



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**  
***DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE***

***CICLO XXI***

**Ruolo dell'acetaldeide**  
**nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico.**  
**Studio comportamentale nel ratto.**

***Coordinatore:***

**Prof. Egidio Miele**

***Autore:***

**Dott.ssa Anna Rita Assaretti**

***Tutore:***

**Dott.ssa Alessandra T. Peana**

# Indice

<b>1. Introduzione.....</b>	<b>4</b>
1.1 Le tossicodipendenze .....	4
1.2 L'alcolismo.....	5
1.3 Cenni storici.....	7
1.4 L'etanolo.....	8
1.5 Farmacocinetica.....	9
1.6 Farmacodinamica.....	15
1.7 Effetti sull'organismo.....	16
1.8 Intossicazione acuta.....	22
1.9 Intossicazione cronica.....	23
1.10 Meccanismi di rinforzo nell'alcolismo e sistemi neurotrasmettitoriali coinvolti.....	25
1.11 Farmacoterapia dell'alcolismo.....	31
<b>2. Scopo della ricerca.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Materiali e metodi.....</b>	<b>39</b>
3.1 Animali.....	38
3.2 Place Preference condizionata.....	39
3.3 Procedura e disegno sperimentale.....	40
3.4 Sostanze e trattamenti.....	43
3.5 Livelli ematici di etanolo e acetaldeide.....	44

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico.  
Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di  
Sassari

3.6 Analisi statistica.....	44
<b>4. Risultati .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Discussione.....</b>	<b>72</b>
<b>6. Conclusione.....</b>	<b>82</b>
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>83</b>
<b>8. Ringraziamenti.....</b>	<b>92</b>

# 1. Introduzione

## 1.1 Le tossicodipendenze

La tossicodipendenza è la condizione di chi richiede l'esigenza ripetuta e irrefrenabile di assumere una sostanza, nonostante il danno fisico, psicologico, affettivo, emotivo o sociale conseguente a tale assunzione. Si tratta di una sindrome scatenata dall'uso di sostanze stupefacenti e psicotrope, molte delle quali letali, che colpisce tutte le categorie sociali, anche se riguarda maggiormente le fasce giovanili.

Le attuali conoscenze nel settore dei comportamenti di abuso e dipendenza da sostanze sono dimostrate da anni di ricerche sia biochimiche che cliniche e consentono di sostenere che la dipendenza da sostanze è una malattia organica del cervello, caratterizzata da un andamento recidivante. Infatti tale malattia si può manifestare anche dopo un lungo periodo di astensione, durante il quale il soggetto è riuscito ad interrompere l'uso abituale. Resta, quindi, poco spazio per le teorie di tipo sociale e psicologico, che focalizzano la dipendenza da sostanze come una serie di comportamenti correlati a deviazioni del soggetto dalla tradizionale condotta o a caratteristiche atipiche di personalità, nonostante lo sviluppo della società occidentale, basato essenzialmente sul consumismo, ha favorito l'incontro tra uomo e sostanza d'abuso, così come la stabilizzazione di un comportamento deviante tramite la psicoterapia può risultare utile in un percorso riabilitativo.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

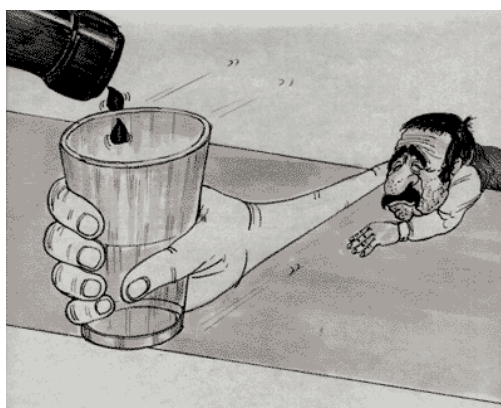
## 1.2 L'alcolismo



L'alcolismo è una condizione che imperversa in tutto il mondo. Si stima che negli Stati Uniti la popolazione coinvolta sia il 3,9%, in Svizzera il 2,4%, in Francia il 2,9%, ma le percentuali aumentano se si considerano anche le forme più lievi.

In un paese come l'Italia l'utilizzo di alcol rientra nella cultura enogastronomica che ci caratterizza; basti pensare alla vasta produzione vinicola e di liquori, e allo sviluppo delle esportazioni italiane attuate su scala internazionale.

Negli ultimi anni si è registrato un sensibile incremento del consumo medio di alcol che ha mostrato un andamento di crescita lineare. Tutte le bevande alcoliche sono potenzialmente capaci di scatenare l'alcolismo, poiché ciò che conta è la quantità di alcol puro ingerito, qualunque sia la bevanda che lo contiene.



Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

La nuova cultura del bere ha portato a un progressivo cambiamento delle abitudini apportando nuovi ritmi di assunzione; gli aperitivi in particolare per l'assunzione alcolica antecedente al pasto che risulta più nociva o i digestivi, assunti dopo i pasti, tipicamente ad elevato tasso alcolico.



Anche la scelta del tipo di bevanda, ampiamente sostenuta da campagne pubblicitarie attraverso i mass-media, ha subito variazioni nel tempo, incentivando l'utilizzo dei superalcolici e della birra anche nel nostro paese.

Le cause dell'alcolismo sono numerose. Familiarità, età e ambiente possono concorrere a determinare una condizione di alcol-dipendenza.

Recenti studi hanno evidenziato che nei figli di genitori biologici alcolisti adottati alla nascita da famiglie di non bevitori, il rischio di diventare alcolisti venisse ad aumentare di 3-4 volte. Altro fattore di rischio, detto di familiarità, è l'incremento dello stesso rischio di 3-4 volte nei parenti stretti di soggetti con dipendenza da alcol. Tuttavia, nell'induzione alla comparsa di una condizione di dipendenza intervengono anche altre variabili, come i fattori socio-ambientali. Possono essere considerati fattori a rischio alcuni fattori della vita, come la solitudine, la disoccupazione, l'età giovanile. Tendenzialmente, l'alcolismo si sviluppa in particolare in individui affettivamente immaturi, molto dipendenti dalle persone che stanno loro intorno e che abbiano delle significative tendenze depressive. Spesso si manifesta come conseguenza ad un'inadattabilità alla vita sociale o a una tendenza all'ansia, sotto l'apparenza, a volte ingannevole, dell'autorità.

L'alcolismo è una minaccia per la vita e spesso porta alla morte, specialmente come causa di patologie epatiche. Tuttavia possono presentarsi anche altri rischi di morte derivanti dall'assunzione di alcol, come gli incidenti sul lavoro o stradali, o il suicidio. Anche l'omicidio è un crimine alcol-correlato, così come qualsiasi forma di maltrattamento, violenza o reato sessuale.

### **1.3 Cenni storici**

Le bevande alcoliche prodotte per fermentazione erano conosciute fin dall'antichità da quasi tutte le civiltà ed usate sia per ragioni mediche o igieniche; infatti l'alcol è noto per le sue proprietà antisettiche. Inoltre l'uso dell'alcol ha anche significati simbolici o religiosi, come nell'antica Grecia nell'ambito dei riti dionisiaci, nella religione cristiana come simbolo dell'Eucarestia o nella Pasqua ebraica.

L'Islam invece proibisce il consumo di bevande alcoliche.

Durante il XVI secolo il vino assunse la denominazione di Aqua Vitae (acqua della vita), in omaggio alla tradizione medievale che associava il vino alla salute e al benessere.

Tuttavia con la rivoluzione industriale, nel corso del XIX secolo, il consumo di alcolici inizia ad essere considerato diversamente, sia per il rapido incremento della sua diffusione, sia per i sempre più frequenti casi di morte alcol-correlati. In questo stesso periodo inoltre gli alcolici assunsero un grosso significato economico e vennero tassati in modo sempre più consistente.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico.  
Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Durante gli anni '20 del secolo scorso, negli Stati Uniti fu emessa la “dry law” (legge asciutta), che proibiva la produzione e il consumo di bevande alcoliche. Ben presto la criminalità organizzata si impadronì illegalmente del mercato e attraverso la produzione e il traffico clandestino i consumatori continuavano ad esserne forniti. Il conflitto tra malavita e tutori della legge divenne talmente aspro e diffuso da indurre una campagna in nome della sicurezza nazionale per l'abrogazione della “dry law”. Successivamente ciò fu ottenuto.

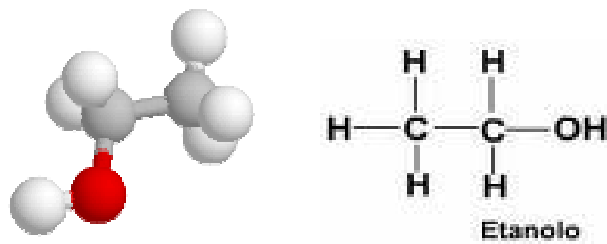
In seguito, già nel 1940 la percentuale di bevitori di alcolici negli Stati Uniti era pari al 30% della popolazione.

In questo modo l'alcolismo, tra le dipendenze da sostanze psicoattive, è quella nei confronti della quale da molto tempo vengono condotti studi scientifici. Fu Magnus Huss, professore di Medicina Interna all'Università di Stoccolma, a coniare i termini “alcolismo” e “alcolista”, già nel 1849. Infine nel 1960 Jellinek fu il primo a considerare l'alcolismo come una malattia cronica con genesi multifattoriale.

## **1.4 L'etanolo**

Quando si parla di etanolo (ETOH) ci si riferisce ad un alcol a catena corta, la cui formula bruta è  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ .





**Fig. 1-** Molecola dell'etanolo (ETOH).

A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore dall'odore caratteristico. E' tendenzialmente volatile, estremamente infiammabile, solubile nei grassi e nell'acqua.

Si ottiene mediante fermentazione di zuccheri o amidi di origine vegetale. Tale processo è determinato da specifici microrganismi. Accanto ai "fermentati" (vino, birra) esiste anche un'altra categoria di bevande alcoliche, ossia quella dei distillati (grappe, whisky, ecc.).

## 1.5 Farmacocinetica

L'alcol, una volta ingerito, è assorbito per la maggior parte dalla mucosa intestinale in meno di un'ora. L'assorbimento è più rapido per le bevande ad elevata gradazione alcolica o per quelle addizionate ad anidride carbonica, o, ancora, se assunte a stomaco vuoto.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

In seguito l'ETOH diffonde nei liquidi corporei e raggiunge il più alto picco plasmatico tra i trenta minuti e le due ore dopo l'assunzione. Nell'encefalo dopo circa mezz'ora raggiunge un valore di concentrazione molto vicino a quella del sangue grazie alla sua capacità di attraversare facilmente la barriera ematoencefalica.

Solo una piccola percentuale di ETOH viene escreta dall'organismo in forma intatta, soprattutto attraverso i reni e i polmoni.

La quantità restante, circa il 90-95%, va incontro ad un processo metabolico, principalmente a livello epatico.

Una volta ingerito l'alcol arriva allo stomaco dove entra in azione un alcol deidrogenasi. Questa essendo localizzata sulla superficie della mucosa di tutto il tratto gastroenterico, ma con una massima concentrazione gastrica, rappresenta una prima barriera all'assorbimento di questa sostanza, riducendone così la quantità di alcol che entra nel circolo sistemico.

Questo enzima è presente in una concentrazione significativamente differente tra uomini e donne; per questa ragione la donna tende ad assumere quantità di alcol inferiori rispetto all'uomo, in quanto possiede un minore attività enzimatica.

La quantità di alcol assorbita dal tratto gastroenterico giunge tramite la vena porta al fegato, dove viene metabolizzato da due sistemi enzimatici diversi:

1. L'alcol deidrogenasi
2. Gli enzimi microsomiali

Il primo, localizzato nel citosol, metabolizza circa il 90% della dose di alcol che arriva al fegato. Esso trasforma l'alcol in acetaldeide (ACD) con liberazione di  $H^+$  e consumo di  $NAD^+$  :

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico.  
Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari



Queste due ossidazioni successive provocano uno sbilanciamento del rapporto  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e all'eccesso di  $\text{H}^+$  all'interno della cellula, con conseguente aumento dell'acidità dell'ambiente per cui la cellula adotta una serie di misure per innalzare il pH: così la via metabolica che dal piruvato porta alla formazione di glucosio viene interrotta e il piruvato viene trasformato in lattato.

Questa inversione metabolica porta ad alcune importanti conseguenze, come all'ipoglicemia nel diabetico insulina-dipendente, che assume particolare rilievo nell'intossicazione acuta. In aggiunta, la malnutrizione che spesso si accompagna in soggetti alcolisti non fa altro che ridurre le riserve glucidiche. Inoltre l'eccesso di acido lattico intracellulare può causare acidosi lattica interferendo con l'escrezione renale degli acidi e in particolare dell'acido urico, provocando la comparsa di gotta.

Anche l'ossidazione degli acidi grassi viene compromessa. Infatti gli  $\text{H}^+$  in eccesso entrano nei mitocondri dove vengono impiegati in alternativa agli  $\text{H}^+$  derivanti dal metabolismo degli acidi grassi. Di conseguenza questa via metabolica viene bloccata e si verifica un eccesso di grassi che si depositano nel fegato provocando steatosi e inizio al danno epatico da ETOH. Questo è significativo che l'assunzione di alcol causa alterazioni del metabolismo sia degli zuccheri che degli acidi grassi.

Dopo che l'alcol viene trasformato in ACD e poi in acetato, questo esce dal fegato e tramite il circolo sanguigno viene veicolato ad altri tessuti dove, soprattutto a livello cardiaco, viene attivato ad acetil-CoA. A sua volta questa molecola può entrare nel ciclo di Krebs e produrre energia, oppure, se prodotto in eccesso, essere trasformato in corpi chetonici. A partire dall'acetil-CoA si possono formare anche acidi grassi che, uniti al glicerolo, formano trigliceridi da depositare come riserva energetica.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari



**Fig. 3-** Schema riassuntivo riguardante il metabolismo dell'ETOH.

Il secondo sistema è rappresentato dagli enzimi microsomiali o MEOS, in particolare da un NADPH-ossidasi. Questo enzima è localizzato a livello del reticolo endoplasmatico liscio degli epatociti, che si presenta ipertrofico negli alcolisti.

Il MEOS è un sistema inducibile da parte dell'ETOH, ossia tende a diventare più attivo con l'aumentare dell'assunzione di alcol.

Il MEOS è anche un sistema aspecifico, capace di metabolizzare anche molti farmaci. Per questo motivo, l'alcolista, quando è sobrio, richiede un dosaggio più elevato di farmaco per ottenere lo stesso effetto terapeutico. Al contrario, quando un frequente bevitore assume farmaci in stato di ebbrezza, il principio attivo viene metabolizzato più lentamente e i suoi effetti, a parità di dose, sono nettamente maggiori, dato che farmaco ed ETOH competono per lo stesso sistema enzimatico.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Infine, esiste una terza via metabolica mediata dall'enzima catalasi, la cui azione risulta più determinante a livello cerebrale.

Il citocromo P-450, e in generale la catena respiratoria mitocondriale, se stimolato in eccesso o in presenza di sostanze antiossidanti, producono nella cellula un accumulo di radicali liberi. In particolare risultano in eccesso l'ione superossido, radicali idrossilici e il perossido di idrogeno, sostanze capaci, a livello cellulare, di causare gravi alterazioni della permeabilità di membrana, nei segnali intracellulari e nella sintesi proteica.

L'escrezione dei prodotti derivanti dal metabolismo dell'alcol (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O) avviene attraverso il filtro renale, il sudore e l'aria espirata.

La capacità di metabolizzazione epatica dipende dalle condizioni del fegato stesso.

Fattori come il sesso, l'età, la presenza di patologie o l'abuso di farmaci psicotropi possono far variare la funzionalità di tali processi metabolici.

Anche gruppi etnici diversi hanno capacità metaboliche differenti. Ad esempio nel 50% degli asiatici esiste una variante genetica inattiva di una delle isoforme dell'aldeide deidrogenasi, mentre negli altri è presente un'isoforma dell'alcol deidrogenasi con ridotta attività, comportando così una minore tolleranza e l'insorgenza di una sindrome alcolica a dosaggi più bassi.

## 1.6 Farmacodinamica

Un tempo si riteneva che gli effetti dell'ETOH derivassero da interazioni aspecifiche con i lipidi di membrana. Al contrario oggi si sostiene che l'azione dell' ETOH si espliciti attraverso un'interazione con recettori specifici localizzati sulla membrana cellulare, dalla quale scaturisce un aumento della trasmissione inibitoria e una riduzione di quella eccitatoria a livello del sistema nervoso centrale.

In particolare l'ETOH promuove la trasmissione nervosa del neurotrasmettitore GABA (acido  $\gamma$ - aminobutirrico), mentre inibisce l'azione dei sottotipi recettoriali NMDA e kainato specifici per gli aminoacidi eccitatori.

L'ETOH potenzia la trasmissione nervosa gabaergica, stabilizzando il recettore-canale GABA nello stato aperto; aumenta così la conduttanza allo ione  $\text{Cl}^-$  e di conseguenza, si riduce, mediante iperpolarizzazione, l'eccitabilità neuronale. Tramite questo meccanismo L'ETOH incrementa fortemente le azioni deprimenti delle benzodiazepine e dei barbiturici.

Il potenziamento dell'ETOH sulla funzione GABAergica avviene anche attraverso un meccanismo indiretto che coinvolge i neurosteroidi, i quali sono potenti modulatori endogeni dei recettori GABA. L'ETOH, infatti, somministrato nell'animale da esperimento, determina un rilevante incremento dei livelli plasmatici di neurosteroidi.

L'ETOH, in aggiunta, agisce anche sui recettori NMDA. Infatti si lega in una tasca idrofobica del recettore bloccando l'attività, con conseguente riduzione del tono eccitatorio glutammatergico (Fumagalli, 2006). In particolare impedisce l'apertura del recettore-canale bloccando il passaggio di  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^+$  e quindi la depolarizzazione, causando l'effetto sedativo e la perdita di memoria a breve termine che si può verificare nell'intossicazione acuta da ETOH.

L'esposizione prolungata all'ETOH determina una serie di fenomeni adattativi a livello recettoriale, che conducono ad una riduzione della sensibilità all'azione dell'ETOH. Il meccanismo principale è l'up-regulation dei recettori accompagnato da un incremento della sintesi delle proteine che costituiscono le subunità recettoriali. Infatti, nell'alcolista, l'aumento del tono glutammatergico, non sufficientemente equilibrato dal tono inibitorio GABAergico, sarebbe alla base dell'ipereccitabilità del sistema nervoso centrale che avviene nel corso della sindrome d'astinenza.

## **1.7 Effetti sull'organismo**

### **Sistema nervoso centrale**

L'alcol esercita effetti significativi sul sistema nervoso centrale, primariamente come depressore dei centri cerebrali superiori.

Il meccanismo di questa azione centrale non è completamente chiaro.

Le principali azioni sono:



1. aumento dell' inibizione mediata dal GABA, aminoacido inibitorio del sistema nervoso centrale: l'ETOH aumenta l'azione del GABA sui recettori GABA<sub>A</sub> in modo simile alle benzodiazepine;
2. inibizione dell'ingresso del Ca<sup>+</sup> voltaggio-dipendente: l'ETOH inibisce il rilascio dei trasmettitori in risposta alla depolarizzazione delle terminazioni nervose attraverso l'inibizione dell'apertura dei canali del Ca neuronali;
3. inibizione della funzione dei recettori NMDA.

Attivando, tuttavia, il rilascio di dopamina (DA) a livello del sistema limbico, l'effetto iniziale dell'alcol risulta stimolante e si traduce in allentamento della tensione, aumento della loquacità, disinibizione. Non di rado l'effetto disinibitorio dell'alcol può condurre a comportamenti violenti.

Altre attività dell'ETOH, la cui importanza non è ben chiara, sono l'aumento degli effetti eccitatori prodotti dai recettori nicotinici e dai recettori serotoninergici 5-HT<sub>3</sub>.

Al crescere delle dosi gli effetti dell'alcol iniziano ad interferire con i processi ideativi, con la coordinazione motoria, con l'equilibrio, con l'articolazione del linguaggio, e con la vista (per interferenza con i canali del calcio nella membrana delle cellule cerebrali).

L'innalzamento del tono dell'umore lascia spazio, a questo punto, all'effetto deprimente che si traduce in sonnolenza, appannamento della vista, rallentamento dei riflessi, mancanza dell'attenzione fino a depressione.

L'alcol possiede anche effetti ipnotici e attenua il dolore; svolge inoltre una funzione ansiolitica. Il sonno indotto dall'alcol presenta comunque delle differenze nei confronti di quello fisiologico, rispetto al quale è meno ristoratore.

La somministrazione cronica causa sindromi neurologiche irreversibili, come la neuropatia periferica o la degenerazione cerebrale, dovute all'ETOH stesso o ai suoi metaboliti, o secondarie alla carenza di tiamina che viene solitamente osservata negli alcolisti.

Molti alcolisti mostrano difficoltà di apprendimento per compromissione della memoria, sia a breve che a lungo termine, effetto che tende a scomparire con l'astensione.

Inoltre nell'alcolista si può presentare depressione, ansia, allucinazioni uditive, illusioni paranoiche.

### **Sistema cardiocircolatorio**

L'ingestione di ETOH provoca vasodilatazione cutanea e aumento del flusso sanguigno a livello periferico, con aumentata perdita di calore (dalla quale scaturisce la tipica sensazione di calore). La perdita di calore fa diminuire la temperatura corporea, effetto che, associato ad un'azione depressoria sui centri regolatori della temperatura a livello centrale, aumenta il rischio di morte per ipotermia.

L'alcol ha inoltre degli effetti a livello cardiaco: provoca aritmie e deprime la contrattilità del muscolo cardiaco, portando a lungo termine ad una cardiomiopatia. Inoltre provoca aumento della pressione sanguigna. Questi ultimi elementi insieme sembrano essere alla base dell'aumento di incidenza che si osserva in chi beve tra i 40 e 60 gr di alcol al giorno.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Infine l'alcol diminuisce l'aggregazione piastrinica (fluidifica il sangue), altera la produzione di eritrociti (anemia megaloblastica), abbassa le difese immunitarie. Questi effetti sono temporanei e regrediscono con l'astinenza, ma facilitano la comparsa di infezioni e tumori.

Tuttavia un moderato consumo giornaliero (20-40 gr/dì) invece è correlato ad una riduzione di circa il 30% della mortalità associata a ischemia miocardica. Questo effetto è dovuto all'inibizione dell'aggregazione piastrinica ed ad un aumento del colesterolo HDL, con conseguente protezione dalle coronaropatie e prevenzione dell'aterosclerosi.

### **Apparato gastroenterico**

L'ingestione di alcol provoca un aumento della secrezione salivare e gastrica, effetti riflessi prodotti dal gusto e dall'azione irritante di un'aumentata secrezione a livello gastrico. L'azione irritante locale dell'ETOH sulle mucose causa esofagiti e gastriti, che possono essere accompagnate da dolore addominale, anoressia, vomito e sanguinamento. I problemi infiammatori dell'apparato digerente sono reversibili, fatta eccezione per una grave complicanza: le varici esofagee. L'alcol è inoltre responsabile di caratteristiche formazioni cancerose (in particolare alla bocca, alla lingua, all'esofago e allo stomaco).

In bevitori cronici di alcol si osserva generalmente malassorbimento a livello intestinale e diarrea, probabilmente dovuti a cambiamenti morfologici dell'epitelio intestinale (con appiattimento dei villi) e una diminuzione degli enzimi digestivi.

L'alcol ha un effetto tossico sia acuto che cronico sul pancreas, provocando pancreatici, probabilmente per un'azione tossica diretta sulle cellule degli acini pancreatici.

I maggiori effetti tossici si manifestano sul fegato.

Uno dei primi effetti della tossicità è l'accumulo di grasso (lipidosi), che avviene anche dopo l'assunzione di dosi relativamente basse.

Il danno progredisce verso un'irreversibile necrosi e fibrosi epatica: l'aumento ematico della  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasi (GGT) è un ottimo indice di danno epatico. La cirrosi è un fattore di rischio per l'epatocarcinoma (HCC).

### **Apparato genitale**

Sia l'esposizione acuta che cronica all'alcol provoca impotenza nell'uomo. Negli alcolisti cronici, talvolta, si osserva atrofia testicolare irreversibile con conseguente sterilità, impotenza e ginecomastia. Questi effetti sono sia secondari a un'alterata funzione dell'ipotalamo, che diretti sulle cellule di Lydig, provocando un'inibizione della sintesi steroidea testicolare. Le donne alcoliste, invece, possono andare incontro ad amenorrea, sterilità ed aborti spontanei. L'effetto sulle funzioni sessuali nelle donne è meno noto.

L'ETOH riduce la secrezione di ossitocina, provocando così un ritardo del parto.

## **Embrio e fetopatia**

L'assunzione di alcol durante la gravidanza provoca effetti tossici gravi sull'embrione e sul feto. Nel primo trimestre di gravidanza aumenta significativamente il rischio di aborto spontaneo. Nel bambino si osserva tipicamente la sindrome alcolica fetale, caratterizzata da tre condizioni: anomalie cranio-facciali (tra cui microcefalia), disfunzioni del sistema nervoso centrale (iperattività, deficit dell'attenzione, ritardo mentale e disfunzione dell'apprendimento) e rallentamento della crescita.

## **Effetti secondari**

Gli etilisti tendono a sostituire con le bevande alcoliche gran parte degli altri alimenti della dieta, e questo li predispone a deficienze nutrizionali, in particolare gravi carenze del gruppo B, da cui derivano rilevanti ripercussioni sulla memoria (sindrome di Korsakoff).

La carenza di tiamina è alla base di una serie di patologie tipicamente osservate negli etilisti, come la neuropatia periferica, la psicosi di Korsakoff e l'encefalopatia di Wernicke.

L'alcol provoca un aumento della secrezione di ormoni steroidei dal surrene, stimolando l'ipofisi anteriore a secernere ACTH (sindrome pseudoCushing).

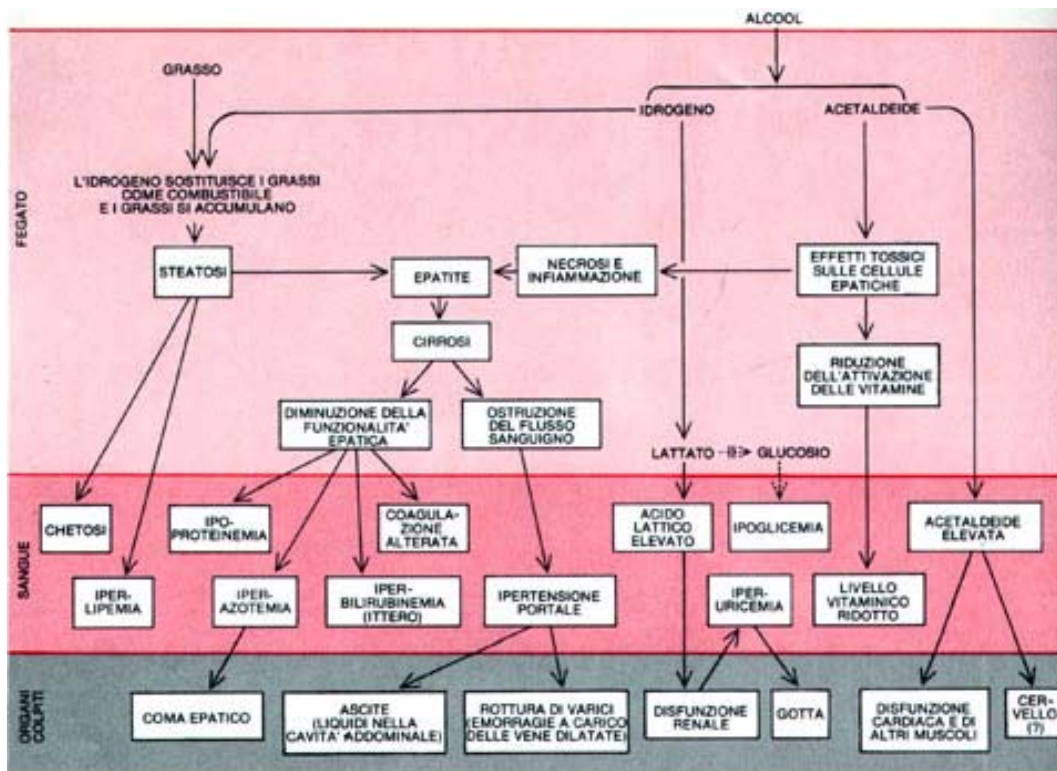


Fig. 4- Schema riassuntivo riguardante gli effetti dell'ETOH sull'organismo.

## 1.8 Intossicazione acuta

Per ingestione di elevate dosi di alcol si possono avere una serie di sintomi che vanno dalla semplice ebbrezza al coma; le diverse fasi sono:

1. Ebbrezza, euforia, sensazione di benessere, scarso autocontrollo, riduzione delle capacità di giudizio, disinibizione.
2. Depressione del sistema nervoso centrale con mancanza di lucidità, torpore, rallentamento ideomotorio, perdita di coordinamento dei movimenti.
3. Induzione del sonno con rapida alternanza tra le diverse fasi e maggiore durata dello stadio profondo.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

4. Depressione respiratoria con perdita di conoscenza e coma. Questa eventualità dipende dalle quantità di alcol ingerita ma anche dalla tolleranza del singolo individuo.

## **1.9 Intossicazione cronica**

L'abuso di alcol può condurre all'instaurarsi dei fenomeni di tolleranza e dipendenza. La condizione di dipendenza, una volta che si è stabilita attraverso diversi meccanismi fisiologici e psicologici, è caratterizzata dal bisogno incontrollabile di bere (*craving*). Per *craving* si intende una particolare *appetizione patologica, un desiderio intenso, una brama, una fame* verso una determinata sostanza, che si esplica nel desiderio spasmodico di assumerla o, nel caso sia impossibile, nella manifestazione di sintomi tipici di ansia, irritabilità, depressione, insonnia, aggressività e nei caratteristici *comportamenti di ricerca*. La dipendenza da alcol è dimostrata dai sintomi osservati in seguito alla deprivazione. Inizialmente i sintomi principali dell'astinenza sono tremore, nausea, aumento della sudorazione, febbre. Segue delirium tremens, caratterizzato da allucinazioni, delirio, tachicardia, convulsioni tonico-cloniche, sino anche ad un esito fatale.

Con il termine alcolismo, quindi, si identifica una condizione di dipendenza da alcol ("addiction") caratterizzata dalla presenza di tre o più dei seguenti elementi:

1. Tolleranza (diminuzione progressiva dell'effetto dell'alcol, cui segue la necessità dell'assunzione di dosi più elevate allo scopo di mantenere l'effetto desiderato).
2. Astinenza (comparsa di una determinata sintomatologia a seguito della sospensione o della riduzione della quantità assunta).
3. Assunzione di alcol in quantità o per periodi maggiori di quanto programmato.
4. Fallimento dei tentativi di controllarne l'uso.
5. Interruzione o forte riduzione delle attività lavorative, sociali e ricreative.
6. Assunzione dell'alcol a dispetto delle conseguenze di ordine fisico e/o psicologico.

La diagnosi di abuso risulta caratterizzata dalla presenza di uno o più dei seguenti elementi:

1. incapacità ad assolvere i principali compiti connessi con il ruolo sul lavoro, a scuola o a casa;
2. ricorrente uso dell'alcol in situazioni fisicamente rischiose (per es., guidando una macchina);
3. presenza di ricorrenti problemi legali correlati all'uso della sostanza stessa;
4. presenza di ricorrenti problemi sociali o interpersonali causati o esacerbati dagli effetti dell'alcol.



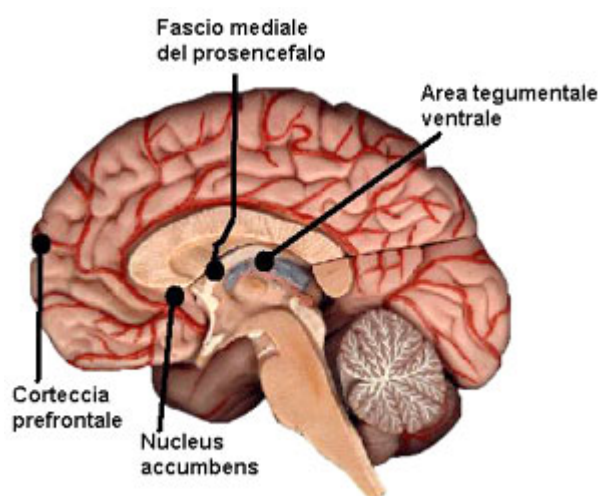
## **1.10 Meccanismi di rinforzo nell'alcolismo e sistemi neurotrasmettitoriali coinvolti**

Il rinforzo viene definito come un'evento che aumenta la probabilità di una risposta biologica (Johanson 1992) e alcune delle azioni farmacologiche che primariamente l'alcol esercita costituiscono stimoli di rinforzo sia positivo che negativo. L'ingestione di alcol risulta infatti associata ad una sensazione piacevole o comunque ad un evento positivo. Il miglioramento del tono dell'umore aumenta la possibilità che esso venga ulteriormente desiderato. All'opposto (o paradossalmente) anche i rinforzi negativi correlati all'abuso di alcol possono condurre un individuo ad assumerne ulteriori quantità: ad esempio in individui nei quali l'alcol viene assunto allo scopo di placare uno stato di ansia o depressione o di evitare l'insorgenza di una sindrome astinenziale. Si può ritenere che conseguenza delle suddette proprietà di rinforzo positivo e negativo sono alla base della reiterazione del comportamento di ricerca dell'alcol e, quindi, dell'istaurarsi della condizione di alcolismo, nonché alla base delle recidive che avvengono anche dopo lunghi periodi di astensione (*relapse*).

Stimoli o eventi di per sé neutrali possono acquisire proprietà di rinforzo quando ripetutamente associati con gli effetti di rinforzo (rinforzo secondario) dell'alcol (Babbini e Gaiardi 1992): ad esempio, quando una persona entra in un bar, nel quale usualmente consuma alcolici, può sperimentare sensazioni positive analoghe a quelle indotte dal consumo di alcool. Anche gli effetti di rinforzo secondario possono essere positivi o negativi; un esempio di effetto di rinforzo negativo condizionato può essere l'associazione di un particolare stimolo con l'insorgenza della sindrome astinenziale da alcol.

## Sistema dopaminergico

Come oramai ampiamente dimostrato (Brodie et al., 1990; Gessa et al., 1985) l'effetto di rinforzo positivo posseduto dall' ETOH è associato alla sua azione attivatoria sulla funzione dopaminergica a livello dell'area ventrale tegmentale (*ventral tegmental area* – VTA), cui consegue un aumento della concentrazione della DA a livello del *nucleus accumbens* (NAC).



**Fig. 5-** Fibre dopaminergiche che dall'*Area Ventrale Tegmentale* si proiettano nel *Nucleus Accumbens*.

All'esposizione cronica all'alcol conseguono dei processi adattativi nella funzione mesolimbica dopaminergica, consistenti principalmente in una ipofunzione della stessa, condizione questa ritenuta fondamentale per il mantenimento della condizione di dipendenza: alla base del prolungamento dell'assunzione di alcol, nonché del ripristino del comportamento di ricerca di alcol dopo un periodo astinziale, vi sarebbe pertanto un tentativo di compensare la diminuita azione di "efficacia" dell'alcol sul rilascio di DA.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Inoltre l'interruzione brusca di una assunzione cronica conduce ad un ulteriore decremento dell'attività dopaminergica neuronale a livello della VTA, nonché dei livelli extracellulari di DA a livello del NAC: ciò suggerisce che l'ipofunzione dopaminergica a livello mesolimbico sia di fondamentale importanza per il mantenimento del comportamento di dipendenza. In altre parole, l'assunzione cronicamente protratta di alcol risulta "necessaria" al fine di compensare la diminuzione del rilascio di DA e costituirebbe inoltre la base farmacologica motivazionale che conduce alla ricerca di alcol dopo un periodo astinenziale.

Il deficit di DA che si osserva in soggetti con storia di alcol-dipendenza (Diana et al., 2003) perdura molto al di là della sindrome astinenziale acuta. Un recente lavoro evidenzia infatti che la concentrazione di DA a livello del VTA permane in bassa concentrazione (Bailey et al., 2000) anche dopo due mesi dall'interruzione. La persistenza di tale alterazione giustifica sia la vulnerabilità alle recidive (*relapse*), che il protrarsi degli effetti avversi caratteristici della sindrome astinenziale. Studi clinici (Heinz et al., 1995) hanno evidenziato che una bassa percentuale di recupero della funzionalità recettoriale della DA rappresenta un fattore determinante di recidiva all'assunzione di alcol confermando ulteriormente la rilevanza comportamentale di una persistente alterazione del sistema dopaminergico nell'abuso di alcol.

Risulta, quindi, evidente il ruolo centrale del sistema dopaminergico negli effetti di rinforzo positivo esibiti dall' ETOH: sono comunque numerose le osservazioni che indicano il coinvolgimento di altri sistemi neurotrasmettitoriali, quali quelli oppiaceo e serotoninergico nel meccanismo di rinforzo positivo correlato all'ingestione di ETOH.

## **Sistema oppioide**

Il sistema oppioide endogeno è implicato nei meccanismi neurobiologici alla base sia dell'induzione che del mantenimento del comportamento di assunzione di alcol.

La distruzione di neuroni dopaminergici a livello mesolimbico non ha mostrato influire significativamente (Ikemoto et al., 1997) sul consumo di alcol in ratti che avevano avuto un precedente contatto con l'alcol stesso, mentre ha inibito significativamente l'acquisizione del comportamento di ingestione, suggerendo pertanto che siano differenti i meccanismi implicati nei comportamenti rispettivamente di mantenimento e di acquisizione del consumo di alcol.

L'esistenza di un meccanismo addizionale di tipo oppiaceo che intervenga nel mediare il consumo di alcol è supportata da numerose osservazioni sperimentali (Herz 1997): la somministrazione dell'antagonista non selettivo degli oppiacei naltrexone inibisce negli animali da laboratorio il comportamento operante volto all'acquisizione dell'alcol (Stromberg 1998). Risultati simili sono stati osservati con la somministrazione di antagonisti selettivi dei recettori oppioidergici  $\mu$  e  $\delta$  (Ciccocioppo et al. 2002). La soppressione del comportamento di autosomministrazione di ETOH in ratti pretrattati con naloxone è accompagnata da una diminuzione del rilascio ETOH -indotto della DA a livello del NAC (Gonzales e Weiss, 1998), dimostrando pertanto come il meccanismo addizionale che media l'assunzione di alcol sia comunque parzialmente riconducibile al sistema dopaminergico mesolimbico.

In una situazione di sindrome astinenziale acuta indotta in ratti alcohol-preferred è stato osservato un aumento dell'affinità degli agonisti dei recettori  $\mu$  sia a livello del NAC che del VTA (Chen e Lawrence, 2000), suggerendo l'esistenza di un meccanismo di adattamento recettoriale durante le fasi precoci dell'astinenza stessa. Più recentemente è stato osservato un aumento della densità dei recettori  $\mu$  (Djouma e Lawrence, 2002). Questi dati suggeriscono che anche il sistema oppioide, oltre al sistema dopaminergico, è suscettibile di modulazione a seguito dell'assunzione cronica di ETOH, nonché a seguito dell'insorgenza di una sindrome astinenziale.

### **Sistema serotoninergico**

Il ruolo del sistema serotoninergico nell'induzione e nel mantenimento del comportamento di assunzione di alcol è oggetto di studio da circa 20 anni, ovvero da quando studi preliminari indicarono che lesioni o alterazioni farmacologiche tali da indurre una deplezione dei livelli centrali di serotonina risultavano associati, nell'animale da laboratorio, ad una diminuzione del comportamento operante volto alla assunzione di ETOH (Myers e Veale 1968).

In particolare l'osservazione che all'attivazione delle fibre serotoninergiche che si proiettano dal nucleo dorsale del rafe al NAC, consegue l'innalzamento dei livelli extracellulari di DA (Yoshimoto e McBride 1992), suggerì un ruolo della serotonina nell'attivazione del sistema dopaminergico mesolimbico.

Più specificamente la perfusione locale del NAC con agonisti dei recettori di tipo 5-HT<sub>2</sub> (Bowers et al., 2000) e 5-HT<sub>3</sub> (Campbell e McBride, 1995) incrementa i livelli di DA nel NAC stesso, suggerendo che in particolare questi due sottotipi recettoriale sono implicati nella regolazione della liberazione di DA a livello del NAC.

Numerosi sono i dati sperimentali che hanno indicato come la somministrazione di antagonisti dei recettori 5-HT<sub>3</sub> diminuisca il consumo di alcol in numerose specie animali (Fadda et al., 1991; McBride e Li, 1998); l'efficacia di tale azione sembra derivare dalle condizioni del "drinking": gli antagonisti dei recettori di tipo 5-HT<sub>3</sub> risultano efficaci nel ridurre l'acquisizione ed il mantenimento del comportamento di assunzione dell'alcol in condizioni di libero accesso nelle 24 ore, mentre all'opposto risultano relativamente inefficaci nella prevenzione del *relapse* o recidive dopo 2 settimane di interruzione dell'assunzione (Rodd-Henricks et al., 2000): questi dati suggeriscono che nel periodo di astensione dall'alcol possono insorgere dei cambiamenti a carico dei recettori stessi cui può conseguire una alterazione della risposta agli antagonisti 5-HT<sub>3</sub> (Thielen et al. 2004). L'osservazione iniziale della inibizione dell'assunzione di alcol in animali trattati con antagonisti dei recettori 5-HT<sub>3</sub> ha posto le basi farmacodinamiche per un più ampio studio degli effetti di un antagonista 5-HT<sub>3</sub> come l'ondansetrone nel trattamento dell'alcolismo.

## **1.11 Farmacoterapia dell'alcolismo**

L'alcolismo è la malattia del bere, mentalmente e fisicamente, per cui il soggetto si trova psicologicamente e fisicamente dipendente dall'alcol etilico. Riconoscere questa malattia in se stessi o in coloro che ci sono vicini è perciò non tanto una questione di ammettere una quantità di alcol bevuta al giorno o alla settimana, quanto di riconoscere le conseguenze negative che l'alcol assume sulla salute fisica e mentale, così come sulla vita familiare, sociale e professionale.

Il trattamento dell'alcolismo mira ad ottenere una piena riabilitazione psicosociale del soggetto e prevede, accanto all'eventuale intervento psicosociale, una farmacoterapia. Malgrado tanto impegno, a tutt'oggi i farmaci utilizzati nella terapia della dipendenza da alcol restano il disulfiram, il naltrexone e l'acamprosato.

Il nome commerciale del Disulfiram, in alcune nazioni, è Antabuse o Antabus. Agisce bloccando l'ossidazione dell'alcol allo stadio di ACD durante il suo metabolismo tramite un'inibizione irreversibilmente dell'enzima aldeide deidrogenasi, il quale metabolizza l'ACD ad acetato. L'accumulo di ACD che ne consegue risulta tossico per l'organismo e provoca una serie di disturbi fisici marcati. In presenza di disulfiram, l'assunzione di alcol (anche piccole quantità) è accompagnata dall'insorgenza di effetti tossici tipici dell'ACD. Tali effetti sono spiacevoli ed allarmanti sul piano soggettivo (calore al viso, cefalea pulsante, sudorazione, nausea, vomito, dispnea, confusione, ipotensione e vertigini).

L'obiettivo del trattamento con disulfiram è quello di creare una avversione nei confronti dell'alcol e il paziente, associando lo stato di malessere conseguente l'assunzione di alcol, dovrebbe esser meno stimolato ad assumere alcolici.

Il Naltrexone è un antagonista dei recettori degli oppioidi che si è dimostrato efficace nel ridurre il craving (desiderio compulsivo) e la frequenza di assunzione di alcol.

L'Acamprosato è ampiamente impiegato in Europa per il trattamento dell'alcolismo e non ancora approvato negli Stati Uniti. L'acamprosato è un analogo del GABA ma il suo meccanismo d'azione come anticraving non è stato ancora spiegato.

La metadoxina, una piridossina-pirrolidone, è in grado di diminuire l'alcolemia e la durata di esposizione dei tessuti all'azione lesiva dell'alcol facilitando il metabolismo ed aumentando l'eliminazione urinaria dell'alcol e del suo metabolita tossico: l'ACD. Esplica un'azione protettiva sulla cellula, importante per il danno epatico provocato da ETOH, prevenendo le alterazioni derivanti da squilibrio redox; infatti favorisce l'ossidazione del NADH in eccesso e mantiene elevati i livelli di glutatione contribuendo alla salvaguardia delle membrane dai danni lipoperossidativi (composti con gruppo tiolico libero come il glutatione sono di vitale importanza nella difesa cellulare dai processi ossidativi), si oppone alla caduta dei livelli epatici e cerebrali di ATP, stimolandone la sintesi "de novo". Oltre ad avere questa funzione di tipo metabolico, il farmaco pare agire sui neurotrasmettitori aumentando il release di GABA e Ach.



Alcuni studi, effettuati su soggetti alcol-dipendenti, avrebbero dimostrato una riduzione del desiderio compulsivo, dell'aggressività e dell'agitazione psicomotoria ed un miglioramento della vita relazionale, dell'affettività e dell'efficienza lavorativa.

Il trattamento con metadoxina nell'etilismo acuto ha evidenziato l'efficacia e la rapidità di azione sulla componente eccitomotoria della intossicazione alcolica acuta. Nell'alcolismo cronico, senza astinenza da alcol durante il trattamento, si genera una tendenza alla normalizzazione statisticamente significativa dei parametri biochimici sierici quali gGT (principale marker alterato nell'alcolismo cronico), bilirubina e GOT. Infine nelle curve da carico alcolemico, nel soggetto sano, si è evidenziata una più rapida cinetica di eliminazione dell'alcol dal sangue ed un avvicinamento ai livelli limite della ornitil-carbamil-transferasi (OCT) enzima che indica, soprattutto a livello epatico, danni all'apparato mitocondriale, generatore di energia mitocondriale, generatore di energia chimica.

## 2. Scopo della ricerca

L'ACD, primo metabolita dell'ETOH, viene prodotta a livello periferico principalmente dall'enzima alcol-deidrogenasi (ADH), gastrica ed epatica, e, in minor misura, dal citocromo P450E1, mentre a livello centrale dalla catalasi cerebrale.

L'ACD è un composto volatile presente comunemente in molti cibi e bevande, dove rappresenta un sottoprodotto della fermentazione dei lieviti. Essa costituisce un componente chiave dei vini, in quanto conferisce loro parte del caratteristico gusto fruttato, per quanto elevate concentrazioni siano considerate un difetto. Il vino bianco e lo sherry possono facilmente contenere oltre 500 mg di ACD per litro (Liu and Pilone, 2000).

Per molto tempo si è sostenuto che l'accumulo di ACD nell'organismo, per azione degli inibitori dell'ALDH, potesse risultare utile nel trattamento dell'alcolismo. Infatti, la contemporanea assunzione di ETOH con farmaci come il disulfiram, un'inibitore dell'aldeide deidrogenasi (ALDH) (Suh et al., 2006) o la carbamide calcica (Brown et al., 1983), determina un notevole innalzamento dei livelli ematici di ACD, scatenando una reazione tossica avversa (flushing reaction) che dovrebbe scoraggiare l'alcolista dal bere (Suh et al., 2006).

Tuttavia, in contrasto con questa ipotesi, è stato evidenziato che gli inibitori dell'ALDH potevano potenziare gli effetti euforizzanti e gratificanti dell'ETOH se assunto a basse dosi (Brown et al., 1983). Infatti già Chevens, nel 1953, aveva notato che alcuni pazienti sottoposti a trattamento con disulfiram potevano addirittura beneficiare dall'assunzione di basse dosi di ETOH.

Le evidenze sperimentali che l'ACD abbia effetti motivazionali positivi (Hunt, 1996) sono state fornite dall'osservazione che essa induce un comportamento di self-administration somministrata per via intracerebroventricolare (i.c.v.) in ratti Wistar (Amit, 1977; Brown et al., 1979; 1980), e per via endovenosa (i.v.) in ratti Long-Evans (Myers et al., 1984); più recentemente, inoltre, è stato evidenziato che l'ACD determina un comportamento di autosomministrazione nella VTA in ratti alcol-preferenti (Rodd-Henricks et al., 2002).

Successivamente, studi comportamentali hanno dimostrato che l'ACD, somministrata per infusione i.c.v. in ratti Sprague-Dawley (Smith et al., 1984), oppure per via intra-peritoneale (i. p.) in ratti Wistar (Quertemont e De Witte, 2001), è in grado di indurre un'evidente *place preference* condizionata.

Un'ulteriore conferma al fatto che l'ACD è in grado di possedere proprietà motivazionali è ottenuta dall'osservazione che la somministrazione periferica di D-penicilamina (DP), un'agente sequestrante l'ACD, la quale riduce l'attivazione comportamentale indotta dall'ACD e dall'ETOH (Font et al. 2006a) e prevenendo gli effetti comportamentali positivi ma non quelli avversivi, indotti dall'ETOH nel topo (Font et al., 2006a). La DP, inoltre, riduce l'autosomministrazione spontanea di ETOH in ratti Long-Evans (Font et al., 2006b).

Un ulteriore sostegno al fatto che l'ACD svolge un ruolo primario negli effetti motivazionali dell'ETOH, è stato fornito dall'osservazione che essa stimola, in modo dose dipendente, l'attività elettrofisiologica dei neuroni dopaminergici del VTA, e che tali effetti siano bloccati dal 4-metil pirazolo (4-MP), un potente inibitore dell'ADLH periferica (Foddai et al., 2004), e dalla DP (Lintas et al., 2007) nel ratto.

Coerentemente con questi risultati, il pretrattamento con il 4-MP previene la stimolazione dopaminergica indotta dall'ETOH nel sistema mesolimbico (Melis et al., 2007), mentre la DP blocca quella indotta sia dall'ETOH che dall'ACD (Mereu et al., 2007; Sirca et al., 2007).

Alla luce di questi dati sperimentali, lo scopo della nostra ricerca è stato quello di indagare il ruolo svolto dall'ACD negli effetti motivazionali dell'ETOH. Per questo scopo, mediante studi di *place preference* condizionata (cpp), sono stati dapprima testati l'ETOH e l'ACD, somministrati per via intragastrica (i.g) attraverso l'utilizzo di un sondino idoneo. Questa via di somministrazione è stata scelta al fine di simulare la modalità di assunzione dell'alcol nell'uomo.

Il lavoro di ricerca è iniziato considerando una dose-curve per l'ETOH (0.5, 1, 2 g/Kg) e per l'ACD (10, 20, 40 mg/Kg). Successivamente, allo scopo di determinare la relazione tra le proprietà motivazionali dell'ETOH e la relativa produzione metabolica dell'ACD, è stato utilizzato il 4-MP, un inibitore competitivo periferico dell'ADH, in grado di bloccare la produzione di ACD.

In aggiunta, per meglio comprendere il ruolo svolto dall'ACD negli effetti rinforzanti dell'ETOH, abbiamo studiato l'azione della DP, un sequestrante selettivo per l'ACD, su ratti condizionati con ETOH e con ACD, alle dosi rispettivamente di 1 g/Kg e 20 mg/Kg, dosi che abbiamo evidenziato indurre una cpp.

Infine, per meglio dimostrare la specificità dei due inibitori utilizzati, metabolico il 4-MP e chimico la DP,, abbiamo valutato la loro azione sulla cpp indotta da morfina.

Dato che il target responsabile degli effetti di rinforzo dell'ETOH sembra essere l'ACD, la ricerca di un farmaco capace di deprivare l'ETOH dalle sue proprietà motivazionali potrebbe essere un buon approccio alla farmacoterapia dell'alcolismo.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

La L-cisteina sembra essere un buon candidato nella terapia dell'alcolismo. Si tratta di un aminoacido solforato non essenziale. Tra le funzioni che svolge, essa mantiene il normale stato delle cellule, ha proprietà antinfiammatorie, protegge l'organismo dall'aggressione delle tossine, è utile nel trattamento dell'osteoartrite e nell'artrite reumatoide.

Prodotti che contengono un gruppo tiolico, come la DP e la L-cisteina, sono conosciuti per la loro capacità di proteggere dagli effetti dell'ACD (Cohen et al., 2000; Nagasawa et al., 1984, Nagasawa et al., 1987, Salaspuro, 2007; Salaspuro et al., 2002, 2006; Sprince et al., 1974; Vasdev et al., 1995).

La L-cisteina, grazie alla presenza del gruppo tiolico, è in grado di sequestrare, tramite un legame covalente, l'ACD per formare un addotto stabile e non tossico. La L-cisteina è stata studiata da Salaspuro nella prevenzione del tumore del tratto gastrointestinale (Salaspuro, 2007; Salaspuro et al., 2002, 2006), nella cardiomiopatia da alcol, nella tossicità cronica da ACD (Sprince et al., 1974) e per quanto riguarda gli effetti dell'ACD sugli enzimi epatici (Shackebaei et al., 2005). In aggiunta, la N-acetilcisteina, un aminoacido della dieta, analogo alla L-cisteina, attenua l'ipertensione indotta dall'ACD derivante dall'ETOH e gli effetti avversi, a livello dei vasi renali, indotti da un trattamento cronico con ETOH nel ratto (Vasdev et al., 1995).

Secondo alcuni studi condotti su modelli animali, i soggetti riceventi una DL50 di ACD e in associazione la cisteina, mostravano un indice di sopravvivenza dell'80% (Sprince et al., 1974).

Analogamente al 4-MP e alla DP, anche la specificità della L-cisteina è stata studiata sulla cpa indotta dalla morfina.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

La L-cisteina potrebbe quindi risultare il miglior candidato in grado di prevenire le azioni farmacologiche dell'ACD derivante dall'ETOH, così come la riduzione delle proprietà motivazionali alcol-indotte.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

### **3. Materiali e metodi**

I nostri studi sono stati condotti in accordo con la Legge Italiana (D.L. 116, 1992), che acconsente alla sperimentazione sugli animali solo in seguito all'approvazione del progetto di ricerca da parte delle autorità competenti. I nostri lavori sono in stretto accordo con i "*Principles of laboratory animal care*" (NIH publ. 80-23, rev. 1996). Ogni procedura è stata eseguita con l'obiettivo di minimizzare la sofferenza e il disagio degli animali, e di ridurre il più possibile il numero dei soggetti impiegati.

#### **3.1 Animali**

Durante i nostri studi sono stati utilizzati ratti maschi Wistar (Harlan, Udine, Italy) (Fig. 6), del peso compreso tra i 180 e i 250 g. Gli animali sono stati collocati in gruppi di 3-4 per gabbia e mantenuti in condizioni ambientali controllate (temperatura  $22\pm 2$  °C; umidità 60-65%; ciclo giorno/notte di 12h, con accensione della luce alle ore 8:00). Gli animali sono stati nutriti con dieta standard e acqua *ad libitum*. Al fine di minimizzare lo stress, gli animali sono stati abituati alle procedure sperimentali (manipolazione, somministrazione i.g.) per i tre giorni precedenti il trattamento. Gli esperimenti sono stati eseguiti durante la fase di luce del ciclo notte/giorno.



**Fig. 6** - Ratto albino Wistar

### **3.2 Place preference condizionata (cpp)**

La *Place Preference* condizionata (cpp) è l'apparecchio comunemente adoperato per studiare le proprietà motivazionali delle sostanze d'abuso: in particolare l'animale, durante la fase del condizionamento, impara ad associare un compartimento con l'esperienza gratificante o con quella sfavorevole.

L'apparato consiste in due compartimenti d'acciaio di forma rettangolare (48Lx33Wx30H cm), separate da una porta rimovibile a ghigliottina. . Le due camere differiscono per le caratteristiche visive e tattili: un compartimento ha pareti grigio chiare e pavimento grigliato, l'altro pareti grigio scuro e pavimento liscio.

L'apparecchio è collocato in una stanza isolata acusticamente e i singoli ambienti sono illuminati da luce erogata da lampade da 40 Watt.



### **3.3 Procedura e disegno sperimentale**

Ogni esperimento consiste in tre fasi. Durante la prima fase (1° giorno), chiamata fase di pre-condizionamento, la porta a ghigliottina viene rimossa, perciò ciascun ratto ha libero accesso ad entrambi i compartimenti per 30 minuti (1800 secondi). Il tempo trascorso da ogni ratto nei compartimenti è stato misurato attraverso l'utilizzo di un cronometro. Il tempo registrato è indicativo di una preferenza incondizionata per ogni compartimento. La preferenza spontanea per i due compartimenti è infatti molto simile, intorno ai 900 secondi su 1800 secondi di osservazione.

Durante la seconda fase, detta di condizionamento, gli animali sono trattati con la sostanza in esame (ETOH, ACD per via i.g., morfina per via i.p.) e posti nel compartimento scuro per 30 minuti (Fig. 7). La durata della fase di condizionamento è variabile a seconda della sostanza somministrata: dal 2° al 16° giorno per l'ETOH, dal 2° al 9° per l'ACD, dal 2° al 5° per la morfina. Durante questa fase la porta a ghigliottina viene tenuta chiusa e l'animale impara ad associare gli affetti gratificanti e rinforzanti della sostanza somministrata, con il compartimento caratterizzato da pareti scure e pavimento liscio. A giorni alterni l'animale viene trattato con salina e posto nel compartimento chiaro con pavimentazione grigliata, sempre per 30 minuti (1800 secondi); di conseguenza, l'ETOH, il cui condizionamento richiede 15 giorni, viene somministrato 8 volte. L'ACD richiede un condizionamento più breve, 8 giorni, perciò viene somministrata 4 volte, mentre la morfina già dopo due somministrazioni è in grado di dare una preferenza condizionata. Le dosi e lo schema procedurale sono stati estrapolati dalla letteratura (Bozarth, 1990; Quertemont and De Witte, 2001).



Fig. 7- Condizionamento nel compartimento scuro (porta chiusa)

Durante la terza fase, definita di postcondizionamento, ed eseguita 24 ore dopo l'ultimo trattamento, la porta a ghigliottina viene rimossa e il tempo trascorso da ciascun ratto nel compartimento associato alla sostanza (ETOH, ACD o morfina) viene registrato durante l'arco di 30 minuti (1800 sec) (Fig. 8). Le condizioni del post-condizionamento e quelle del pre-condizionamento sono le medesime. Il tempo trascorso nel compartimento associato alla sostanza nel post-condizionamento confrontato con quello trascorso durante la fase di pre-condizionamento è indice del grado di *place conditioning* indotto dalla sostanza (Carr et al., 1989).

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Una differenza statisticamente significativa tra il tempo trascorso durante il pre- e il post- condizionamento, o tra il tempo trascorso nel post-condizionamento e il tempo del gruppo salina/salina indica lo sviluppo di *conditioned place preference*.



**Fig. 8** - Post condizionamento o test (porta aperta)

Tutti gli esperimenti sono stati svolti tra le 8:30 am e 1:00 pm. La L-cisteina e la DP sono state somministrate 30 minuti prima della sessione di condizionamento nel compartimento scuro con ETOH, ACD o morfina, mentre il 4-MP 24 ore prima di ricevere la sostanza in esame.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Ogni gruppo di controlli (salina /salina) è stato trattato con un pari volume di salina.

### **3.4 Sostanze e trattamenti**

L'ETOH (Zedda-Piras, Alghero, Italia) (0.5, 1 and 2 g/kg) e l'ACD (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (10, 20 and 40 mg/kg) sono stati solubilizzati in salina (0.9% NaCl) fino ad un volume finale di 1 ml e somministrate tramite sondino gastrico (i.g.). La soluzione etanolica (20% v/v) è stata ottenuta per diluizione di ETOH (96%) secondo le specifiche del *Medicamenta*. . Il 4-MP (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (22.5, 45 and 67.5 mg/kg), la DP (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (25 e 50mg/kg) e la L-cisteina, o acido (R)-2-amino-3-mercaptopropionico, sotto forma di cloridrato, (Sigma-Aldrich, Milano, Italy) (10, 20, and 30 mg/ kg) sono stati disciolti in soluzione salina e somministrati per via intraperitoneale (i.p.). Infine la morfina cloridrato (S.A.L.A.R.S., Camerlata, Como) (2.5 mg/kg) è stata disciolta in salina e somministrata per via i.p.

Tutte le soluzioni sono state preparate di fresco prima di ogni procedura sperimentale.

L'infusione intragastrica di ETOH e ACD o salina avviene rapidamente (5 sec) ed è eseguita immediatamente prima della sessione di condizionamento.

### **3.5 Livelli ematici di ETOH e ACD**

Una aliquota pari a 1000 µl di sangue è stata prelevata dall'atrio destro del cuore dell'animale e rapidamente trasferita in provette HS da 10 ml per l'analisi.

Le provette da analizzare per ETOH e ACD son poste in un termostato a 45°C per 10 minuti. I campioni sono stati analizzati col sistema HS-GC-FID con un Dani 86.50 HSS-autocampionante , e un gas cromatografo Hewlett-Packard HP 6890 Plus. I capillari della colonna utilizzati sono Econo CAP EC-5 (Alltech, Italia) (30m, 0.53mm i.d., 1.2 µm d.f.). La temperature al sito d'iniezione è mantenuta a 250° C. Il termostato del GC mantiene la temperatura a 45°C per 8 minuti. Il flusso del gas carrier (elio) è 6.1 ml/min. La temperature del FID è mantenuta a 250°C. I parametri dell'HS sono: 75°C temperatura del collettore, 150°C temperatura di trasferimento, 1.57 psi pressione del gas carrier, 1 min tempo di pressurizzazione del vial, 1ml volume di iniezione.

### **3.6 Analisi statistica**

I tempi sono espressi come media ± S.E.M (deviazione standard). Per analizzare la preferenza spontanea durante la fase di pre-condizionamento (ossia il tempo speso in ogni compartimento) i dati sono stati elaborati con il metodo dell'analisi della varianza ad una via (ANOVA). Per determinare l'effetto dell'ETOH, ACD, della morfina o della salina sulla cpp, così come l'effetto del 4-MP, della DP o della L-cisteina sulla preferenza indotta dalle diverse sostanze in esame, i dati sono stati analizzati attraverso il metodo dell'ANOVA a due vie.

Il confronto Post- hoc è stato realizzato solo se è stato trovato un significativo effetto d'interazione ( $P < 0.05$ ). Il confronto è stato eseguito usando il test Newman Keuls.

## 4. Risultati

### Fase di preconditionamento

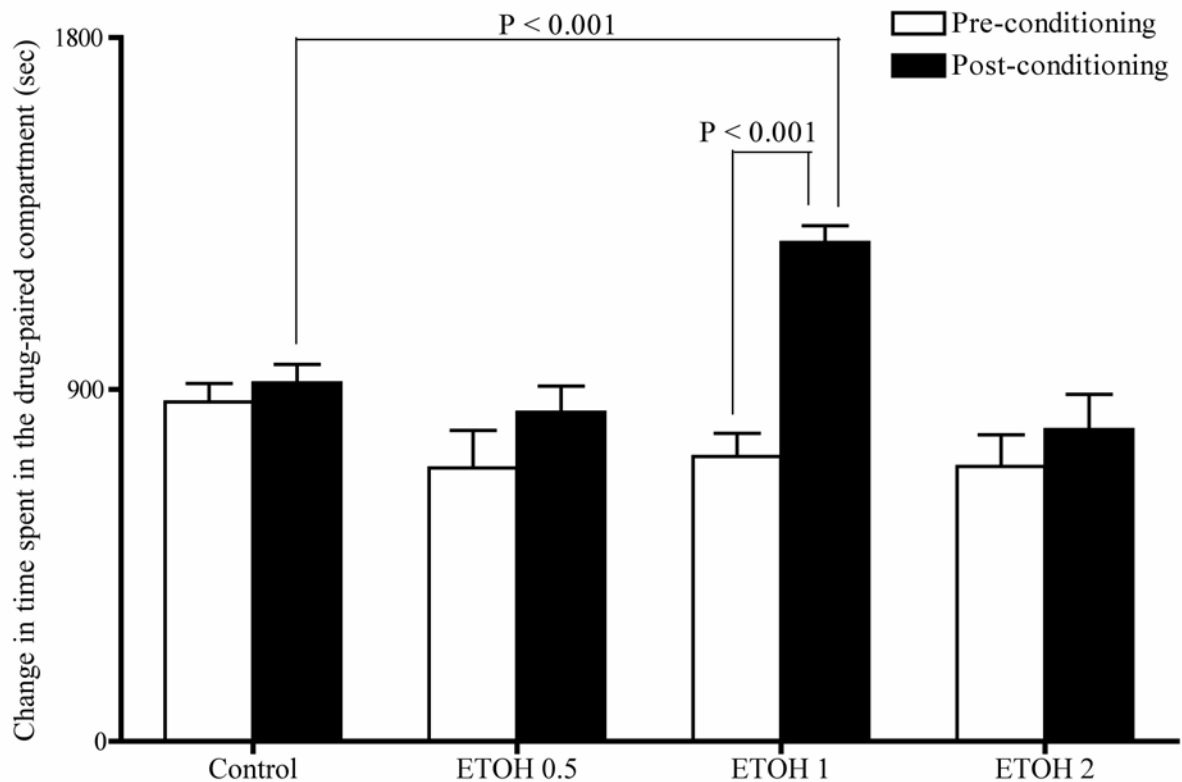
Durante la fase di preconditionamento, la preferenza spontanea per i due compartimenti è stata simile; infatti gli animali tendono a trascorrere approssimativamente lo stesso tempo in entrambi i compartimenti senza evidenziare differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi [ $F(1,90) = 10,24$ ,  $p < 0,05$ ] (dati riferiti ai gruppi di controllo dell'ACD e dell'ETOH) [ $F(7,54) = 0,255$ ,  $p > 0,99$ ] (dati riferiti ai gruppi salina/salina, L-cisteina/salina, salina/ETOH e L-cisteina/ETOH).

### Cpp indotta dall'ETOH

L'analisi ANOVA a due vie mostra un significativo effetto di gruppo [ $F(3,70)=4.22$ ,  $P<0.01$ ], un effetto di condizionamento [ $F(1,70)=21,64$ ,  $P<0,00005$ ] e un'interazione gruppo/condizionamento [ $F(3,70)=8,63$ ,  $P<0,0001$ ]. L'effetto di diverse dosi di ETOH sulla cpp è mostrato nella Fig. 9.

I ratti che ricevono ETOH (1 g/kg, i.g.; n=20) durante la sessione di condizionamento di 15 giorni, il giorno del test trascorrono più tempo nel compartimento che associano all'ETOH ( $1276,0 \pm 43,1$ ), rispetto alla fase di preconditionamento ( $728,3 \pm 59,5$ ,  $P<0,001$ ) e rispetto al gruppo di controllo salina/salina nella fase di post-condizionamento (n=23;  $P<0,001$ ). Questo effetto è dose-dipendente e non si osserva a dosi più basse o più elevate di ETOH (0,5 e 2 g/kg, i.g.; n=8 e 21, rispettivamente).

In conclusione, l'ETOH somministrato per via i.g. induce una cpp alla dose di 1g/Kg, mentre non modifica la preferenza alle dosi di 0,5 e 2 g/Kg.



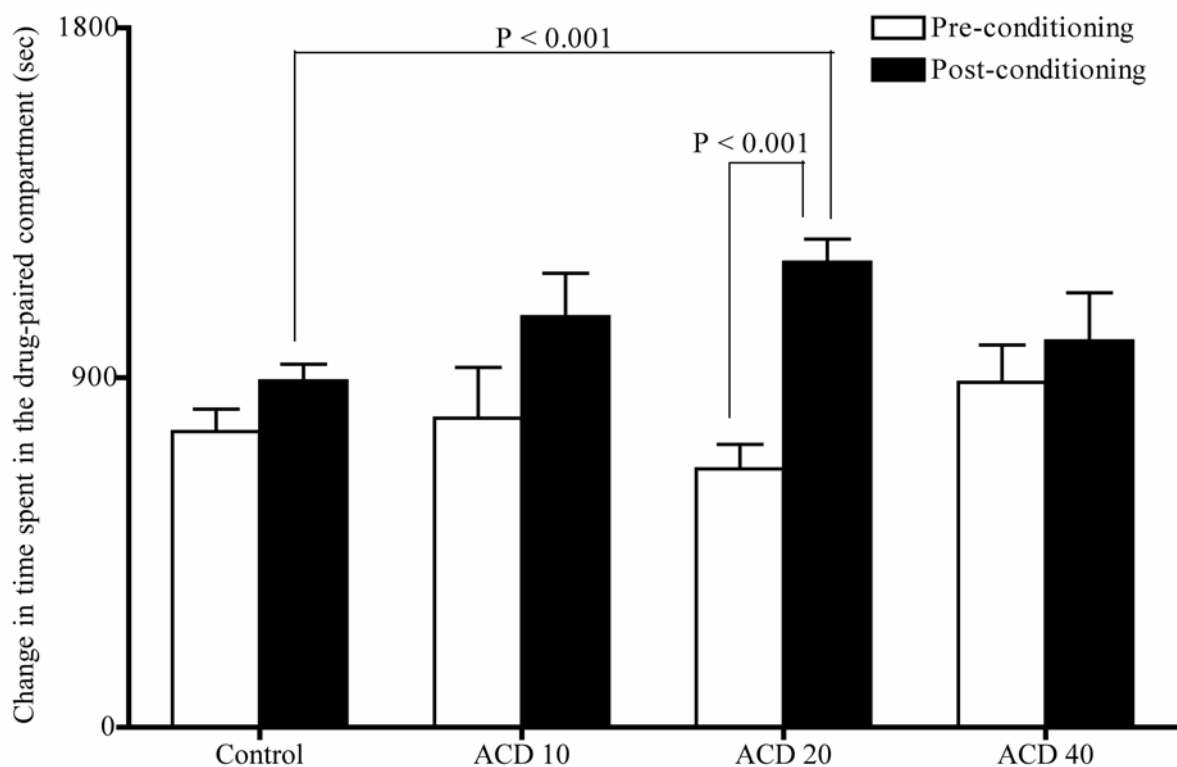
**Fig. 9** - Effetto di dosi differenti di ETOH (0.5, 1 e 2 g/kg, i.g.) sulla cpp, associata con il compartimento meno preferito. I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n=8-23). Sono indicate le differenze statisticamente significative tra il tempo trascorso durante la fase di postcondizionamento e i tempi di pre- o postcondizionamento del gruppo di controllo (ANOVA a due vie seguito dal post-hoc-test di Newman Keuls).



## **Cpp indotta dall'ACD**

L'analisi ANOVA e due vie relativa ai dati ottenuti con la cpp da ACD, rivela un significativo effetto di condizionamento [ $F(1,55)=20,85$ ,  $P<0,00005$ ] ed un'interazione di gruppo x condizionamento [ $F(3,55)=5,35$ ,  $P<0,005$ ]. I ratti trattati con l'ACD (20 mg/kg, i.g.; n=20) durante la sessione di condizionamento (8 giorni), trascorrono più tempo ( $1197,6 \pm 59,3$  sec) nel compartimento che essi associano all'ACD, rispetto alla fase di preconditionamento ( $664,8 \pm 62,7$  sec,  $P<0,001$ ) e rispetto alla fase di post-condizionamento del gruppo di controllo salina/salina ( $892,2 \pm 42,8$ , n=20;  $P<0,001$ ). La curva dose-risposta è analoga a quella dell'ETOH, ed anche in questo caso, non si osservano variazioni con dosi più basse o più alte di ACD (10 e 40 mg/kg, i.g.; n=10 e 9, rispettivamente).

In conclusione, l'ACD somministrata per via i.g. induce una cpp significativa solo alla dose di 20 mg/Kg, mentre non determina cpp alle dosi di 10 mg/Kg e di 40 mg /Kg. Gli effetti dell'ACD sono mostrati nella Fig.10.

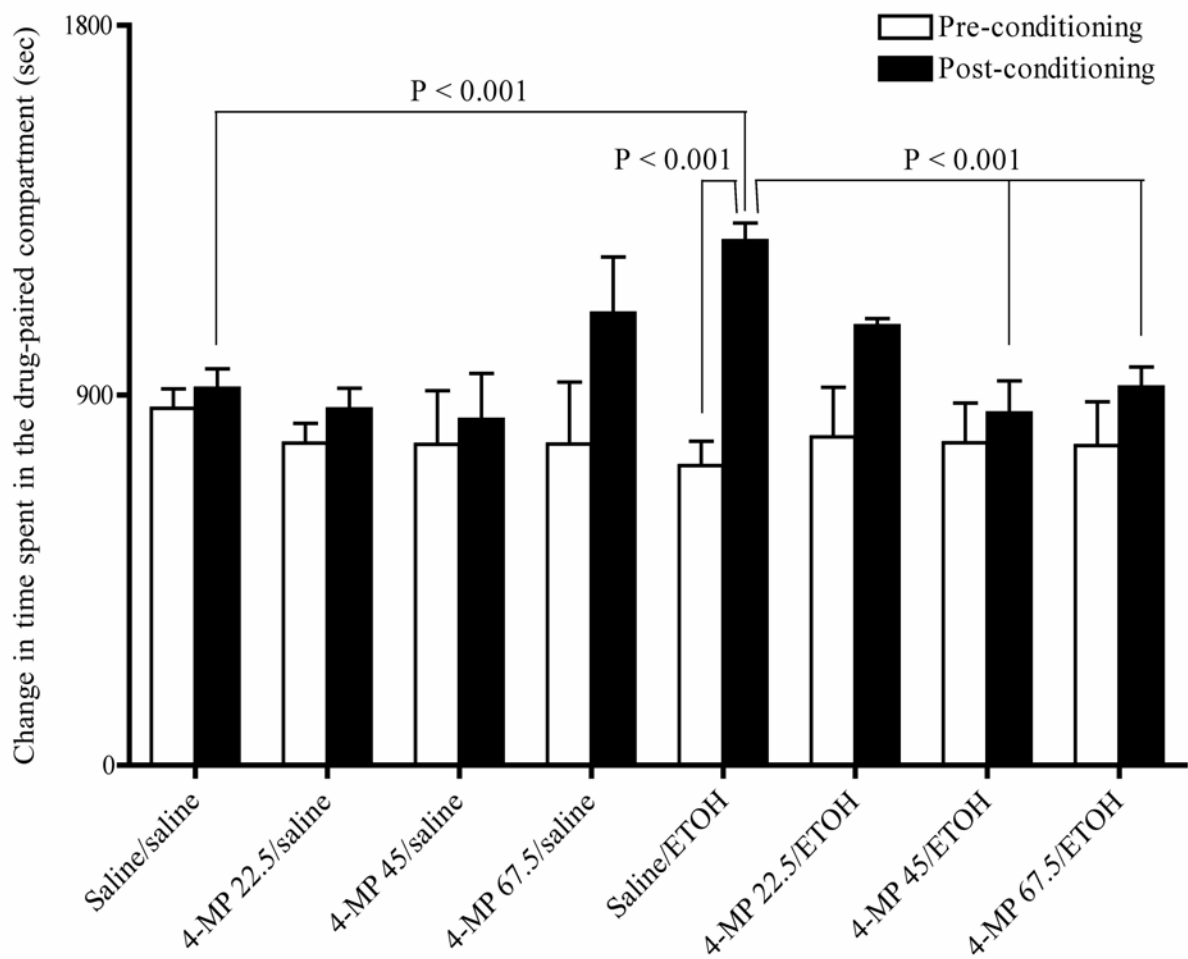


**Fig. 10** - Effetti di differenti dosi di ACD (10, 20 and 40 mg/kg, i.g.) sulla cpp, associate al compartimento meno preferito. I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n=9-20). Sono indicate le differenze statisticamente significative tra il tempo di post-condizionamento e il tempo di pre-condizionamento e il post-condizionamento del gruppo controllo (ANOVA a due vie seguita dal post-hoc test ,Newman Keuls).

## **Effetto del pretrattamento con il 4-MP sulla cpp indotta dall'ETOH**

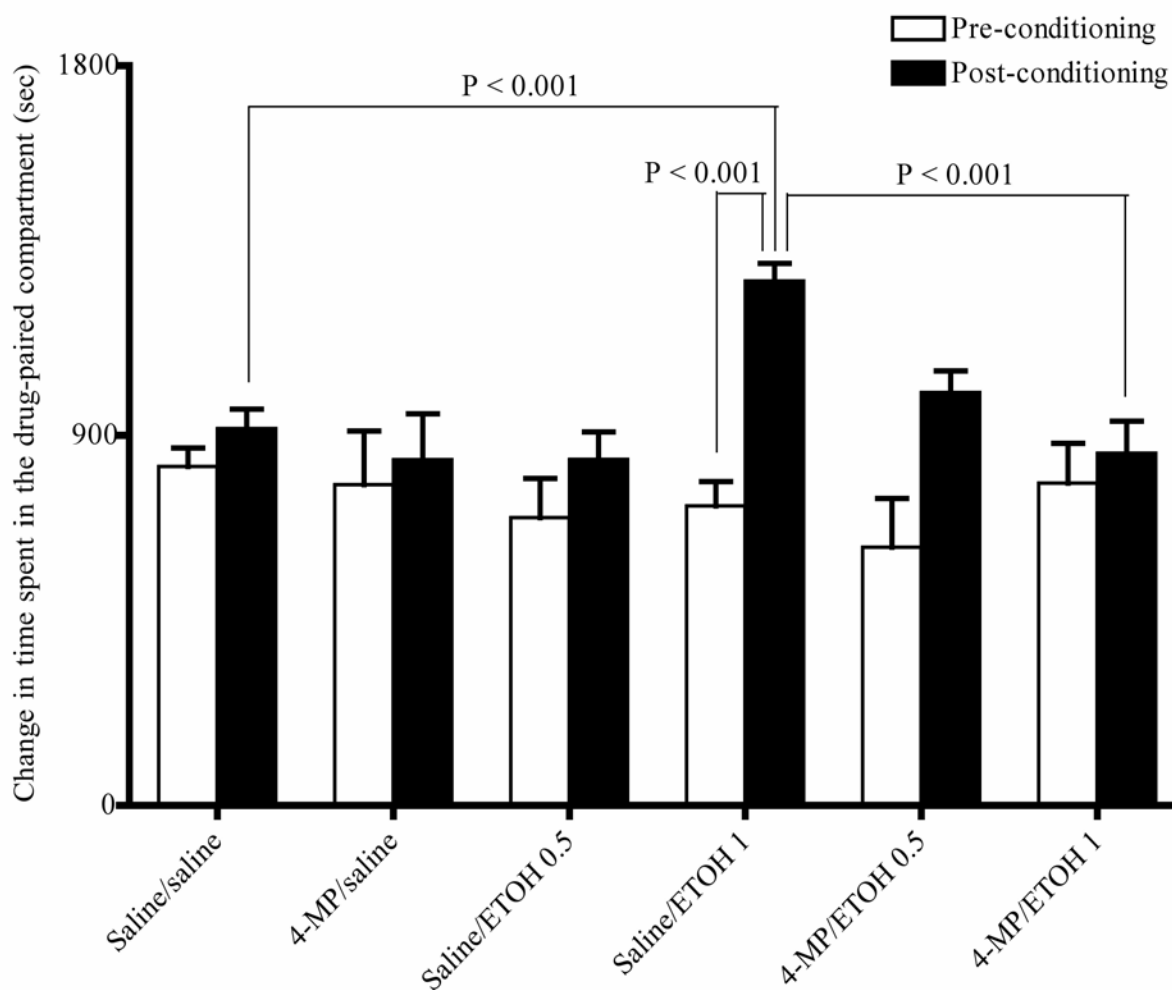
L'ANOVA a due vie, relativa al pretrattamento con il 4-MP (22,5, 45, 67,5 mg/kg, i.p.) sulla cpp indotta dall'ETOH, mostra un significativo effetto di dose [F(7,73)=1,87, P<0,05], di condizionamento [F(1,73)=19,10, P<0,00005] e una significativa interazione gruppo x condizionamento [F(7,73)=4,27, P<0,001]. Il 4-MP previene in maniera dose-dipendente, la cpp indotta dall'ETOH (1 g/kg, i.g.) nel ratto. L'effetto è mostrato nella Fig 11.

I ratti che vengono pretrattati con il 4-MP (45 o 67,5 mg/kg, i.p.; n=9 in entrambi i casi) trascorrono meno tempo ( $857,0 \pm 78,1$  sec e  $920,1 \pm 48,5$  sec, rispettivamente) nel compartimento associato al trattamento con 4-MP/ETOH, rispetto al gruppo trattato con salina/ETOH che mostra, al contrario, un'evidente cpp ( $1276,0 \pm 43,1$ ; P<0,001 in entrambi i casi). L'effetto inibente sulla cpp indotta dall'ETOH non è stato osservato alla dose più bassa di 4-MP (22,5 mg/kg, i.p.).



**Fig. 11** - Effetti del pretrattamento con il 4-MP (22.5, 45 and 67.5 mg/kg, i.p.) sulla cpp indotta dall'ETOH (1 mg/Kg i.g.). I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n=8-16). Sono indicate le differenze statisticamente significative tra il tempo di post- condizionamento e i tempi di pre- o post-condizionamento del gruppo di controllo (ANOVA a due vie seguito dal post-hoc-test di Newman Keuls).

Dato che la somministrazione con il 4-MP produce, nel ratto che riceve l'ETOH per via i.g., un incremento dei livelli ematici di ETOH (Waller et al., 1982), abbiamo deciso di verificare se la contemporanea somministrazione di 4-MP (45 mg/Kg) e di ETOH alla dose più bassa (0,5 g/Kg), fosse capace di indurre una cpp non evidente a quella dose. La dose di 45 mg/Kg di 4-MP è stata scelta in quanto rappresenta la minima dose efficace e non altera il comportamento dell'animale (Meli et al., 2007; Peana et al., 2008). L'ANOVA a due vie mette in risalto un significativo effetto di gruppo [ $F(5,64)=3,03$ ,  $P<0,05$ ], di condizionamento di gruppo [ $F(1,64)=21,52$ ,  $P<0,00005$ ] ed una significativa interazione di gruppo x del gruppo di condizionamento [ $F(5,64)=6,65$ ,  $P<0,00005$ ]. Come mostrato nella Fig. 12, il pretrattamento con il 4-MP nei ratti che ricevono la dose più bassa di ETOH (0,5 mg/kg, i.g.; n=9), non mette in luce alcuna cpp, mentre previene la cpp indotta dall'ETOH quando è somministrato alla dose di 1 g/kg, i.g. (n=9;  $P<0,001$ ).

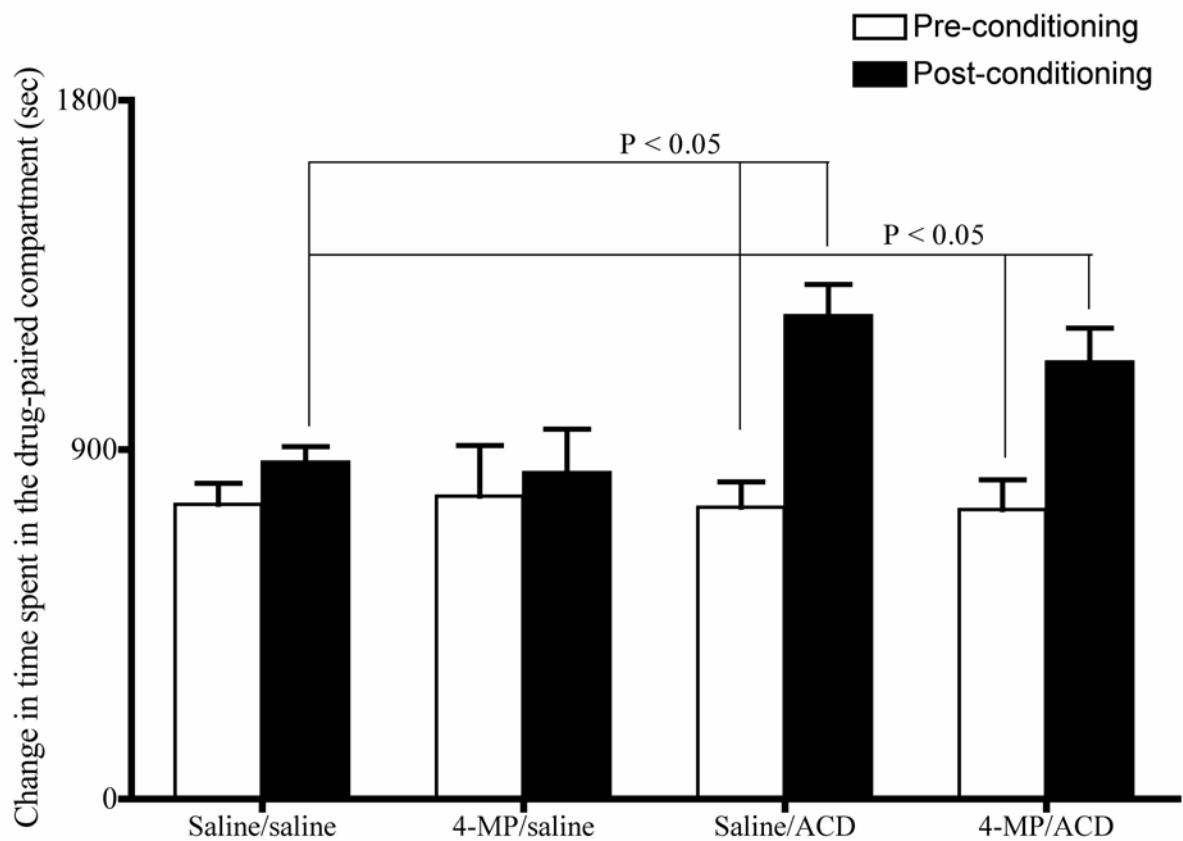


**Fig. 12** - Effetti del pretrattamento con il 4-MP (45 mg/kg, i.p) sulla dose più bassa di ETOH (45 mg/kg, i.p.). I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n=9-24). Sono indicate le differenze statisticamente significative tra il tempo di postcondizionamento e i tempi di pre- o post-condizionamento del gruppo di controllo (ANOVA a due vie seguito dal post-hoc-test di Newman Keuls).

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

### **Effetto del pretrattamento con il 4-MP nella cpp indotta dall'ACD**

Gli effetti del trattamento con il 4-MP (45 mg/kg, i.p.) sulla cpp indotta dall'ACD (20 mg/kg, i.g.), sono mostrati nella Fig. 13. L'analisi ANOVA dei valori ottenuti con la cpp in risposta al pretrattamento con il 4-MP mette in luce un significativo effetto di condizionamento di gruppo [ $F(1,15)=18,02$ ,  $P<0,0001$ ] e un'interazione di gruppo x del gruppo di condizionamento [ $F(3,15)=3,02$ ,  $P<0,05$ ]. Come già descritto, il trattamento con salina/ACD induce un incremento del tempo trascorso nel compartimento preferito che essi associano agli effetti dell'ACD, durante la fase di postcondizionamento ( $1197,6 \pm 59,3$  sec), sia rispetto alla fase di preconditionamento ( $664,8 \pm 62,7$  sec;  $P<0,05$ ) e sia rispetto alla fase di postcondizionamento del gruppo salina/salina ( $892,2 \pm 42,8$  sec;  $P<0,05$ ). Inoltre il trattamento con 45 mg/kg di 4-MP prima della somministrazione i.g. di ACD, non è in grado di inibire la cpp indotta dall'ACD. Questo perché gli animali, nella fase di postcondizionamento, trascorrono lo stesso tempo del gruppo salina/ACD. In entrambi i casi, si osserva una cpp indotta dall'ACD.

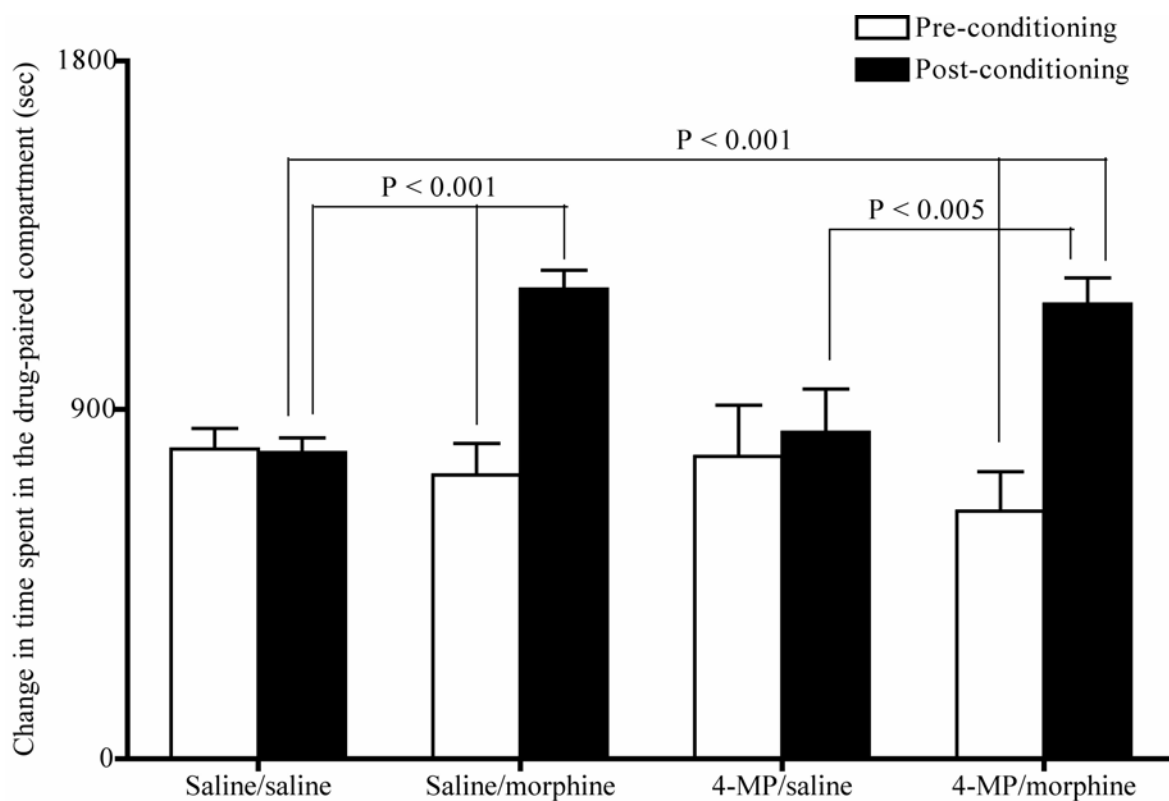


**Fig. 13** -. Effetto del pretrattamento con il 4-MP (45 mg/kg, i.p.) sulla cpp indotta dall'ACD. I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n= n=6-8). Sono indicate le differenze statisticamente significative tra il tempo di postcondizionamento e i tempi di pre- o postcondizionamento del gruppo di controllo (ANOVA a due vie seguito dal post-hoc-test di Newman Keuls).



### **Effetto del pretrattamento con il 4-MP sulla cpp indotta dalla morfina.**

L'analisi ANOVA a due vie mette in risalto un significativo effetto di gruppo [ $F(3,31)=2,31$ ,  $P<0,05$ ], di condizionamento [ $F(1,31)=47,76$ ,  $P<0,0000001$ ] ed un'interazione gruppo x condizionamento [ $F(3,31)=16,56$ ,  $P<0,00005$ ]. Come mostrato nella Fig. 14, i ratti che vengono condizionati per 4 giorni con morfina (2,5 mg/kg, i.p) mostrano una notevole preferenza per il compartimento che essi associano alla sostanza stessa ( $1210,0 \pm 49,1$  sec), sia rispetto alla fase di preconditionamento ( $733,4 \pm 79,2$  sec,  $n=9$ ;  $P<0,001$ ) sia rispetto alla fase di post-condizionamento del gruppo di controllo salina/salina ( $788,7 \pm 38,3$  sec,  $n=10$ ;  $P<0,001$ ). Il pretrattamento con il 4-MP non interferisce con la preferenza indotta dalla morfina. Infatti, i ratti del gruppo 4-MP/morfina mostrano nel postcondizionamento la stessa preferenza per il compartimento associato alla morfina ( $1172,8 \pm 67,5$  sec), sia rispetto alla fase di preconditionamento ( $639,2 \pm 102,3$  sec,  $n=9$ ;  $P<0,001$ ), e sia rispetto alla fase di postcondizionamento del gruppo di controllo salina/salina ( $788,7 \pm 38,3$  sec,  $n=10$ ;  $P<0,001$ ).



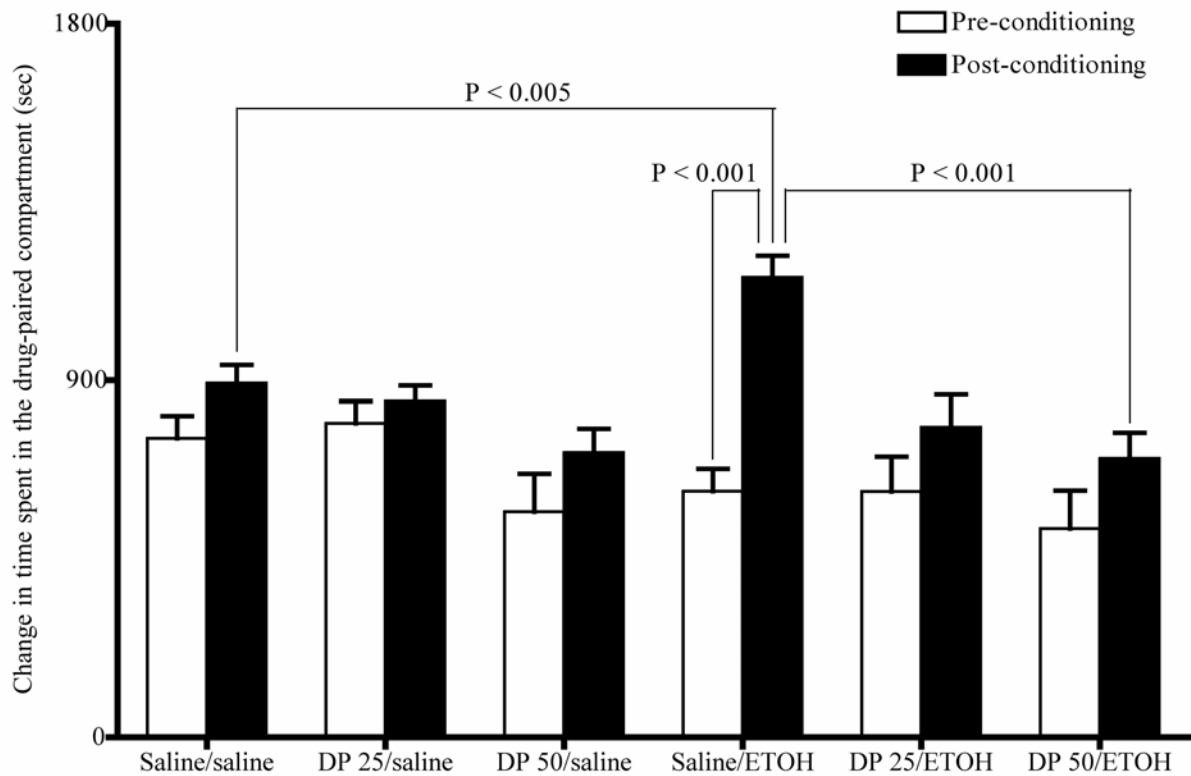
**Fig. 14** - Effetto del pretrattamento con il 4-MP (45 mg/kg, i.p.), sulla preferenza indotta dalla morfina (2.5 mg/kg, i.p.). I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM;  $n=8-10$ ). Sono indicate le differenze statisticamente significative tra il tempo trascorso durante il postcondizionamento e il tempo trascorso nella fase di pre- o postcondizionamento del gruppo di salina/salina o del gruppo 4-MP/salina (ANOVA a due vie seguito dal post-hoc-test di Newman Keuls).

## **Effetti del pretrattamento con la DP sulla cpp indotta dall'ETOH**

L'ANOVA a due vie, relativa al pretrattamento con la DP sulla cpp indotta dall'ETOH, ha messo in evidenza un significativo effetto di dose [ $F(5,94)=5,70$ ,  $P<0,0005$ ], di condizionamento [ $F(1,94)=20,37$ ,  $P<0,00005$ ] ed interazione dose x condizionamento [ $F(5,94)=4,06$ ,  $P<0,005$ ]. Come si può notare dalla Fig. 15, il gruppo salina/salina ( $n=24$ ) ed i gruppi DP (25 e 50 mg/kg;  $n=14$ )/salina trascorrono gli stessi tempi in entrambi i compartimenti, indicando quindi un'assenza di cpp. Il trattamento con salina/ETOH alla dose di 1g/Kg ha indicato in precedenti esperimenti l'induzione di un incremento del tempo trascorso nel compartimento che essi associano al trattamento durante la fase di postcondizionamento ( $n=29$ ,  $1159,5 \pm 54,9$  sec), rispetto alla fase di preconditionamento ( $621,2 \pm 56,7$  sec;  $P<0,001$ ), e rispetto alla fase di postcondizionamento del gruppo salina/salina ( $n=33$ ,  $892,9 \pm 45,6$  sec;  $P<0,005$ ).

Il pretrattamento con la DP, alla dose più bassa ( $n=14$ , 25 mg/kg), nei ratti trattati con la dose di EtOH inducente la cpp, induce ad una debole riduzione della cpp indotta dall'ETOH stesso ( $n=14$ ,  $P<0,001$ ); al contrario il pretrattamento con DP alla dose di 50 mg/Kg ha mostrato una più marcata diminuzione della cpp indotta dall'ETOH ( $n=14$ ,  $P<0,001$ ).

Infatti gli animali pretrattati con la DP passano meno tempo nel compartimento associato alla somministrazione di DP/ETOH (25 mg/kg:  $782,6 \pm 82,0$  sec; 50 mg/kg:  $704,9 \pm 63,9$  sec) rispetto al gruppo trattato con salina /ETOH alla dose che induce una cpp ( $n=29$ ,  $1159,5 \pm 54,9$  sec). Gli effetti del pretrattamento con la DP alle dosi di 25 e 50 mg/Kg per via i. p. sulla cpp indotta dall'ETOH (1 g/Kg, i. g.) sono mostrati nella Fig. 15.



**Fig. 15** – Effetti del pretrattamento con la DP (25 e 50 mg/kg, i. p.) sulla cpp indotta da ETOH (1g/KG, i. g.). I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n=14-29). Sono indicate le differenze statisticamente significative tra il tempo trascorso durante il postcondizionamento e il tempo trascorso nella fase di preconditionamento, così come tra il postcondizionamento del gruppo ed il postcondizionamento del gruppo salina/salina (ANOVA a due vie seguito dal post-hoc-test di Newman Keuls).

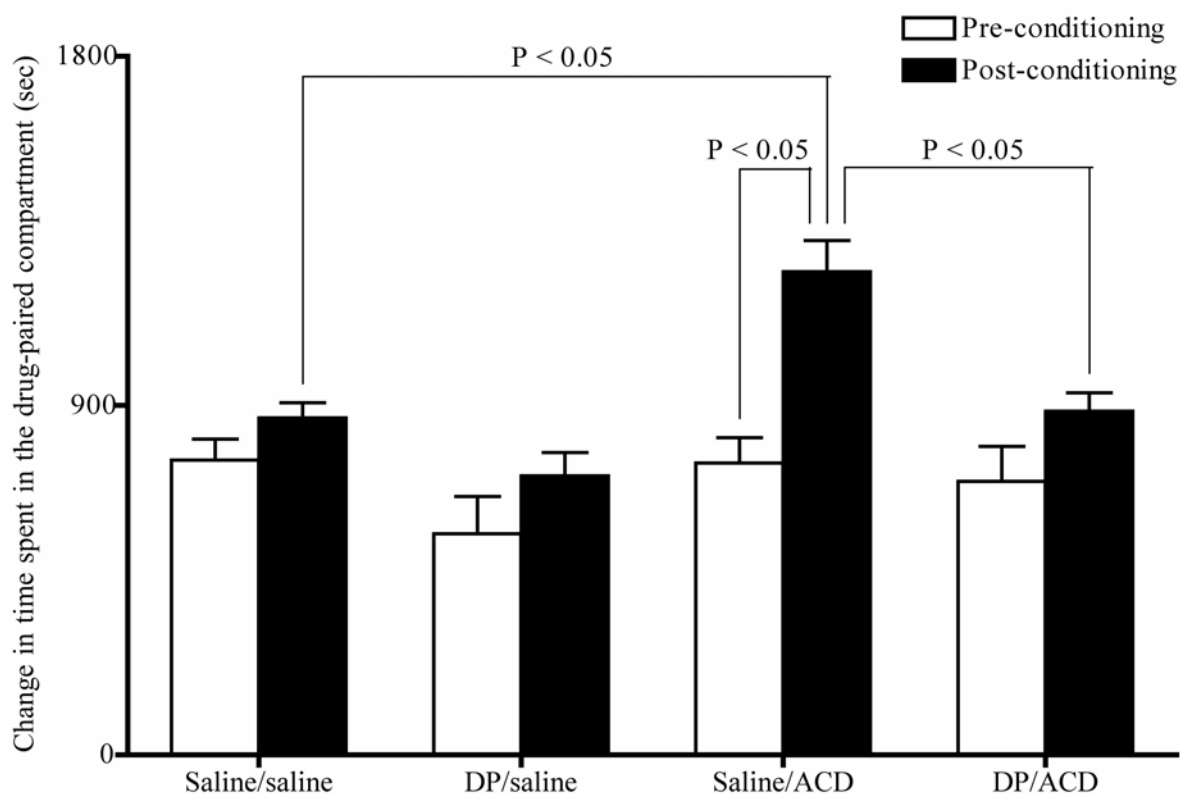
### **Effetti del pretrattamento con la DP sulla cpp indotta dall'ACD**

E' stata scelta la dose di 50 mg/Kg, poichè è stata la minima dose efficace nel prevenire la cpp indotta dall' ETOH .

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

L'ANOVA a due vie relativa ai valori della cpp indotta dall'ACD in seguito al pretrattamento con la DP, rivela un significativo effetto di dose [ $F(3,25)=4,94$ ,  $P<0,01$ ], un effetto di condizionamento [ $F(1,25)=13,77$ ,  $P<0,001$ ] e una interazione dose x condizionamento [ $F(3,25)=1,79$ ,  $P<0,05$ ].

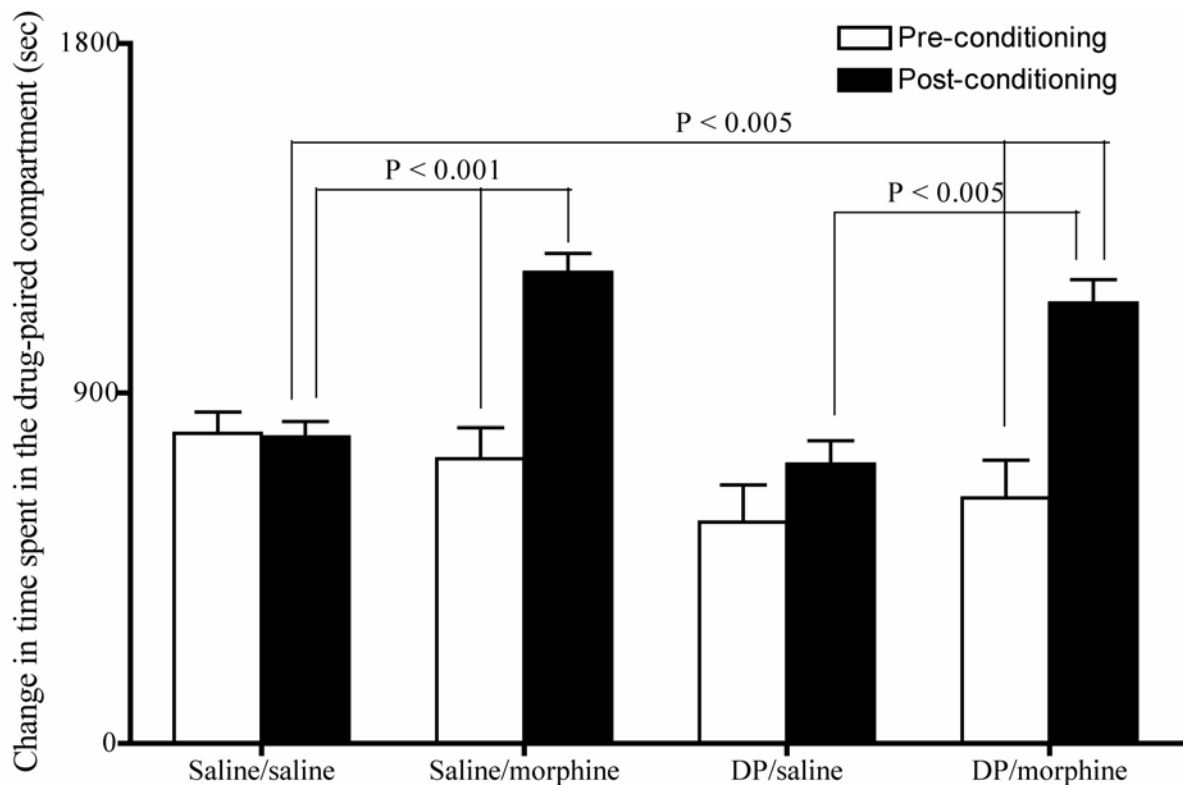
Poiché il gruppo salina/salina rapportato al gruppo DP/salina, trascorre tempi pressochè uguali sia nella sessione di pre- che di postcondizionamento, questo è indicativo dell'assenza di una cpp. I ratti trattati con salina/ACD mostrano un incremento del tempo durante la fase di postcondizionamento ( $1245,0 \pm 80,9$  sec;  $n=8$ ) sia rispetto al gruppo salina/salina ( $867,8 \pm 40,2$  sec;  $n=7$ ;  $P<0,05$ ), sia rispetto alla sua fase di preconditionamento ( $752,0 \pm 65,4$  sec;  $P<0,05$ ); inoltre gli animali pretrattati con la DP 30 minuti prima di ogni sessione con l'ACD, non mostrano preferenza per il compartimento associato alla DP/ACD ( $885,4 \pm 48,1$  sec;  $n=7$ ) sia rispetto alla fase di preconditionamento ( $704,4 \pm 90,3$  sec) e sia rispetto alla fase di postcondizionamento del gruppo salina/salina ( $867,8 \pm 40,2$  sec), come mostrato nella Fig. 16. In effetti, il pretrattamento con la DP abolisce gli effetti della cpp indotta dall' ACD, poiché gli animali passano significativamente meno tempo nel compartimento associato alla DP/ACD rispetto al gruppo trattato con salina/ACD ( $1245,0 \pm 80,9$  sec;  $n=8$ ;  $P<0,05$ ) alla dose inducente una cpp.



**Fig.16** - Effetti del pretrattamento con DP (50 mg/kg, i.p.) sulla cpp indotta da ACD (20 mg/kg, i.g.). I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n=6-14). Sono evidenziate le differenze significative tra il tempo passato nel compartimento meno preferito nella fase di postcondizionamento rispetto alla fase di pre-condizionamento e alla fase di postcondizionamento del gruppo salina/salina e salina/ACD (ANOVA a due vie seguita da post-hoc test, Newman Keuls,).

## **Effetti del pretrattamento con la DP sulla cpp indotta dalla morfina**

L'ANOVA a due vie dei dati relativi alla cpp indotta dalla morfina ha messo in evidenza un significativo effetto di gruppo [ $F(3,40)=6,50$ ,  $P<0,005$ ], un significativo effetto di condizionamento [ $F(1,40)=37,97$ ,  $P<0,0000005$ ] ed una significativa interazione dose x condizionamento [ $F(4,40)=8,47$ ,  $P<0,0005$ ]. Il pretrattamento con la DP (50 mg/Kg, i.p., n=9), 30 minuti prima di ogni sessione con la morfina, non ha mostrato interferenze sulla cpp indotta dalla morfina stessa. Infatti, gli animali mostrano una preferenza netta per il compartimento associato alla DP/morfina ( $1132 \pm 59,8$  sec; n=8), sia rispetto al postcondizionamento del gruppo salina/salina (riportato precedentemente,  $788,7 \pm 38,3$  sec;  $P<0,005$ ; n=15) e sia rispetto alla fase di preconditionamento ( $631,6 \pm 97,4$  sec;  $P<0,005$ ; n=8). Inoltre i ratti condizionati con DP/morfina passano uguale tempo, durante la fase di postcondizionamento ( $1132 \pm 59,8$  sec) del gruppo trattato con salina/morfina ( $1210,6 \pm 49,1$  sec; n=10) (Fig. 17).



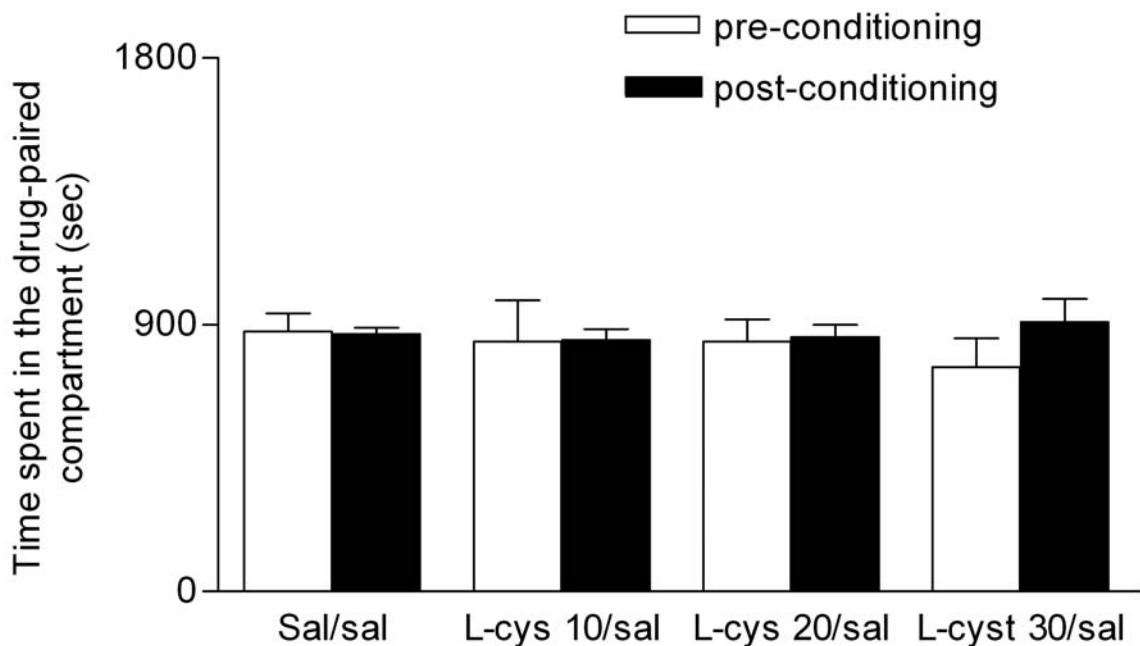
**Fig. 17** - Effetti del pretrattamento con la DP (50 mg/kg, i.p.) sulla cpp indotta dalla morfina (2.5 mg/kg, i.p.). I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n=8-10). Sono messe in evidenza le significative differenze tra il tempo trascorso nel compartimento meno preferito durante il postcondizionamento e il pre- e postcondizionamento dei gruppi indicati (ANOVA a due vie seguita da post-hoc-test, Newman Keuls)

### Effetti del pretrattamento con la L-cisteina sulla cpp indotta dall'ETOH

Il pretrattamento con la L-cisteina non evidenzia nessun effetto di cpp; infatti il gruppo salina/salina (n = 12) rispetto ai gruppi L-cisteina (10, 20 and 30 mg/kg; n = 7 in tutti i casi)/salina trascorrono gli stessi tempi nelle sessioni di pre- e postcondizionamento, indicando quindi un'assenza di effetti motivazionali (Fig. 18).

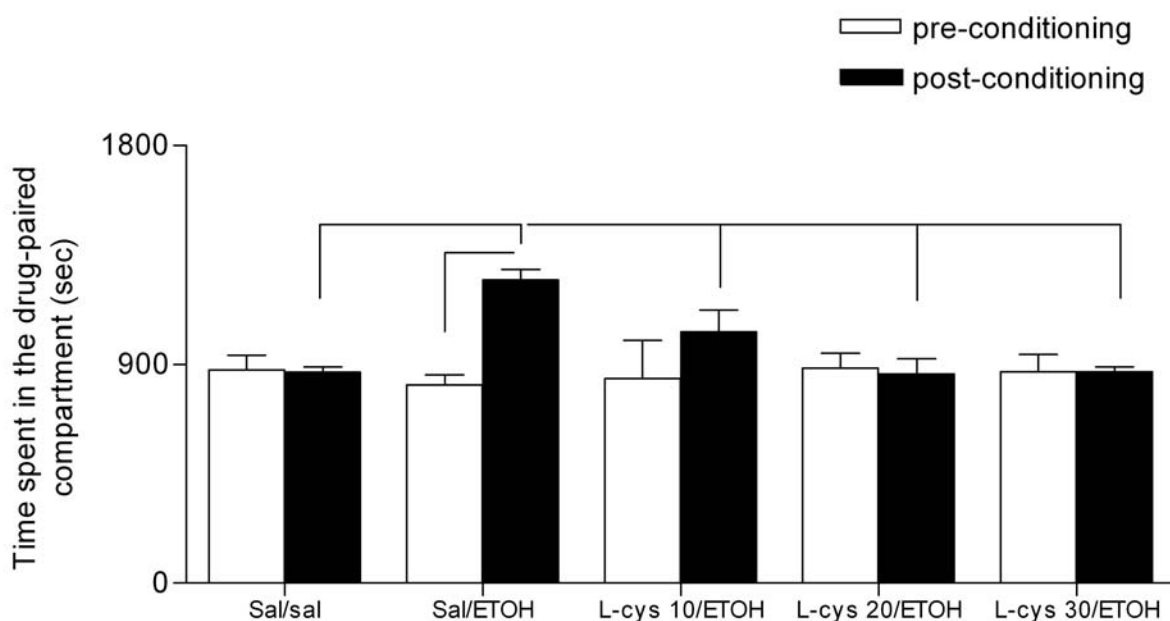
Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari





**Fig. 18** – Effetti di differenti dosi di L-cisteina (10, 20 e 30 mg/Kg, i. p.) sulla cpp, confrontate nel compartimento scuro. I dati sono espressi come tempo in secondi ( $\pm$  SEM; n = 7 - 12).

L'ANOVA a due vie relativa alle diverse dosi di L-cisteina (10, 20 and 30 mg/kg, i. p.) sulla cpp indotta dall'ETOH rivela un significativo effetto di gruppo [ $F(4,38) = 4,51, p = 0,0004$ ], di condizionamento [ $F(1,38) = 7,16, p = 0,001$ ] ed una interazione di gruppo x condizionamento [ $F(4,38) = 6,08, p = 0,0007$ ]. La L-cisteina previene la cpp indotta dall'ETOH (1g/Kg, i. g.; n=17). Questo effetto è mostrato nella Fig. 18. Gli animali pretrattati con la L-cisteina trascorrono meno tempo (10 mg/Kg:  $1035,00 \pm 87,21$  secondi,  $p = 0,037$ ; 20 mg/Kg:  $861,17 \pm 62,85$  secondi,  $p = 0,0037$  e 30 mg/Kg;  $87,17 \pm 19,51$ ,  $p = 0,002$  rispettivamente) nel compartimento associato all'ETOH, rispetto al gruppo trattato con salina/ETOH, il quale induce una significativa cpp ( $1246,29 \pm 43,16$ ).

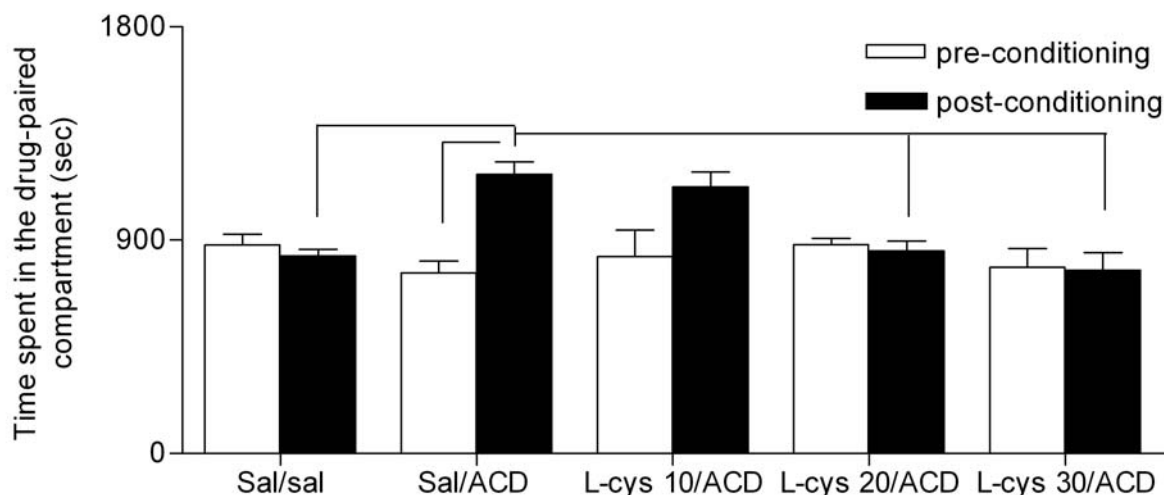


**Fig. 18** – Effetto del pretrattamento della L-cisteina (10, 20 e 30 mg/Kg, i. p.) sulla cpp indotta dall'ETOH (1g/Kg, i. g.). I dati sono espressi come tempo in secondi ( $\pm$  SEM; n = 5-14). Sono indicate le differenze statisticamente significative tra il tempo trascorso durante il post-condizionamento e il tempo trascorso nella fase di pre-condizionamento, così come tra il post-condizionamento del gruppo ed il post-condizionamento del gruppo salina/salina (ANOVA a due vie seguito dal post-hoc-test di Newman Keuls).

### **Effetti del pretrattamento con la L-cisteina sulla cpp indotta dall'ACD**

L'effetto del pretrattamento con la L-cisteina (10, 20 and 30 mg/kg, i. p.) è stato studiato sulla dose di ACD in grado di indurre un'evidente cpp (20 mg/Kg, i. g.), come mostrato nella Fig. 19.

L'ANOVA a due vie riferita ai dati ottenuti con la cpp indotta dall'ACD in risposta al pretrattamento con la L-cisteina mostra un significativo effetto di gruppo [ $F(4,38) = 2,86$ ,  $p = 0,0036$ ], di condizionamento [ $F(1,38) = 16,14$ ,  $p = 0,00027$ ] e una interazione gruppo x condizionamento [ $F(4,38) = 11,62$ ,  $p = 0,000003$ ]. Si è evidenziato che il trattamento salina/ACD induce un incremento del tempo trascorso nel compartimento associato alla sostanza in esame durante la fase di postcondizionamento ( $n = 9$ ,  $1178,56 \pm 52,86$  secondi) rispetto alla rispettiva fase di precondizionamento ( $761,00 \pm 50,12$  secondi;  $p < 0,00014$ ) e rispetto alla fase di postcondizionamento del gruppo salina/salina ( $n = 16$ ,  $832,81 \pm 29,30$  secondi;  $p < 0,00015$ ). Gli animali pretrattati con la L-cisteina, 30 minuti prima di ogni sessione di condizionamento con ACD, (20 mg/ Kg, i. g.) mostrano una riduzione della cpp. I ratti pretrattati con la L-cisteina (20 mg/kg:  $853,71 \pm 41,30$  secondi,  $p = 0,00033$  e 30 mg/kg:  $773,20 \pm 74,20$ ,  $p = 0,00022$ , rispettivamente) trascorrono meno tempo nel compartimento associato all'ACD rispetto al gruppo trattato con salina/ACD. Il pretrattamento con 10 mg/Kg di L-cisteina, prima della somministrazione i. g. di ACD, non è in grado di ridurre la cpp indotta dall'ACD stessa.



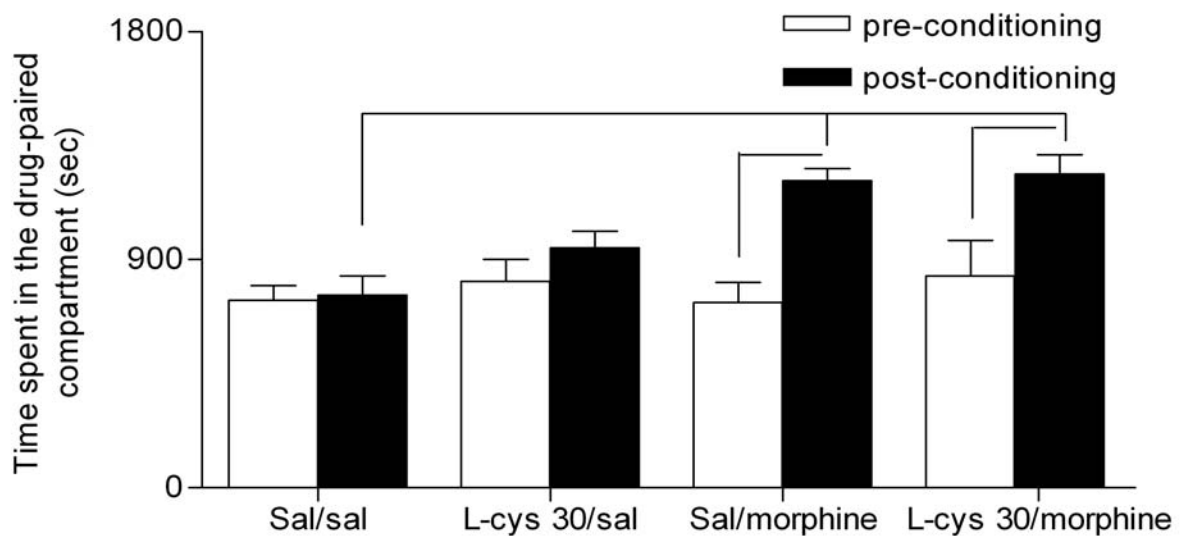
**Fig. 19** - Effetti del pretrattamento con la L-cisteina (10, 20 e 30 mg/kg, i.p.) sulla cpp indotta da ACD (20 mg/kg, i.g.). I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n=5-16). Sono evidenziate le differenze significative tra il tempo passato nel compartimento meno preferito nella fase di postcondizionamento rispetto alla fase di precondizionamento e alla fase di postcondizionamento del gruppo salina/salina e salina/ACD (ANOVA a due vie seguita da post-hoc test, Newman Keuls,).

### **Effetti del pretrattamento con la L-cisteina sulla cpp indotta dalla morfina**

L'ANOVA a due vie evidenzia un significativo effetto di gruppo [ $F(3,32) = 4,05$ ,  $p = 0,015$ ], di condizionamento [ $F(1,32) = 30,59$ ,  $p = 0,000004$ ] e un'interazione di gruppo  $\times$  condizionamento [ $F(3,32) = 6,52$ ,  $p = 0,0014$ ]. Come mostrato nella Fig. 20, gli animali condizionati per 4 giorni con la morfina (sotto forma di cloridrato alla dose di 2.5 mg/Kg, i. p.) mostrano una cpp verso il compartimento associato alla sostanza in esame ( $1210,0 \pm 49,06$  secondi) rispetto alla fase di precondizionamento ( $733,40 \pm 79,17$  secondi,  $n = 10$ ;  $p=0,00018$ ) e rispetto alla fase di postcondizionamento del gruppo salina/salina ( $763,00 \pm 72,33$  secondi,  $n = 12$ ;  $p < 0,00015$ ).

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Il pretrattamento con la dose più alta di L-cisteina (30 mg/Kg) 30 minuti prima del condizionamento con la morfina, non interferisce con la capacità di questa di indurre una cpp. Infatti gli animali mostrano la stessa preferenza verso il compartimento associato al trattamento con la L-cisteina/morfina ( $1236,60 \pm 76,32$  secondi) sia rispetto alla sua fase di preconditionamento ( $834,00 \pm 142,12$  secondi,  $n = 5$ ;  $p = 0,0095$ ) che rispetto alla fase di postcondizionamento del gruppo salina/salina ( $763,00 \pm 72,33$  secondi,  $n = 12$ ;  $p = 0,0006$ ). Il pretrattamento con la dose più alta di L-cisteina (30 mg/Kg) 30 minuti prima del condizionamento con la morfina, non interferisce con la capacità di questa di indurre una cpp. Infatti gli animali mostrano la stessa preferenza verso il compartimento associato al trattamento con la L-cisteina/morfina ( $1236,60 \pm 76,32$  secondi) sia rispetto alla sua fase di preconditionamento ( $834,00 \pm 142,12$  secondi,  $n = 5$ ;  $p = 0,0095$ ) che rispetto alla fase di postcondizionamento del gruppo salina/salina ( $763,00 \pm 72,33$  secondi,  $n = 12$ ;  $p = 0,0006$ ).



**Fig. 20** - Effetti del pretrattamento con la L-cisteina (30 mg/kg, i.p.) sulla cpp indotta dalla morfina (2.5 mg/kg, i.p.). I dati sono espressi in secondi ( $\pm$  SEM; n=5-12). Sono messe in evidenza le significative differenze tra il tempo trascorso nel compartimento meno preferito durante il post-condizionamento e il pre- e postcondizionamento dei gruppi indicati (ANOVA a due vie seguita da post-hoc-test, Newman Keuls).

## 4.2 Livelli ematici di ACD

Un ulteriore gruppo di animali (n = 18) è stato utilizzato allo scopo di determinare i livelli ematici di ETOH ed ACD, ottenuti dopo un'unica somministrazione i. g. di ETOH alla dose di 1g/Kg. I campioni di sangue sono stati prelevati a 30, 60 e 120 minuti dal trattamento. I valori sono espressi in mg/ml di plasma. L'ANOVA a due vie (dose x tempo) ha mostrato un significativo effetto di gruppo [ $F(7,33) = 33,48, p < 0,001$ ].

E' stato dimostrato che le concentrazioni ematiche di ETOH sono correlate alla dose di ETOH somministrato per via i. g. (1g/Kg, n=6) mentre il 4-MP (45 mg/Kg, n=6) determina un loro incremento significativo (30 minuti,  $p < 0,05$ ; 60 minuti,  $p < 0,05$ ; 120 minuti,  $p < 0,05$ , rispettivamente) (Tab. 1).

Treatment	ETOH			ACD		
	30 min	60 min	120 min	30 mins	60 mins	120 mins
Saline /ETOH	0.1407± 0.0175	0.1383± 0.0363	0.1163± 0.0196	0.0027± 0.0004	0.0040± 0.0012	0.0035± 0.0006
4-MP/ETOH	0.1873± 0.0086 *	0.1795± 0.0250 *	0.1402± 0.0273 *	0.0014± 0.0009 **	0.0015± 0.0002 ***	0.0009± 0.00007 ****

**Tab. 1** – Livelli ematici di ETOH e ACD dopo trattamento con ETOH.

Inoltre i livelli plasmatici di ACD tendono ad aumentare in seguito allo stesso trattamento di ETOH, raggiungendo così concentrazioni significanti. Quando invece gli animali (n=6) vengono pretrattati con una sola dose di 4-MP mostrano una significativa riduzione delle concentrazioni di ACD nel sangue rispetto al gruppo ricevente solo ETOH (30 minuti,  $p < 0,01$ ; 60 minuti,  $p < 0,005$ ; 120 minuti,  $p < 0,005$  rispettivamente).

## 5. Discussione

I nostri risultati suggeriscono che l'ACD svolge un ruolo fondamentale negli effetti motivazionali dell'ETOH ingerito. Questo è stato evidenziato dall'utilizzo di tre strumenti di indagine : il 4-MP, un inibitore periferico competitivo della ADH, la DP, un agente sequestrante selettivo dell'ACD e, soprattutto, la L-cisteina, un aminoacido non essenziale, capace di legare covalentemente l'ACD. Tali agenti sono stati in grado di diminuire, in modo dose-dipendente, la cpp indotta dall'ETOH. Mentre la DP, e la L-cisteina hanno ridotto in modo dose-dipendente, anche la cpp indotta dalla somministrazione intragastrica di di ACD. Il fatto che i tre antagonisti non interferiscono sulla cpp indotta dalla morfina, ben suggerisce che non interferiscono con la motivazione e ben dimostrano la loro specificità d'azione sulle proprietà motivazionali indotte dall'ETOH con il suo primo metabolita e dell'ACD *di per se*. Il 4-MP non interferendo con la cpp indotta nel ratto dall'ACD conferma ulteriormente il suo effetto sull'ADH. La capacità del 4-MP, della DP e della L-cisteina di ridurre la cpp indotta dall'ETOH potrebbe essere giustificata da una diminuzione dei livelli ematici di ACD formata in seguito al metabolismo dell'ETOH sia a livello periferico che centrale (Peana et al., 2008).

L'assenza di effetti del 4-MP sulla cpp indotta dall'ACD esclude la possibilità che esso possa agire aumentando i livelli ematici di ETOH (Waller et al., 1982) in seguito al blocco del suo metabolismo.



L'alcol deidrogenasi (ADH) rappresenta la principale via metabolica, per mezzo della quale l'ETOH ingerito viene trasformato in ACD; questa attività enzimatica è situata a livello gastrico, dove esercita un effetto di primo passaggio, e a livello epatico (Baraona et al., 1991).

Questo studio ha dimostrato che il pretrattamento con 4-MP ha ridotto la cpp indotta dall'ETOH in maniera dose-dipendente; questo può confermare che l'ACD derivante dal suo metabolismo possa essere responsabile degli effetti motivazionali osservati nel ratto. Poiché a livello centrale, fisiologicamente, non sono presenti forme attive di ADH, l'azione del 4-MP avviene a livello periferico, dove previene la formazione di ACD (Escarabajal and Aragon, 2002a; 2002b). Quertemont et al., (2005) hanno evidenziato che il 4-MP previene gli effetti della cianammide, un inibitore della ALDH, sul comportamento indotto dall'ETOH, sostenendo che questi effetti sono dovuti all'accumulo periferico di ACD. Una possibile ipotesi per spiegare la capacità del 4-MP di bloccare la cpp indotta dall'ETOH, potrebbe essere trovata nel fatto che il 4-MP abbia *di per se* proprietà motivazionali. Tuttavia, il trattamento con questo inibitore metabolico, il 4-MP (22.5, 45 and 67.5mg/kg) non produce né effetti positivi o avversivi rispetto al gruppo dei controlli, ricevente salina. L'osservazione che il 4-MP non induce *di per se* una *place preference* o una *place aversion*, ma riduce la *place preference* da ETOH, indica che le proprietà motivazionali dell'ETOH sono riconducibili all'ACD. In aggiunta, il nostro studio rivela che il 4-MP non interferisce sugli effetti rinforzanti ottenuti in seguito alla somministrazione i. g. di ACD. Infatti gli animali pretrattati con il 4-MP e condizionati con l'ACD, il giorno del test, mostrano lo stessa preferenza rispetto al gruppo trattato con salina/ACD.

Queste osservazioni sostengono ulteriormente l'ipotesi che l'effetto del 4-MP avvenga tramite la riduzione dei valori plasmatici di ACD, ottenuta dal metabolismo dell'ETOH a livello periferico come da noi dimostrato. La somministrazione di 4-MP potrebbe però interferire sulla mancanza di cpp indotta dall'ETOH quando quest'ultimo è somministrato a dosi normalmente inefficaci (0,5 g/Kg).

Tuttavia, i nostri risultati mostrano che il gruppo 4-MP/ETOH (0,5 g/Kg) non mostra una cpp statisticamente significativa. L'inibizione della ADH incrementa i livelli ematici di ETOH di circa 5-6 volte (Waller et al., 1982); a queste alte concentrazioni, l'ETOH non induce alcuna preferenza condizionata (Van der Kooy et al., 1983; Bozarth, 1990). Nei nostri esperimenti non possiamo escludere che l'effetto inibente del 4-MP sulla dose di ETOH, inducente una cpp, possa essere dovuto ad una maggiore concentrazione di ETOH circolante, tendente all'avversione, ma i dati ottenuti con la somministrazione della DP supportano l'idea che l'ACD sia la responsabile degli effetti rinforzanti dell'ETOH. Infatti la DP è in grado di prevenire la cpp sia dall'ETOH che dall'ACD e, grazie alle sue proprietà sequestranti nei confronti dell'ACD, non interferisce, aumentandoli, sui livelli ematici di ETOH (Nagasawa et al., 1978), come invece accade con il 4-MP.

Le dosi di ETOH e di ACD, somministrati per via i.g., sono state scelte in considerazione di altri lavori già pubblicati, nonostante fossero riferiti a vie di somministrazioni intraperitoneali e procedure sperimentali leggermente differenti (Bozarth, 1990; Quertemont and De Witte, 2001). È importante sottolineare che il trattamento i.g. è sottoposto ad un più rilevante metabolismo di primo passaggio, con conseguente minore incremento dei livelli ematici rispetto alla via i.p. Pertanto, un confronto delle dosi tra le due vie di somministrazione è solo indicativo.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

I nostri risultati mostrano che l'ETOH induce effetti motivazionali positivi, mediante la tecnica della *place preference* leggermente sbilanciata. Infatti la somministrazione di ETOH, alla dose di 1 g/Kg per via i.g., produce una significativa cpp, mentre è privo di effetti quando il condizionamento avviene alle dosi di 0,5 e 2 g/Kg.

Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da altri autori, che utilizzano simili dosaggi, ma che impiegano vie di somministrazione differenti (Bozarth, 1990; Biała e Kotlińska, 1999). Studi precedenti eseguiti sulla cpp indotta dall'ETOH hanno evidenziato risultati contraddittori (Fidler et al., 2004; Bozarth, 1990; Bieńkowski et al., 1996; Biała and Kotlińska 1999); comunque bisogna ricordare che la capacità dell'ETOH di indurre una cpp dipende da una serie di complesse interazioni tra un certo numero di variabili, che includono fattori genetici, la via di somministrazione (Fidler, et al., 2004), il disegno sperimentale (biased contro unbiased), il numero e la durata dei *trials* di condizionamento e la dose di ETOH (Carr, et al., 1989; Bozarth, 1990). Nel nostro caso abbiamo associato la sostanza al compartimento meno preferito, ossia il compartimento più scuro con il pavimento a griglia, condizionando gli animali per 15 giorni per un totale di 8 associazioni salina/ETOH. Così come l'ETOH, anche l'ACD, somministrata per via i.g., dà origine a una curva dose-effetto a forma di campana, molto simile a quella ottenuta dai lavori di Quertemont e De Witte, (2001), realizzati nel ratto Wistar con dosaggi analoghi. I nostri dati sperimentali, in accordo con quelli di Rodd-Henricks (2002), dimostrano che l'ACD è molto più potente dell'ETOH nell'indurre un rinforzo positivo; infatti la cpp può essere ottenuta con l'ACD dopo solo 8 giorni di condizionamento alla dose di 20 mg/Kg, mentre l'ETOH richiede un condizionamento di 15 giorni a dosi 50 volte superiori (1000 mg/Kg ).

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Inoltre, dopo una singola somministrazione i.g. di ETOH alla dose in grado di indurre una *place preference* (1000 mg/Kg ), i livelli ematici di ETOH arrivano a 0.132 mg/ml, valore all'interno del range determinato da Cunningham e colleghi (2002) nel topo.

Inoltre, in seguito alla somministrazione della stessa dose di ETOH si raggiungono livelli di ACD nel sangue di 0.0034 mg/ml, corrispondenti ad un rapporto 50 volte inferiore rispetto all'EtOH. Ciò indica, quindi, che la somministrazione i.g. di ETOH 1g/Kg raggiunge livelli ematici di ACD paragonabili a quelli prodotti da una ipotetica somministrazione di ACD alla dose di 20 mg/kg per via i.g..

Gli effetti ottenuti in seguito alla somministrazione di ACD (20 mg/kg, i.g.) sul test della cpp, aggiunge una ulteriore conferma sull'ipotesi che una elevata concentrazione ematica di ACD possa saturare la barriera ematoencefalica e raggiungere il cervello. L'ACD prodotta perifericamente può aggiungersi a quella prodotta a livello centrale, attraverso il sistema della catalasi (Quertemont et al., 2005). Inoltre diversi studi evidenziano che la somministrazione sistemica di ACD, a dosi vicine ai 20 mg/Kg satura le ALDH epatiche ed endoteliali (Hoover e Brien, 1981; Ward et al., 1997). In queste condizioni l'ACD potrebbe attraversare la barriera ematoencefalica ed esercitare la propria azione sul cervello. D'altro canto, la nozione che l'ACD possa attraversare la barriera ematoencefalica è supportata da precedenti dati di letteratura i quali hanno mostrato che la somministrazione periferica di ETOH induce livelli significativi di ACD nel cervello (Isse et al., 2005) e che l'ACD è stata ritrovata in rilevanti concentrazioni nel cervello (Ward et al., 1997; Quintanilla e Tampier, 2003; Quintanilla et al., 2002; Quertemont e tambour, 2004; Heap et al., 1995) dopo una somministrazione periferica della stessa ACD.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Coerentemente con i dati sopra riportati, l'aminoacido DP, a dosi che non producono proprietà motivazionali, riduce la cpp indotta dalla somministrazione di ETOH e ACD per via intragastrica.

Inoltre, il fatto che la cpp indotta dalla morfina non risenta del pretrattamento con la DP, è indicativo della sua specificità nella modulazione delle proprietà motivazionali dell' ETOH e dell'ACD. La scelta delle dosi di DP (25 and 50 mg/kg), è basata su precedenti risultati della letteratura (Font et al., 2005; 2006a; 2006b) che dimostrano l'interazione tra la somministrazione i.p. di DP e il trattamento con ETOH e ACD. Il meccanismo con cui la DP riduce la cpp indotta dall'ETOH e dall'ACD, si basa su precedenti dati di letteratura che indicano come la DP, *in vivo*, possa condensare l'ACD per formare un addotto stabile. Questo prodotto della condensazione con l'ACD è un aminoacido ciclico,(2,5,5-trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid), che mostra una buona stabilità e viene escreto per via urinaria (Nagasawa et al., 1975; 1987; Cohen et al., 2000; Font et al., 2006a).

Nagasawa e colleghi (1977; 1978; 1980), inoltre, hanno dimostrato che la somministrazione i.p. di DP nel ratto, a differenti intervalli di tempo, prima della somministrazione di ETOH, produce un significativa riduzione dei valori ematici di ACD, con una riduzione media del 70% (Yusof et al., 2000), senza incrementare i livelli emetici di ETOH, mentre è rilevata nel cervello 30 minuti dopo la somministrazione di 100 mg/kg (Yusof et al., 2000).

I risultati del nostro lavoro di ricerca concordano con le osservazioni riportate sull'inattivazione della ACD da parte della DP con conseguente riduzione degli effetti comportamentali prodotti dalla somministrazione per via i.p. di ETOH e ACD nel topo (Font et al., 2005), dall'abolizione del consumo volontario di ETOH nel ratto (Font et al., 2006b) se somministrata per via intracerebroventricolare e dalla riduzione della cpp indotta dall'ETOH nel topo (Font et al., 2006a).

Nonostante questi studi comportamentali forniscano una metodica sensibile per la valutazione delle effettive proprietà motivazionali delle sostanze d'abuso, i dati neurochimici, tuttavia, ben supporteranno l'ipotesi sull'inattivazione dell'ACD da parte della DP.

I risultati di uno sviluppo di un comportamento di self-administration di ACD nella VTA in ratti alcol preferenti (Rodd-Henricks et al., 2002) e i dati elettrofisiologici di Foddai e colleghi (2004) mostrano che l'ACD stimola, in maniera dose dipendente, l'aumento dell'attività neuronale nella VTA dei neuroni dopaminergici. Inoltre, Enrico e colleghi (2006) hanno evidenziato che l'ACD, somministrata nel ratto per via i.g., incrementa il rilascio di dopamina nella *shell del Nucleus Accumbens* (Melis et al., 2007).

Queste osservazioni rendono plausibile l'ipotesi che il sistema dopaminergico mesolimbico possa essere coinvolto nei meccanismi neurochimici che stanno alla base delle proprietà motivazionali dell'ACD.

In una seconda fase della nostra ricerca, allo scopo di dimostrare ulteriormente il coinvolgimento dell'ACD nelle proprietà motivazionali dell'ETOH, i nostri studi si sono indirizzati su un altro agente potenzialmente in grado di inibire gli effetti gratificanti dell'ETOH, o meglio, dell'ACD attraverso le sue proprietà sequestranti l'ACD, la L-cisteina.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

Più precisamente la L-cisteina, un aminoacido non essenziale è in grado di legare covalentemente l'ACD per formare un addotto stabile e non tossico (Peano et al., 2008). La somministrazione intraperitoneale della L-cisteina, 30 minuti prima di ogni sessione di condizionamento con EtOH ed ACD, riduce la cpp indotta dagli stessi, alle stesse dosi sopra citate. In aggiunta, la L-cisteina non interferisce sulla cpp indotta dalla morfina, indicando la sua specificità nella modulazione degli effetti motivazionali dell'EtOH e dell'ACD.

La capacità della L-cisteina di ridurre la cpp indotta dall'EtOH potrebbe essere dovuta ad una diminuzione dei livelli plasmatici dell'ACD formata dal metabolismo dell'EtOH ingerito. Il trattamento con L-cisteina (10, 20 e 30 mg/Kg) non mostra effetti di rinforzo né positivi e né avversivi se confrontata con il gruppo di ratti di controllo, trattati con salina. L'osservazione che la L-cisteina non induce né una *place preference* né una *place aversion* ma è capace di ridurre la *place preference* indotta dall'EtOH e dall'ACD, suggerisce che l'ACD derivante dall'EtOH svolge un ruolo chiave sulla cpp indotta dall'EtOH stesso.

La presenza di un gruppo sulfidrilico nella molecola della L-cisteina potrebbe essere molto importante negli effetti comportamentali osservati durante questo studio. Infatti, l'interazione tra l'ACD e composti contenenti gruppi tiolici, come la L-cisteina (Salaspuro, 2007; Salaspuro et al., 2002) e la DP (Cohen et al., 2000; Font et al., 2005; Kera et al., 1985; Nagasawa et al., 1980, 1984, 1987), sono stati più volte descritti in letteratura.

È stato dimostrato che la L-cisteina è in grado di legare covalentemente l'ACD formata in seguito all'ossidazione dell'ETOH *in vivo* (Cederbaum and Rubin, 1976; Nagasawa et al., 1978, 1984) per formare un composto atossico (2-methylthiazolidine-4-carboxylic acid); inoltre, previene l'interazione dell'ACD derivante dall'ETOH con molte proteine cellulari con conseguenti effetti tossici (Salaspuro et al., 2002; Sprince et al., 1974; Vasdev et al., 1995).

In aggiunta, i composti tiolici sono stati studiati come sequestranti dell'ACD proveniente dal metabolismo dell'ETOH in grandi consumatori di bevande alcoliche. Infatti, la L-cisteina rilasciata da formulazioni farmaceutiche idonee, a livello buccale, riduce marcatamente i livelli di ACD nella saliva dopo l'ingestione di alcol (Salaspuro et al., 2002, 2006).

Coerentemente, Vasdev e collaboratori (1995) hanno mostrato che la N-acetilcisteina, un aminoacido della dieta, analogo alla L-cisteina, attenua l'ipertensione indotta dall'ACD derivante dall'ETOH e gli effetti avversi, a livello dei vasi renali, indotti da un trattamento cronico con ETOH nel ratto. Infine, la somministrazione della L-cisteina nel ratto, riduce significativamente l'incremento di ACD nel sangue, dopo trattamento per via orale con ETOH, senza interferire con i livelli ematici dell'ETOH stesso (Escarabajal et al., 2001). D'altro canto, è stato visto che negli animali da esperimento la L-cisteina esogena protegge dagli effetti nocivi dell'ACD (Nagasawa et al., 1984; O'Neill and Rahwan, 1976). In considerazione di ciò, Sprince e collaboratori (1974) sostengono che la L-cisteina sia un possibile agente protettivo contro la tossicità cronica da ACD associata all'abuso di alcol.



Il meccanismo alla base della quale la L-cisteina riduce la cpp indotta dall' ETOH e dall'ACD potrebbe essere ricercato nel fatto che la L-cisteina, attraversando la barriera ematoencefalica mediante i trasportatori specifici per gli aminoacidi eccitatori, i quali rappresentano dei fattori limitanti (Chen and Swanson, 2003), possa intervenire sulla riduzione dei valori di ACD formata dopo metabolismo dell' ETOH sia a livello centrale che periferico. D'altronde le cellule del sangue agiscono come trasportatori dell'ACD negli altri organi. In aggiunta, gli eritrociti e i macrofagi, entrambi cellule circolanti, hanno una buona capacità di ossidare l' ETOH in ACD la quale agisce sui tessuti vascolari (Baraona et al., 1987; Wickramasinghe, 1987).

La L-cisteina, come la DP, interagisce, sia *in vivo* che *in vitro*, con l'ACD per l'elevata reattività dell'atomo di carbonio carbonilico.

Di conseguenza, come la DP (Nagasawa et al., 1977, 1978, 1980, 1987), anche la N-acetil cisteina è in grado di ridurre i livelli ematici di ACD prodotta dopo un'iniezione intraperitoneale di ETOH (Vasdev et al., 1995) mentre quelli di ETOH non subiscono modificazioni (Escarabajal et al., 2001; Nagasawa et al., 1980).

Un effetto positivo della L-cisteina sul metabolismo ossidativo dell' ETOH potrebbe includere anche l'abilità di questo composto tiolico di subire reazioni redox. Infatti, diversi dati dimostrano le proprietà antiossidanti della L-cisteina come precursore dell'antiossidante fisiologico, il glutatione (Soghier and Brion, 2006) e come diretto scavenger di radicali liberi (Shackebaei et al., 2005).

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

## 6. Conclusioni

In conclusione, la capacità del 4-MP, della DP e della L-cisteina di ridurre la CPP indotta dalla somministrazione i.g. di ETOH può essere riconducibile alla riduzione dei livelli ematici di ACD derivante dal metabolismo dell'ETOH.

Anche se saranno necessari ulteriori approfondimenti questi risultati mettono in discussione la teoria classica sull'EtOH come *di per sé* responsabile degli effetti gratificanti delle bevande alcoliche e rafforzano l'ipotesi che le proprietà motivazionali possono essere attribuite, almeno in parte, all'ACD. Sembra quindi plausibile che la somministrazione delle tre sostanze da noi utilizzate per antagonizzare l'azione dell'ETOH e dell'ACD, possa esercitare una profonda influenza sugli effetti euforizzanti e motivazionali associati all'assunzione di ETOH. Questa osservazione potrebbe portare a un diverso approccio terapeutico dell'alcolismo; infatti un agente farmacologico in grado di ridurre la concentrazione dell'ACD circolante potrebbe essere sfruttato nella terapia dell'alcolismo o meglio ancora nella prevenzione di una dipendenza da bevande alcoliche. Tali potenziali farmaci, privando l'ETOH delle sue proprietà gratificanti, potrebbe scoraggiare così l'alcolista dal bere.

## 7. Bibliografia

1. Amit Z (1977) Brain and liver aldehyde dehydrogenase: relations to ethanol consumption in wistar rats. *Neuropharmacology* 16:781–784.
2. Baraona E, Padova CD, Tabasco J, Lieber CS (1987) Red blood cells: a new major modality for acetaldehyde transport from liver to other tissues. *Life Sci* 40:253–258.
3. Biala G, Kotlinska J (1999) Blockade of the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference by N-methyl-D-Aspartate receptor antagonist. *Alcohol Alcohol* 28(Suppl. 2):345–351.
4. Bienkowski P, Kuca P, Piasecki J, Kostowski W (1996) Low doses of ethanol induce conditioned place preference in rats after repeated exposure to ethanol or saline injection. *Alcohol Alcohol* 32:547–553.
5. Blednov YA, Harris RA (2008) Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) regulation of ethanol sedation, dependence and consumption: relationship to acamprosate actions. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:1–19.
6. Bozarth MA (1990) Evidence for the rewarding effects of ethanol using the conditioned place preference method. *Pharmacol Biochem Behav* 35:485–487.
7. Brown ZW, Amit Z, Rockman GE (1979) Intraventricular self-administration of acetaldehyde, but not ethanol, in naive laboratory rats. *Psychopharmacology (Berl)* 64:271–276.
8. Brown ZW, Amit Z, Smith BR (1980) Intraventricular self-administration of acetaldehyde and voluntary consumption of ethanol in rats. *Behav Neural Biol* 28:150-155.

9. Carr GD, Fibiger HC, Phillips AG (1989) Conditioned place preference as a measure of drug reward, in *The Neuropharmacological Basis of Reward* (Liebman J, Cooper S eds), pp 264–319. Oxford Science Publication, Clarendon Press, Oxford.
10. Cederbaum AI, Rubin E (1976) Protective effect of cysteine on the inhibition of mitochondrial functions by acetaldehyde. *Biochem Pharmacol* 25:963–973.
11. Chen Y, Swanson RA (2003) The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J Neurochem* 84:1332–1339.
12. Cohen JF, Elberling JA, DeMaster EG, Lin RC, Nagasawa HT (2000) N-Terminal dipeptides of D-(-)-penicillamine as sequestration agents for acetaldehyde. *J Med Chem* 43:1029–1033.
13. Cunningham CL, Clemans GM, Fidler TL (2002) Injection timing determines whether intragastric ethanol produces conditioned place preference or aversion in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 72:659–668.
14. Cunningham CL, Ferree NK, Howard MA (2003) Apparatus bias and place conditioning with ethanol in mice. *Psychopharmacology* 170:409–422.
15. Enrico P, Peana AT, Sirca D, Mereu M, Demurtas L, Columbano N, Diana M (2006). Are the hedonistic properties of oral ethanol mediated by acetaldehyde? In vivo microdialysis study in the rat. Program No. 193.17 /NN762006 Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience, 2006. Online, Atlanta, GA.
16. Escarabajal D, Miquel M, Aragon CMG (2001) L-cysteine, a thiol amino acid, increases the stimulating acute effect of ethanol on locomotion. *Alcohol* 25:83–88.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

17. Escarabajal MD, Aragon CM (2002a) The effect of cyanamide and 4-methylpyrazole on the ethanol-induced locomotor activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 72:389–395.
18. Escarabajal MD, Aragon CM (2002b) Concurrent administration of diethyldithiocarbamate and 4-methylpyrazole enhances ethanol-induced locomotor activity: the role of brain ALDH. *Psychopharmacology* 160:339–343.
19. Feelisch M (1998) The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:113–122. Fidler TL, Bakner L, Cunningham CL (2004) Conditioned place aversion induced by intragastric administration of ethanol in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 77:731–743.
20. Foddai M, Dosia G, Spiga S, Diana M (2004) Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology* 29:530–536.
21. Font L, Aragon CM, Miquel M (2006) Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by d-penicillamine. *Behav Brain Res* 171:78–86.
22. Font L, Miquel M, Aragon CM (2005) Prevention of ethanol-induced behavioral stimulation by D-penicillamine: a sequestration agent for acetaldehyde. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1156–1164.
23. Genovese A, Dimaggio R, Lisanti MT, Piombino P, Moio L (2005) Aroma composition of red wines by different extraction methods and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Ann Chim* 95:383–394.
24. Heap L, Ward RJ, Abiaka C, Dexter D, Lawlor M, Pratt O, Thomson A, Shaw K, Peters TJ (1995) The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochem Pharmacol* 50:263–270.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

25. Hoover DJ, Brien JF (1981) Acetaldehyde concentration in rat blood and brain during the calcium carbimide-ethanol interaction. *Can J Physiol Pharmacol* 59:65–70.
26. Hunt WA (1996) Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain: a review. *Alcohol* 13:147–151.
27. Isse T, Matsuno K, Oyama T, Kitagawa K, Kawamoto T (2005) Aldehyde dehydrogenase 2 gene targeting mouse lacking enzyme activity shows high acetaldehyde level in blood, brain, and liver after ethanol gavages. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1959–1964.
28. Kera Y, Kiriya T, Komura S (1985) Conjugation of acetaldehyde with cys-teiniylglycine, the first metabolite in glutathione breakdown by c-glutamyl-transpeptidase. *Agents Actions* 17:48–52.
29. Lill R, Muhlenhoff U (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:457–486.
30. Lintas A, Sirca D, Peana AT, Enrico P, Assaretti AR, Mereu M, Golosio A, Diana M. D-Penicillamine prevents ethanol and acetaldehyde-induced increase in mesolimbic dopaminergic neuronal activity Program No. 609.19 / JJ4 2007 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, California: Society for Neuroscience, 2007. Online.
31. Lippard SJ, Berg JM (1994) Principles of Bioinorganic Chemistry. University Science Books, Mill Valley, California.
32. Liu S, Pilone GJ (2000) An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int J Food Sci Technol* 35:49–61.
33. *Medicamenta* (1991–1992) Vol.1\_, Parte Generale: Tab.18–19. Cooperativa Farmaceutica Milanese, Milano, Italy, pp 814–815.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

34. Melis M, Enrico P, Peana AT, Diana M (2007) Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *Eur J Neurosci*, 26:2824–2833.
35. Mereu M, Enrico P, Sirca D, Melis M, Golosio A, Peana AT, Assaretti AR, Lintas A, Diana M. Functional acetaldehyde blockade selectively prevents ethanol-induced increase in mesolimbic dopaminergic system activity. In vivo microdialysis Program No. 609.21 / JJ6 2007 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, California: Society for Neuroscience, 2007. Online.
36. Myers WD, Ng KT, Singer G (1984) Effects of naloxone and buprenorphine on intravenous acetaldehyde self-injection in rats. *Physiol Behav* 33:449–455.
37. Nagasawa HT, Elberling JA, DeMaster EG (1980) Structural requirements for the sequestration of metabolically generated acetaldehyde. *J Med Chem* 23:140–143.
38. Nagasawa HT, Elberling JA, Roberts J (1987) Beta-substituted cysteines as sequestering agents for ethanol-derived acetaldehyde in vivo. *J Med Chem* 30:1373–1378.
39. Nagasawa HT, Goon DJ, Constantino NV, Alexander CS (1975) Diversion of ethanol metabolism by sulfhydryl amino acids. D-penicillamine-directed excretion of 2,5,5-trimethyl-D-thiazolidine-4-carboxylic acid in the urine of rats after ethanol administration. *Life Sci* 17:707–713.
40. Nagasawa HT, Goon DJ, DeMaster EG (1978) 2,5,5-Trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a D(-)-penicillamine-directed pseudometabolite of ethanol. Detoxication mechanism for acetaldehyde. *J Med Chem* 21:1274–1279.
41. Nagasawa HT, Goon DJ, DeMaster EG, Alexander CS (1977) Lowering of ethanol-derived circulating blood acetaldehyde in rats by D-penicillamine. *Life Sci* 20:187–193.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

42. Nagasawa HT, Goon DJW, Muldoon WP, Zera RT (1984) 2-substituted thiazolidine-4(R)-carboxylic acids as prodrugs of L-cysteine. Protection of mice against acetaminophen hepatotoxicity. *J Med Chem* 27:591–596.
45. O'eill PJ, Rahwan RG (1976) Protection against acute toxicity of acetaldehyde in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 13:125–128.
46. Peana AT, Enrico P, Assaretti AR, Pulighe E, Muggironi G, Nieddu M, Piga A, Lintas A, Diana M (2008) Key role of ethanol-derived acetaldehyde in the motivational properties induced by intragastric ethanol: a conditioned place preference study in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 32:249–258.
47. Quertemont E, De Witte P (2001) Conditioned stimulus preference after acet- aldehyde but not ethanol injections. *Pharmacol Biochem Behav* 68:449–454.
454. Rodd-Henricks ZA, Melendez RI, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Lu TK (2002) The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72:55–64.
48. Quertemont E, Tambour S (2004) Is ethanol a pro-drug? The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Trends Pharmacol Sci* 25:130–134.
46. Quertemont E, Tambour S., Tirelli E (2005) The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: A comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol* 75:247–274.
49. Quintanilla ME, Callejas O, Tampier L (2002) Aversion to acetaldehyde: differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Alcohol* 26:69–74.
50. QuintanillaME, Tampier L (2003) Brain mitochondrial aldehyde dehydrogenase: relation to acetaldehyde aversion in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Addict Biol* 8:387–397.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari



51. Rodd-Henricks ZA, Melendez RI, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Lu TK (2002) The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72:55–64.
52. Roma PG, Riley AL (2005) Apparatus bias and the use of light and texture in place conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 82:163–169.
53. Smith BR, Amit Z, Splawinsky J (1984) Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol* 1:193–195.
54. Salaspuro V (2007) Pharmacological treatments and strategies for reducing oral and intestinal acetaldehyde. *Novartis Found Symp* 285:145–153.
55. Salaspuro VJ, Hietala J, Kajhovaaka P, Pihlajarinne L, Marvola M, Salaspuro M (2002) Removal of acetaldehyde from saliva by a slow-release buccal tablet of L-cysteine. *Int J Cancer* 97:361–364.
56. Salaspuro VJ, Hietala JM, Marvola ML, Salaspuro MP (2006) Eliminate carcinogenic acetaldehyde by cysteine from saliva during smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:146–149.
57. Shackebaei D, King N, Shukla B, Suleiman MS (2005) Mechanisms underlying the cardioprotective effect of L-cysteine. *Mol Cell Biochem* 277:27–31.
58. Sirca D, Enrico P, Mereu M, Golosio A, Peana AT, Assaretti AR, Lintas A, Diana M. The role of acetaldehyde in the ethanol-induced increase in dopamine release in the Nucleus Accumbens. In vivo microdialysis Program No. 609.20 / JJ5 2007 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, California: Society for Neuroscience, 2007. Online.
59. Smith BR, Amit Z, Splawinsky J (1984) Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol* 1:193–195.

Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari

60. Soghier LM, Brion LP (2006) Cysteine, cystine or N-acetylcysteine supplementation in parenterally fed neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 18:CD004869.
61. Spanagel R, Siegmund S, Cowen M, Schroff KC, Schumann G, Fiserova M, Sillaber I, Wellek S, Singer M, Putzke J (2002) The neuronal nitric oxide synthase gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol. *J Neurosci* 22:8676–8683.
62. Sprince H, Parker CM, Smith GG, Gonzales LJ (1974) Protection against acetaldehyde toxicity in the rat by L-cysteine, thiamin and L-2-methylthiazolidine-4-carboxylic acid. *Inflamm Res* 4:125–130.
63. Stowell RM, Greenway AR, Batt RD (1977) Acetaldehyde formation during deproteinization of human blood samples containing ethanol. *Biochem. Med.* 18:392–401.
64. Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP (2006) The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol* 26:290–302.
63. Thompson GA, Kilpatrick IC (1996) The neurotransmitter candidature of sulphur-containing excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 72:25–36.
65. Van der Kooy D, O'Shaunessy M, Mucha R, Kalant H (1983) Motional properties of ethanol in naive rats as studied by place conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 19:441–445.
66. Vasdev S, Mian T, Longrich L, Prabhakaran V, Parai S (1995) N-acetyl cysteine attenuates ethanol induced hypertension in rats. *Artery* 21:312–316.
67. Waller MB, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (1982) Effects of intravenous ethanol and of 4-methylpyrazole on alcohol drinking in alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 17:763–768.

68. Ward RJ, Colantuoni C, Dahchour A, Quertemont E, De Witte P (1997). Acetaldehyde-induced changes in monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 36:225–232.
69. Wickramasinghe SN (1987) Role of macrophages in the pathogenesis of alcohol induced tissue damage. *BrMed J* 294:1137–1139.
70. Yusof M, Neal R, Aykin N, Ercal N (2000) High performance liquid chromatography analysis of D-penicillamine by derivatization with N-(1-pyrenyl)maleimide (NPM). *Biomed Chromatogr* 14:535–540.

## 8. Ringraziamenti

Questi esperimenti sono stati realizzati grazie ai finanziamenti della Fondazione Banco di Sardegna (2006.0454) e della Banca d'Italia (2007) alla Dott.ssa Alessandra T. Peana e al contributo PRIN al Prof. Marco Diana (MIUR, 2006057754).



Anna Rita Assaretti-Ruolo dell'acetaldeide nelle proprietà motivazionali dell'alcool etilico. Studio comportamentale nel ratto-Tesi di Dottorato in Neuroscienze-Università degli Studi di Sassari