via per misure ripetute.

L'ANOVA a una via per misure ripetute è stata utilizzata anche per confrontare il comportamento di auto-somministrazione operante mostrato dalle femmine ovariectomizzate nelle ultime 4 sessioni

di auto-somministrazione a FR10. Anche in questo caso, i parametri comportamentali analizzati sono stati: (1) il numero di pressioni della leva, (2) i volumi di bevanda assunta, (3) i tempi di latenza alla prima pressione della leva e (4) l'efficienza consumatoria.

Inoltre, l'andamento comportamentale dei ratti ovariectomizzati, espresso in forma di frequenza assoluta del numero di pressioni della leva ad intervalli di 5 min, è stato analizzato confrontando le AUC misurate nelle ultime 4 sessioni di auto-somministrazione, tramite ANOVA a una via per misure ripetute.

**Esperimento 5:** L'ANOVA a una via è stata utilizzata per confrontare le medie dei valori di BP e del numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine intatte e da quelle ovariectomizzate. Anche in questo caso i risultati ottenuti sulle femmine intatte sono stati suddivisi in base alla fase del ciclo estrale.

**Esperimento 6:** le concentrazioni di DA e DOPAC extracellulare sono state espresse come variazioni in percentuale rispetto alla media dei 4 valori di base misurati prima dell'inizio della sessione di auto-somministrazione.

L'effetto del genere sulle concentrazioni di DA e DOPAC misurate durante la sessione a FR10 è stato valutato confrontando, inizialmente le AUC medie delle curve di concentrazione misurate nei maschi e nelle femmine intatte tramite test *t* di Student. In seguito le curve di concentrazione sono state confrontate mediante ANOVA a due vie, con il tempo come fattore *within-subject* e il genere come fattore *between-subject*, seguita dal test di Bonferroni.

Il comportamento di auto-somministrazione operante mostrato dai due gruppi di animali durante la sessione di microdialisi è stato confrontato mediante test *t* di Student.

Per valutare l'effetto dell'ovariectomia e del ciclo estrale sulle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulari, sono stati posti a confronto i risultati ottenuti sulle femmine intatte e suddivise nelle due fasi estrali di D/M e P/E con quelli ottenuti sulle femmine ovariectomizzate. Una prima analisi è stata condotta confrontando le medie delle AUC delle curve di concentrazione di DA e DOPAC misurate nei tre gruppi di animali tramite ANOVA a una via.

In seguito è stata condotta un'analisi più dettagliata tramite ANOVA a due vie con il tempo come fattore *within-subject* e lo stato ormonale come fattore *between-subject* seguita dal test di Bonferroni.

Il comportamento di auto-somministrazione operante mostrato dai 3 gruppi di animali durante la sessione di microdialisi è stato confrontato mediante ANOVA a una via seguita dal test di Bonferroni. Inoltre, il comportamento di auto-somministrazione operante mostrato dalle femmine

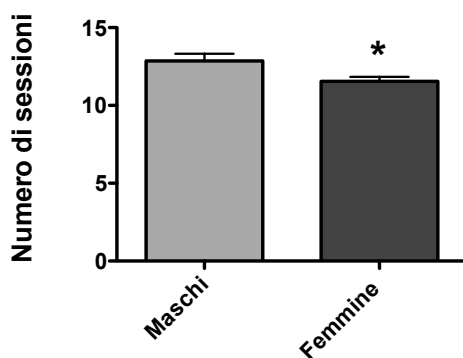
intatte durante le due fasi del ciclo estrale è stato analizzato in maniera più dettagliata confrontando le frequenze cumulate e assolute del numero di pressioni della leva eseguite dagli animali ad intervalli di 15 minuti. Le frequenze assolute sono state poste a confronto mediante ANOVA a due vie con la fase estrale come fattore *between-subject* seguita dal test di Bonferroni.

## 4. Risultati

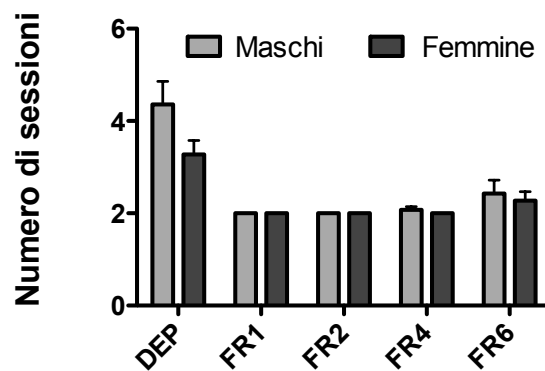
#### 4.1 Differenze di genere nell'acquisizione della procedura di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato.

Su un numero totale di 28 animali all'inizio dell'esperimento (16 maschi e 12 femmine), solamente 3 animali (2 maschi e una femmina) non hanno acquisito la procedura di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato.

Il valore medio del numero totale di sessioni necessarie ai due gruppi di animali per completare la fase di *shaping* dell'addestramento ha mostrato una differenza del 10% (Fig. 8) che sebbene modesta è risultata significativa quando analizzata con test t di Student ( $P = 0.03$ ;  $t = 2.24$ ,  $df = 23$ ). Come si può osservare dalla Figura 9, la differenza di acquisizione si manifesta nel primo *step* della fase di *shaping*, dove sembrerebbe vi sia da parte dei ratti maschi una tendenza ad un numero superiore di sessioni (4 sessioni) per raggiungere il criterio stabilito di 100 rinforzi.



**Figura 8.** Numero di sessioni totali necessarie alle femmine (n=11) e ai maschi (n=14) a completare la fase di acquisizione dell'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato. I valori sono medie \*  $P = 0.03$  Maschi vs Femmine



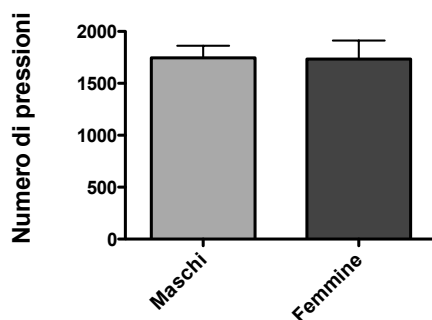
**Figura 9.** Il grafico mostra, per ognuno degli steps della fase di acquisizione (*shaping*), il numero di sessioni necessarie alle femmine (n=11) e ai maschi (n=14) per raggiungere il criterio di 100 rinforzi. Come si può osservare, i ratti maschi mostrano una tendenza ad un numero superiore di sessioni nel primo step della fase di acquisizione.

#### 4.2 Differenze di genere nell'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato durante le sessioni a FR10.

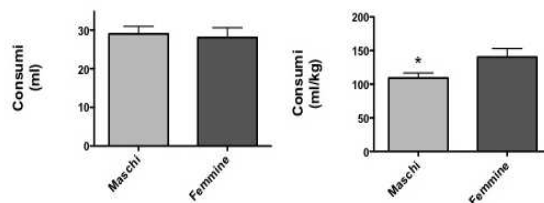
Questo esperimento ha mostrato che ratti di sesso maschile e femminile sottoposti a sessioni di auto-somministrazione a FR10 mostrano un comportamento analogo, che si manifesta non solo

nelle medie del numero di pressioni della leva (1700) e dei volumi di bevanda al gusto di cioccolato assunti (28 ml/sessione) [Fig. 10 e Fig. 11 (A)], ma anche in quelle dell'efficienza consumatoria (Fig. 12) e del tempo di latenza alla prima pressione della leva (Fig. 13) Tuttavia, il test *t* di Student ha mostrato una differenza significativa ( $t=2.21$ ,  $df= 23$ ,  $p < 0.03$ ) nei consumi di bevanda al gusto di cioccolato medi quando espressi in relazione al peso corporeo degli animali (ml/kg), infatti le femmine hanno mostrato consumi superiori di circa il 40% rispetto a quanto misurato nei maschi [Fig. 11(destra)].

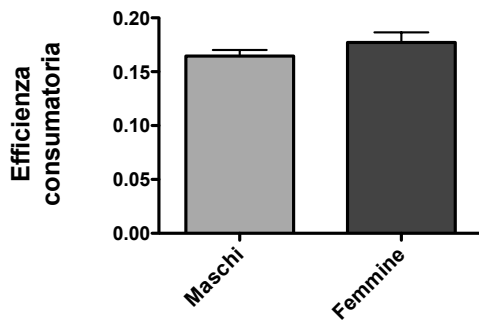
Il confronto delle frequenze cumulate (Fig. 14) e assolute (Fig. 15) del numero di pressioni della leva eseguite dai maschi e dalle femmine ad intervalli di 5 minuti ha mostrato un differente andamento comportamentale nei due gruppi di animali. Infatti, l'ANOVA a due vie, applicata sulle frequenze assolute, ha rivelato un effetto significativo di interazione [interazione:  $F_{(11, 253)} = 7.35$ ,  $p < 0.001$ ] e il test di Bonferroni ha mostrato delle differenze significative nel numero di pressioni eseguite dai ratti maschi e femmina a diversi intervalli di tempo (fig. 15)



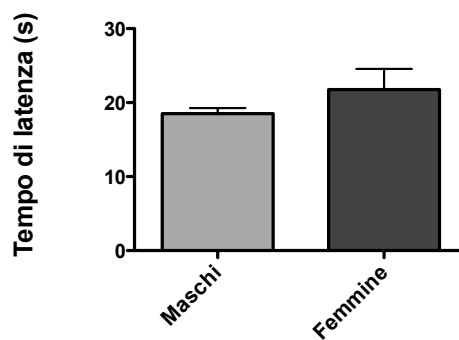
**Figura 10.** Media  $\pm$  esm del numero di pressioni eseguite dai ratti maschi ( $n = 14$ ) e femmina ( $n = 11$ ) durante le sessioni di auto-somministrazione operante a FR10.



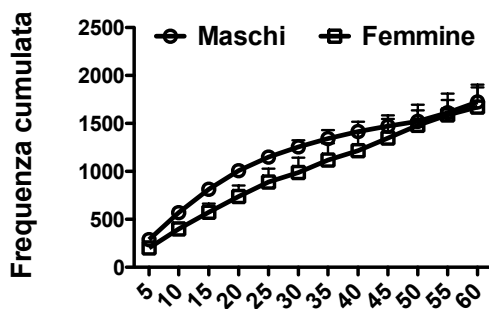
**Figura 11.** Media  $\pm$  esm dei volumi di bevanda al gusto di cioccolato assunti durante dai ratti maschi ( $n = 14$ ) e femmina ( $n = 11$ ) durante le sessioni di auto-somministrazione operante a FR10 espressi in ml per sessione (sinistra) e ml/kg (destra). \*  $p < 0.05$  Maschi vs Femmine



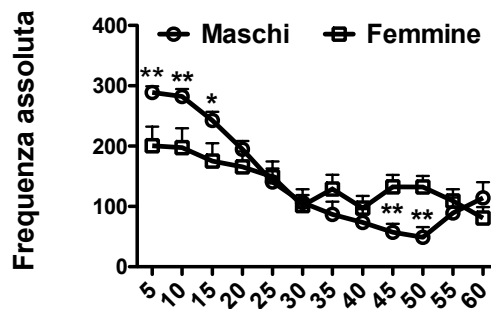
**Figura 12.** Media  $\pm$  esm dell'efficienza consumatoria (ml / n° di rinforzi) misurata nei ratti maschi (n = 14) e femmina (n = 11) durante le sessioni di auto-somministrazione operante a FR10.



**Figura 13.** Media  $\pm$  esm dei tempi di latenza alla prima pressione della leva misurati durante le sessioni di auto-somministrazione a FR10 nei ratti maschi (n = 14) e femmina (n = 11).



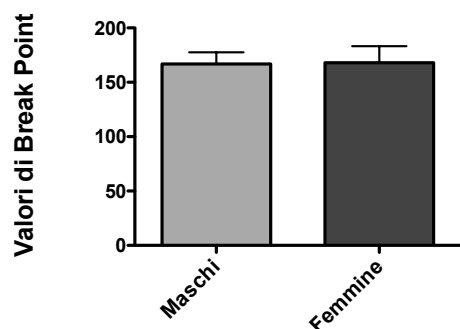
**Figura 14.** Frequenza cumulata del numero di pressioni della leva eseguite ad intervalli di 5 minuti, dai ratti maschi (n = 14) e femmina (n = 11) durante le sessioni di auto-somministrazione a FR10.



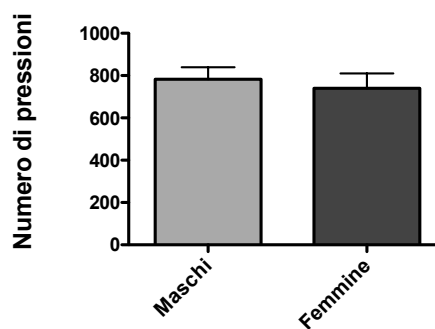
**Figura 15.** Frequenza assoluta del numero di pressioni della leva eseguite ad intervalli di 5 minuti, dai ratti maschi (n = 14) e femmina (n = 11) durante le sessioni di auto-somministrazione a FR10. \*  $p < 0.05$ ; \*  $p < 0.01$  Maschi vs Femmine.

#### 4.3 Differenze di genere nella motivazione degli animali durante le sessioni di Progressive Ratio (PR).

Da questo esperimento è emerso che non esistono differenze di genere nei parametri comportamentali misurati durante le sessioni di auto-somministrazione operante in PR. Infatti i ratti maschi e femmina non hanno mostrato differenze sia nei valori medi di BP, indice della motivazione degli animali, che nelle medie del numero di pressioni eseguite (Fig. 16 e 17) durante la sessione.



**Figura 16.** Media  $\pm$  esm. dei valori di BP misurati nei maschi (n=14) e nelle femmine (n=11) durante le sessioni di PR. Il valore di BP esprime il numero massimo di pressioni che gli animali non sono disposti a premere per ottenere la bevanda al gusto di cioccolato, quindi più è alto il valore di BP maggiore è la motivazione degli animali verso il rinforzo.



**Figura 17.** Media  $\pm$  esm. del numero di pressioni della leva eseguite dai maschi (n=14) e dalle femmine (n=11) durante le sessioni di PR.

#### 4.4 Effetto del ciclo estrale sul comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni di mantenimento a FR10.

I risultati di questo esperimento hanno rivelato che il comportamento di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato nelle femmine varia in relazione alle fasi del ciclo estrale.

Infatti, durante le fasi di Proestro ed Estro, è stata osservata una riduzione della media del numero di pressioni della leva e del volume di bevanda assunto dagli animali rispetto alle medie misurate nelle fasi di Diestro e Metestro. Infatti, l'ANOVA a una via per misure ripetute, applicata sulle medie del numero di pressioni della leva eseguite dai ratti nelle 4 fasi del ciclo estrale, è risultata significativa ( $F_{3,13} = 7.23$ ,  $p < 0.001$ ), e il test di Bonferroni ha mostrato che la media del numero di pressioni della leva misurata durante la fase di Estro è significativamente inferiore del 30% rispetto a quella misurata nella fase di Diestro ( $p < 0.001$ ) e del 27% rispetto a quella misurata nella fase di Metestro ( $p < 0,01$ ) (Fig. 18).

La diminuzione del numero di pressioni della leva durante la fase di Estro si accompagna ad una riduzione statisticamente significativa della media dei volumi di bevanda assunti dai ratti. Infatti, come rivelato dall'ANOVA a una via ( $F_{3,13} = 6.41$ ,  $p < 0.001$ ) seguita dal test di Bonferroni, durante

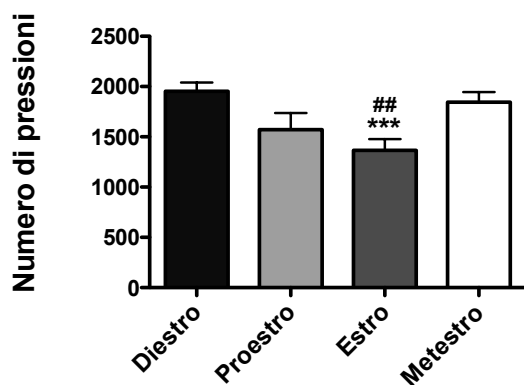


la fase di Estro gli animali bevono circa il 30 e 25% in meno rispetto a quando si trovano in fase di Diestro ( $p < 0.01$ ) e Metestro ( $p < 0.05$ ) (Fig. 19).

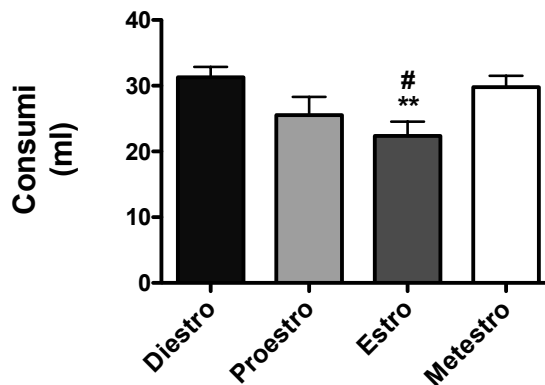
Le medie del numero di pressioni e dei consumi di bevanda al gusto di cioccolato misurati durante la fase di Proestro, sebbene non statisticamente significative, hanno mostrato una tendenza alla riduzione, mentre il comportamento di auto-somministrazione operante mostrato dalle femmine nelle fasi di Diestro e Metestro è risultato analogo, sia nella media del numero di pressioni che in quella dei volumi di bevanda al gusto di cioccolato assunti.

Al fine di seguire un'analisi più approfondita sul comportamento di auto-somministrazione operante durante il ciclo estrale, sono stati valutati ulteriori parametri, quali l'efficienza consumatoria e il tempo di latenza alla prima pressione della leva.

In primo luogo si è voluto valutare se il ridotto comportamento di auto-somministrazione osservato durante la fase estrale fosse associato ad una variazione nell'efficienza consumatoria dei ratti. Questo parametro è stato calcolato facendo il rapporto fra il volume totale di bevanda assunto durante la sessione e il numero di rinforzi ottenuti. Da questa analisi è emerso che l'efficienza consumatoria media dei ratti durante il ciclo estrale non subisce variazioni, infatti in ogni fase del ciclo, i ratti hanno mostrato un'efficienza consumatoria media pari a circa 0.16 ml per rinforzo (Fig. 20).

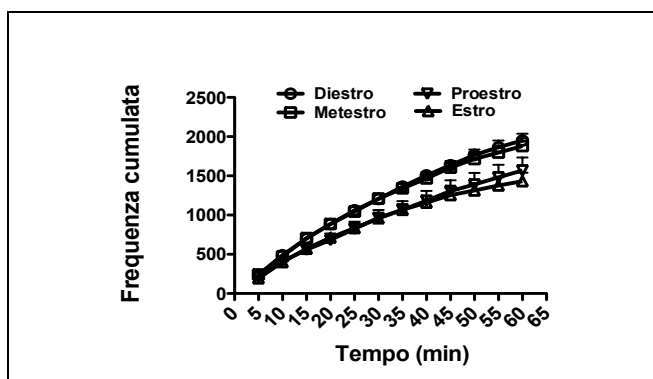
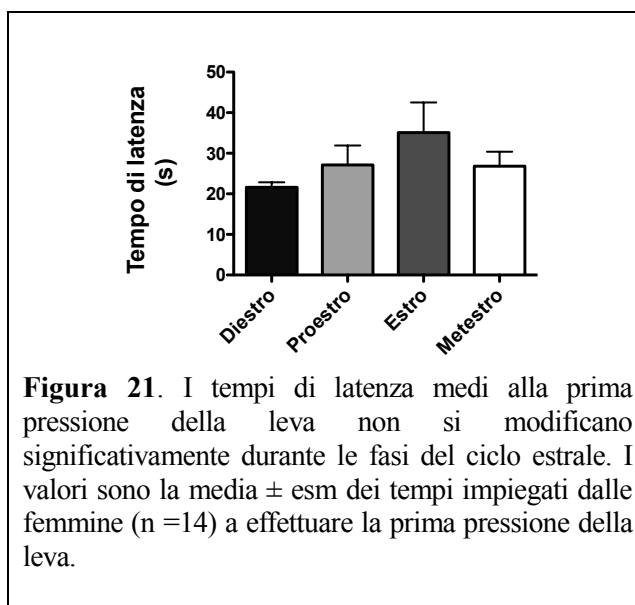


**Figura 18.** Il numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine intatte durante le sessioni di auto-somministrazione a FR10 nelle fasi del ciclo estrale diminuisce durante la fase di estro. I valori riportati sono medie  $\pm$  esm ( $n=14$ ). ##  $p < 0.01$ , Estro vs Metestro; \*\*\* $p < 0.001$ , Estro vs Diestro

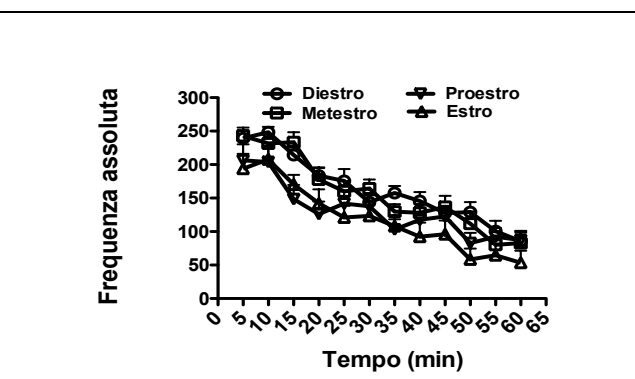


**Figura 19.** I volumi di bevanda al gusto di cioccolato assunti dalle femmine intatte durante le sessioni di auto-somministrazione a FR10 nelle fasi del ciclo estrale diminuiscono durante le fasi di estro. I valori riportati sono medie  $\pm$  esm ( $n=14$ ). #  $p < 0.05$ , Estro vs Metestro; \*\* $p < 0.01$ , Estro vs Diestro

Un ulteriore parametro che si è voluto esaminare è il tempo di latenza alla prima pressione della leva, ossia il tempo che intercorre fra l'inizio della sessione di auto-somministrazione e la prima pressione della leva eseguita dai ratti. Applicando l'ANOVA a una via sulle medie dei tempi di latenza misurate nelle quattro fasi del ciclo estrale, non sono state osservate differenze statisticamente significative ( $F_{(3,13)} = 1.36, p > 0.05$ ), sebbene, durante la fase di Estro, si possa osservare una tendenza al ritardo nella risposta da parte degli animali ad eseguire la prima pressione della leva. Infatti, in questa fase, la media dei tempi di latenza alla prima pressione della leva è risultata essere superiore del 60% e 30% rispetto a quanto misurato durante le fasi di Diestro e Metestro (Fig. 21).



**Figura 22.** Analisi dell'andamento cumulativo del numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine durante le sessioni di auto-somministrazione nelle fasi del ciclo estrale. I valori riportati sono le medie  $\pm$  esm del numero di pressioni cumulate eseguite dagli animali (n=14) ogni 5 minuti durante la sessione di auto-somministrazione.



**Figura 23.** Analisi della frequenza assoluta del numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine durante le sessioni di auto-somministrazione nelle fasi del ciclo estrale. I valori riportati sono le medie  $\pm$  esm del numero di pressioni della leva eseguite dagli animali (n=14) ogni 5 minuti durante le sessioni di auto-somministrazione.

Infine è stato esaminato se la frequenza del numero di pressioni della leva eseguite durante la sessione di auto-somministrazione varia in relazione alle fasi del ciclo estrale. Il parametro utilizzato per effettuare quest'analisi è stata la frequenza del numero di pressioni della leva eseguite dai ratti ad intervalli di 5 minuti. La frequenza è stata espressa sia in forma cumulata (Fig. 22) che in forma assoluta (Fig. 23) e, al fine di eseguire un'analisi statistica, le AUC medie delle frequenze assolute, misurate durante le fasi del ciclo estrale, sono state confrontate mediante ANOVA a una via per misure ripetute. L'ANOVA ha rivelato che le AUC delle frequenze assolute del numero di pressioni della leva variano in maniera statisticamente significativa durante le fasi del ciclo estrale ( $F_{(3,13)} = 6.24$ ,  $p < 0.01$ ) e il test di Bonferroni ha mostrato una riduzione significativa della frequenza del numero di pressioni della leva durante le fasi di Estro e Proestro rispetto a quelle di Diestro e Metestro (Tabella 1).

**Tabella 1.** Valori delle AUC della frequenza assoluta del numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine (n=14) ogni 5 min durante le sessioni di auto-somministrazione in ciascuna fase del ciclo estrale.

Fasi del ciclo estrale	Frequenza assoluta del numero di pressioni della leva
Diestro	1789 ± 86
Proestro	1423 ± 152*
Estro	1308±101** #
Metestro	1717 ± 93

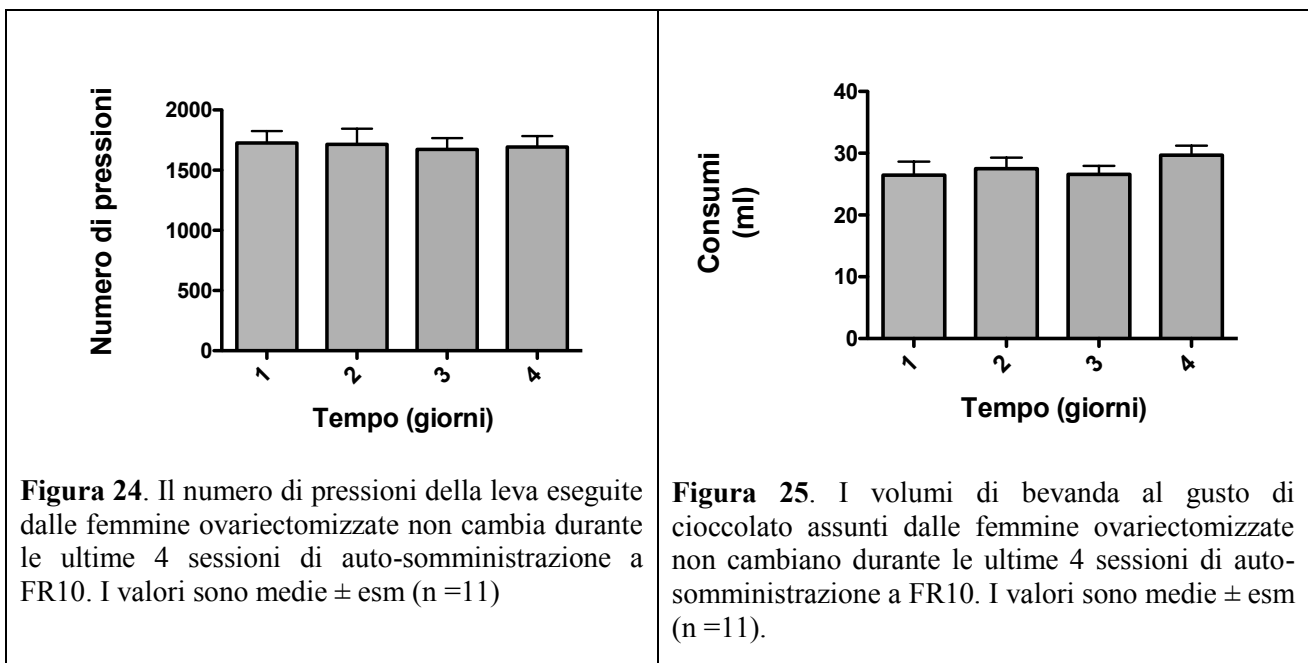
\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  Estro, Proestro vs Diestro; #  $p < 0.05$  Estro vs Metestro [ $F_{(3,13)} = 6,24$ ,  $p < 0.01$ , ANOVA a una via per misure ripetute, seguite dal Test di Bonferroni).

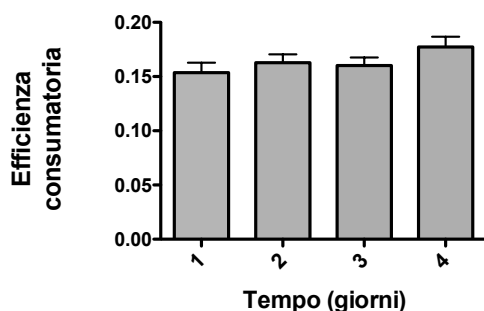
#### 4.5 Effetto dell'ovariectomia sul comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni a FR10.

Le differenze sopra riportate durante le sessioni a FR10 scompaiono nelle femmine ovariectomizzate, in accordo con un ruolo chiave del ciclo dell'estro e delle variazioni ormonali ad esso associate nelle suddette differenze. Infatti, contrariamente a quanto osservato nelle femmine intatte, il comportamento di auto-somministrazione operante delle femmine ovariectomizzate non subisce variazioni nel tempo, e il numero di pressioni (1700) e i volumi assunti di bevanda al gusto

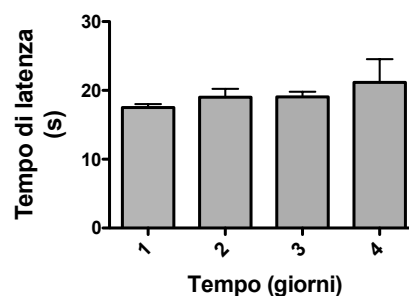
di cioccolato (27 ml/sessione) nelle ultime 4 sessioni di auto-somministrazione a FR10 sono stabili e costanti (Fig. 24 e 25). L'ANOVA a una via per misure ripetute non ha infatti mostrato differenze significative quando applicata per confrontare le medie del numero di pressioni della leva eseguite ( $F_{(3,10)} = 0.10, p > 0.05$ ), dei volumi di bevanda assunti ( $F_{(3,10)} = 2.82, p > 0.05$ ) e dell'efficienza consumatoria ( $F_{(3,10)} = 1.61, p > 0.05$ ) (Fig. 26). Anche l'analisi delle medie dei tempi di latenza alla prima pressione della leva misurate durante le ultime 4 sessioni di auto-somministrazione delle femmine ovariectomizzate non ha rivelato differenze significative e i valori sono risultati stabili nel tempo ( $\approx 18-19$  sec) ( $F_{(3,10)} = 0.81, p > 0.05$ ) (Fig. 27).

Allo stesso modo, la frequenza nel numero di pressioni eseguite dalle femmine ovariectomizzate ad intervalli di 5 min non subisce variazioni fra una sessione e l'altra (Fig. 28 e 29). Infatti, l'ANOVA a una via non ha rivelato differenze fra le AUC medie delle frequenze assolute misurate nelle femmine ovariectomizzate durante le ultime 4 sessioni di auto-somministrazione a FR10 (Tabella 2).

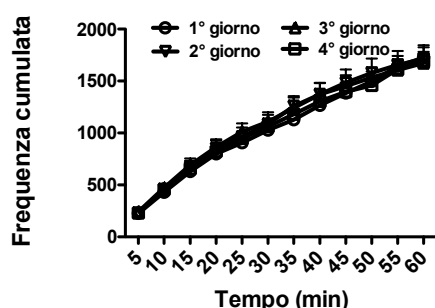




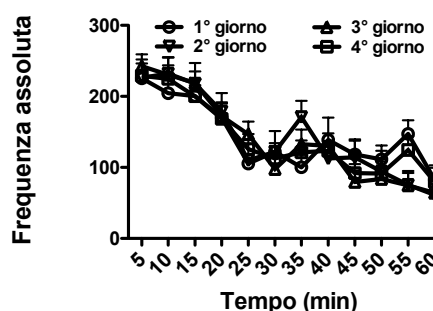
**Figura 26.** L'efficienza consumatoria delle femmine ovariectomizzate durante le ultime 4 sessioni di auto-somministrazione a FR10 non subisce variazioni nel tempo. I valori sono le medie ± esm (n=11)



**Figura 27.** I tempi di latenza alla prima pressione della leva non cambiano durante le ultime 4 sessioni di auto-somministrazione a FR10 delle femmine ovariectomizzate. I valori sono medie ± esm (n=11).



**Figura 28.** Analisi dell'andamento cumulativo del numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine ovariectomizzate (Ovx) nelle ultime 4 sessioni di auto-somministrazione. Il grafico è espresso come media ± esm del numero di pressioni cumulate eseguite dai ratti (n=11) ogni 5 minuti durante la sessione di auto-somministrazione.



**Figura 29.** Analisi della frequenza assoluta del numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine ovariectomizzate nelle ultime 4 sessioni di auto-somministrazione. Il grafico è espresso come media ± esm del numero di pressioni eseguite dai ratti (n=11) ogni 5 minuti durante le sessioni di auto-somministrazione.

**Tabella 2.** Valori delle AUC della frequenza assoluta del numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine ovariectomizzate (n=11) ogni 5 min durante le ultime 4 sessioni di auto-somministrazione.

Fasi del ciclo estrale	Frequenza assoluta numero pressioni della leva
1° giorno	1571 ± 94
2° giorno	1580 ± 126
3° giorno	1520 ± 89
4° giorno	1538 ± 79

[F (3,10) = 0.16, p > 0.05, ANOVA a una via per misure ripetute].

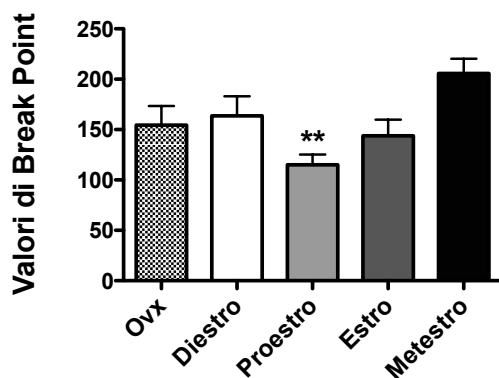
#### 4.6 Effetto del ciclo estrale sul comportamento di auto-somministrazione operante durante le sessioni di PR.

Questo esperimento ha mostrato che la motivazione degli animali esposti a singola sessione di PR al termine della fase di mantenimento, subisce, analogamente a quanto osservato nelle sessioni di auto-somministrazione a FR10, una riduzione durante la fase di Proestro ed Estro del ciclo. Infatti, le ANOVA a una via, applicate sulle medie dei valori di BP ( $F_{(4, 40)} = 3.62, p < 0.05$ ) e su quelle relative al numero di pressioni della leva ( $F_{(4, 40)} = 3.07, p < 0.05$ ) eseguite dalle femmine nelle diverse fasi del ciclo estrale e dalle femmine ovariectomizzate, sono risultate significative, e il test di Bonferroni ha rivelato una differenza significativa fra il valore medio di BP misurato durante la fase di Proestro e quello misurato nella fase di Metestro ( $p < 0.01$ ) (Fig. 30).

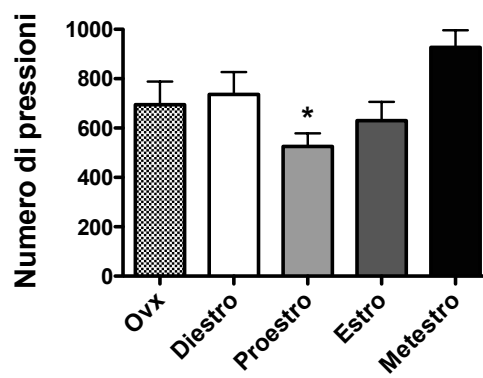
Il test di Bonferroni ha inoltre rivelato una riduzione significativa, di circa il 40% ( $p < 0.01$ ), nelle medie del numero di pressioni della leva eseguite durante la fase di Proestro rispetto a quanto misurato nella fase di Metestro (Fig. 31).

La media dei valori di BP e quella del numero di pressioni della leva misurate in fase Estro, sebbene non significative mostrano una tendenza alla riduzione rispetto a quanto misurato in fase di Metestro, al pari della media dei valori di BP e del numero di pressioni della leva misurate in fase di Diestro.

Infine, i valori medi di BP e del numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine ovariectomizzate durante la sessione di PR hanno mostrato valori simili a quelli misurati nelle femmine intatte in fase di Diestro ( $163 \pm 19, 736 \pm 90$ ). Tuttavia non sono emerse differenze significative con i valori misurati nelle femmine intatte nelle fasi di Proestro ed Estro.



**Figura 30.** Valori di BP misurati nelle femmine ovariectomizzate durante la sessione Progressive Ratio: confronto con le femmine intatte. I valori di BP nelle femmine intatte sono stati suddivisi in base alla fase del ciclo estrale. I valori sono medie  $\pm$  esm (OVX, n=11; Intatte n=6-8). \*\* p < 0.01, Proestro vs Metestro.



**Figura 31.** Numero di pressioni della leva eseguite durante la sessione di PR dalle femmine ovariectomizzate: confronto con le femmine intatte. I valori di LP misurati nelle femmine intatte sono stati suddivisi in base alla fase del ciclo estrale. I valori sono medie  $\pm$  esm (OVX, n=11; Intatte n=6-8). \* p < 0.05 Proestro vs Metestro.

#### 4.7 Misurazione delle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulari nel NAcc shell durante la sessione di auto-somministrazione operante a FR10.

##### 4.7.1 Concentrazioni basali di DA e DOPAC extracellulare.

I valori basali di DA e DOPAC extracellulare misurati nel dializzato ottenuto dal NAcc Shell dei gruppi di animali utilizzati in questo esperimento non hanno mostrato, da un punto di vista statistico, differenze significative, sebbene le concentrazioni di DA extracellulare misurate nelle femmine intatte e suddivise nelle due macrofasi D/M e P/E come descritto in precedenza, siano leggermente superiori rispetto a quelle misurate nei maschi e nelle femmine ovariectomizzate. Nelle femmine in fase D/M e in quelle in fase P/E sono state misurate rispettivamente concentrazioni di DA pari a  $2.48 \pm 0.5$  e  $2.73 \pm 0.7$  nM e di DOPAC pari a  $287 \pm 42.4$  e  $315 \pm 45.8$  nM. Nei maschi e nelle femmine ovariectomizzate invece sono state misurate rispettivamente concentrazioni di DA extracellulare pari a  $1.6 \pm 0.3$  e  $1.36 \pm 0.1$  nM e di DOPAC pari a  $333 \pm 24.8$  e  $316 \pm 34.7$  nM.

Le suddette concentrazioni sono state ottenute calcolando la media dei valori delle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulare misurate in 5 aliquote di dializzato ottenute dopo un periodo di perfusione del probe da microdialisi di circa 90 minuti precedente all'inizio della fase sperimentale e necessario al fine di favorire l'equilibrio osmotico a livello della membrana da dialisi nel NAcc Shell.

**Tabella 3.** Concentrazioni basali di DA e DOPAC extracellulare misurate negli ultimi 4 campioni di dializzato prima che gli animali vengano inseriti nella gabbia operante (medie  $\pm$  esm).

Animali	Dopamina (nM)	DOPAC (nM)
Femmine D/M	2.48 $\pm$ 0.5	287 $\pm$ 42.4
Femmine P/E	2.73 $\pm$ 0.7	315.9 $\pm$ 45.8
Femmine ovariectomizzate	1.4 $\pm$ 0.1	384 $\pm$ 54.8
Maschi	1.6 $\pm$ 0.3	333 $\pm$ 24.50

[DA,  $F_{(3,45)} = 1.57$ ,  $p > 0.05$  ANOVA a una via con correzione di Welch; DOPAC,  $F_{(3,45)} = 0.69$ ,  $p > 0.05$  ANOVA a una via].

#### 4.7.2 Differenze di genere nelle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulari misurate durante la sessione di auto-somministrazione a FR10.

Come si può osservare dalla Fig. 32 (A e B), durante la sessione di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato, le concentrazioni di DA e DOPAC extracellulari aumentano, sia nei maschi che nelle femmine, principalmente in fase appetitiva. Durante questa fase, della durata di 15 minuti, gli animali sono esposti a stimoli visivi ed olfattivi che preannunciano l'inizio della sessione di auto-somministrazione ma non hanno possibilità di accedere alle leve.

Al fine di eseguire un primo confronto di genere, la media delle AUC delle concentrazioni di DA extracellulare misurate in entrambi i gruppi di animali sono state analizzate mediante test t di Student.

Il test ha mostrato che l'AUC delle concentrazioni di DA extracellulare misurata nei maschi (385  $\pm$  35.2) è significativamente maggiore rispetto a quanto misurato nelle femmine intatte (277  $\pm$  20.2) ( $t = 2.85$ ,  $df = 36$   $p < 0.01$ ). Una successiva analisi più approfondita mediante ANOVA a due vie ha rivelato effetti significativi del tempo e del genere sui risultati ottenuti [tempo:  $F_{(9, 324)} = 9.48$ ,  $p < 0.001$ ; genere:  $F_{(1, 360)} = 11.58$ ,  $p < 0.001$ ].

Il test di Bonferroni ha rivelato aumenti significativi della concentrazione di DA rispetto ai valori basali nei maschi di circa il 47% ( $p < 0.01$ ) in fase appetitiva, e nelle femmine intatte del 30% ( $p < 0.001$ ). Un ulteriore aumento significativo della concentrazione di DA, di circa il 54% rispetto ai

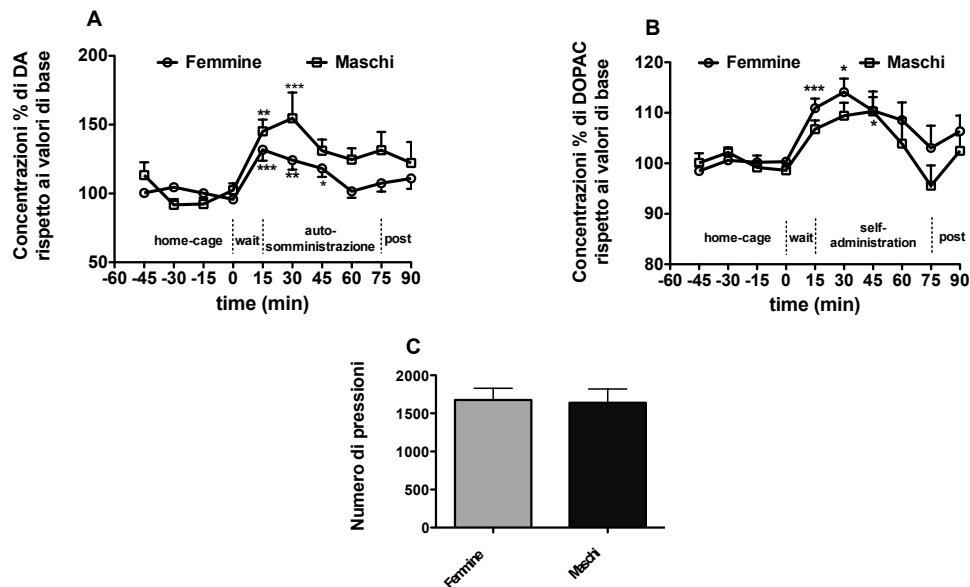


valori di base, è stato osservato nei maschi durante i primi 15 min di auto-somministrazione ( $p < 0.001$ ), mentre nelle femmine intatte le concentrazioni di DA si riducono rimanendo tuttavia significative sino al termine dei 30 min di auto-somministrazione.

Le concentrazioni di DA misurate nei maschi rimangono significativamente superiori rispetto ai valori di base per tutta la durata della sessione di auto-somministrazione.

Per quanto riguarda le concentrazioni di DOPAC extracellulare, il test  $t$  di Student non ha rivelato differenze significative fra le AUC delle concentrazioni misurate nei maschi ( $209 \pm 16.0$ ) e nelle femmine intatte ( $233 \pm 11.5$ ), mentre l'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo del tempo sulle concentrazioni di DOPAC extracellulari [tempo:  $F_{(9, 324)} = 7.50$ ,  $p < 0.001$ ].

Il Bonferroni ha rivelato aumenti delle concentrazioni di DOPAC in fase appetitiva, sia nei maschi che nelle femmine. Tuttavia l'aumento è risultato significativo solamente nelle femmine intatte che hanno mostrato incrementi di circa il 12% rispetto ai valori di base ( $p < 0.001$ ). Durante l'auto-somministrazione, le concentrazioni di DOPAC nelle femmine intatte subiscono un ulteriore aumento significativo ( $p < 0.05$ ), a differenza dei maschi in cui le concentrazioni di DOPAC, sebbene superiori ai livelli di base, raggiungono la significatività statistica solamente al 45° minuto. Come rivelato dall'ANOVA a due vie, il comportamento di auto-somministrazione operante mostrato dai due gruppi di animali prima e durante la sessione di microdialisi non ha mostrato differenze statisticamente significative a confermare che la procedura di microdialisi utilizzata in questo studio non determina alterazioni a livello comportamentale negli animali. Durante la sessione di microdialisi i due gruppi di animali hanno mostrato un comportamento di auto-somministrazione analogo con un numero di pressioni della leva di circa 1600 (Fig. 32 C).



**Figura 32.** A) Concentrazione della DA extracellulare nel NAcc Shell delle femmine intatte (n=25) e dei maschi (n=13) prima e durante l'auto-somministrazione della bevanda al gusto di cioccolato. I dati sono le medie  $\pm$  esm dei valori di DA extracellulare espressi in termini di aumento in percentuale rispetto alla media  $\pm$  esm degli ultimi 4 valori basali misurati prima dell'entrata degli animali nella gabbia operante. \* $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs valori basali. B) Concentrazione del DOPAC extracellulare nel NAcc Shell delle femmine intatte (n=25) e dei maschi (n=13) prima e durante l'auto-somministrazione della bevanda al gusto di cioccolato. I dati sono le medie  $\pm$  esm dei valori di DOPAC extracellulare espressi in termini di aumento in percentuale rispetto alla media  $\pm$  esm degli ultimi 4 valori basali misurati prima dell'entrata degli animali nella gabbia operante. \* $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs valori basali. C) Il grafico mostra le medie del numero di pressioni eseguite dalle femmine intatte (n = 25) e dai maschi (n 13) durante la sessione di microdialisi.

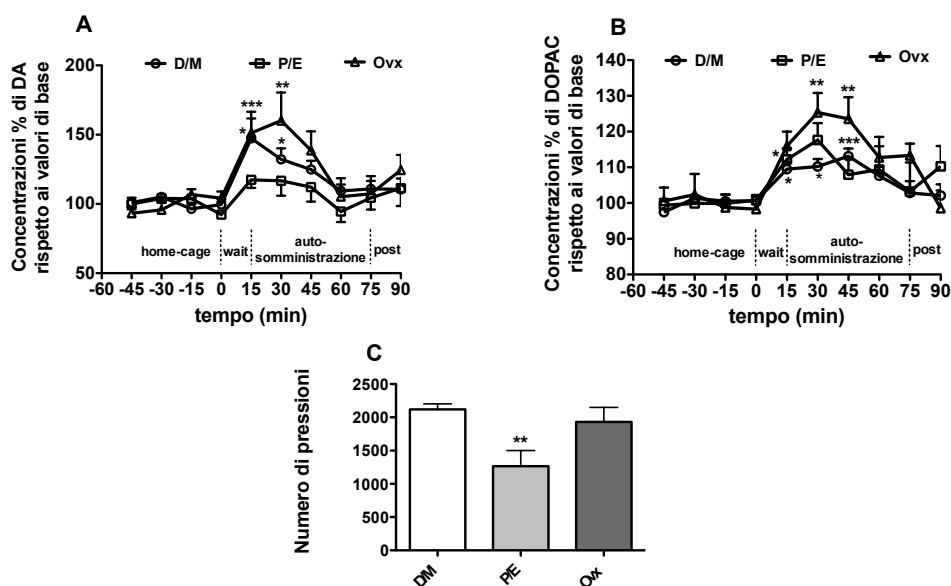
#### 4.7.3 Effetto del ciclo estrale sulle concentrazioni di DA e DOPAC extracellulare misurate durante la sessione di auto-somministrazione a FR10: confronto con le femmine ovariectomizzate

Come si può osservare dalla figura 33 (A e B), durante l'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato, le concentrazioni di DA extracellulare aumentano, sia nelle femmine ovariectomizzate che in quelle intatte, principalmente durante la fase appetitiva, preliminare all'auto-somministrazione operante. L'aumento delle concentrazioni di DA extracellulare sembra, nelle femmine intatte, risentire di un'influenza del ciclo estrale, infatti come è possibile osservare, le femmine in fase di P/E mostrano concentrazioni di DA extracellulare inferiori rispetto a quanto misurato nelle femmine in fase di D/M.

Al fine di identificare eventuali differenze tra i tre gruppi di animali, una prima analisi è stata condotta confrontando le AUC medie delle concentrazioni di DA delle femmine intatte in fase D/M,

P/E e delle femmine ovariectomizzate. L'ANOVA a una via ha mostrato significatività ( $F_{(2,32)}=4.19, p < 0.05$ ) e il test di Bonferroni ha mostrato una differenza significativa ( $p < 0.05$ ) fra le AUC misurate nelle femmine in fase di P/E ( $242 \pm 29.4$ ) e quelle misurate nelle femmine ovariectomizzate ( $367 \pm 36.8$ ). Al fine di eseguire un'analisi più dettagliata, le concentrazioni di DA extracellulare misurate nei tre gruppi sono state confrontate mediante ANOVA a due vie, che ha mostrato un effetto del tempo e dell'ovariectomia sulle concentrazioni di DA extracellulare ottenute nei tre gruppi di animali [ovariectomia:  $F_{(2, 300)} = 5.86, p < 0.01$ ; tempo:  $F_{(9, 270)} = 10.44, p < 0.001$ ]. Il test di Bonferroni ha mostrato che nelle femmine ovariectomizzate ( $p < 0.001$ ), in maniera analoga alle femmine in fase D/M ( $p < 0.05$ ), la DA extracellulare aumenta, in fase appetitiva, di circa il 47% rispetto ai valori di base. Al termine della fase appetitiva, sia nelle femmine in fase D/M che in quelle ovariectomizzate, i valori di DA extracellulare rimangono significativamente superiori rispetto ai valori di base, con un picco di concentrazione più elevato, di circa il 50% rispetto ai valori basali ( $p < 0.01$ ), misurato nelle femmine ovariectomizzate in corrispondenza dei primi 15 min di auto-somministrazione. Nelle femmine in fase di P/E non si sono registrati aumenti significativi nelle concentrazioni di DA extracellulare che aumenta leggermente raggiungendo valori di poco superiori al 10% rispetto ai valori di base.

Anche le concentrazioni di DOPAC extracellulare durante l'auto-somministrazione operante sono risultate aumentate in fase appetitiva e consumatoria in tutti e tre i gruppi di animali. L'analisi condotta per confrontare le AUC ottenute in ciascun gruppo di animali, non ha rivelato differenze statisticamente significative. L'ANOVA a due vie applicata alle concentrazioni di DOPAC ha rivelato un effetto del tempo, ma non dell'ovariectomia sulle concentrazioni di DOPAC extracellulare [tempo:  $F_{(9,270)} = 9.24, p < 0.001$ ]. Il test Bonferroni ha mostrato aumenti



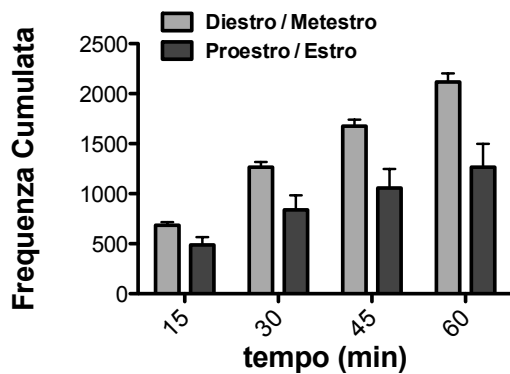
**Figura 33.** A) Concentrazione della DA extracellulare nel NAcc Shell delle femmine in fase D/M (n=12), nelle femmine in fase P/E (n=13) e nelle femmine ovariectomizzate (Ovx) (n=8). I valori sono la media  $\pm$  esm dei valori di DA extracellulare espressi in termini di aumento in percentuale rispetto alla media  $\pm$  esm degli ultimi 4 valori basali misurati prima dell'entrata degli animali nella gabbia operante. \* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs valori basali. B) Concentrazione del DOPAC extracellulare nel NAcc Shell delle femmine in fase D/M (n=12), nelle femmine in fase P/E (n=13) e nelle femmine ovariectomizzate (Ovx) (n=8). I valori sono la media  $\pm$  esm dei valori di DOPAC extracellulare espressi in termini di aumento in percentuale rispetto alla media  $\pm$  esm degli ultimi 4 valori basali misurati prima dell'entrata degli animali nella gabbia operante. \* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs valori basali; C) Comportamento di auto-somministrazione operante mostrato dai tre gruppi di animali durante la sessione di microdialisi. Il grafico è la media del numero di pressioni sulla leva eseguite dalle femmine in fase di D/M (n= 12), femmine in fase di P/E (n = 13) e femmine ovariectomizzate (n = 8) durante la sessione di microdialisi. \*  $p < 0,01$

significativi, di circa il 15% rispetto ai valori basali, durante la fase appetitiva, sia nelle femmine ovariectomizzate che in quelle di fase di P/E ( $p < 0.05$ ).

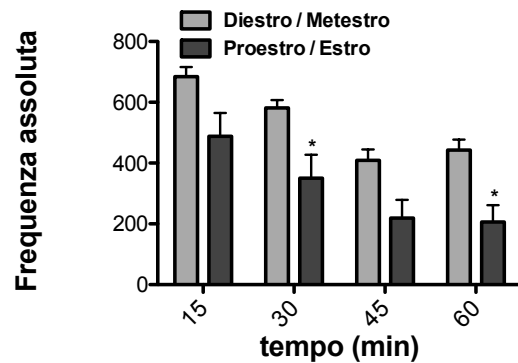
Durante la fase consumatoria dell'auto-somministrazione operante, le concentrazioni di DOPAC aumentano e rimangono significativamente superiori ai livelli di base in tutti e tre i gruppi di animali, ma con valori più elevati nelle femmine ovariectomizzate rispetto alle femmine in fase D/M e P/E. I valori di DOPAC, in maniera analoga a quelli della DA extracellulare, diminuiscono lentamente fino a tornare ai valori di base al termine dei 30 min di auto-somministrazione.

Come si può osservare nella figura 33, durante la sessione di microdialisi il numero di pressioni eseguite dalle femmine intatte in fase di P/E è inferiore rispetto a quanto osservato nelle femmine in fase di D/M e nelle femmine ovariectomizzate. L'ANOVA a una via ( $F_{(2, 32)} = 6.05$ ,  $p < 0.01$ ) utilizzata per effettuare il confronto fra le medie del numero di pressioni sulla leva eseguite dai 3 gruppi di animali è risultata statisticamente significativa (Tabella 4) e il test di Bonferroni ha

rivelato che il numero di pressioni sulla leva eseguite dalle femmine intatte in fase di P/E è statisticamente inferiore rispetto a quanto misurato nelle femmine in fase di D/M ( $p < 0.01$ ) (Fig. 33 C). Al fine di eseguire un'analisi più dettagliata sul comportamento di auto-somministrazione operante mostrato dalle femmine intatte durante le due macrofasi di D/M e P/E, sono state confrontate le frequenze cumulate e assolute del numero di pressioni sulla leva eseguite ogni 15 minuti durante la sessione di micro dialisi (Fig. 34 e 35). L'ANOVA a due vie applicata sulle frequenze assolute misurate nei due gruppi di animali ha mostrato un effetto significativo della fase estrale (fase estrale:  $F_{(1, 92)}=30.73$ ,  $p < 0.001$ ) e il test di Bonferroni ha rivelato che a 30 e 60 minuti le femmine in fase di D/M hanno eseguito un maggior numero di pressioni sulla leva rispetto a quanto misurato nelle femmine in fasi di P/E ( $p < 0.05$ ).



**Figura 34.** Analisi dell'andamento cumulativo del numero di pressioni della leva eseguite durante la sessione di microdialisi. Il grafico mostra la media  $\pm$  esm del numero di pressioni cumulate eseguite dalle femmine in fase D/M ( $n=12$ ) e dalle femmine in fase P/E ( $n=13$ ) ogni 15 minuti durante la sessione di microdialisi.



**Figura 35.** Analisi della frequenza del numero di pressioni eseguite durante la sessione di microdialisi. Il grafico mostra la media  $\pm$  esm del numero di pressioni della leva eseguite dalle femmine in fase D/M ( $n=12$ ) e dalle femmine in fase P/E ( $n=13$ ) ogni 15 minuti durante la sessione di microdialisi. \*  $p < 0.05$  P/E vs D/M.

**Tabella 4.** Valore medio del numero di pressioni eseguite dai diversi gruppi di animali, prima e dopo la sessione di microdialisi.

Animali	Numero pressioni della leva medie (3 giorni precedenti alla dialisi)	Numero pressioni della leva durante la dialisi
Femmine D/M	1816 ± 90	2119 ± 83
Femmine P/E	1708 ± 188	1266 ± 235**
Femmine ovariectomizzate	2181 ± 127	1931 ± 218
Maschi	2079 ± 122	1639 ± 181

\*\* p < 0,01 P/E vs D/M durante la sessione di microdialisi (F<sub>(2, 32)</sub> = 6.05, p < 0.01); ANOVA a una via seguita dal test di Bonferroni).

## 5. Discussione

Il principale obiettivo di questo studio è stato quello di indagare la possibile esistenza di differenze legate al genere in un modello di auto-somministrazione operante di una bevanda al gusto di cioccolato. Questa bevanda ha mostrato possedere elevate proprietà di rinforzo in grado di provocare un robusto comportamento di auto-somministrazione che si manifesta con un elevato numero di pressioni nella gabbia operante e un ingente volume di bevanda assunto (**Maccioni et al., 2008**).

Alla luce di queste caratteristiche comportamentali, questo modello animale rappresenta un valido strumento per lo studio dei comportamenti motivati da rinforzi positivi naturali, in particolare cibi caratterizzati da proprietà organolettiche percepite come gratificanti da un organismo e quindi in grado di favorire processi di apprendimento che generano risposte comportamentali specifiche.

Gli animali utilizzati in questo studio sono costantemente mantenuti in un regime nutrizionale illimitato e la bevanda al gusto di cioccolato è caratterizzata da un apporto calorico modesto (0.19 kcal/g) che rende possibile ipotizzare che alla base dell'auto-somministrazione operante vi sia una ricerca delle proprietà edoniche della bevanda anziché di quelle nutrizionali.

Inizialmente, quindi, si è proceduto a valutare in che modo i ratti di sesso maschile e quelli di sesso femminile intatti acquisiscono la procedura di auto-somministrazione operante. Quello che si è osservato è una maggior velocità delle femmine nell'acquisire la procedura sperimentale, seppur la differenza nel numero di sessioni totali di acquisizione sia risultata modesta. Questo ritardo si manifesta durante il primo degli *steps* della fase di *shaping*, che è quello in cui gli aspetti legati all'apprendimento risaltano maggiormente, in quanto gli animali devono creare le associazioni fra rinforzo e comportamento messo in atto. Inizialmente queste associazioni si creano a seguito della pressione casuale della leva da parte degli animali che determina quindi l'esposizione del rinforzo favorendo i processi di apprendimento. La più rapida velocità di acquisizione da parte delle femmine potrebbe essere legata alla loro maggiore attività esploratoria spontanea rispetto ai maschi, che quindi potrebbe aver determinato un numero di pressioni casuali superiore e di conseguenza favorire l'apprendimento, come suggerito da diversi studi (**Simpson & Kelly, 2012**).

Lo studio delle differenze di genere dei processi di acquisizione dell'auto-somministrazione di sostanze d'abuso ha condotto a risultati spesso differenti. Infatti, mentre alcuni studi hanno mostrato una maggior velocità di apprendimento nelle femmine anziché nei maschi, altri non hanno rivelato differenze significative e solo pochi studi hanno mostrato una maggiore velocità dei maschi rispetto alle femmine (**Swalve et al., 2015; Donny et al, 2000; Linch et al., 2000; Fattore et al., 2009**).



Nel presente studio, quando monitorati durante la fase di mantenimento, caratterizzata da sessioni di auto-somministrazione in cui il valore di FR è mantenuto costante a 10, i ratti maschi e femmina hanno mostrato valori comportamentali simili, sia nel numero di pressioni della leva che nell'efficienza consumatoria e nei tempi di latenza alla prima pressione. Tuttavia è possibile ipotizzare che il comportamento di auto-somministrazione della bevanda al gusto di cioccolato risenta di un *ceiling effect* che potrebbe aver impedito di osservare delle differenze principalmente nelle medie del numero di pressioni eseguite dagli animali.

Infatti, è emersa una differenza significativa confrontando i consumi di bevanda al gusto di cioccolato espressi in relazione al peso corporeo degli animali, infatti le femmine hanno mostrato consumi superiori di circa il 40% rispetto ai maschi.

Questa differenza non è irrilevante, in quanto, sebbene il comportamento di auto-somministrazione presenti caratteristiche analoghe fra maschi e femmine, non bisogna trascurare il fatto che le femmine hanno dimensioni corporee inferiori e quindi il comportamento consumatorio da loro mostrato risulta essere, in proporzione, superiore rispetto a quanto misurato nei maschi (**Zhou et al., 2015**).

Un'ulteriore importante differenza di genere è emersa confrontando gli andamenti del numero di pressioni della leva eseguite dai ratti maschi e femmina ad intervalli di 5 minuti. Infatti, osservando le frequenze cumulate e assolute si può notare che i ratti maschi eseguono la maggior parte del comportamento di auto-somministrazione, e quindi delle pressioni sulla leva, nei primi 20 minuti della sessione, contrariamente alle femmine, che mostrano un andamento comportamentale più regolare e costante durante l'intera sessione.

Sebbene siano necessari ulteriori esperimenti per spiegare le differenze osservate, è possibile ipotizzare che le femmine, rispetto ai maschi, siano maggiormente in grado di controllare il comportamento di auto-somministrazione e quindi garantirsi consumi costanti per l'intera durata della sessione. Potrebbero esistere infatti delle differenze di genere sul modo in cui i due gruppi di animali approcciano la bevanda al gusto di cioccolato, i.e. i maschi sono più avidi o irruenti nell'assumerla rispetto alle femmine che manifestano più auto-controllo.

La carenza di studi che prendono in esame le differenze di genere in modelli di auto-somministrazione di cibo non consente di trovare un riscontro diretto sui dati presentati in questo studio; inoltre, le procedure di auto-somministrazione operante spesso prevedono programmi di addestramento diversi, e i criteri utilizzati per stabilire il grado di apprendimento degli animali

variano a seconda della natura del rinforzo stesso, quindi spesso diventa difficile confrontare in maniera univoca i risultati provenienti da diversi studi.

Successivamente, al fine di valutare se i ratti maschi e femmine mostrano delle differenze nella motivazione verso la bevanda al gusto di cioccolato, questi sono stati sottoposti a singole sessioni di PR, che diversamente dalle sessioni di FR, sono maggiormente in grado di svelare lo stato motivazionale degli animali in quanto l'ottenimento del rinforzo è reso progressivamente più impegnativo col procedere della sessione.

Da quanto emerso dallo studio, i ratti maschi e femmina non differiscono nei parametri comportamentali utilizzati per misurare la motivazione verso la bevanda al gusto di cioccolato, infatti i valori di BP e quelli relativi al numero di pressioni della leva sono risultati pressoché identici nei due gruppi. Un risultato analogo è stato mostrato anche da precedenti studi che hanno messo in evidenza come i ratti maschi e femmina non mostrino differenze di genere negli aspetti motivazionali che controllano l'auto-somministrazione di rinforzi appetibili, sebbene tali differenze emergano quando gli stessi ratti sono esposti a sessioni di auto-somministrazione di cocaina in PR (**Linch, 2008; Reichelt et al., 2016**).

A seguito di questi risultati, che hanno mostrato come il comportamento di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato non subisce variazioni legate al genere, poiché le femmine risentono dell'influenza del ciclo estrale, in cui le concentrazioni seriche degli ormoni sessuali variano in maniera ciclica e poiché questi ultimi, come dimostrato da un'ampia letteratura, sono responsabili di alterazioni riscontrabili sia a livello comportamentale che neurochimico (**Uban et al., 2012; Diaz-Veliz et al., 1999; Becker & Koob, 2015**), in questo studio si è proceduto a studiare la possibile influenza del ciclo estrale sul comportamento di auto-somministrazione operante. Ciò che è emerso dai risultati della ricerca è una riduzione del comportamento di auto-somministrazione operante durante le fasi di Proestro ed Estro rispetto a quelle di Diestro e Metestro, con effetti riscontrabili e significativi sia nel numero di pressioni della leva effettuate per ottenere il rinforzo che nei volumi di bevanda al gusto di cioccolato assunti. Questi effetti comportamentali (sulla pressione della leva e sulla quantità di bevanda assunta) scompaiono nelle femmine ovariectomizzate, in cui non esiste più ciclo estrale. Nell'interpretazione di questo risultato si può inizialmente far riferimento alle variazioni ormonali che intervengono durante il ciclo estrale delle femmine, in particolare quelle relative alle concentrazioni plasmatiche di estradiolo e di progesterone.

Infatti, è importante sottolineare che numerosi studi clinici e pre-clinici hanno mostrato che il comportamento alimentare è fortemente influenzato dalle variazioni delle concentrazioni seriche degli ormoni sessuali, attribuendo principalmente all'estradiolo un effetto anoressizzante in grado di determinare una riduzione dell'assunzione di cibo durante le fasi del ciclo in cui le concentrazioni seriche di questo ormone sono elevate. Il progesterone, invece, ha mostrato effetti regolatori sull'assunzione di cibo soprattutto a dosaggi sopra-fisiologici (**Hirshberg, 2012**). A supporto di ciò, è stato dimostrato, che la resezione chirurgica di entrambe le ovaie induce iperfagia e aumento del peso corporeo nei ratti e nei primati non umani (**Wade & Gray, 1979**), un effetto che può essere prevenuto attraverso la sola somministrazione di estradiolo (**Asarian & Geary, 2002**). Inoltre, il trattamento farmacologico con estradiolo, in ratti femmina intatti e ovariectomizzati, è risultato efficace nell'inibire sia l'assunzione di cibo normale che ad elevato contenuto di grassi (**Hrupka et al., 1996; Butera et al., 2009; Eckel et al., 2011**). Infine, è stato anche riportato in un paradigma comportamentale di reattività al gusto, che le risposte edoniche oro-facciali e i comportamenti ingestivi delle femmine di ratto sottoposte alla somministrazione intra-orale di una soluzione zuccherina si riducono durante la fase di estro rispetto a quelle di diestro e proestro (**Clarke et al., 1998**).

Anche i risultati di questo studio suggeriscono che gli ormoni sessuali influiscano sul comportamento di auto-somministrazione esercitando un effetto inibitorio che si ripercuote non solo sul numero di pressioni eseguite dai ratti, ma anche sui volumi di bevanda assunti. I valori comportamentali misurati durante le sessioni di auto-somministrazione cominciano a ridursi durante la fase di Proestro, quando le concentrazioni seriche di estradiolo aumentano, e raggiungono valori minimi nella fase di Estro, durante la quale aumentano le concentrazioni di progesterone circolante. La massima riduzione comportamentale, osservata durante la fase di estro, non sembra risentire dell'influenza del progesterone che, secondo alcuni studi, avrebbe un effetto di stimolazione sui comportamenti alimentari (**Stelmanska et al., 2014**), ma al contrario sembrerebbe essere ancora sotto l'effetto dell'estradiolo nella fase di Proestro. A tale riguardo vanno ricordati diversi studi che hanno mostrato come gli effetti inibitori dell'estradiolo sull'assunzione di cibo siano riscontrabili anche ore dopo il picco di concentrazione serica (**Santollo et al., 2012**). Infatti, l'estradiolo, oltre che determinare un effetto diretto per la stimolazione di recettori localizzati a livello della membrana citoplasmatica (via diretta), esercita la sua azione interagendo con recettori nucleari localizzati all'interno della cellula. In particolare, l'effetto anoressizzante dell'estradiolo è attribuibile all'interazione con i recettori nucleari ER $\alpha$  ed ER $\beta$ . L'attivazione di questi recettori

innesca un processo di trascrizione genica che induce sintesi di RNA-messaggero e proteine in grado di agire sui sistemi neurali coinvolti nei meccanismi di fame e sazietà (via indiretta). Siccome i processi di trascrizione genica e la conseguente sintesi proteica richiedono tempo per potersi manifestare, è possibile ipotizzare che l'estradiolo eserciti il suo effetto inibitorio sull'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato interagendo con i suoi recettori nucleari ER $\alpha$  ed ER $\beta$  (Eckel, 2004). Questa interpretazione è in linea con studi che hanno mostrato come la somministrazione simultanea di agonisti selettivi dei recettori ER $\alpha$  ed ER $\beta$  in femmine di ratto ovariectomizzate determini uno *shift* motivazionale da un comportamento che richiede uno sforzo elevato per ottenere una ricompensa gratificante, a un comportamento meno "costoso" ma che conduce ad una ricompensa meno gratificante. Questo effetto, inoltre, è risultato maggiore quando misurato nelle 24 ore successive al trattamento farmacologico (Uban et al., 2012).

Tuttavia, altre possibili cause della diminuzione del comportamento di auto-somministrazione nelle fasi Proestro-Estro non possono essere completamente escluse. Analizzando in maniera più dettagliata il comportamento di auto-somministrazione delle femmine intatte, è infatti emerso che durante le fasi di Proestro ed Estro c'è un ritardo da parte degli animali ad eseguire la prima pressione della leva, che può portare a un ridotto comportamento di auto-somministrazione nelle prime fasi della sessione, come rivelato dall'analisi delle frequenze cumulate e assolute del numero di pressioni della leva, fenomeno che non viene osservato nelle femmine ovariectomizzate.

La causa di questo ritardo da parte degli animali ad eseguire la prima pressione della leva potrebbe essere legata ad aspetti motivazionali che intervengono precedentemente alla sessione di auto-somministrazione. Questa possibilità è infatti supportata dai risultati ottenuti sottoponendo le femmine intatte, dopo un periodo di mantenimento a FR10 di circa 10 giorni, ad una singola sessione di PR, una procedura sperimentale mirata a differenziare gli aspetti motivazionali da quelli di rinforzo del comportamento di auto-somministrazione. Infatti, similmente a quanto osservato durante le sessioni a FR10, la motivazione degli animali esposti a singole sessioni di PR subisce variazioni che seguono le oscillazioni della concentrazione di estradiolo durante il ciclo estrale, con una riduzione dei valori di BP e del numero di pressioni della leva che si verificano principalmente durante le fasi di Proestro ed Estro rispetto alle fasi di Diestro e Metestro.

A favore di questa interpretazione sono anche i risultati di altri studi che hanno mostrato come durante le fasi di Proestro ed Estro le femmine di ratto mostrino, rispetto ai maschi, sia una maggior propensione ad assumere cocaina piuttosto che cibo normale, sia una riduzione nella quantità di cibo assunta (Perry et al., 2015). Inoltre, è stato riportato che nelle femmine di ratto la motivazione

per il cibo e per il comportamento sessuale sono inversamente correlati: infatti queste mostrano un comportamento alimentare ridotto quando sono in estro, ossia sessualmente ricettive. Questo suggerisce che durante le fasi di ricettività sessuale c'è uno *shift* motivazionale verso comportamenti che favoriscono la probabilità di un incontro con il partner di sesso opposto e quindi l'accoppiamento, a discapito di altri comportamenti, tra cui quello alimentare (Yoekst et al., 2014). Dato che le femmine ovariectomizzate mostrano valori di BP e di pressioni della leva simili a quelli mostrati dalle femmine in fase di Diestro, e che il profilo ormonale delle femmine in fase di Diestro e delle femmine ovariectomizzate presenta caratteristiche simili (e.g., entrambi presentano concentrazioni degli ormoni sessuali relativamente basse), questo suggerisce ancora una volta che nelle femmine intatte possa esistere una variazione della motivazione che riflette le oscillazioni cicliche delle concentrazioni seriche degli ormoni sessuali e dell'estradiolo in particolare.

Le interpretazioni fornite sinora per spiegare la diminuzione dell'auto-somministrazione nelle femmine in fase Proestro e Estro tengono conto soprattutto delle variazioni ormonali (estradiolo in particolare) che si verificano in queste fasi dell'estro. Non si può però non tenere presente che tanti altri aspetti comportamentali sono influenzati dal ciclo estrale, anche drammaticamente, ragion per cui la riduzione comportamentale osservata nelle fasi di Proestro ed Estro potrebbe anche essere dovuta ad aspetti che prescindono da quelli precedentemente descritti. Ad esempio è stato osservato che la risposta delle femmine di ratto allo stress è fortemente influenzata dal ciclo estrale, risultando maggiore durante le fasi di Diestro e Metestro, mentre i parametri comportamentali che descrivono l'attività locomotoria spontanea delle femmine di ratto risulta maggiore durante le fasi di Diestro e Metestro rispetto a quelle di Proestro ed Estro (Reddy et al., 1999; Diaz-Veliz et al., 1998; Lovick, 2012).

Un altro obiettivo importante di questo studio è stato quello di monitorare, durante la sessione di auto-somministrazione operante, la neurotrasmissione dopaminergica nel NAcc Shell, un'area coinvolta nell'espressione dei comportamenti motivati e nei processi di gratificazione. Questo a causa dell'importanza primaria che il sistema dopaminergico mesolimbico ricopre nei comportamenti motivati. Sulla base dei risultati comportamentali descritti prima, si è anche proceduto a studiare se le concentrazioni extracellulari di DA e del DOPAC (uno dei suoi principali metaboliti) nel NAcc Shell fossero influenzate da differenze legate al genere o, nelle femmine intatte, alla fase estrale.

Dall'analisi delle concentrazioni extracellulari di DA e DOPAC presenti nel dializzato ottenuto dal NAcc Shell dei diversi gruppi di animali (maschi, femmine intatte e femmine ovariectomizzate), si

evinces chiaramente che DA e DOPAC extracellulari aumentano durante l'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato e principalmente in seguito all'esposizione degli animali agli stimoli condizionati al rinforzo durante la fase appetitiva rispetto ai valori basali misurati prima dell'introduzione degli animali nell'apparato per l'auto-somministrazione (gabbia operante). Questo effetto è risultato di entità analoga nei maschi, nelle femmine ovariectomizzate e nelle femmine in fase di D/M. In questi gruppi di animali, inoltre, è evidente anche che l'aumento di DA extracellulare è nettamente superiore rispetto a quello delle femmine in fase P/E, che invece mostrano aumenti dei livelli di DA extracellulare poco superiori al 10% rispetto a valori basali.

L'aumento di DA e DOPAC osservato nella fase appetitiva dell'auto-somministrazione è in linea con la nozione generale comunemente accettata secondo cui, nei processi di apprendimento strumentale e condizionato, stimoli associati ad un rinforzo primario acquisiscono, in seguito a ripetute associazioni, valenza motivazionale e diventano capaci, anche in assenza del rinforzo stesso, di generare risposte innate o strumentali in un animale. Questa caratteristica è stata associata alla capacità degli stimoli condizionati di indurre un'attivazione del sistema dopaminergico mesolimbico con conseguente aumento delle concentrazioni di DA extracellulare nel NAcc Shell (Shultz et al., 1993; Shultz et al., 1997; Cheng et al., 2003; Di Chiara 2002; Bassareo et al., 1999; Volkow et al., 2002).

Diversi studi hanno inoltre mostrato come la neurotrasmissione dopaminergica nel NAcc sia direttamente correlata con lo stato motivazionale degli animali. Infatti, non solo è stato osservato che la somministrazione di antagonisti dopaminergici in fase appetitiva determina negli animali uno *shift* motivazionale verso comportamenti a minor dispendio energetico, ma anche che, aumentando la carica motivazionale degli animali, deprivandoli ad esempio da cibo o acqua, si ottengono aumenti maggiori nella DA extracellulare rispetto ad animali che non sono stati sottoposti a deprivazione (Salamone et al., 1991; Wilson et al., 1995; Di Chiara et al., 2002; Sokolowsky et al., 1998).

Sulla base di queste evidenze sperimentali e poiché gli animali utilizzati in questo studio sono mantenuti costantemente ad un regime nutrizionale illimitato, è possibile supporre che l'aumento di DA extracellulare osservato in fase appetitiva rifletta lo stato motivazionale degli animali verso la bevanda al gusto di cioccolato, e che è innescato da tutti quegli stimoli di natura sensoriale a cui gli animali sono stati esposti prima di aver accesso alla bevanda.

Invece, durante la fase consumatoria della sessione di auto-somministrazione, quando gli animali hanno accesso alla leva e premono questa per accedere alla bevanda al gusto di cioccolato, le

concentrazioni di DA extracellulare, sebbene permangano al di sopra dei valori di base, non subiscono aumenti significativi ulteriori.

L'ampia letteratura scientifica riguardante il ruolo della DA nella fase consumatoria dei comportamenti di auto-somministrazione, ha condotto a risultati spesso differenti per l'utilizzo di procedure sperimentali complesse mirate all'osservazione di un aspetto del comportamento anziché di un altro.

Vi sono studi che hanno mostrato ad esempio aumenti delle concentrazioni di DA extracellulare in relazione agli aspetti consumatori di un comportamento *goal-directed* (**Wilson et al., 1995; Pfaus et al., 1990; Rada et al., 2005; Hoebel & Hernandez, 1988**), e altri che invece hanno messo in risalto come la neurotrasmissione dopaminergica nel NAcc Shell sia prettamente correlata con aspetti legati all'apprendimento o alla motivazione degli animali. Fra questi, alcuni studi hanno mostrato come la liberazione di DA extracellulare nel NAcc Shell in fase consumatoria venga prevenuta dalla precedente esposizione di uno stimolo che anticipa e rende prevedibile l'ottenimento di un rinforzo primario (**Bassareo, et al., 1999**). Inoltre, è stato anche riportato che l'aumento delle concentrazioni di DA extracellulare nel NAcc Shell, secondario all'esposizione di un cibo caratterizzato da un'elevata appetibilità, risente di un fenomeno definito di *single-trial habituation* che fa sì che la DA extracellulare aumenti solamente alla prima esposizione del rinforzo (**Bassareo et al., 2002**).

Ulteriori studi hanno invece mostrato che non c'è correlazione fra la quantità di DA extracellulare liberata nel NAcc Shell e il numero di risposte comportamentali eseguite dagli animali in una sessione di auto-somministrazione (**Cheng & Feenstra, 2006**). Infatti, l'aumento delle concentrazioni di DA extracellulare, misurate durante l'auto-somministrazione operante, è risultato superiore nelle fasi iniziali dell'addestramento rispetto a quelle finali, quando gli animali mostrano una maggior *performance* comportamentale in termini di numero di pressioni della leva. Questo è stato attribuito al fatto che la neurotrasmissione dopaminergica nel NAcc Shell è maggiormente coinvolta nelle fasi iniziali dell'apprendimento di un compito e nella capacità o meno di un animale ad apprendere quel compito (**Segovia et al., 2011**).

I nostri risultati sembrano in linea con quelli della letteratura, tuttavia cercare di trovare una correlazione diretta fra le concentrazioni di DA extracellulare e gli eventi che si verificano a livello comportamentale è reso complicato dal fatto che la microdialisi è una procedura sperimentale che misura le variazioni di DA extracellulare su una scala temporale relativamente lunga (minuti).

A tale riguardo, studi che hanno utilizzato la voltammetria, una tecnica in grado di misurare le variazioni delle concentrazioni di DA su intervalli temporali dell'ordine dei millisecondi, hanno mostrato che durante la procedura di auto-somministrazione operante di una soluzione zuccherina, la risposta dopaminergica nel NAcc è strettamente correlata con la fase appetitiva piuttosto che quella consumatoria. Infatti, dopo la presentazione dello stimolo condizionato, nel momento in cui le leve fuoriescono e gli animali cominciano a premerle per ottenere il rinforzo, i valori di DA extracellulare ritornano gradualmente verso i valori di base (Roitman, 2004).

Quindi, sulla base di queste evidenze sperimentali e considerata la natura dei risultati ottenuti in questo studio, si può assumere che nel modello comportamentale utilizzato la DA extracellulare eserciti un ruolo maggiore in fase appetitiva anziché in fase consumatoria, e che essa sia legata maggiormente agli aspetti motivazionali che regolano il comportamento di auto-somministrazione.

Come già discusso in precedenza, la ridotta liberazione di DA extracellulare misurata nelle femmine intatte durante le fasi di P/E potrebbe essere associata ad un ridotto *drive* motivazionale degli animali, che quindi potrebbero essere meno sensibili al potere incentivante degli stimoli condizionati. Questa ridotta sensibilità potrebbe riflettere, almeno in parte, anche il fatto che nelle femmine che si trovano nelle fasi peri-estrali ed estrali del ciclo vi sia uno *shift* motivazionale verso comportamenti che acquisiscono una maggior valenza in termini di salvaguardia della specie (Yuest et al., 2014).

Se, come discusso in precedenza, l'oscillazione delle concentrazioni plasmatiche degli ormoni sessuali durante il ciclo estrale influenza il comportamento di auto-somministrazione operante tramite una riduzione dello stato motivazionale che si verifica in fase appetitiva, e se questo si verifica contemporaneamente ad alterazioni dell'attività della neurotrasmissione dopaminergica mesolimbica nel NAcc Shell, come dimostrato dalle differenze nella quantità di DA liberata durante l'auto-somministrazione della bevanda al gusto di cioccolato tra le femmine intatte nelle differenti fasi del ciclo estrale, e tra queste e le femmine ovariectomizzate, è possibile suggerire che esista un'interazione tra i livelli di ormoni sessuali, estradiolo in particolare, e la neurotrasmissione dopaminergica mesolimbica. A tale riguardo occorre ricordare che numerosi studi hanno mostrato che l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di estradiolo e progesterone è associato ad una riduzione dell'attività presinaptica dei recettori dopaminergici D<sub>2</sub>, sia nello striato che nel NAcc, con conseguente potenziamento della trasmissione dopaminergica in queste due aree. Infatti, è stato mostrato che nei ratti femmina in fase di Estro, la somministrazione di amfetamina induce una liberazione di DA maggiore di quella che si verifica nei ratti femmina in fase di Diestro o nei ratti



ovariectomizzati, e che questo si correla a effetti comportamentali più marcati nelle femmine in fase di estro (Becker et al., 1989; Becker, 1990). È stato suggerito che questo effetto sia mediato da un controllo inibitorio esercitato dall'estradiolo sulla liberazione di GABA da neuroni localizzati nello striato, secondario ad un'inibizione delle correnti del  $Ca^{2++}$ . Questo determinerebbe una disinibizione dei neuroni dopaminergici, che di conseguenza rilasciano una maggiore concentrazione di DA extracellulare. Apparentemente, questo effetto causa anche un aumento dell'attività del DAT e una riduzione nell'espressione dei recettori  $D_2$  a livello presinaptico (Mermelstein et al., 1996).

Altri studi hanno invece mostrato che l'ovariectomia produce una sensibile diminuzione delle concentrazioni extracellulari di DA a livello striatale e che le femmine intatte, durante le fasi di Proestro ed Estro, mostrano concentrazioni basali di DA maggiori rispetto a quando si trovano nella fase di Diestro (Xiao et al., 1994). Inoltre, è stato riportato che il trattamento con estradiolo produce, sia nei maschi castrati che nelle femmine ovariectomizzate, un incremento delle concentrazioni basali di DA extracellulare (Cummings et al., 2013).

Tuttavia, dai risultati di questo studio non si può dedurre se meccanismi analoghi a quelli appena descritti si verificano anche durante l'auto-somministrazione, né per un eventuale potenziamento dell'attività dopaminergica durante le fasi di Proestro ed Estro rispetto alla fase Diestro/Metestro (la concentrazione di DA extracellulare durante l'auto-somministrazione nella fase Proestro/Estro non è più elevata di quella della fase Diestro/Metestro, ma è addirittura più bassa), né per un aumentato *turnover* della DA (non sono state trovate differenze tra la concentrazione di DOPAC extracellulare, uno dei principali metaboliti della DA, indicatore dell'attività di *turnover* del sistema dopaminergico, nelle femmine in fase Diestro/Metestro e Proestro/Estro, sebbene in queste ultime, le concentrazioni di DOPAC raggiungano valori leggermente superiori). Ulteriori studi sono quindi necessari per chiarire in che modo le variazioni della concentrazione dell'estradiolo durante il ciclo estrale interagiscono con la neurotrasmissione dopaminergica nel NAcc. Altri meccanismi potrebbero infatti essere implicati. Ad esempio è stato osservato che le popolazioni neuronali che originano dalla VTA e proiettano al NAcc sono in grado di rilasciare, insieme alla DA, anche forme attive di colecistochinina (Lanca et al., 1998). Nel NAcc la colecistochinina è in grado di inibire la liberazione di DA extracellulare mediato da ioni  $K^+$ , e la somministrazione di agonisti dei recettori per la colecistochinina è efficace nell'inibire la liberazione di DA indotta dall'amfetamina e nel ridurre gli effetti di rinforzo di quest'ultima, come mostrato dai ridotti valori di BP compiuti da ratti sottoposti a sessioni di PR (Bush et al. 1999a). Altri studi hanno dimostrato che nelle femmine

intatte, la liberazione di DA extracellulare stimolata dallo ione  $K^+$  è fortemente influenzata dal ciclo ormonale, con un effetto maggiore misurato nelle fasi di Diestro rispetto a quanto osservato nelle fasi di Estro e Proestro. Sempre da questo studio è inoltre emerso che durante la fase di Proestro vi sia una maggior attività di trasporto della DA dallo spazio extracellulare all'interno dei neuroni ad opera del DAT (**Thompson & Moss, 1997**). Ancora, è stato riportato che la somministrazione sistemica di cocaina produce, nelle femmine ovariectomizzate e trattate con estradiolo, una minore liberazione di DA extracellulare rispetto a quella che si osserva nei maschi (**Cummings et al., 2002**).

Indipendentemente dal fatto che sia ancora da chiarire se le variazioni ormonali e dell'estradiolo, in particolare durante il ciclo estrale, possano in qualche modo essere responsabili della diminuzione dell'auto-somministrazione della bevanda al gusto di cioccolato che si verifica nelle femmine intatte nella fase Proestro/Estro, questo studio ha dimostrato che la neurotrasmissione dopaminergica in questa fase del ciclo estrale è ridotta rispetto a quella della fase Diestro/Metestro e questo potrebbe essere suggestivo di un calo motivazionale verso l'assunzione del cibo che in questo caso è rappresentato dalla bevanda al gusto di cioccolato. Poiché la neurotrasmissione dopaminergica nel NAcc è fondamentale per il controllo dei comportamenti alimentari, diventa importante ricordare che questo trova riscontro in ambito clinico. Infatti, anche nelle donne è stato osservato che il consumo e il desiderio verso cibi ricchi di grassi e ad elevato contenuto calorico subisce delle oscillazioni che sono strettamente associate con le variazioni ormonali che si verificano durante il ciclo mestruale. Per esempio, è stato riportato che il desiderio e il consumo di cibi a base di cioccolato sia maggiore durante la fase luteale del ciclo mestruale, quando le concentrazioni plasmatiche di estradiolo sono basse e quelle di progesterone sono elevate (**Zellner et al., 1999**). Addirittura nel 30% di donne fra quelle esaminate è stata trovata una correlazione fra il ciclo mestruale e il desiderio di cioccolato e, in queste, il 70% ha riportato episodi di *craving* più intensi e frequenti durante le fasi perimestruali del ciclo (**Hormes et al., 2011**). Infine, uno studio di fMRI ha rivelato che durante la fase follicolare del ciclo mestruale, quando le concentrazioni sieriche di estrogeno sono elevate, in seguito alla presentazione di stimoli in grado di rievocare cibi ad altro contenuto calorico, le aree del sistema mesolimbico si attivano maggiormente rispetto a quanto osservato nella fase luteale (**Frank et al., 2010**). Occorre tuttavia ricordare che una maggior risposta dopaminergica non per forza è associata ad un aumentato desiderio di cibo, infatti, come osservato in pazienti obesi, spesso il comportamento alimentare è compensatorio ad un ridotto tono dopaminergico nelle aree mesolimbiche (**Wang et al., 2001**).

## 6. Conclusioni

Questo studio ha mostrato che l'auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato non risente di un effetto legato al genere e che ratti maschi e femmina sottoposti alle medesime procedure sperimentali non differiscono, se non per alcuni aspetti, nei diversi parametri comportamentali esaminati.

Tuttavia, un aspetto interessante emerso da questo studio riguarda il fatto che il comportamento di auto-somministrazione operante delle femmine intatte subisce, contrariamente a quanto misurato nelle femmine ovariectomizzate e quindi prive di ciclo ormonale, delle variazioni che sembrano riflettere le oscillazioni ormonali che avvengono durante il ciclo estrale con effetti riscontrabili anche negli aspetti motivazionali che regolano il comportamento di auto-somministrazione. Inoltre, lo studio del correlato neurochimico del comportamento ha messo in evidenza che le variazioni comportamentali osservate nelle femmine intatte sono associate a variazioni nei livelli di DA extracellulare durante le fasi del ciclo estrale, con una maggior attivazione dopaminergica durante quelle fasi in cui il quadro ormonale è caratterizzato da ridotti livelli di estradiolo e progesterone.

Questi risultati trovano conferma in un'ampia letteratura, clinica e pre-clinica, che ha mostrato come il comportamento alimentare e il desiderio di cibo possa variare in relazione alle fluttuazioni ormonali che si verificano durante il ciclo estrale (e mestruale).

In sintesi questo studio mostra come la presa in esame delle differenze di genere in un modello animale di comportamento motivato non possa prescindere da un'adeguata valutazione del comportamento e dei correlati neurochimici anche in relazione alle diverse fasi che compongono il ciclo estrale.

## 7. Direzioni Future

Al fine di poter rispondere a molte delle ipotesi formulate in questo studio, sarebbe indispensabile eseguire dei test di natura farmacologica mirati a valutare l'effetto diretto degli ormoni estrogeni e del progesterone sul comportamento di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato nelle femmine ovariectomizzate. Solo in questo modo sarebbe difatti possibile testare l'ipotesi secondo cui le variazioni comportamentali osservate nelle femmine intatte siano influenzate dalla componente ormonale.

Sarebbe inoltre importante valutare l'effetto degli estrogeni e del progesterone sulla liberazione di DA extracellulare nel NAcc Shell degli animali che eseguono l'auto-somministrazione operante di cioccolato.

Questo studio apre le porte per future indagini sperimentali mirate ad approfondire le caratteristiche del modello animale di auto-somministrazione operante della bevanda al gusto di cioccolato e a mettere in risalto eventuali differenze di genere anche attraverso l'utilizzo di altre procedure sperimentali. Ad esempio, sarebbe interessante estendere i risultati ottenuti in questo studio anche alle procedure di "estinzione" e "*reinstatement*", per valutare in che modo il genere influenza i comportamenti di ricerca ed assunzione della sostanza dopo che gli animali sono stati esposti a periodi di astinenza forzata e stabilire se, nei soggetti di sesso femminile, gli effetti comportamentali indotti da questi paradigmi sperimentali siano soggetti ad una variabilità legata al ciclo ormonale.

Anche in questo caso, la caratterizzazione comportamentale dovrebbe essere condotta in relazione agli aspetti neurochimici, in modo che sia possibile studiare la relazione fra questi paradigmi comportamentali con le concentrazioni di DA extracellulare, non solo nel NAcc Shell, ma anche nella corteccia prefrontale, un'altra area cerebrale coinvolta nei meccanismi di ricerca di una sostanza d'abuso e in quelli che ne controllano l'assunzione in seguito a periodi di astinenza.

Il modello comportamentale utilizzato in questo studio riproduce alcuni dei segni tipici di disordini alimentari caratterizzati da episodi in cui si ha una perdita di controllo sull'assunzione del cibo. Sarebbe interessante sperimentare se il robusto comportamento di auto-somministrazione mostrato dagli animali risponda ad uno dei criteri chiave che identificano l'abuso e la dipendenza, ossia la persistenza del comportamento nonostante questo conduca a conseguenze negative. A questo scopo si potrebbero condurre degli esperimenti mirati a valutare se il comportamento di auto-somministrazione della bevanda al gusto di cioccolato persista nonostante la concomitante esposizione degli animali a conseguenze negative (i.e., foot-shock) e valutare se questo è sensibile di differenze legate al genere.

Qualora gli effetti comportamentali persistessero ed esistessero differenze di genere, questo modello comportamentale potrebbe rappresentare un valido strumento per lo studio degli aspetti compulsivi legati all'assunzione di cibo ed aprire ulteriori indagini di natura sperimentale mirate a valutare il ruolo degli ormoni sessuali in queste patologie.

## 8. Referenze Bibliografiche

- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder 5<sup>th</sup> edn. American Psychiatric Press: Washington, DC (2012)
- Arias-Carrión, O., Stamelou, M., Murillo-Rodriguez, E., Menendez-Gonzales, M., Poppel, E. Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Inter. Archiv. Med.* 3: 24 (2010)
- Asarian, L. and Geary, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm. Behav.* 42: 461-471 (2002)
- Avena, N. M., Rada, P., Hoebel, B. G. Evidence for sugar addiction: behavioural and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32: 20-39 (2008)
- Bassareo, V. and Di Chiara, G. Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *J. Neurosci.* 11: 4389-97 (1999)
- Bassareo, V., De Luca, M. A., Di Chiara, G. Differential expression of motivational stimulus properties by dopamine in nucleus accumbens shell versus core and prefrontal cortex. *Jour. Neurosci.* 22: 4709-19 (2002)
- Beaulieu, J. M. and Gainetdinov, R. R. The physiology, signaling and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63: 182-217 (2011)
- Becker, J. B. and Cha, J. Estrous cycle-dependent variation in amphetamine-induced behaviors and striatal dopamine release assessed with microdialysis. *Behav. Brain. Res.* 35: 117-125; (1989)
- Becker, J. B. Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64 (4): 803- 812 (1999)
- Becker, J. B. and Koob, G. F. Sex differences in animal models: focus on addiction. *Pharmacol. Rev.* 68: 242-263 (2016)
- Becker, J. B. Direct effect of 17  $\beta$ -estradiol on striatum: Sex differences in dopamine release. *Synapse.* 5: 157-164 (1990).
- Berridge, K. C., Venier, I. L., Robinson, T. E. Taste reactivity analysis of 6-hydroxydopamine-induced aphagia: implications for arousal and anhedonia hypotheses of dopamine function. *Behav. Neurosci.* 103: 36–45 (1989)



- Boswell, R. G., Kober, H. Food cue reactivity and craving predict eating and weight gain: A meta-analytic review. *Obes. Rev.* 17: 159-77 (2016)
- Brandling-Bennett, E. M., Blasber, M. E., Clark, A. S. Paced mating behaviour in female rats in response to different hormone priming regimens. *Horm. Behav.* 35: 144 - 154 (1999)
- Bryant, M., Truesdale, K. P., Dye, L. Modest changes in dietary intake across the menstrual cycle: implication for food intake research. *Br. J. Nutr.* 96: 888 - 894 (2006)
- Bush, D. E. A., DeSousa, N. J., Vaccarino, F. J. Self-administration of intravenous amphetamine: effect of nucleus accumbens CCKB receptor activation on fixed ratio responding. *Psychopharmacology.* 147: 331- 334 (1999a).
- Butera, P. C., Wojcik, M., Shannon, J. Clough. Effects of estradiol on food intake and meal patterns for diets that differ in flavor and fat content *Physiol. Behav* 12: 142 - 145 (2010)
- Calu D., J., Chen, W., Kawa, B., A., Nair, G., S., Shaham, Y. The use of the reinstatement model to study relapse to palatable food seeking during eating. *Neuropharmacology* 76: 395 – 406 (2014)
- Cheng, J. J. and Feenstra, G. P. Individual differences in dopamine efflux in nucleus accumbens shell and core during instrumental learning. *Learn. Mem.* 13: 168 - 177 (2006)
- Cheng, J. P. C. and Feenstra, M. G. P. Dopamine efflux in nucleus accumbens shell and core in response to appetitive classical conditioning. *Eur. J. Neurosci* 18: 1306-1314 (2003)
- Clarke, S. N. D. A. and Osseknopp, K. P. Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrus cycle. *Am. J. Physiol.* 274: 718 - 24 (1998).
- Colantuoni, C., Rada, P., McCarthy, J., Patten, C., Avena, N. M., Chadeayne, A., Hoebel, B. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. *Obes. Res.* 10: 478 - 488 (2002)
- Cora, C. M., Kooistra, L., Travlos, G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol. Pathol.* 43: 776 - 793 (2015)
- Cumming, A. J., Lakshmikripa, J., Jackson, L. R., Becker, J. B. Sex differences in the effects of estradiol in the nucleus accumbens and striatum on the response to cocaine: neurochemistry and behavior. *Drug Alcohol Depend.* 135:22 - 28 (2013)
- Devoto, P., Fattore, L., Antinori, S., Saba, P., Frau, R., Fratta, W., Gessa, G. L. Elevated dopamine in the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking via D1 receptor

- overstimulation. *Add. Biol.* 21: 61-71 (2014)
- Del Parigi, A., Chen, K., Gautier, J., Salbe, D. A., Pratley, P. E., Ravussin, E., Reiman, E. M., Tataranni, P. A. Sex differences in the human brain's response to hunger and satiation. *Am. J. Clin. Nutr.* 75: 1017 - 22 (2002)
  - Di Chiara, G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav. Brain. Res.* 137: 75-114 (2002)
  - Di Chiara, G., Tanda, G., Carboni, E. Estimation of in-vivo neurotransmitter release by brain microdialysis: the issue of validity. *Behav. Pharmacol.* 7: 640-657 (1996)
  - Di Segni, M., Patrono, E., Patella, L., Puglisi-Allegra, S., Ventura, R. Animal models of compulsive eating behavior. *Nut.* 6 (10): 4591-4609 (2014)
  - Diaz-Veliz G., Benavides, S. M., Butron, S., Dussaubat, N., Mora, S. Behavioral effects of dopamine agonists and antagonists: influence of estrous cycle, ovariectomy, and estrogen replacement in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62(1): 21-29 (1999)
  - Dickinson, A., Balleine, B. Motivational control of instrumental action. *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 4:162-7 (1995)
  - Dickinson, A. Conditioning and associative learning. *Brit. Med. Bul.* 37: 165-168 (1981)
  - Dickinson, A. Instrumental conditioning. *An. Lear. Cogn. San Diego: Academic Press*, 45 - 79 (1994)
  - Dolan, R. J. and Dayan, P. Goals and Habits in the Brain. *Neuron.* 80: 312 - 325 (2013)
  - Dye, L. and Blundell, J. E. Menstrual cycle and appetite control: implication for weight regulation. *Hum. Rep.* 12: 1142 - 51 (1997)
  - Donny, E. C., Caggiula, A. R., Rowell, P. P., Gharbi, M. A., Maldovan, V., Booth, S., Mileke, M. M., Hoffman, A., McCallum, S. Nicotine self-administration in rats: estrous cycle effects, sex differences and nicotinic receptor binding. *Psychopharmacology* 151: 392 - 405 (2000)
  - Emera, D., Romero, R., Wagner, G. The evolution of menstruation: A new model for genetic assimilation. *Bioessays.* 34: 26 - 35 (2012)
  - Evans, A. H., Pavese, N., Lawrence, A. D., Tai, Y. F., Appel, S., Doder, M., Brooks, D. J., Lees, A. J., Piccini, P. Compulsive drug use linked to sensitized ventral striatal dopamine transmission. *Ann. Neurol.* 59: 852 - 858 (2006)
  - Everitt, B. J., Robbins, W. T. From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of

- their roles in drug addiction. *Neurosci. Behav. Rev.* 37: 1946 - 54 (2013)
- Fattore, L., Melis, T. Sex differences in impulsive and compulsive behaviors: a focus on drug addiction. *Addict. Biol.* 21: 1043 - 1051 (2016)
  - Fattore, L., Fadda, P., Fratta, W. Sex differences in the self-administration of cannabinoids and other drugs of abuse. *Psychoneuroendocrinology.* 345: 227-236 (2009)
  - Frank, T. C., Kim, G. L., Krzemien, A., Van Vugt, D. A. Effect of menstrual cycle phase on corticolimbic brain activation by visual food cues. *Brain Res.* 1363: 81 - 92 (2010)
  - Geary, N., Trace, D., Smith, P. G. Estradiol interacts with gastric or postgastric food stimuli to decrease sucrose ingestion in ovariectomized rats. *Physiol. Behav.* 1: 155-158 (1995)
  - Gessa, G. L., Orrù, A., Lai, P., Maccioni, P., Lecca, R., Lobina, C., Carai, M. A. M, Colombo, G. Lack of tolerance to the suppressing effect of rimonabant on chocolate intake in rats. *Psychopharmacology* 185: 248 - 254 (2006)
  - Glickman, S. E., Schiff, B. B. A biological theory of reinforcement. *Psychol. Rev.* 74: 81-109 (1967).
  - Goldman, J. M, Murr, S. A., Cooper, L. R. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 80: 84 - 97 (2007)
  - Gray, T., Wise, R. A. Effects of pimozide on lever pressing behavior maintained on an intermittent reinforcement schedule. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12: 931 - 5 (1980)
  - Hajnal, A., Smith, G. P., Norgren, R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286: 31 - 37 (2004)
  - Hallam, J., Boswell, R. G., DeVito, E. E., Kober, H. Gender-related differences in food craving and obesity. *Yale J. Biol. Med.* 89: 161 - 173 (2016)
  - Hernandez, L. and Hoebel, B. G. Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. *Life Sci.* 42: 1705 - 1712 (1988)
  - Hirshberg, A. L. Sex hormones, appetite and eating behavior in women. *Maturitas* 71: 248 - 256 (2012)
  - Hormes, J. M., Timko, C. A. All cravings are not created equal. Correlates of menstrual versus non-cyclic chocolate craving. *Appetite* 57(1):1 - 5 (2011)
  - Hrupka, B. J., Smith, G. P., Geary, N. Ovariectomy and estradiol affects postingestive

- controls of sucrose licking. *Physiol. Behav.* 2: 243 - 247 (1996)
- Ikemoto, S., Panksepp, J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain. Res. Rev.* 31: 6-41 (1999)
  - Imperato, A., Carboni, E., Perezzi, L., Di Chiara, G. Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 28: 653 - 61 (1989)
  - Ito, R., Dalley, J. W., Robbins, T.W., Everitt, B. J. Dopamine releases in the dorsal striatum during cocaine seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J. Neurosci.* 22: 6247 - 53 (2002)
  - Kaczmarek, H. J., Kiefer, S. W. Microinjections of dopaminergic agents in the nucleus accumbens affects ethanol consumption but not palatability. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66: 307 - 12 (2000)
  - Kammoun, I., Saâda, B. W., Sifaou, A., Haouat, E., Kandara, H., Salem, L. B., Slama, C. B. Change in women's eating habits during the menstrual cycle. *Ann. End.* (2016)
  - Koob, G. F., Le Moal, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52 - 58 (1997).
  - Lanca, A. J., De Cabo, C., Arifuzzaman, A. I., Vaccarino, F. J. Cholecystokinergic innervation of nucleus accumbens subregions. *Peptides* 19: 859 - 868 (1998)
  - Linch, W. J. Acquisition and maintenance of cocaine self-administration in adolescent rats: effects of sex and gonadal hormones. *Psychopharmacology.* 197: 237 - 246 (2008)
  - Linch, W. J., Arizzi, M., N., Carroll, M. E. Effects of sex and estrous cycle on regulation of intravenously self-administered cocaine in rats. *Psychopharmacology.* 152: 132 - 139 (2000)
  - Long, J. A. and Evans, H. M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California,* 6: 1-148 (1922)
  - Lovick, T. A. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. *Braz. Journ. Med. Biol. Res.* 54: 314 - 320 (2012)
  - Maccioni, P., Pes, D., Carai, A. M., Gessa, G. L., Colombo, G. suppression by the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist, rimonabant, of the reinforcing and motivational properties of a chocolate-flavoured beverage in rats. *Behav. Pharmacol.* 19:197 - 209 (2008)

- Mandl, A. M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *J. Exper. Biol.* 28: 576 - 584 (1951).
- Marcondes, F.K, Bianchi F. J., Tanno, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 62: 609 - 614 (2002)
- Martel, P. and Fantino, M. Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward: a microdialysis study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51: 221- 6 (1996)
- McFarland, K. and Ettenber, A. Haloperidol differentially affects reinforcement and motivational processes in rats running an alley for intravenous heroin. *Psychopharmacology* 122: 346 - 350 (1995)
- Melendez, R. I., Rodd-Henricks, Z. A., Engleman, E. A., Ting-Kai L., McBride W. J., Murphy, J. M. Microdialysis of dopamine in the Nucleus Accumbens of Alcohol preferring (P) rats during anticipation and operant self-administration of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26: 318 - 325 (2002).
- Melis, T., Succu, S., Sanna, F., Boi, A., Argiolas, A., Melis, M. R. The cannabinoid antagonist SR 141716A (Rimonabant) reduces the increase of extra-cellular dopamine release in the rat nucleus accumbens induced by a novel high palatable food. *Neurosci. Lett.* 419: 231 - 235 (2007)
- Mermelstein, P.G, Becker, J.B., Surmeier, D. J. Estradiol reduces calcium current in rat neostriatal neurons through a membran receptor. *J. Neurosci.* 16: 595 - 604 (1996)
- Mogenson, G. J., Jones, D. L., Yim C. Y. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog. Neurobiol.* 14: 69 - 97 (1980)
- Obesity and Overweight. World Health Organization. [Internet] Retrieved Nov 5, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/v> (2010)
- Olds, J. Self-stimulation of the brain. *Science* 127: 315 - 324 (1958)
- Oswald, K. D., Murdaugh, D. L., King, V. L., Boggiano, M. M. Motivation for palatable food despite consequences in an animal model of binge-eating. *Int. J. Eat. Dis.* 44: 203 - 211 (2011)
- Pavlov, I. P. *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex.* Oxford University Press, Oxford (1927)
- Peciña, S., Berridge, K. C., Parker, L. A. Pimozide does not shift palatability: separation of anhedonia from sensorimotor suppression by taste reactivity. *Pharmacol. Biochem.*

- Behav. 58: 801 - 811 (1997)
- Pfaus G. J., Dansma, G., Nomikos, G. G., Wenkstern, D. G., Blaha, C. D., Phillips, A. G., Fibiger, H. C. Sexual Behavior enhances central dopamine transmission in the male rats. Brain Res. 530: 345 - 348 (1990)
  - Phillips, A. G. and Fibiger, H. C. Decreased resistance to extinction after haloperidol: implications for the role of dopamine in reinforcement. Pharmacol. Biochem. Behav. 10: 751-760 (1978)
  - Phillips, G. D., Robbins, T. W., Everitt, B. J. Mesoaccumbens dopamine–opiate interactions in the control over behaviour by a conditioned reinforcer. Psychopharmacology 114: 345 - 359 (1994)
  - Phillips, G. D., Stuber, G. D., Heien, M., Wightman, R. M., Carelli, R. M. Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. Nature 422: 614 - 618 (2003)
  - Pontier F. E., Tanda, G., Di Chiara, G., Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. Pharmacology 92: 12304-12308 (1995)
  - Rada, P., Avena, N. M., Hoebel, G. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. Neuroscience 134: 737-744 (2005)
  - Reddy, D. S and Kulkarni, S. K. Sex and estrous cycle-dependent changes in neurosteroid and benzodiazepine effects on food consumption and plus-maze learning behaviors in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 62: 53 - 60 (1999)
  - Reichelt, A. C., Abbott, K. N., Westbrook, F. R., Morris, J. M. Differential motivational profiles following adolescent sucrose access in male and female rats. Physiol. Behav. 157: 13 - 19 (2016)
  - Richardson, R. N and Roberts, C. S. D. Progressive schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. J. Neurosci. 66: 1 - 11 (1996)
  - Roitman, M. F., Stuber, G. D., Wightman, M. R., Carelli, R. M. Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. Journ. Of Neurosci. 24: 1265 - 1271 (2004)
  - Salamone, J. D., Steinpreis, R. E., McCullough, L. D., Smith, P., Grebel, D., Mahan, K. Haloperidol and nucleus accumbens depletion suppresses lever pressing for food but increase free food consumption in a novel food choice procedure. Psychopharmacology 104: 515 - 521 (1991)

- Salamone, J. D. and Correa, M. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav. Brain Res.* 137: 3 - 25 (2002)
- Schultz, W. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 191-197 (1997).
- Schultz, W., Apicella, P., Lyungberg, T. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J. Neurosci.* 13: 900 - 913 (1993)
- Segovia, K. N, Correa, M., Salamone, J. D. Slow phasic changes in nucleus accumbens during fixed ratio acquisition: a microdialysis study. *Neuroscience* 196: 178-188 (2011)
- Sienkiewicz-Jarosz, H., Scinska, A., Kuran, W., Ryglewicz D., Rogowski A., Wrobel E., Korkosz, A., Kukwa, A., Kostowski, W., Bienkowski P. Taste responses in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psy.* 76: 40 - 46 (2005)
- Simpson, J., Kelly, J. P. An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. *Behav. Brain Res.* 229: 289 - 300 (2012)
- Smith Y, Villalba R. Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov. Disord.* 23: 534 - 547 (2008)
- Sokolowsky, J. D., Conlan, A. N., Salamone, J. D. A microdialysis study of nucleus accumbens core and shell dopamine during operant responding in the rat. *Neuroscience* 86: 1001 - 1009 (1998)
- Sokolowsky, J. D., Salamone, J. D. The role of accumbens dopamine in lever pressing and response allocation. Effect of 6-OHDA injected into core and dorso-medial shell. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59: 557 - 566 (1998)
- Stelmanska, E., Sucajtis-Szulc, E. Enhanced food intake by progesterone-treated female rats is related to changes in neuropeptide genes expression in hypothalamus. *Endokrynol. Pol.* 65: 54 - 56 (2014)
- Stice, E., Spoor, S. Relation of reward from food intake and anticipated food intake to obesity: a functional magnetic resonance imagine study. *J. Abnorm. Psychol.* 177: 924 - 935

- Swalve, N., Smethells, J. R., Carroll, M. E. Sex differences in the acquisition and maintenance of cocaine and nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 233: 1005 - 1013 (2015)
- Thompson, T. L. and Moss, R. L. Modulation of mesolimbic dopaminergic activity over the rat estrous cycle. *Neurosci. Lett.* 229: 145 - 148 (1997).
- Tuomisto, T., Hetherington, M. M., Morris, M., Tuomisto, M. T., Turjanmaa, V., Lappalainen, R. Psychological and physiological characteristics of sweet food "addiction". *Int. J. Eat. Disord.* 25: 169 - 75 (1999)
- Uban, K. A., Rummel, J., Floresco, S. B., Galea, L. A. M. Estradiol modulates effort-based decision making in female rats. *Neuropsychopharmacology* 37: 390 - 401 (2012)
- Uher, R., Treasure, J., Heining, M., Brammer, M. J., Campbell, I. C. Cerebral processing of food-related stimuli: Effects of fasting and gender. *Behav. Brain. Res.* 169: 111 - 9 (2006)
- Ungerstedt, U. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367: 95 - 122 (1971)
- Volkow, N. D. and Wise, R. A. How can drug addiction help us understand obesity. *Nat. Neurosci.* 8: 555 - 60 (2005)
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J. Role of dopamine in drug reinforcement and addiction in humans: results from imaging studies. *Behav. Pharmacol.* 13: 355 - 366 (2002)
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Baler, R. D. Reward, dopamine and the control of food intake: implication for obesity. *Trends in Cognitive Sciences* 15: 37 - 46 (2011)
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Logan, J., Pappas, N. R., Wong, T. C., Zhu, W., Netusil, N., Fowler, J. S. Brain dopamine and Obesity. *Lancet* 357 (2001)
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Telang, F., Millard, J., Ma, J., Rao, M., Zhou, W., Wong, T. C., Pappas, N., Geliebter, A., Fowler, J. S. Exposure to appetitive food stimuli markedly activates the human brain. *Neuroimage* 21:179 - 1797 (2003)
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Telang, F., Jayne, M., Ma, Y., Pradhan, K. Evidence of gender differences in the ability to inhibit brain activation elicited by food stimulation. *PNAS.* 106: 1249 - 54 (2009).
- Weingarten, H. P., Elston, D. Food Cravings in a college population. *Appetite* 17: 167 - 175 (1991)



- Willhun, I., Wanat, J. M., Clark, J. J., Phillips, P. E. M. Dopamine signaling in the nucleus accumbens of animals self-administering drugs of abuse. *Behav. Neurosci.* 3: 29 - 71 (2010)
- Wilson, C., Nomikos, G.G., Collu, M., Fibiger, H. C. Dopaminergic correlates of motivated behavior: importance of drive. *J. Neurosci.* 15: 5169 - 5178 (1995)
- Wise R. A. Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis. *Behav. Brain Sci.* 5: 39 - 87 (1982)
- Wise, R. A. Neuroleptic-Induced "Anhedonia" in Rats: Pimozide blocks reward quality of food. *Science* 201: 262 - 264 (1978)
- Wise, R. A. Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacology* 29: 203 - 210 (1973)
- Wise, R. A. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 483 - 494 (2004)
- Wise, RA. Forebrain substrates of reward and motivation. *Journ. Comp. Neurol.* 493: 115 - 121 (2005)
- Wise, R. A. Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361: 1149 – 1158 (2006)
- Wyvell, C. L. and Berridge, K. C. Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward “wanting” without enhanced “liking” or response reinforcement. *J. Neurosci.* 20: 8122 - 30 (2000)
- Xiao, L. and Becker, J. B. Quantitative microdialysis determination of extracellular striatal dopamine concentration in male and female rats: effect of estrous cycle and gonadectomy. *Neurosci. Lett* 180: 155 - 158 (1994)
- Yoest, K. E., Cummings, J. A., Becker, J. B. Estradiol, dopamine and motivation. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 14: 83 - 89 (2014)
- Yokel, R. A. and Wise, R. A. Increased lever pressing for amphetamine after pimozide in rats: implications for a dopamine theory of reward. *Science* 187: 547 - 549 (1975)
- Zaru, A., Maccioni, P., Colombo, G., Gessa, G. L. The dopamine  $\beta$ -hydroxylase inhibitor, nepicastat, suppresses chocolate self-administration and reinstatement of chocolate seeking in rats. *Brit. J. Nut.* 110: 1524 - 1533 (2013)
- Zaru, A., Maccioni, P., Colombo, G., Gessa, G. L. Disulfiram inhibits chocolate self-administration and reinstatement to chocolate seeking in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 148: 119 - 127 (2016)

- Zellner, D. A., Garriga-Trillo, A., Rohm, E., Ceteno, S., Parker, S. Food liking and craving: A cross-cultural approach. *Appetite*. 33: 61 - 70 (1999).
- Zhou, L., Ghee, M. S., See, R. E., Reichel, C. M. Oxytocin differentially affects sucrose taking and seeking in male and female rats. *Behav. Brain. Res.* 283: 184 - 190 (2015)