



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN PSICOBIOLOGIA E NEUROSCIENZE
COGNITIVE**

Effetti di un ambiente arricchito
sul sistema dopaminergico mesolimbico
e sull'auto-somministrazione di alcol
in ratti *Sardinian alcohol-preferring*

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa PAOLA PALANZA

Correlatore:

Chiar.ma Dott.ssa ANNA LISA MUNTONI

Tesi di laurea di:

LAURA REGONINI SOMENZI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

MOD03 – Rev. 4 del 29/03/017

INDICE

Abstract.....	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1. Alcolismo e modello sperimentale	5
1.2. Sistema dopaminergico mesolimbico e alcol.....	8
1.3. Ambiente arricchito.....	14
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	19
3. MATERIALI E METODI	20
3.1. Soggetti e disegno sperimentale	20
3.2. Condizioni ambientali	21
3.3. Registrazioni elettrofisiologiche <i>in vivo</i>	24
3.4. Auto-somministrazione	26
3.5. Statistica	33
3.5.1 Statistica elettrofisiologia	33
3.5.1 Statistica auto-somministrazione.....	33
4. RISULTATI	35
4.1. Effetti dell'ambiente arricchito sul sistema dopaminergico mesolimbico nei ratti sP.....	35

4.2. Effetti dell'ambiente arricchito sull'auto-somministrazione di alcol	
nei ratti sP.....	36
4.2.1 <i>Shaping</i>	37
4.2.2 <i>Training</i>	38
4.2.3 <i>Testing</i>	42
5. DISCUSSIONE	46
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	53
Ringraziamenti.....	75

Abstract

Numerosi studi preclinici hanno dimostrato come l'alloggiamento di ratti e topi all'interno di gabbie cosiddette "arricchite" (ovvero dotate di ruote, scale e labirinti e con piccole colonie di animali, così da garantire stimolazioni sensoriali, motorie e sociali) abbia un grande impatto sulla funzionalità cerebrale e sul comportamento animale. Ciò è dimostrato anche per i comportamenti motivati dalle sostanze d'abuso. Tale quadro risulta però essere meno chiaro per i comportamenti alcol-correlati, rendendo pertanto necessario lo svolgimento di ulteriori indagini sperimentali. A questo scopo, il presente studio ha impiegato una linea di ratti selezionati geneticamente per l'elevato consumo di alcol (*Sardinian alcohol-preferring*, sP), indagando l'effetto dell'arricchimento ambientale (i) sull'attività del sistema dopaminergico mesolimbico e (ii) sull'auto-somministrazione di alcol.

A partire dal 21° giorno d'età, i ratti sono stati alloggiati in tre diverse condizioni ambientali: ambiente impoverito (*impoverished environment*, IE; alloggiamento singolo in piccole gabbie prive di arricchimento ambientale); ambiente intermedio (*standard environment*, SE; alloggiamento in piccole colonie di tre ratti senza arricchimento ambientale); ambiente arricchito (*enriched environment*, EE; alloggiamento in grandi gabbie con colonie di sei ratti e molteplici elementi di arricchimento ambientale). Lo studio si compone di due diversi esperimenti (uno di elettrofisiologia, l'altro comportamentale), che hanno utilizzato due gruppi indipendenti di ratti, suddivisi in tre sottogruppi in base al tipo di alloggiamento.

Il primo esperimento ha utilizzato ratti di 60 giorni d'età e, tramite registrazioni dell'elettrofisiologiche *in vivo* nell'area ventrale del tegmento, ha indagato l'effetto delle tre condizioni ambientali sui seguenti parametri: numero di neuroni

dopaminergici spontaneamente attivi; frequenza di scarica basale dei neuroni dopaminergici; percentuale dei potenziali d'azione organizzati in treni. I risultati ottenuti indicano la presenza di differenze significative nel numero di neuroni dopaminergici spontaneamente attivi; specificatamente, esso è maggiore nei ratti EE, intermedio nei ratti SE e inferiore nei ratti IE. Questi risultati dimostrano come le condizioni ambientali di alloggiamento possano determinare significativi cambiamenti nell'attività neuronale dopaminergica nel sistema mesolimbico.

Nel secondo esperimento, e a partire dall'età di 60 giorni, i ratti sono stati esposti al protocollo dell'auto-somministrazione orale e operante inizialmente di acqua (*shaping*) e successivamente di alcol (*training* e *testing*). L'acquisizione del comportamento basale (pressione della leva per l'ottenimento di acqua in ratti acqua-deprivati) è stata più lenta (ovvero ha richiesto un numero superiore di sessioni giornaliere di auto-somministrazione) nei ratti EE rispetto a quelli IE e SE, come probabile conseguenza di una minore salienza degli stimoli forniti dalla gabbia per il comportamento operante rispetto a quelli a cui i ratti EE sono abitualmente esposti nella loro *homecage*. Inoltre, la fase di *training* di auto-somministrazione di alcol (senza più alcuna deprivazione) è stata più lunga nei ratti EE rispetto a quelli IE, mentre i ratti SE hanno mostrato valori intermedi. Un ordine simile (IE > SE > EE) è stato osservato anche nelle successive fasi di *testing* ed esplicitato da un numero inferiore di pressioni sulla leva per l'alcol, una ridotta quantità di alcol auto-somministrato e da un più basso valore di *breakpoint* per l'alcol nei ratti EE rispetto agli altri due gruppi. Questi dati suggeriscono che l'arricchimento ambientale riduce le proprietà di rinforzo e motivazionali dell'alcol nei ratti sP; essi sono interpretabili ipotizzando che le proprietà di rinforzo e motivazionali delle principali componenti dell'arricchimento ambientale possono sostituire, almeno in parte, quelle dell'alcol.

1. INTRODUZIONE

1.1 Alcolismo e modello sperimentale

L'alcolismo, o "*Alcohol Use Disorder*" (AUD), è un disturbo mentale cronico, recidivante e potenzialmente mortale, caratterizzato dalla perdita di controllo sul consumo di alcol, da ripetuti episodi di intossicazione e dalla comparsa di fenomeni di tolleranza (ovvero la necessità di incrementare le dosi di alcol per percepire effetti centrali di pari intensità) e astinenza (ovvero la comparsa di segni e sintomi astinenziali quando il consumo di alcol viene interrotto o considerevolmente ridotto in tempi molto brevi) (APA, 2013). Il consumo eccessivo di alcol, quando protratto nel tempo, è correlato al rischio di sviluppare gravi conseguenze a diversi organi e apparati, in particolare il sistema nervoso centrale e l'apparato gastrointestinale (AA.VV. Goodman & Gilman's, 2021). Gli individui affetti da AUD spesso soffrono di altri disturbi mentali quali disturbi dell'umore, disturbi d'ansia, disturbi da uso di altre sostanze e disturbi di personalità (Schuckit, 2006). Oltre ai disturbi fisici e mentali, AUD comporta gravi conseguenze socio-economiche per l'intera società, per gli individui affetti e i loro familiari (Knox et al., 2019).

Nei Paesi occidentali si calcola che circa il 13% della popolazione adulta soddisfi i criteri per AUD nel corso della vita, con una maggiore prevalenza nel sesso maschile rispetto a quello femminile (Grant et al., 2015).

AUD è un disturbo a eziopatogenesi multifattoriale, con fattori genetici e ambientali che concorrono in misura più o meno uguale (Schuckit, 2014). Studi di adozione e su gemelli hanno dimostrato che circa il 50% del rischio di sviluppare AUD si basa

su fattori genetici (Schuckit, 2014). I familiari di primo grado di individui affetti da AUD presentano un rischio notevolmente più alto di sviluppare a loro volta AUD. Ciò che viene ereditato non è il disturbo mentale, ma la vulnerabilità a svilupparlo. Si parla pertanto di “predisposizione” e non di “predeterminazione”. I fattori ambientali (ad esempio le pressioni sociali, la disponibilità dell’alcol e l’età di inizio del consumo) possono aumentare o, viceversa, ridurre (effetto protettivo) tali rischi. La relazione tra consumo di alcol e disturbi mentali è complessa. Gli individui affetti da AUD possono sviluppare un altro disturbo mentale, quale ad esempio un disturbo d’ansia, durante gli episodi di intossicazione o astinenza (Schuckit, 2006). In questo caso il disturbo mentale viene definito “secondario” rispetto a AUD. Il caso opposto è rappresentato da individui affetti da un disturbo mentale (“primario”) che assumono alcol al fine di auto-medicarsi e che col tempo possono sviluppare AUD (qui definito “secondario”). Questa suddivisione è utile al fine della scelta del trattamento per entrambi i disturbi.

Nel campo della ricerca biomedica negli ultimi decenni sono stati raggiunti notevoli risultati nella comprensione dei meccanismi neurobiologici dell’alcolismo. Tuttavia, per quanto riguarda le terapie farmacologiche attualmente disponibili, pur essendo di comprovata efficacia, esse sono utilizzate da un numero assai limitato (< 2%) dei pazienti che potrebbero beneficiarne (Han et al., 2021). Ciò a causa delle numerose limitazioni, della scarsa maneggevolezza e dell’elevata variabilità nella risposta tra le diverse tipologie di pazienti (ad esempio, pazienti affetti da AUD “primario” o “secondario”).

Risulta pertanto importante indagare ulteriormente quali siano i meccanismi neurobiologici e farmacologici alla base di AUD, col fine ultimo di individuare nuove terapie sempre più efficaci e mirate.

Nella ricerca scientifica i modelli sperimentali rappresentano uno strumento indispensabile nell'indagine di molti meccanismi complessi in quanto si configurano come la riproduzione semplificata di specifici aspetti della fisiologia e della patologia umana.

Anche la ricerca nel settore dell'alcolismo e delle dipendenze ha beneficiato del ricorso a numerosi e validati modelli sperimentali. Molti di questi utilizzano ratti e topi, in quanto questi animali riproducono, o "modellano", diversi comportamenti caratteristici di AUD. Essi, infatti, esposti a opportune condizioni sperimentali, consumano volontariamente quantità intossicanti di alcol e sono disposti a compiere un "lavoro" (quale ad esempio, la ripetuta pressione di una leva) per ottenere l'alcol; l'assunzione volontaria di alcol determina lo sviluppo di tolleranza, dipendenza e astinenza (Bell et al., 2012).

Tra questi modelli uno dei più validi è rappresentato dai ratti *Sardinian alcohol-preferring* (sP), la cui selezione ha avuto inizio nel 1981 da una popolazione di ratti del ceppo Wistar. La procedura di selezione di questi ratti prevedeva l'esposizione alla libera scelta tra due bottiglie, una contenente soluzione alcolica al 10% (vol/vol) e una contenente acqua. Generazione dopo generazione, i ratti che manifestavano i consumi di alcol più elevati (consumo giornaliero superiore a 6 g di alcol puro per chilogrammo corporeo) sono stati incrociati tra loro per dare origine alla linea sP. Allo stesso tempo, i ratti che tendevano a rifiutare l'alcol (consumo giornaliero inferiore a 1 g/kg) sono stati incrociati per dare origine alla linea *Sardinian alcohol-non preferring* (sNP).

Alla fine del processo selettivo, i ratti sP hanno soddisfatto tutti i requisiti posti per definire un modello di alcolismo, ovvero: (a) ingestione volontaria di alcol; (b) consumo di dosi elevate di alcol; (c) raggiungimento di concentrazioni

farmacologicamente rilevanti di alcol nel sangue (alcolemie); (d) disponibilità a compiere un “lavoro” per ottenere l’alcol (riproducendo sperimentalmente il cosiddetto “*craving*” del paziente affetto da AUD); (e) sviluppo di tolleranza ad un dato effetto indotto dall’assunzione volontaria di alcol; (f) sviluppo, indotto dal consumo volontario di alcol, di dipendenza fisica (indicata dalla comparsa di segni astinenziali quali tremori e convulsioni) o comportamentale (indicata da un consumo di alcol nonostante la manifestazione di conseguenze avverse, come nel caso di adulterazione della soluzione alcolica con il chinino); (g) l’aumentato consumo di alcol dopo un periodo di astinenza da alcol (riproducendo gli episodi di ricaduta e perdita di controllo del paziente affetto da AUD (Colombo et al., 2006; Loi et al., 2010; Bell et al., 2012).

Questo modello possiede una validità di facciata (forti analogie con l’endofenotipo della patologia umana), di costrutto (substrato biologico simile a quello della patologia umana), predittiva (risposta analoga a trattamenti che prevengono o attenuano i sintomi della patologia umana).

1.2 Sistema dopaminergico mesolimbico e alcol

I neuroni dopaminergici che originano nell’area ventrale del tegmento (VTA) del mesencefalo e proiettano a strutture limbiche sottocorticali come il nucleus accumbens (NAc), l’amigdala e l’ippocampo, formano il sistema mesolimbico (Fuxe et al., 1974; Oades & Halliday 1987). Questo circuito, che attraverso le azioni del neurotrasmettitore dopamina regola la risposta a stimoli edonici e controlla i comportamenti motivati, costituisce il fulcro del sistema cerebrale della

gratificazione e della ricompensa (Di Chiara et al., 2004; Ikemoto et al., 2010) (Figura 1).

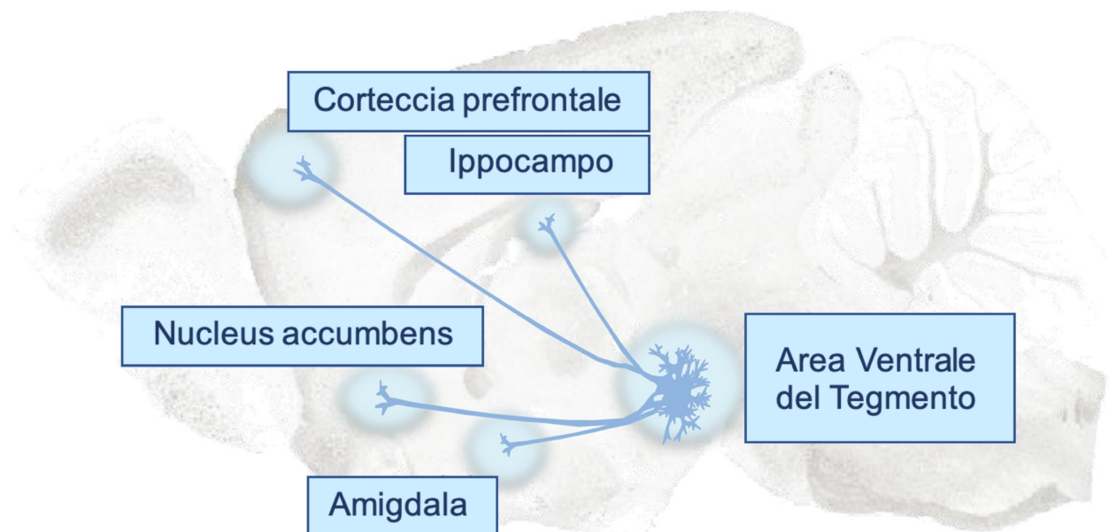


Figura 1. Rappresentazione illustrativa dei sistemi dopaminergici mesolimbico e mesocorticale nel cervello di ratto (adattata da: Jayaram-Lindström et al., 2016).

Da un punto di vista evolutivistico, i neuroni dopaminergici della VTA sono deputati a mediare gli effetti gratificanti degli stimoli naturali (ad esempio cibo, acqua, sesso), garantendo la preservazione della specie. D'altra parte, gli stessi neuroni processano anche le risposte agli stimoli condizionati e alle sostanze d'abuso, incluso l'alcol (Melis et al., 2005; Marinelli et al., 2006; Pan et al., 2006; Wilson & Bowman, 2006; Everitt et al., 2008; Nestler & Luscher, 2019). Nello specifico, all'interno dell'eterogenea popolazione dei neuroni dopaminergici della VTA, quelli che inviano proiezioni al NAc (soprattutto alla sua parte ventro-mediale definita *shell*) rappresentano il target principale delle sostanze d'abuso, come dimostrato da studi di microdialisi cerebrale e voltammetria a rapida scansione (Di Chiara & Imperato, 1988; Pontieri et al., 1996; Tanda et al., 1997; Stuber et al., 2005; Aragona et al., 2008), optogenetica (Bass et al., 2013; Juarez et al., 2017; Budygin et al.,

2020) o attraverso l'utilizzo di sonde fluorescenti geneticamente codificate (Wei et al., 2018).

Cambiamenti nell'attività spontanea dei neuroni dopaminergici della VTA, correlati con i livelli extracellulari di dopamina nel NAc, sono implicati sia nelle fasi iniziali del disturbo da uso di sostanze sia nella suscettibilità alle ricadute dopo un periodo di astinenza (Marinelli et al., 2003; Lüscher & Ungless, 2006; Diana, 2011; Piazza & Deroche-Gamonet, 2013). In particolare, le sostanze d'abuso, a prescindere dalla classe farmacologica a cui appartengono e dal meccanismo d'azione, inducono un aumento o una riduzione dell'attività neuronale dopaminergica mesolimbica rispettivamente dopo l'esposizione acuta e dopo un uso cronico ed eccessivo (Melis et al., 2005; Morikawa & Morrisett, 2010; Diana, 2011; Jayaram-Lindström et al., 2016). La stimolazione della trasmissione dopaminergica mesolimbica (per esempio, aumento dell'attività neuronale della VTA e/o aumento del rilascio di dopamina nel NAc) è ampiamente riconosciuta come il substrato degli effetti acuti euforizzanti delle sostanze e della loro capacità di indurre un rinforzo positivo che facilita il comportamento motivato, sia nell'uomo sia negli animali da esperimento (Melis et al., 2005; Diana, 2011; Jayaram-Lindström et al., 2016). Per contro, lo stato di profonda ipofunzionalità del sistema dopaminergico mesolimbico indotto dall'uso eccessivo e ripetuto delle sostanze d'abuso rappresenta il correlato neurobiologico del "craving" e della disforia e contribuisce alle ricadute anche dopo un lungo periodo di astinenza (Melis et al., 2005; Diana, 2011; Jayaram-Lindström et al., 2016).

Alla luce di ciò, non sorprende quindi che il sistema dopaminergico mesolimbico (VTA-NAc) giochi un ruolo di primo piano nel complesso network eziopatogenetico dell'AUD (Morikawa & Morrisett, 2010; Ma & Zhu, 2014; Jayaram-Lindstrom et al.,

2016). Le evidenze sperimentali raccolte nel corso degli ultimi cinquant'anni mostrano infatti chiaramente come questo circuito sia coinvolto negli effetti comportamentali, neurochimici e neurofisiologici dell'alcol, sia nell'uomo sia negli animali da laboratorio. Menzioniamo di seguito giusto alcuni dei risultati più rappresentativi. Le prime indicazioni dell'importanza della dopamina per gli effetti gratificanti dell'alcol sono emerse grazie a due ricerche che hanno svelato che l' α -metiltirosina (un inibitore della sintesi delle catecolamine che impedisce la formazione di dopamina nelle terminazioni) bloccava l'euforia e la disinibizione indotte dall'alcol nell'uomo (Ahlenius et al., 1973) nonché la stimolazione dell'attività locomotoria (ovvero il correlato animale dell'euforia) nel ratto (Engel et al., 1974). Successivamente, studi di voltametria (*ex vivo* e *in vivo*) e di microdialisi cerebrale *in vivo* nei roditori hanno dimostrato che la somministrazione passiva di alcol, così come il consumo volontario, aumentavano in maniera dose-dipendente i livelli extracellulari di dopamina nella *shell* del NAc, rafforzando l'ipotesi di un'associazione diretta tra effetti gratificanti/euforizzanti e rilascio di dopamina in questa sub-regione del sistema mesolimbico (Jayaram-Lindström et al., 2016). Negli anni '90 lo sviluppo della tomografia ad emissione di positroni (PET), e l'utilizzo di un radiotracciante specifico per i recettori della dopamina (11C-raclopride), hanno permesso di studiare *in vivo* la funzionalità dei sistemi dopaminergici nell'uomo e di evidenziare che l'alcol aumentava il rilascio del neurotrasmettitore nello striato ventrale (Jayaram-Lindström et al., 2016). Questo risultato importante è stato poi ulteriormente corroborato dalla scoperta della correlazione diretta tra gli effetti euforizzanti e il desiderio di assunzione dell'alcol con l'entità e la frequenza del rilascio di dopamina nello striato ventrale, confermando le strette analogie con quanto osservato in ambito preclinico

(Jayaram-Lindström et al., 2016). Per quanto riguarda la VTA, esperimenti di elettrofisiologia sia *in vivo* (Gessa et al., 1985; Diana et al., 1993; Foddai et al., 2004) sia *in vitro* (Brodie et al., 1990, 1999) hanno mostrato che l'alcol (come altre sostanze d'abuso) stimola la frequenza di scarica dei neuroni dopaminergici che proiettano al NAc.

Anche i modelli sperimentali di AUD sono stati largamente utilizzati per investigare i meccanismi neuronali e neurochimici alla base della preferenza per l'alcol. Limitandoci alla linea dei ratti sP e al ruolo del sistema mesolimbico, è stato ad esempio riportato che questi animali hanno, in confronto agli sNP: (i) livelli extracellulari basali di dopamina più elevati nella *shell* del NAc (Leggio et al., 2003); (ii) un'aumentata attività spontanea dei neuroni dopaminergici della VTA posteriore (Melis et al., 2009); (iii) una riduzione della loro inibizione mediata dal nucleo rostromediale del tegmento (RMTg), afferenza GABAergica coinvolta sia nell'elaborazione degli stimoli avversivi sia nella modulazione dell'attività neuronale dopaminergica (Melis et al., 2014). Nell'insieme queste osservazioni, tra loro consistenti, suggeriscono che l'innata predisposizione per un'elevata preferenza per l'alcol si accompagna ad un'incrementata trasmissione dopaminergica mesolimbica.

Gli studi sul ruolo del circuito dopaminergico mesolimbico negli effetti comportamentali dell'alcol sono partiti dall'osservazione che lesioni neurotossiche delle terminazioni dopaminergiche nel NAc sopprimevano l'acquisizione di diversi comportamenti alcol-correlati, misurati attraverso i paradigmi della *free-choice* (paradigma di libera scelta tra due bottiglie, una contenente alcol e una contenente acqua, presenti nella *homecage*) o dell'auto-somministrazione operante (ovvero attraverso il compimento di un "lavoro") (Morikawa & Morrisett, 2010; Ma & Zhu,

2014; Jayaram-Lindström et al., 2016). In linea con questi risultati, un numero considerevole di studi ha dimostrato che il blocco farmacologico (per via sistemica o locale a livello del NAc) dei recettori dopaminergici riduceva il consumo volontario e l'auto-somministrazione di alcol (Morikawa & Morrisett, 2010; Ma & Zhu, 2014; Jayaram-Lindström et al., 2016). Anche l'infusione nella VTA del quinpirolo, un agonista dei recettori dopaminergici di tipo 2 (D₂) che inibisce l'attività dei neuroni della VTA, si è rivelato in grado di attenuare i summenzionati comportamenti alcol-correlati (Morikawa & Morrisett, 2010; Ma & Zhu, 2014; Jayaram-Lindström et al., 2016). In modo analogo, l'espressione della *conditioned place preference* (il correlato animale degli effetti gratificanti di una sostanza) indotta dall'alcol è ridotta dall'inibizione dei neuroni dopaminergici a seguito della somministrazione intra-VTA di un agonista dei recettori di tipo B per l'acido gamma-aminobutirrico (GABA_B), suggerendo il coinvolgimento dei neuroni dopaminergici nella memoria degli stimoli ambientali associati all'alcol (Bechtholt & Cunningham, 2005). A riprova della centralità di questi neuroni nei comportamenti alcol-correlati anche in validati modelli sperimentali di AUD, uno studio recente di Maccioni et al. (2018) ha riportato come micro-iniezioni di un agonista GABA_B (baclofen) e di un modulatore allosterico positivo dello stesso recettore (CGP7930) sopprimono l'auto-somministrazione di alcol nei ratti sP. Altre evidenze dirette del ruolo dei neuroni dopaminergici della VTA, ed in particolare di quelli localizzati nella sua parte posteriore, nelle proprietà di rinforzo dell'alcol derivano dalle ricerche che hanno dimostrato come l'auto-somministrazione volontaria di alcol direttamente in VTA posteriore viene bloccata dalla co-somministrazione dell'agonista dei recettori dopaminergici D₂ quinpirolo anche in linee di ratti alcol-preferenti (Morikawa & Morrisett, 2010; Ma & Zhu, 2014; Jayaram-Lindström et al., 2016). Infine, grazie all'utilizzo delle tecniche più moderne

di optogenetica si è potuto esplorare con maggiore precisione il ruolo causale delle alterazioni della neurotrasmissione a livello dei circuiti coinvolti nei comportamenti d'abuso (Vickstrom et al., 2021). In particolare, alcuni studi recenti hanno fornito le prime evidenze che la trasmissione dopaminergica VTA-NAc modula in maniera diretta il consumo di alcol (Bass et al., 2013; Juarez et al., 2017; Budygin et al., 2020).

1.3 Ambiente arricchito

L'ambiente nel quale siamo inseriti è nell'AUD, come in molte altre psicopatologie, un fattore importante sia per l'insorgere della malattia sia per il suo decorso.

Alla luce di ciò, anche nella ricerca scientifica si è cercato di comprendere come l'ambiente possa influenzare molti aspetti comportamentali e molte funzioni cerebrali. A tal fine, sono stati realizzati opportuni modelli animali di arricchimento ambientale, con l'intento di riprodurre, almeno in parte, la complessità dell'ambiente in cui viviamo, sostituendo, ove possibile, la condizione dell'animale da esperimento alloggiato in gabbia singola e priva di ogni tipo di stimolazione sociale e ambientale (condizione, quest'ultima, senz'altro vantaggiosa in termini di spazio e costi, ma assai distante dalla situazione umana che il modello sperimentale intende riprodurre).

L'arricchimento ambientale nel roditore di laboratorio si traduce generalmente in gabbie più ampie, dotate di un abbondante strato di lettiera, materiale per costruire nidi, ruote su cui correre, tubi, labirinti, oggetti di varie forme e colori con i quali giocare. Inoltre, gli animali sono alloggiati in piccole colonie (Baumans, 2005;

Sztainberg & Chen, 2010; Slater & Cao, 2015). Tutto ciò permette una maggior complessità e ricchezza di stimoli sensoriali, sociali, cognitivi e motori (Nithianantharajah & Hannan, 2006; Crofton et al., 2015; Kempermann, 2019).

Nel corso degli anni, varie ricerche hanno dimostrato come un ambiente arricchito produca profonde modificazioni a livello del sistema nervoso centrale, dal punto di vista sia morfologico sia funzionale (Sale et al., 2009; Segovia et al., 2009). Ad esempio, è stato osservato che ratti e topi allevati in un ambiente arricchito possiedono una corteccia cerebrale di maggior spessore e peso grazie a un'aumentata densità di neuroni (Bennett et al., 1969; Murtha et al., 1990). Sempre dal punto di vista morfologico, l'ambiente arricchito favorisce l'arborizzazione dendritica e la densità delle spine dendritiche in diverse aree cerebrali (van Praag et al., 2000; Will et al., 2004).

Dal punto di vista funzionale, animali alloggiati in ambienti arricchiti manifestano migliori performance cognitive. Questo effetto è stato riscontrato sia in individui sani sia in individui con determinati danni cerebrali o alterazioni genetiche che abbiano indotto deficit cognitivi (Murtha et al., 1990; Restivo et al., 2005). Inoltre, l'ambiente arricchito sembra rallentare i processi di neurodegenerazione e ridurre i comportamenti legati all'ansia e alla risposta allo stress (Sale et al., 2014; Sale, 2018; Rojas-Carvajal et al., 2021).

È stato proposto che l'arricchimento ambientale nel roditore rappresenti e modelli ciò che nell'uomo è il complesso di relazioni familiari e sociali appaganti e di un buon livello socio-economico e culturale; per contro, l'ambiente impoverito del roditore riproduce ciò che nell'uomo può essere la somma di rapporti interpersonali assenti o insoddisfacenti, un basso livello socio-economico e l'esistenza di difficoltà nell'ambiente scolastico o lavorativo (Sale, 2018). Queste ultime condizioni sono

state spesso associate a un incremento della vulnerabilità alle tossicodipendenze e all'alcolismo (Solinas et al., 2010).

Per quanto riguarda le dipendenze, in particolare da cocaina, amfetamine e nicotina, alcune ricerche precliniche mostrano effetti benefici dell'ambiente arricchito. Esso contribuisce nel prevenire lo sviluppo della dipendenza e nel ridurre l'auto-somministrazione operante endovenosa di tali sostanze (Stairs & Bardo, 2009; Solinas et al., 2010; 2021; Rodríguez-Ortega & Cubero, 2018). Il possibile meccanismo d'azione sottostante prevede che le proprietà edoniche di tutti i principali componenti dell'ambiente arricchito (cioè interazioni sociali, attività motoria, esplorazione, novità) si sostituiscano, almeno in parte, alle proprietà di rinforzo, motivazionali e gratificanti delle sostanze d'abuso, riducendone conseguentemente la ricerca e l'assunzione (Solinas et al., 2010). Al riguardo, è interessante notare che la funzionalità del sistema dopaminergico mesolimbico, uno dei sistemi neurotrasmettitoriali che sottendono la dipendenza da alcol (vedi paragrafo 1.2), è sensibile alle influenze ambientali (Aumann et al., 2013; Tomas et al., 2015; Aumann et al., 2016). Ad esempio, è stato osservato che nei topi l'esposizione a un ambiente arricchito è in grado di determinare alterazioni nel numero dei neuroni dopaminergici del mesencefalo e fenomeni di "plasticità neurotrasmettitoriale" (cambiamenti nell'espressione di geni e/o proteine da essi codificate, nella quantità o nel tipo di neurotrasmettitore utilizzato, ecc.). Modificazioni di questo tipo potrebbero avere significative ripercussioni sulla neurotrasmissione dopaminergica e, di conseguenza, su funzioni cerebrali, comportamenti e patologie dopamino-mediate, come la dipendenza da alcol e sostanze d'abuso.

Per quanto riguarda l'alcol, l'esposizione di ratti e topi all'ambiente arricchito ha prodotto effetti comportamentali contrastanti: alcune ricerche non hanno dimostrato alcuna influenza, altre hanno mostrato una riduzione e altre addirittura una stimolazione di diversi comportamenti correlati all'alcol, incluso il consumo volontario di alcol (Kazmainer et al., 1973; Kulkosky et al., 1980; Ellison, 1981; Rockman et al., 1986; 1988; 1989; Rockman & Gibson, 1992; de Carvalho et al., 2010; Lopez & Laber, 2015; Berardo et al., 2016; Bahi, 2017; Holgate et al., 2017; Marianno et al., 2017) e l'auto-somministrazione orale ed operante di alcol (Deehan et al., 2007; 2011).

È da tenere in considerazione il fatto che le modalità e le tempistiche di arricchimento ambientale non sono ancora state standardizzate. Gli studi sopramenzionati sono stati condotti utilizzando procedure sperimentali assai differenti tra loro; le differenze metodologiche riguardavano il tipo e la durata dell'arricchimento, la tempistica dell'intervento di arricchimento e la tempistica dell'esposizione all'alcol. Tale variabilità nei disegni sperimentali può spiegare la discordanza dei risultati ottenuti.

Da qui la necessità di uniformare le procedure metodologiche in funzione della domanda sperimentale per poter indagare in maniera più mirata l'influenza dell'ambiente arricchito sui comportamenti alcol-correlati.

La comprensione dell'effetto dell'arricchimento ambientale sui comportamenti alcol-correlati permetterebbe anche di migliorare i modelli sperimentali di AUD, rendendoli più simili alla condizione umana che essi intendono riprodurre. Modelli maggiormente rappresentativi della patologia umana saranno infatti sempre più utili per la comprensione delle basi neurobiologiche dell'alcolismo e per l'identificazione di nuove ed efficaci strategie terapeutiche. Riguardo quest'ultimo aspetto, i risultati

di un effetto positivo (in termini di riduzione o prevenzione dei comportamenti alcol-correlati) dell'ambiente arricchito potrebbero permettere anche di ipotizzare terapie cognitivo-comportamentali che, attraverso il miglioramento e l'arricchimento delle condizioni di vita dei pazienti, possano ridurre la vulnerabilità allo sviluppo della dipendenza da alcol e prevenire gli episodi di "ricaduta".

2. SCOPO DELLA RICERCA

Sulla base della documentata e complessa relazione tra stimolazione ambientale, funzionalità del sistema dopaminergico e suscettibilità alle dipendenze, come esposto nella parte introduttiva, la presente tesi si propone di investigare l'effetto dell'arricchimento ambientale sull'attività elettrica dei neuroni dopaminergici della VTA e sull'apprendimento del comportamento di auto-somministrazione orale ed operante di alcol nei ratti della linea sP.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Soggetti e disegno sperimentale

Lo studio qui presentato comprende due analisi sperimentali, entrambe condotte in ratti della linea sP: la prima, di tipo neurofisiologico, volta a valutare la funzionalità dei neuroni dopaminergici della VTA; la seconda, di tipo comportamentale, volta a misurare il comportamento consumatorio di alcol in sessioni di auto-sommistrazione orale in gabbie per il comportamento operante.

Per le suddette analisi sono stati utilizzati rispettivamente campioni di $n = 27$ e $n = 36$ ratti maschi della linea sP rispettivamente della 104^a e 105^a generazione, mai esposti all'alcol prima dell'inizio degli esperimenti.

Gli animali sono stati alloggiati in uno stabulario con ciclo invertito con 12 ore di luce e 12 ore di buio (luce dalle 19:00). La temperatura è mantenuta costante a 22 ± 2 °C e l'umidità circa 60%. Gli animali hanno sempre avuto libero accesso a cibo e acqua, ad eccezione dei periodi di deprivazione delle fasi iniziali dell'auto-somministrazione di alcol (vedi sotto).

I protocolli sperimentali impiegati nel presente studio sono conformi alla Direttiva Europea n. 2010/63/UE e al Decreto Legislativo Italiano n. 26 del 4 marzo 2014, riguardante la "Tutela degli animali utilizzati a fini scientifici".

3.2 Condizioni ambientali

Dopo 21 giorni dalla nascita (*postnatal day*, PND; finito il periodo di svezzamento), i ratti sono stati assegnati in modo casuale a una delle tre condizioni ambientali: ambiente impoverito (*impoverished environment*, IE), ambiente intermedio (*standard environment*, SE) e ambiente arricchito (*enriched environment*, EE). La condizione assegnata è stata mantenuta per tutto il periodo di tempo dell'esperimento.

In questo modo l'esposizione ai vari ambienti ha compreso anche il cosiddetto "periodo critico", ovvero il periodo durante il quale l'organizzazione e lo sviluppo del sistema nervoso centrale SNC sono particolarmente influenzati dagli stimoli esterni (Sale, 2018).

I ratti IE (n = 12 in entrambi gli esperimenti) sono stati alloggiati individualmente in gabbie di plastica trasparente [425 x 266 x 185 (h) mm, superficie del pavimento: 800 cm²] con coperchio con grata metallica e uno strato di 30 mm di spessore di lettiera in trucioli di legno. Non è stato previsto alcun elemento di arricchimento ambientale (Figura 2).

I ratti SE (n = 12 in entrambi gli esperimenti) sono stati alloggiati tre per gabbia in gabbie di plastica [612 x 435 x 216(h) mm, superficie del pavimento: 2065 cm²] con coperchio con grata metallica e uno strato di 30 mm di spessore di lettiera in trucioli di legno. Non è stato previsto alcun elemento di arricchimento ambientale (Figura 3).

I ratti EE (n = 12 in entrambi gli esperimenti) sono stati alloggiati in piccole colonie di sei animali per gabbia in gabbie Marlau™ [800 x 600 x 510(h) mm, superficie totale: 9600 cm²]. Queste gabbie sono formate da due piani. Il piano terra ha uno

strato di lettiera in truciolo di 50 mm di spessore ed è composto da due compartimenti indipendenti separati da una parete trasparente. Lo spazio di destra, più grande, è dotato di tre ruote sulle quali gli animali possono correre, una casetta rossa semitrasparente (destinata a fungere da tana) e beccucci per quattro bottiglie (capacità di 500 ml). Lo spazio sinistro, più piccolo, è dotato di una grande mangiatoia (Figura 4). Il piano superiore è quasi totalmente occupato da un labirinto, che lascia lo spazio solo per due piccole aree laterali per accedere a due scalette, ciascuna collegata ad un compartimento sottostante del piano terra. Di conseguenza, i ratti dovevano attraversare il labirinto per spostarsi tra i due scomparti del piano terra per accedere al cibo (scomparto sinistro) e ai liquidi, alle ruote o alla casetta (scomparto destro) (Figura 5). Durante il periodo di alloggiamento, la configurazione del labirinto è stata modificata due volte a settimana (lunedì e giovedì), alternando otto diverse configurazioni. La lettiera è stata cambiata con la stessa frequenza in tutte e tre le condizioni ambientali.



Figura 2. Fotografia della gabbia nella quale sono stati alloggiati i ratti IE.



Figura 3. Fotografia della gabbia nella quale sono stati alloggiati i ratti SE.



Figura 4. Fotografia del piano inferiore della gabbia nella quale sono stati alloggiati i ratti EE allestita con gli arricchimenti ambientali sopra descritti.



Figura 5. Fotografia del piano superiore della gabbia (mancante del coperchio) nella quale sono stati alloggiati i ratti EE raffigurante una delle otto configurazioni del labirinto.

3.3 Registrazioni elettrofisiologiche *in vivo*

Per gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati utilizzati ratti maschi sP (60 giorni di età) appartenenti ai tre gruppi sperimentali (EE, SE e IE). Gli animali sono stati anestetizzati con uretano (1.3 g/kg) somministrato per via intraperitoneale (i.p.) e successivamente posizionati sull'apparato stereotassico (Kopft, Tujunga CA, USA) per la localizzazione dell'area cerebrale di registrazione. La temperatura dei ratti è stata mantenuta costante a 37 ± 1 °C tramite l'ausilio di un tappetino riscaldante. L'area ventrale del tegmento (VTA) è stata identificata secondo le coordinate (5.6-5.8 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.5-0.7 mm lateralmente rispetto alla

vena sagittale; 7.0-8.0 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebrale) fornite dall'atlante cerebrale del ratto (Paxinos & Watson 2007) (Figura 6).

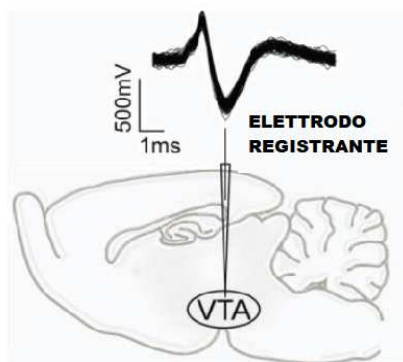


Figura 6. Rappresentazione schematica della collocazione dell'elettrodo nel protocollo di registrazione dei neuroni dopaminergici della VTA. La traccia sopra l'elettrodo rappresenta il potenziale d'azione di una cellula dopaminergica della VTA.

L'attività delle singole cellule è stata registrata mediante una micropipetta in vetro (elettrodo registrante) riempita con 2% di Pontamine Sky Blue (PsB) disciolto in 0.5 M di Acetato di Sodio e avente un'impedenza stimata tra i 2.5-5 M Ω .

Il segnale neuronale, registrato extracellularmente, è stato filtrato (passa banda: 0.1--10000 Hz), amplificato (Neurolog System, Digitimer, Hertfordshire, UK), visualizzato su un oscilloscopio digitale (TDS 3012, Tektronix, Marlow, UK) e infine acquisito tramite computer connesso ad un'interfaccia di conversione analogico-digitale CED 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) e visualizzato per mezzo del software Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

È stato condotto un campionamento dei neuroni dopaminergici della VTA mediante l'esecuzione di 6-9 affondate stereotassiche dell'elettrodo registrante, separate di 200 μ m una dall'altra, nella regione di interesse. In particolare, è stata selezionata la porzione della VTA posteriore che contiene la maggior densità di neuroni

dopaminergici che proiettano al nucleus accumbens (NAc), ovvero il nucleo parabrachiale pigmentato.

I neuroni dopaminergici della VTA sono stati identificati e selezionati utilizzando i criteri presenti in letteratura (Grace & Bunney, 1983; 1984a; 1984b):

- durata del potenziale d'azione \geq a 2.5 ms;
- frequenza di scarica \leq a 10 Hz;
- tipica forma dell'onda (prima fase positiva di depolarizzazione seguita da una seconda negativa ed una terza fase di ripolarizzazione lenta; vedi esempio Figura 6).

L'attività spontanea di ogni neurone è stata registrata per un minimo di due-tre minuti al fine di valutare i seguenti parametri elettrofisiologici:

- il numero dei neuroni dopaminergici spontaneamente attivi registrati per affondata (*cell/track*). Questo indice rappresenta infatti una misura attendibile dei cambiamenti dell'attività neuronale;
- la frequenza di scarica basale media;
- la percentuale di potenziali d'azione organizzati in treni (*burst*) (Grace & Bunney, 1983).

3.4 Auto-somministrazione

Le sessioni di auto-somministrazione sono state condotte in gabbie per il comportamento operante insonorizzate, ventilate e con rumore bianco di fondo. Ogni gabbia è dotata di una luce bianca sulla parete posteriore, mentre la parete frontale è dotata di due leve di risposta retrattili, un recipiente per liquidi

posizionato tra le due leve, due luci-stimolo (una verde e una bianca) montate sopra ciascuna leva e un generatore di suoni (Figura 7, pannello A). Il recipiente del liquido è collegato tramite tubi in polietilene a due pompe con siringa situate all'esterno della gabbia (Figura 7, pannello B). Per la metà dei ratti di ciascun gruppo (IE, SE ed EE), le leve destra e sinistra sono state associate rispettivamente all'alcol e all'acqua; la condizione opposta (leva destra: acqua; leva sinistra: alcol) è stata applicata all'altra metà dei ratti.

Nelle sessioni di auto-somministrazione, il raggiungimento del requisito di risposta (*response requirement*, RR), cioè il numero stabilito di pressioni della leva necessario per l'erogazione del rinforzo, ha avuto le seguenti conseguenze: attivazione delle pompe per alcol o acqua, erogazione di 0.1 ml di fluido, illuminazione della luce di segnale per il periodo di tempo di erogazione del fluido e attivazione del generatore del suono.

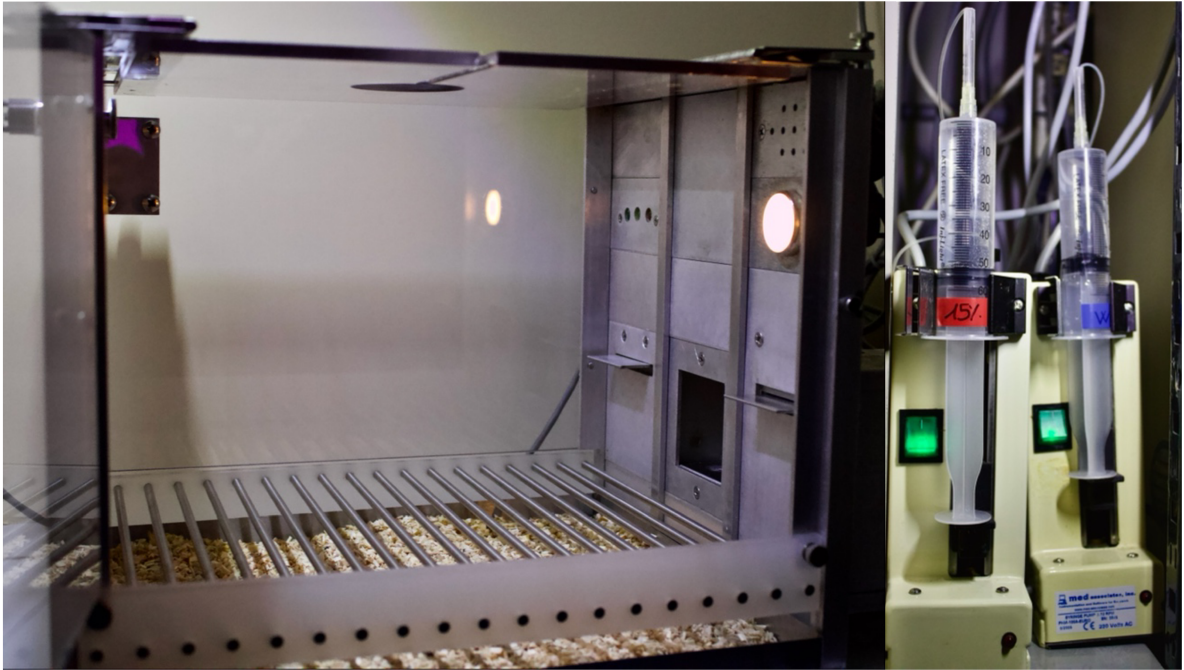
A**B**

Figura 7.

Pannello A: fotografia di una gabbia per il comportamento operante con la luce-segnale bianca attivata a seguito della pressione, in questo caso, della leva destra.

Pannello B: fotografia delle pompe con siringa, situate all'esterno della gabbia, che erogano rispettivamente alcol al 15% e acqua.

La sequenza completa delle fasi sperimentali è illustrata nella Figura 8, pannello A. Al PND 50 i ratti sono stati esposti ad un regime di *free-choice* (scelta "alcol (10%, v/v) vs acqua" con due bottiglie con accesso illimitato nella *homecage*) per 24 ore al giorno e 10 giorni consecutivi. Nello specifico, ogni gabbia IE e SE è stata dotata di due bottiglie, contenenti rispettivamente alcol e acqua; ogni gabbia EE è stata invece dotata di quattro bottiglie, due bottiglie contenenti alcol e due bottiglie contenenti acqua, per consentire l'accesso simultaneo ad alcol o acqua a più ratti, riducendo al minimo i possibili conflitti tra i ratti in competizione per il fluido. Le bottiglie sono state riempite ogni giorno con soluzione fresca e la loro posizione da destra a sinistra è stata scambiata casualmente per evitare lo sviluppo di preferenze di posizione. Questa fase iniziale è parte della procedura convenzionale di auto-

somministrazione di alcol impiegata in questo laboratorio con i ratti sP (Maccioni et al., 2015). Essa viene condotta per abituare i ratti al sapore della soluzione alcolica e a sperimentarne gli effetti psicofarmacologici. A causa della mancanza di un adeguato sistema automatizzato per misurare i comportamenti di consumo dei singoli ratti che vivono in gabbie di colonia (cioè condizioni SE ed EE), l'assunzione di alcol e acqua non è stata registrata ed analizzata durante questa fase iniziale.

Al 60° giorno di età dei ratti è stato avviato l'esperimento di auto-somministrazione. Durante l'esperimento, i ratti sono stati rimossi dalla *homecage* (gabbie IE, SE o EE) immediatamente prima dell'inizio della sessione quotidiana di auto-somministrazione e sono tornati alla *homecage* immediatamente dopo la sua conclusione. Lo spostamento da/verso la stanza di stabulazione e la stanza di auto-somministrazione è stato effettuato utilizzando gabbie che riproducessero le condizioni di stabulazione di ciascun ratto. Per cui, i ratti IE sono stati spostati utilizzando gabbie individuali, i tre ratti SE di ciascuna gabbia di alloggio sono stati spostati insieme in una gabbia di colonia e i sei ratti EE di ciascuna gabbia di alloggio sono stati spostati insieme in una gabbia di colonia più grande. Le sessioni di auto-somministrazione sono state condotte cinque giorni alla settimana dal lunedì al venerdì durante le prime 4-6 ore della fase buia del ciclo giornaliero luce/buio.

Le sessioni di auto-somministrazione sono state condotte all'interno delle gabbie per il comportamento operante descritte in precedenza. Le procedure sperimentali di formazione (*shaping*) e addestramento (*training*) all'auto-somministrazione sono state progettate in modo che, con la sola eccezione della Fase 9, i ratti dovessero soddisfare un determinato criterio per passare alla fase successiva (criterio di avanzamento). Questo criterio richiedeva (i) l'accesso ad almeno 35 rinforzi alcolici

(o acqua) per sessione in almeno due sessioni della stessa fase o (ii) l'auto-somministrazione di una quantità di alcol pari o superiore a 0.5 g/kg per sessione in almeno due sessioni della stessa fase. Quando il criterio non veniva soddisfatto in dieci sessioni, i ratti venivano comunque promossi alla fase successiva.

La fase di acquisizione del comportamento di pressione della leva (*shaping*; Fasi 1-3, vedi sotto) è stata condotta imponendo ai ratti una blanda deprivazione dall'acqua, in modo da aumentare il valore di rinforzo della pressione della leva. Nello specifico, i ratti sono stati privati dell'acqua durante le 4 ore precedenti ogni sessione.

Nelle sessioni iniziali di auto-somministrazione i ratti sono stati esposti a un programma di rinforzo per l'acqua a rapporto fisso (*fixed ratio*, FR) 1 (FR1) (Fase 1); ciò significa che ad ogni singola pressione sulla leva corrispondeva l'erogazione di un rinforzo (0.1 ml di acqua). Queste sessioni iniziali avevano la durata di 120 minuti. Essa è stata quindi ridotta a 60 minuti (Fase 2).

La fase successiva (Fase 3) è stata costituita da sessioni giornaliere di auto-somministrazione in cui i ratti sono stati esposti a un programma FR1 di rinforzo per l'alcol (10%, v/v); queste sessioni avevano la durata di 60 minuti. Il numero di presentazioni di rinforzo è stato limitato a 40 per evitare episodi di sovradosaggio (si rammenta che, in questa fase, i ratti erano sottoposti a deprivazione dell'acqua). La Fase 3 ha concluso il periodo di *shaping* dell'auto-somministrazione. Terminata la Fase 3, la deprivazione dell'acqua è stata definitivamente rimossa. Il *training* all'auto-somministrazione di alcol è iniziato con la Fase 4, in cui i ratti sono stati esposti a sessioni giornaliere di auto-somministrazione di 60 minuti secondo il programma FR1 di rinforzo per l'alcol (10%, v/v) senza limiti imposti nel numero di

presentazioni del rinforzo. La durata delle sessioni è stata quindi ridotta a 30 minuti (Fase 5). Questa durata è stata mantenuta per tutte le fasi successive (con la sola eccezione della Fase 11).

Il programma di rinforzo FR per l'alcol (10%, v/v) è stato quindi aumentato progressivamente a FR2 e FR4 in due fasi consecutive (Fasi 6 e 7, rispettivamente). Dalla Fase 7 in poi è stato mantenuto FR4.

Nella Fase 8 la soluzione alcolica è stata presentata ad una concentrazione del 15% (v/v). Questa concentrazione di alcol è stata mantenuta anche per le fasi successive.

La Fase 9 prevedeva la presentazione della leva acqua. Nello specifico, questa fase è stata composta da due sessioni giornaliere di auto-somministrazione durante le quali era disponibile solo la leva dell'acqua (in regime di FR1), intervallate da una sessione durante la quale era disponibile solo la leva dell'alcol (in regime di FR4). Queste tre sessioni hanno concluso il periodo di *training* all'auto-somministrazione.

Le ultime due fasi (Fasi 10 e 11; *testing*) del programma sperimentale hanno inteso saggiare le proprietà di rinforzo e motivazionali dell'alcol nei tre gruppi di ratti. Nella Fase 10 i ratti sono stati esposti per venti giorni a sessioni giornaliere di auto-somministrazione con leve di alcol e acqua disponibili contemporaneamente, rispettivamente secondo i programmi FR4 e FR1. Questa fase aveva lo scopo di valutare come il comportamento di pressione della leva dell'alcol si fosse sviluppata e stabilizzata nel tempo tra i tre gruppi di ratti utilizzando il protocollo standard in base al quale sono stati prodotti la maggior parte dei dati sull'auto-somministrazione di alcol nei ratti sP (Maccioni et al., 2015).

Il giorno dopo il completamento della Fase 10, i ratti sono stati esposti a un'ultima sessione di auto-somministrazione secondo il programma di rinforzo del rapporto progressivo (*progressive ratio*, PR) (Fase 11). In questa sessione, della durata di 60 minuti, la RR sulla leva alcolica è stata aumentata progressivamente secondo una procedura leggermente adattata da quella descritta da Richardson e Roberts (1996). Vale a dire, RR è stato aumentato come segue: 4, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, ecc. In questo modo è stato possibile individuare il cosiddetto *breakpoint*, ovvero il numero massimo di pressioni sulla leva dell'alcol i ratti sono disposti a compiere per ottenere un rinforzo. La leva dell'acqua era inattiva.

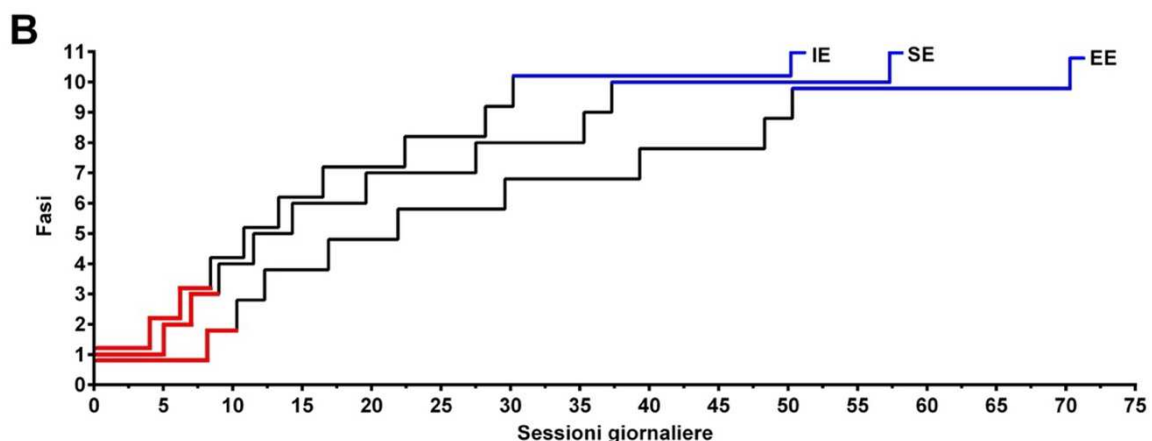
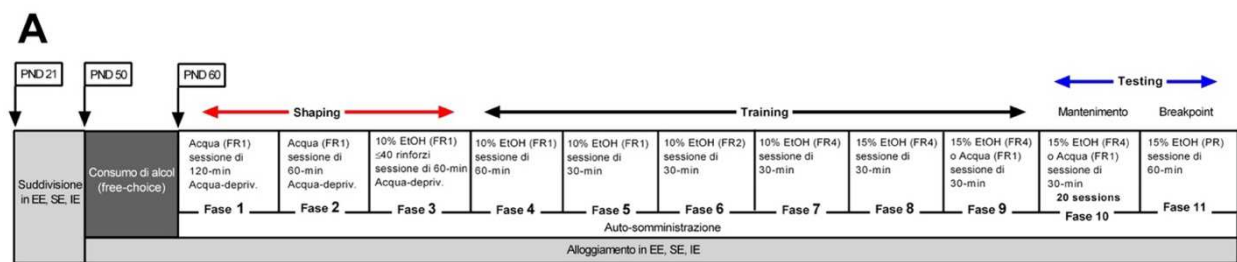


Figura 8.

Pannello A: rappresentazione schematica del disegno sperimentale.

Pannello B: numero di sessioni giornaliere di auto somministrazione, appartenenti alle fasi di *shaping* (linee rosse), *training* (linee nere) e *testing* (linee blu), necessarie per completare ogni fase.

Abbreviazioni: PND, giorni dopo la nascita; FR, rapporto fisso; PR, rapporto progressivo; EtOH, alcol.

3.5 Statistica

3.5.1 Statistica elettrofisiologia

I dati raccolti ed elaborati (Spike 2) sono stati sottoposti ad analisi statistica per mezzo del software Graphpad Prism (La Jolla, CA). Per analizzare i parametri elettrofisiologici basali delle cellule dopaminergiche della VTA è stato utilizzato il test di ANOVA, seguito dal test di Tukey per i confronti *post hoc*. Il livello di significatività è stato fissato a $p < 0.05$.

3.5.2 Statistica auto-somministrazione

Per le Fasi dalla 1 alla 11 i dati sul numero totale di sessioni di auto-somministrazione necessarie per completare lo studio sono stati analizzati mediante ANOVA a una via, seguito dal test di Tukey per i confronti *post hoc*. Il livello di significatività è stato fissato a $p < 0.05$.

Fase 1: i dati sul numero di sessioni di auto-somministrazione necessarie per raggiungere il criterio di avanzamento sono stati analizzati mediante ANOVA a una via, seguita dal test di Tukey per confronti *post hoc*.

Fasi 4-8: i dati su (i) numero di sessioni di auto-somministrazione necessarie per raggiungere il criterio di avanzamento e (ii) rapporto di "propensione all'alcol" (cioè il rapporto tra la quantità media di alcol auto-somministrato in una data fase e il numero di sessioni necessarie in quella fase per raggiungere il criterio di

avanzamento) sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie (ambiente; fase) con misure ripetute sul fattore “fase”, seguito dal test di Tukey per i confronti *post hoc*.

Fase 10: i dati su (i) numero di pressioni della leva per alcol o per l’acqua e (ii) quantità di alcol o acqua auto-somministrati registrati in ciascuna delle venti sessioni di auto-somministrazione sono stati analizzati da due vie (ambiente; sessione) ANOVA con misure ripetute sul fattore “sessione”, seguito dal test di Tukey per confronti *post hoc*.

I dati espressi come media (i) del numero di pressioni della leva dell’alcol o dell’acqua e (ii) della quantità di alcol o acqua auto-somministrati durante l’intera fase sono stati analizzati mediante ANOVA a una via, seguito dal test di Tukey per confronti *post hoc*.

Fase 11: i dati su (i) numero di pressioni sulla leva dell’alcol e (ii) *breakpoint* per l’alcol sono stati analizzati mediante ANOVA a una via, seguito dal test di Tukey per confronti *post hoc*.

4. RISULTATI

4.1 Effetti dell'ambiente arricchito sul sistema dopaminergico mesolimbico nel ratto sP

Al fine di investigare l'influenza dell'ambiente arricchito sulla funzionalità del sistema dopaminergico mesolimbico, sono state condotte registrazioni elettrofisiologiche da singole cellule dopaminergiche della VTA posteriore in ratti maschi anestetizzati con uretano, appartenenti ai tre gruppi sperimentali: IE, SE e EE. Come anticipato, ci siamo concentrati sulla porzione della VTA posteriore (per esempio, il nucleo parabrachiale pigmentato) che contiene la maggior densità di neuroni dopaminergici che proiettano al NAc (Lammel et al., 2014; Morales & Margolis, 2017). Per questi esperimenti abbiamo utilizzato 9 ratti IE (62 cellule), 9 ratti SE (96 cellule), 9 ratti EE (92 cellule). L'analisi dell'ANOVA a una via ha rivelato delle differenze significative tra i tre gruppi nel numero dei neuroni dopaminergici spontaneamente attivi indicati con il valore delle cellule/affondata ($F(2,24) = 7.661$, $P = 0.027$) (Figura 9, pannello A). Inoltre, l'analisi dell'ANOVA a una via tramite delle comparazioni multiple tra i diversi gruppi (test *post hoc*) ha evidenziato una differenza significativa sia tra IE vs. SE ($P = 0.016$), sia tra IE vs. EE ($P = 0.033$) (Figura 9, pannello A). In particolare, i ratti SE hanno mostrato un numero medio di cellule/affondata intermedio rispetto a quello dei gruppi EE e IE. Nessuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi è stata invece riscontrata per quanto riguarda la frequenza di scarica basale ($F(2, 247) = 1.305$, $P = 0.273$) e la percentuale dei potenziali d'azione organizzati in treni (*spikes in bursts*) ($P = 0.306$). (Figura 9, pannello B; Figura 9, pannello C).

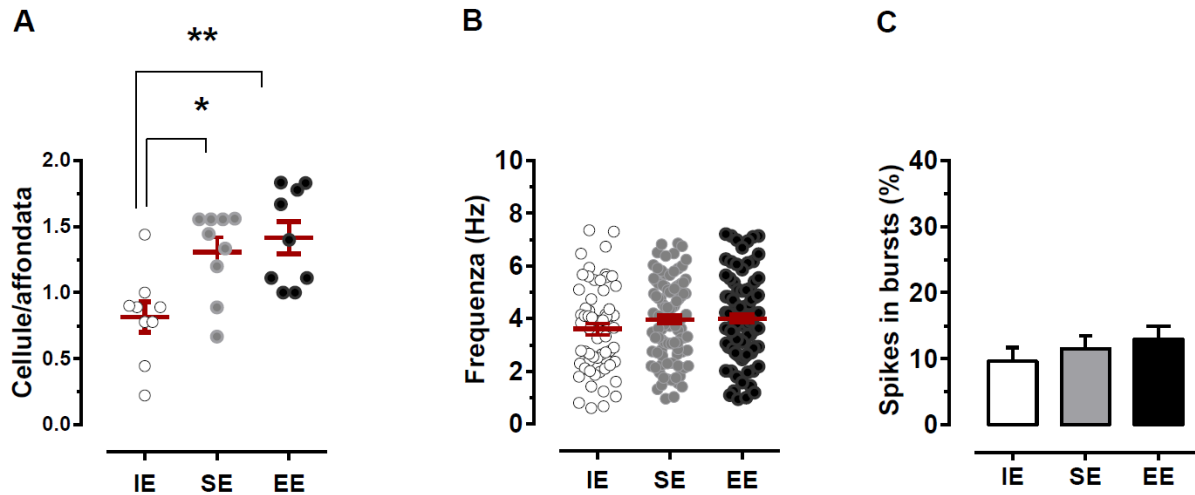


Figura 9. Effetto dell'ambiente arricchito sull'attività elettrica dei neuroni dopaminergici della VTA.

Pannello A: il grafico rappresenta il numero di cellule dopaminergiche spontaneamente attive registrate per singola affondata nei tre gruppi sperimentali.

Pannello B: il grafico illustra la frequenza di scarica basale delle cellule.

Pannello C: l'istogramma a barre mostra la percentuale di *spikes in bursts* nei tre gruppi sperimentali.

I dati sono espressi come media \pm errore standard.

*: $P = 0.016$; **: $P = 0.033$.

4.2 Effetti dell'ambiente arricchito sull'auto-somministrazione di alcol nel ratto sP

La Figura 8, pannello B, riassume il numero di sessioni giornaliere di auto-somministrazione necessarie per completare ogni singola fase e illustra come le fasi di *shaping*, *training* e *testing* dell'auto-somministrazione si sono sviluppate nel corso dell'intero esperimento nei ratti IE, SE ed EE. Nel complesso, i ratti EE hanno impiegato un numero totale di sessioni (70.3 ± 3.4) significativamente superiore a quello dei ratti SE (57.3 ± 2.6 ; $P < 0.05$) e IE (50.2 ± 2.7 ; $P < 0.0001$) [$F(2,33) =$

12.04, $P < 0.0001$]. Queste differenze sono dovute al fatto che, nelle Fasi 1 e 4-8, i ratti EE hanno impiegato più sessioni per raggiungere il criterio di avanzamento e passare alla fase successiva.

4.2.1 Shaping

Nell'analizzare il periodo di *shaping* dell'auto-somministrazione, ci si è concentrati sulla Fase 1 (ratti privati dell'acqua; acqua come rinforzo; FR1, sessioni di 120 minuti) in quanto fornisce un quadro chiaro di come i ratti hanno reagito, in termini di acquisizione del comportamento di pressione della leva, alla primissima esposizione alle gabbie per il comportamento operante. La Fase 2 (sessioni identiche a quelle della Fase 1, che differiscono unicamente per la durata, che è stata dimezzata) e la Fase 3 (sostituzione dell'acqua con l'alcol come rinforzo, ma con un limite imposto al numero di rinforzi) sono state considerate meno informative sulla capacità dei ratti di acquisire il comportamento operante.

L'ANOVA a una via ha indicato differenze significative nel numero di sessioni di auto-somministrazione nella Fase 1 necessarie per raggiungere il criterio di avanzamento [$F(2,33) = 6.61$, $P < 0.005$]. Più nello specifico, i ratti EE hanno completato la Fase 1 in un numero di sessioni quasi doppio rispetto a quello dei ratti IE, mentre i ratti SE mostrano valori intermedi (ancora significativamente inferiori a quelli dei ratti EE) (Figura 10).

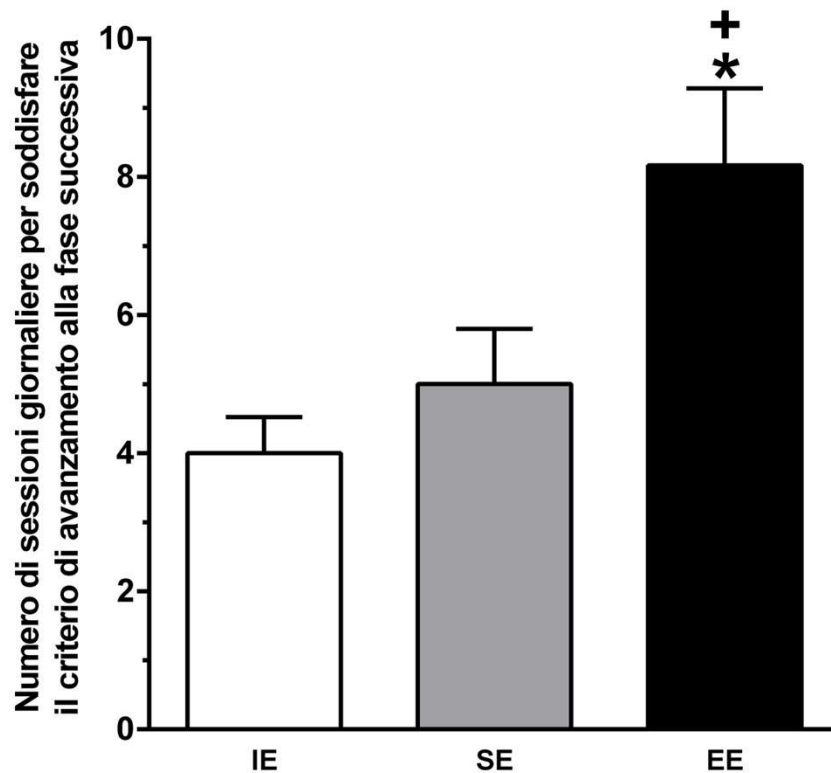


Figura 10. Numero di sessioni giornaliere di auto-somministrazione di acqua necessarie per raggiungere il criterio di avanzamento nella Fase 1.

Ogni barra è la media \pm errore standard di $n = 12$ ratti.

+: $P < 0.05$; *: $P < 0.005$; ratti EE in confronto rispettivamente ai ratti SE e IE (test di Tukey).

4.2.2 Training

Il periodo di *training* è stato analizzato utilizzando i dati raccolti nelle Fasi 4-8. Queste cinque fasi sono state caratterizzate da due importanti aspetti: (i) assenza di deprivazione dall'acqua; (ii) alcol come rinforzo (con FR che aumentava progressivamente da FR1 a FR4 e concentrazione di alcol che aumentava dal 10% al 15%). Al contrario, la nostra analisi non ha incluso la Fase 9 (composta da tre sessioni alternate con acqua e alcol come rinforzo) in quanto caratterizzata da un numero di sessioni predeterminato e fisso.

L'ANOVA a due vie ha indicato un effetto altamente significativo dell'ambiente [$F(2,33) = 12.31, P < 0.0001$], un effetto altamente significativo delle fasi [$F(4,132) = 31.10, P < 0.0001$], ma nessuna interazione significativa [$F(8,132) = 0.68, P > 0.05$], sul numero di sessioni di auto-somministrazione necessarie per raggiungere il criterio di avanzamento. In ogni fase, e rispetto ai ratti IE, i ratti EE hanno richiesto un numero maggiore di sessioni per raggiungere il criterio di avanzamento (Figura 11, pannello A); questo aumento del numero di sessioni per raggiungere il criterio di avanzamento ha raggiunto la significatività statistica all'analisi *post hoc* nelle Fasi 6, 7 e 8. L'aumento è, in media, rispettivamente 135%, 65% e 60%. I ratti SE hanno mostrato valori intermedi (Figura 11, pannello A).

Oltre al numero di sessioni necessarie per raggiungere il criterio di avanzamento, il comportamento di auto-somministrazione dell'alcol dei ratti IE, SE ed EE in ciascuna fase è stato esaminato utilizzando quello che è stato chiamato rapporto di "propensione all'alcol". Questo parametro, combinando la quantità di alcol auto-somministrato con la durata della fase, ha lo scopo di fornire una misura dell'efficienza del comportamento di ricerca e consumo dell'alcol di ciascun ratto in ciascuna fase. Di conseguenza, un valore basso suggerisce piccole quantità di alcol auto-somministrate insieme a numerose sessioni per raggiungere il criterio di avanzamento (tipico di un ratto con ridotta motivazione a cercare e consumare alcol), mentre un valore alto suggerisce grandi quantità di alcol auto-somministrate insieme a poche sessioni per raggiungere il criterio di avanzamento (tipico di un ratto con forte motivazione a cercare e consumare alcol). L'ANOVA a due vie ha indicato un effetto significativo dell'ambiente [$F(2,33) = 7.44, P < 0.005$], un effetto altamente significativo delle fasi [$F(4,132) = 29.56, P < 0.0001$], ma nessuna interazione significativa [$F(8,132) = 1.58, P > 0.05$]. Ad ogni fase, e rispetto ai ratti

IE, i ratti EE hanno mostrato un rapporto di "propensione all'alcol" più basso (Figura 11, pannello B); questa riduzione del rapporto ha raggiunto una significatività statistica all'analisi *post hoc* nelle Fasi 5 e 6. In media è rispettivamente del 50% e il 65%. I ratti SE hanno mostrato valori intermedi, esclusa la Fase 4, durante la quale il rapporto di "propensione all'alcol" dei ratti SE si è dimostrato alto quanto quello dei ratti IE (Figura 11, pannello B).

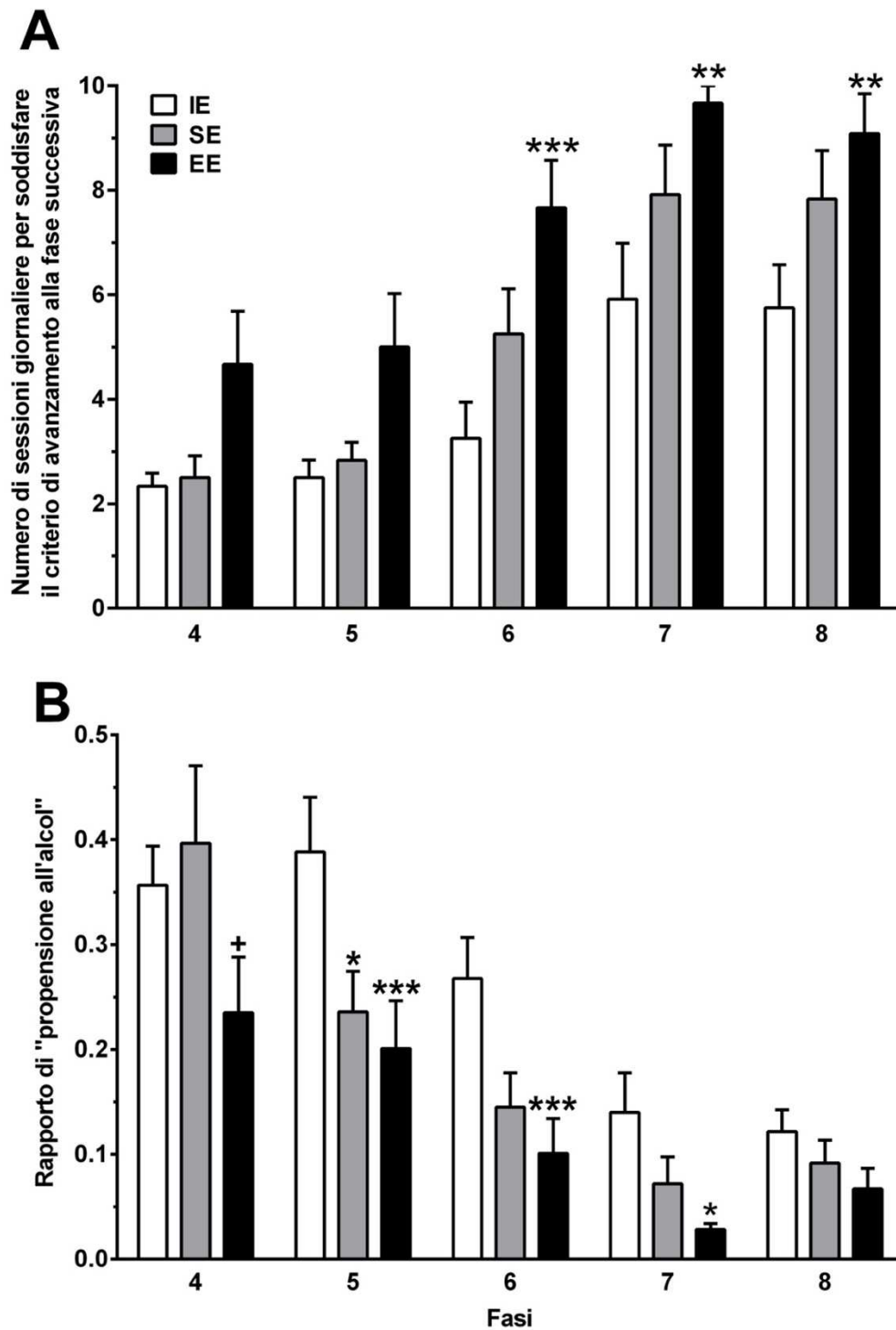


Figura 11.

Pannello A: numero di sessioni giornaliere di auto-somministrazione di alcol necessarie per raggiungere il criterio di avanzamento nelle Fasi 4-8.

Pannello B: rapporto di "propensione all'alcol" nelle Fasi 4-8.

Ogni barra è la media \pm errore standard di $n = 12$ ratti.

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.005$; ratti EE in confronto ai ratti IE (test di Tukey).

+: $P < 0.05$; ratti EE in confronto ai ratti SE (test di Tukey).

4.2.3 Testing

La Fase 10 è stata composta da venti sessioni di auto-somministrazione giornaliera di 30 minuti secondo i programmi di rinforzo FR4 e FR1 rispettivamente per l'alcol (al 15%) e l'acqua. L'ANOVA a due vie ha indicato un effetto significativo dell'ambiente [$F(2,33) = 3.61, P < 0.05$], un effetto altamente significativo delle sessioni [$F(19,627) = 6.30, P < 0.0001$] e un'interazione significativa [$F(38,627) = 1.56, P < 0.05$] sul numero di pressioni sulla leva dell'alcol. Durante il periodo di venti sessioni il numero di pressioni della leva associata all'alcol inizialmente è aumentato e poi si è stabilizzato in tutti e tre i gruppi di ratti. Il numero di pressioni è inferiore nei ratti EE rispetto ai ratti IE nella maggior parte delle sessioni, raggiungendo però una significatività statistica all'analisi *post hoc* solo alle sessioni 16, 18 e 19 (Figura 12, pannello A). Nella prima metà della Fase 10, il numero di pressioni nei ratti SE è stato generalmente inferiore a quello nei ratti IE, raggiungendo la significatività statistica all'analisi *post hoc* alle sessioni 3, 7, 8 e 9 (Figura 12, pannello A); nella seconda metà della Fase 10, il numero di pressioni sulla leva dell'alcol nei ratti SE e IE si è praticamente sovrapposto. I valori medi di pressioni dei ratti dei tre gruppi sono mostrati nel grafico della Figura 12, pannello C. Il numero medio di pressioni è inferiore nei ratti EE rispetto ai ratti IE di circa il 35%. I ratti SE hanno mostrato valori intermedi [$F(2,33) = 6.61, P < 0.05$].

L'ANOVA a due vie ha indicato un effetto quasi significativo dell'ambiente [$F(2,33) = 3.18, P = 0.054$], un effetto altamente significativo delle sessioni [$F(19,627) = 6.27, P < 0.0001$] e nessuna interazione significativa [$F(38,627) = 1.34, P > 0.05$], sulla quantità di alcol auto-somministrato. L'andamento della quantità di alcol auto-somministrato tendeva a essere parallelo a quello del numero di pressioni sulla leva

dell'alcol (Figura 12, pannello B). Il consumo di alcol nei ratti IE, SE ed EE è riassunto nel grafico che rappresenta i valori medi della quantità di alcol auto-somministrato durante l'intero periodo di venti sessioni (Figura 12, pannello D). La quantità media di alcol auto-somministrato era inferiore nei ratti EE rispetto ai ratti IE di circa il 30%. I ratti SE hanno mostrato valori intermedi [$F(2,33) = 3.81$, $P < 0.05$].

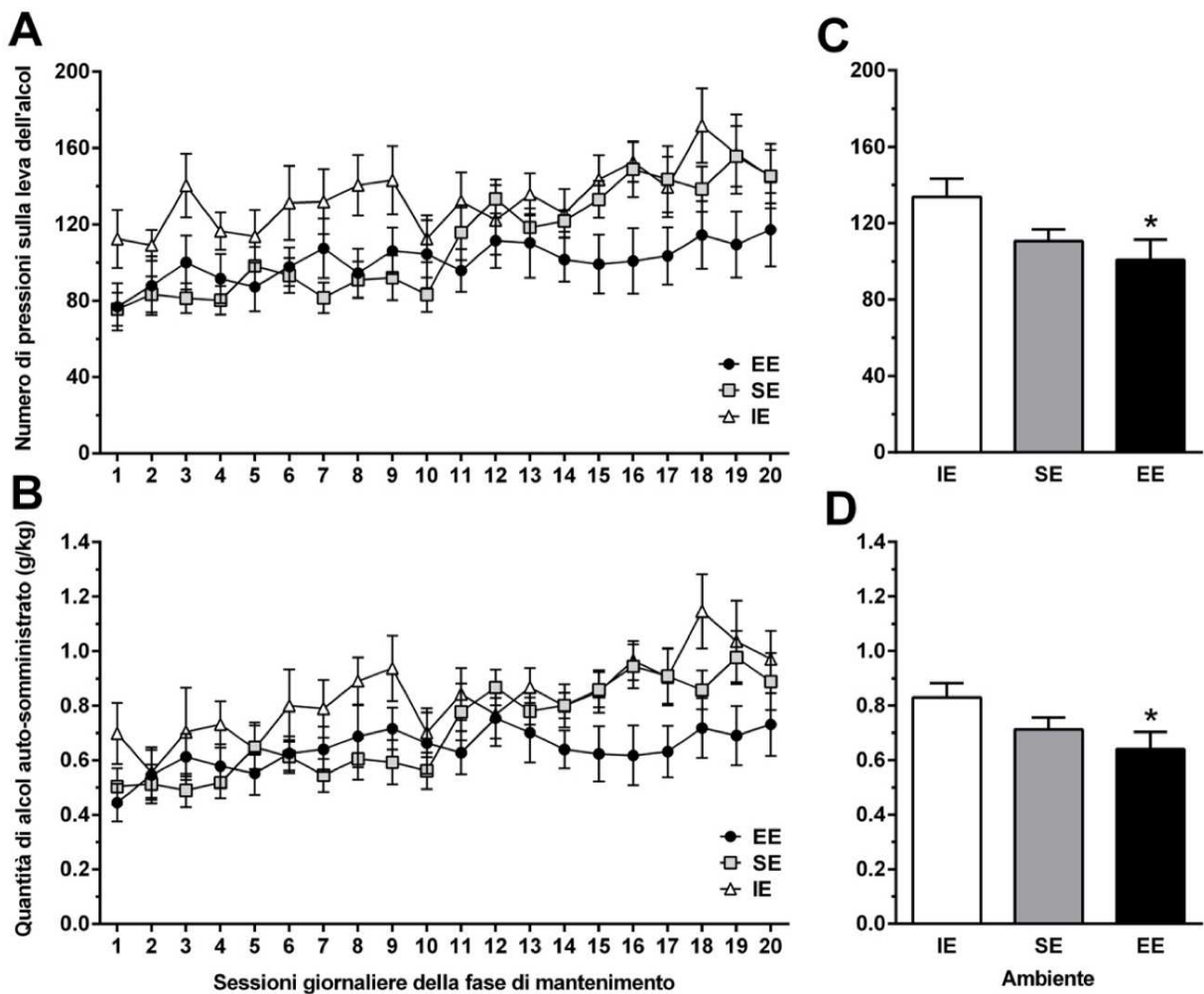


Figura 12.

Pannello A: numero di pressioni sulla leva dell'alcol: valori di ogni sessione giornaliera della fase di mantenimento (Fase 10).

Pannello C: valori medi del numero di pressioni sulla leva dell'alcol nell'intera fase di mantenimento (Fase 10).

Pannello B: quantità di alcol auto-somministrato: valori di ciascuna seduta giornaliera della fase di mantenimento (Fase 10).

Pannello D: valori medi della quantità di alcol auto-somministrato nell'intera fase di mantenimento.

Ogni punto e ogni barra rappresenta la media \pm errore standard di $n = 12$ ratti.

★: $P < 0.05$; ratti EE in confronto con i ratti IE (test di Tukey).

La Fase 11 è stata costituita da una singola sessione di auto-somministrazione di 60 minuti secondo il programma PR di rinforzo per il 15% di alcol. L'ANOVA ad una via ha indicato differenze significative nel numero di pressioni per l'alcol [$F(2,33) = 6.31$, $P < 0.005$]. Il test *post hoc* ha indicato che il numero di pressioni è stato significativamente inferiore nei ratti EE rispetto ai ratti IE (Figura 13, pannello A), con una riduzione di circa il 35%. Una riduzione quasi significativa ($P = 0.052$) del numero di pressioni è stata osservata anche nei ratti SE rispetto ai ratti IE (Figura 13, pannello A).

L'ANOVA ad una via ha anche indicato differenze significative nel *breakpoint* per l'alcol [$F(2,33) = 6.17$, $P < 0.001$]. Il test *post hoc* ha indicato che il *breakpoint* era significativamente più basso nei ratti EE rispetto a quelli IE (Figura 13, pannello B), con una riduzione di circa il 30%. I ratti SE hanno mostrato un *breakpoint* medio, intermedio tra quello dei ratti IE ed i ratti EE (Figura 13, pannello B).

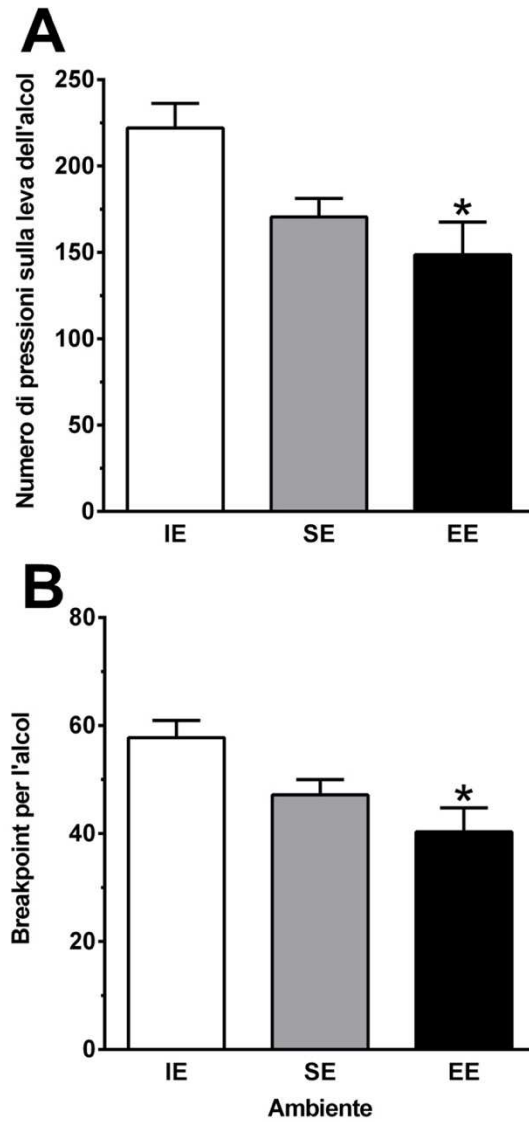


Figura 13.

Pannello A: numero di pressioni sulla leva dell'alcol nella Fase 11.

Pannello B: *breakpoint* per l'alcol.

Ogni barra rappresenta la media \pm l'errore standard di $n = 12$ ratti.

*: $P < 0.005$; ratti EE in confronto con i ratti IE (test di Tukey).

5. DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo utilizzato un modello di arricchimento ambientale semi-naturalistico al fine di investigare se e in che modo questa condizione sperimentale potesse influenzare l'attività del sistema dopaminergico mesolimbico (VTA-NAc) ed il comportamento di auto-somministrazione orale ed operante di alcol di ratti sP.

Per rispondere alla prima domanda ci siamo avvalsi della tecnica dell'elettrofisiologia *in vivo* e di un particolare protocollo sperimentale (cellule per affondata, vedi sezione 3.3) che ci ha consentito di studiare la popolazione neuronale di interesse, ovvero i neuroni dopaminergici del nucleo parabrachiale della VTA posteriore che proiettano al NAc (circuito dopaminergico mesolimbico).

Il campionamento dei neuroni dopaminergici della VTA è stato eseguito mediante registrazioni elettrofisiologiche extracellulari a singola cellula in ratti mai esposti all'alcol appartenenti diversi gruppi sperimentali: IE, SE ed EE.

L'analisi delle proprietà elettrofisiologiche dei neuroni dopaminergici della VTA ha rivelato un aumento statisticamente significativo nel numero di cellule spontaneamente attive registrate nei gruppi EE e SE rispetto a IE. Nello specifico, il valore del parametro delle cellule per affondata nel gruppo SE è risultato intermedio ($EE > SE > IE$), indicando un'influenza non solo dell'arricchimento ambientale, ma anche della socialità. Non sono state osservate invece differenze significative per quanto riguarda gli altri due parametri dell'attività neuronale considerati, ossia la frequenza di scarica e la modalità di scarica in treni di potenziali d'azione (*spikes in bursts*), anche se si è evidenziata una tendenza verso valori più alti nel gruppo EE, con il gruppo SE sempre in posizione intermedia ($EE > SE > IE$).

L'indice delle cellule spontaneamente attive per affondata rappresenta una misura attendibile dei cambiamenti dell'attività neuronale (Diana et al., 1993; West & Grace, 2004). Infatti, è stato ampiamente dimostrato che trattamenti o condizioni sperimentali che alterano in un senso o nell'altro il numero dei neuroni dopaminergici registrati durante i campionamenti nella VTA modificano in modo corrispondente il rilascio di dopamina nelle aree terminali come, ad esempio, il NAc (Diana et al., 1993; West & Grace, 2004).

Alla luce di ciò, possiamo ipotizzare che la permanenza nell'ambiente arricchito e, anche se in misura minore, quella nell'ambiente intermedio, arricchito solo dal punto di vista sociale, abbiano determinato un'aumentata trasmissione dopaminergica nel circuito mesolimbico ed uno stato di maggior gratificazione ed "appagamento" nei ratti EE e SE. I nostri risultati sono in linea con studi precedenti che hanno dimostrato come nei topi l'esposizione a diverse tipologie di arricchimento ambientale induca un aumento nel numero di cellule dopaminergiche a livello del mesencefalo e fenomeni di "plasticità neurotrasmettitoriale" (Aumann et al., 2013; Tomas et al., 2015; Aumann et al., 2016; vedi sezione 1.3).

Per quanto riguarda i dati ottenuti mediante la procedura dell'auto-somministrazione, il primo risultato che merita un commento è quello relativo all'acquisizione del comportamento di pressione della leva (*shaping*). Nella Fase 1, infatti, i ratti sono stati introdotti per la prima volta nelle gabbie per il comportamento operante. I risultati ottenuti indicano che i ratti IE hanno acquisito rapidamente il comportamento di pressione della leva; con una media di circa 4 sessioni di auto-somministrazione, i ratti IE hanno premuto la leva un numero di volte sufficientemente alto da (i) suggerire che le pressioni non sono state casuali e (ii) soddisfare il criterio di avanzamento alla fase successiva (accesso ad almeno 35

rinforzi di acqua per sessione in almeno due sessioni). Anche i ratti SE sono stati relativamente rapidi nell'acquisizione del comportamento di pressione della leva, poiché hanno impiegato una media di circa 5 sessioni per soddisfare il criterio di avanzamento. I dati dei ratti IE e SE sono in linea con ciò che è stato ripetutamente osservato nei ratti sP (alloggiati singolarmente o in gruppi di tre/quattro individui) (Maccioni et al., 2012; 2015; Lorrai et al., 2019). Al contrario, i ratti EE hanno avuto bisogno di un numero superiore di sessioni per acquisire il comportamento di pressione della leva: hanno impiegato una media di circa 8 sessioni per soddisfare il criterio di avanzamento e passare alla Fase 2.

È altamente improbabile che la più lenta acquisizione del comportamento di pressione della leva mostrato dai ratti EE sia dovuto a deficit cognitivi. Sebbene non espressamente affrontato nel presente studio, è stato ripetutamente segnalato che la condizione di arricchimento ambientale migliora i processi di apprendimento e memoria nei ratti (Redolat & Mesa-Gresa, 2012; Morè et al., 2020). Ciò è ancora più probabile per ratti alloggiati in gabbie "arricchite" come quelle utilizzate nel presente studio, poiché le funzioni cognitive sono state ulteriormente stimulate dalla presenza del labirinto che i ratti dovevano necessariamente attraversare per spostarsi tra lo scomparto dove era presente il cibo e quello dove era presente l'acqua (Fares et al., 2013). Una spiegazione più probabile per l'acquisizione più lenta del comportamento di pressione della leva osservata nei ratti EE è probabilmente rappresentata dall'ipotesi che l'esposizione prolungata ai molteplici stimoli forniti dalla condizione EE abbia portato a una "svalutazione", o ridotta salienza, dei nuovi stimoli forniti dalle gabbie per il comportamento operante. Al contrario, questi ultimi stimoli hanno acquisito particolare rilevanza nei ratti IE, abituati a una pressoché totale assenza di qualsiasi stimolo nella loro *homecage*. In

altre parole, i ratti EE, rispetto ai ratti IE, avrebbero manifestato una ridotta attitudine all'esplorazione della gabbia per il comportamento operante. Questa diminuita curiosità di esplorare il nuovo ambiente probabilmente ha portato a tempi più lunghi per scoprire la leva e le conseguenze, in termini di erogazione di acqua, della pressione della leva. Questa ipotesi è coerente con una serie di dati sperimentali che indicano che i ratti tenuti in un ambiente arricchito, rispetto ai ratti tenuti in un ambiente impoverito, hanno un'attività locomotoria ed esplorativa inferiore quando esposti a un nuovo ambiente (Smith et al., 1997; Bowling et al., 1993; Bowling & Bardo, 1994; Bardo et al., 1995).

Differenze sostanziali nel comportamento di auto-somministrazione tra i ratti IE, SE ed EE sono state osservate anche quando la soluzione alcolica ha sostituito l'acqua come rinforzo. Nelle Fasi dalla 4 alla 8, la durata del *training* è stata infatti più lunga nei ratti EE rispetto ai ratti IE, come evidenziato dal maggior numero di sessioni necessarie per raggiungere il criterio di avanzamento (che, a partire dalla Fase 4, includeva anche una quantità di alcol auto-somministrato pari o superiore a 0.5 g/kg per sessione in almeno due sessioni). I ratti EE, oltre ad essere più lenti nell'avanzare alla fase successiva, si sono auto-somministrati generalmente quantità minori di alcol, come indicato da valori più bassi del cosiddetto rapporto di "propensione all'alcol", con cui si intendeva mettere in relazione la quantità di alcol auto-somministrato con la durata della corrispondente fase di *training*. Il comportamento dei ratti SE è risultato essere intermedio tra quello dei ratti IE e quello dei ratti EE, poiché sia il numero di sessioni necessarie per raggiungere il criterio di avanzamento sia il rapporto di "propensione all'alcol" erano intermedi tra quelli dei ratti IE e quelli dei ratti EE nella maggior parte delle fasi del *training*.

L'ordine $IE > SE > EE$ è stato mantenuto anche nelle due fasi di *testing* (Fase 10 e Fase 11). Nelle venti sessioni della Fase 10, il numero di pressioni della leva dell'alcol e, in misura minore, la quantità di alcol auto-somministrato sono stati inferiori nei ratti EE rispetto a quelli IE, suggerendo che vivere in un ambiente complesso riduce le proprietà di rinforzo dell'alcol nei ratti sP.

Risultati simili sono stati osservati nella Fase 11, durante la quale è stato applicato il paradigma del *breakpoint*, il quale misura quanto il ratto è disposto a "lavorare" per ottenere l'alcol. I ratti EE hanno raggiunto un valore di *breakpoint* inferiore a quello dei ratti IE, suggerendo che le proprietà motivazionali dell'alcol (così come quelle di rinforzo) sono ridotte nei ratti sP che vivono in un ambiente arricchito. L'ordine $IE > SE > EE$ ottenuto nel presente studio con i ratti sP è coerente con i risultati di studi precedenti che suggeriscono che il consumo e l'auto-somministrazione di alcol nei ratti e nei topi sono inversamente proporzionali al livello di arricchimento ambientale (Deehan et al., 2011; Holgate et al., 2017). In linea con l'interpretazione data ai risultati di precedenti studi sperimentali sulla capacità dell'arricchimento ambientale di sopprimere diversi comportamenti indotti dall'alcol e da altre sostanze d'abuso (Solinas et al., 2010), il ridotto comportamento di auto-somministrazione di alcol registrato nei ratti EE può essere spiegato in termini di sostituzione delle proprietà di rinforzo e motivazionali delle principali componenti dell'EE (cioè interazioni sociali, attività motorie, esplorazione, novità) a quelle dell'alcol, rendendo pertanto meno urgente il comportamento di pressione della leva e il consumo di alcol. Questa "sostituzione edonica" ricorda quella osservata in casi in cui sono stati presentati degli stimoli naturali alternativi all'alcol. Ad esempio, la contemporanea disponibilità di bevande altamente palatabili, come soluzioni di cioccolato, saccarosio e saccarina, ha ritardato l'acquisizione del

comportamento di consumo di alcol (Colombo et al., 2005a) e ha soppresso il consumo di alcol quando esso era già stabilizzato (Colombo et al., 1997; 2005b) in ratti sP esposti nella *homecage* ad un regime di libera scelta tra soluzione alcolica, acqua e bevanda palatabile. Al contrario, gli alti valori di pressioni della leva, la quantità di alcol auto-somministrato e il *breakpoint* per l'alcol registrati nei ratti IE possono essere interpretati ipotizzando che lo stress indotto dall'isolamento abbia esacerbato la predisposizione genetica dei ratti sP a sviluppare comportamenti ansia-correlati (Colombo et al., 1995; Richter et al., 2000; Cagiano et al., 2002; Leggio et al., 2003; Roman & Colombo, 2009; Roman et al., 2012) e che l'alcol sia stato consumato come forma di "auto-medicazione". Studi precedenti hanno infatti dimostrato che l'alcol consumato volontariamente riduceva diversi comportamenti correlati all'ansia nei ratti sP (Colombo et al., 1995; 2015; Lobina et al., 2013), suggerendo che l'ansiolisi indotta dall'alcol è un fattore importante alla base del consumo di alcol in questa linea di ratti. I valori intermedi registrati nei ratti SE confermano questa ipotesi, in quanto suggeriscono che il solo arricchimento sociale sia in grado di produrre un certo grado di riduzione delle proprietà rinforzanti e motivazionali dell'alcol nei ratti sP.

I presenti dati sull'auto-somministrazione di alcol nei ratti IE e SE possono anche essere visti come una parziale risposta alla domanda, ancora aperta (considerando i risultati contrastanti), sull'influenza dell'alloggiamento singolo o sociale sul consumo di alcol in ratti e topi (Deathrage, 1972; Wolffgramm, 1990; Lodge & Lawrence, 2003; Thorsell et al., 2005; McCool & Chappell, 2009; Evans et al., 2020; Scott et al., 2020; Fulenwider et al., 2021; Moench & Logrip, 2021).

Studi futuri potranno inoltre valutare il contributo di ogni specifico tipo di stimoli (cognitivi, sensoriali e motori) all'effetto di riduzione indotto dall'arricchimento

ambientale sulle proprietà di rinforzo e motivazionali dell'alcol nei ratti sP. Questa ulteriore domanda sperimentale ha una certa rilevanza, poiché è stato riportato che la sola attività motoria nella ruota riduce il consumo di alcol (McMillan et al., 1995; Ehringer et al., 2009; Reguilón et al., 2020), il ripristino del comportamento di ricerca di alcol (Somkuwar et al., 2016) e la cosiddetta *conditioned place preference* indotta dall'alcol (Contó et al., 2021) in ratti e topi.

Con la cautela con la quale i risultati di sperimentazioni precliniche possono essere interpretati in chiave traslazionale, questi risultati suggeriscono che attraverso il miglioramento e l'arricchimento delle condizioni di vita si possano raggiungere importanti risultati in termini di terapia dell'alcolismo.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Ahlenius, S., Carlsson, A., Engel, J., Svensson, T., & Sodersten P. (1973).
Antagonism by alpha methyltyrosine of the ethanol-induced stimulation and
euphoria in man. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 14: 586–591.
- Aragona, B. J., Cleaveland, N. A., Stuber, G. D., Day, J. J., Carelli, R. M., &
Wightman, R. M. (2008). Preferential enhancement of dopamine transmission
within the nucleus accumbens shell by cocaine is attributable to a direct
increase in phasic dopamine release events. *Journal of Neuroscience*, 28 (35):
8821-8831.
- Aumann, T. D., Tomas, D., & Horne M. K. (2013). Environmental and behavioral
modulation of the number of substantia nigra dopamine neurons in adult mice.
Brain and Behavior, 3: 617-25.
- Aumann, T. D. (2016). Environment- and activity-dependent dopamine
neurotransmitter plasticity in the adult substantia nigra. *Journal of Chemical
Neuroanatomy*, 73: 21-32.
- Bahi, A. (2017). Environmental enrichment reduces chronic psychosocial stress
induced anxiety and ethanol-related behaviors in mice. *Progress in Neuro-
Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 77: 65-74.

- Bardo, M. T., Bowling, S. L., Rowlett, J. K., Manderscheid, P., Buxton, S. T., & Dwoskin, L. P. (1995). Environmental enrichment attenuates locomotor sensitization, but not in vitro dopamine release, induced by amphetamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 51: 397-405.
- Bass, C. E., Grinevich, V. P., Gioia, D., Day-Brown, J. D., Bonin, K. D., Stuber, G. D., Weiner J. L., & Budygin E. A. (2013). Optogenetic stimulation of VTA dopamine neurons reveals that tonic but not phasic patterns of dopamine transmission reduce ethanol self-administration. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, Article 173.
- Baumans, V. (2005). Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR Journal*, 46: 162-170.
- Bechtholt, A. J., & Cunningham, C. L. (2005). Ethanol-induced conditioned place preference is expressed through a ventral tegmental area dependent mechanism. *Behavioral Neuroscience*, 119 (1): 213-223.
- Bell, R. L., Sable, H. J. K., Colombo, G., Hyytiä, P., Rodd, Z. A., & Lumeng, L. (2012). Animal models for medications development targeting alcohol abuse using selectively bred rat lines: neurobiological and pharmacological validity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103: 119-155.

- Bennett, E. L., Rosenzweig, M. R., & Diamond, M. C. (1969). Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Science*, 163: 825-826.
- Berardo, L. R., Fabio, M. C., & Pautassi, R. M. (2016). Post-weaning environmental enrichment, but not chronic maternal isolation, enhanced ethanol intake during periadolescence and early adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10: 195.
- Bowling, S. L., Rowlett, J. K., & Bardo, M. T. (1993). The effect of environmental enrichment on amphetamine-stimulated locomotor activity, dopamine synthesis and dopamine release. *Neuropharmacology*, 32: 885-893.
- Bowling, S. L., & Bardo, M. T. (1994). Locomotor and rewarding effects of amphetamine in enriched, social, and isolate reared rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48: 459-464.
- Brodie, M. S., Shefner, M. S., & Dunwiddie, T. V. (1990). Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Research*, 508 (1): 65-69.
- Brodie, M. S., Pesold, C., & Appel, S. B. (1999). Ethanol directly excites dopaminergic ventral tegmental area reward neurons. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23 (11): 1848-1852.

Budygin E. A., Bass C. E., Grinevich V. P., Deal A. L., Bonin K. D., & Weiner, J.

L. (2020). Opposite consequences of tonic and phasic increases in accumbal dopamine on alcohol-seeking behavior. *iScience*, Volume 23, Issue 3: 100877.

Cagiano, R., Cassano, T., Coluccia, A., Gaetani, S., Giustino, A., Steardo, L., Tattoli, M., Trabace, L., & Cuomo, V. (2002). Genetic factors involved in the effects of developmental low-level alcohol induced behavioral alterations in rats. *Neuropsychopharmacology*, 26: 191-203.

Colombo, G., Agabio, R., Lobina, C., Reali, R., Zocchi, A., Fadda, F., & Gessa, G. L. (1995). Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. *Physiology & Behavior*, 57: 1181-1185.

Colombo, G., Agabio, R., Diaz, G., Fà, M., Lobina, C., Reali, R., & Gessa, G. L. (1997). Sardinian alcohol-preferring rats prefer chocolate and sucrose over ethanol. *Alcohol*, 14: 611-615.

Colombo, G., Lobina, C., Maccioni, P., Mascia, M. F., Orrù, A., Gessa, G. L., & Carai, M. A. M. (2005a). Suppression of acquisition of alcohol drinking behavior by the concurrent availability of saccharin in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol*, 35: 27-33.

- Colombo, G., Lobina, C., Maccioni, P., Mascia, M. F., Orrù, A., Gessa, G. L., & Carai, M. A. M. (2005b). Suppression of maintenance of alcohol drinking behavior by the concurrent availability of saccharin in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol*, 35: 35-41.
- Colombo G., Lobina C., Carai M. A. M., & Gessa G. L. (2006). Phenotypic characterization of genetically selected Sardinian alcohol-preferring (sP) and -non-preferring (sNP) Rats. *Addiction Biology*, 11 (3-4): 324-38.
- Contó, M. B., Dos Santos, N. B., Munhoz, C. D., Marcourakis, T., D'Almeida, V., & Camarini, R. (2021). Exposure to running wheels prevents ethanol rewarding effects: The role of CREB and deacetylases SIRT-1 and SIRT-2 in the nucleus accumbens and prefrontal cortex. *Neuroscience*, 469: 125-137.
- Crofton, E. J., Zhang, Y., & Green, T. A. (2015). Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 49, 19-31.
- Deatherage, G. (1972). Effects of housing density on alcohol intake in the rat. *Physiology & Behavior*, 9: 55-57.
- de Carvalho, C. R., Pandolfo, P., Pamplona, F. A., & Takahashi, R. N. (2010). Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural Brain Research*, 208: 231-236.

- Deehan, G. A. Jr., Palmatier, M. I., Cain, M. E., & Kiefer, S. W. (2011). Differential rearing conditions and alcohol-preferring rats: consumption of and operant responding for ethanol. *Behavioral Neuroscience*, 125: 184-193.
- Diana, M., Pistis, M., Carboni, S., Gessa, G. L., & Rossetti, Z. L. (1993). Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 90 (17): 7966-7969.
- Diana, M. (2011). The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Frontiers in Psychiatry*, 29 (2): 64.
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 85: 5274–5278.
- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M. A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V., & Lecca, D. (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1: 227-241.
- Ehringer, M. A., Hoft, N. R., & Zunhammer, M. (2009). Reduced alcohol consumption in mice with access to a running wheel. *Alcohol*, 43: 443-452.

- Ellison, G. D. (1981). A novel animal model of alcohol consumption based on the development of extremes of ethanol preference in colony-housed but not isolated rats. *Behavioral and Neural Biology*, 31: 324-330.
- Engel, J., Strombom, U., Svensson, T.H., & Waldeck, B. (1974). Suppression by alpha-methyltyrosine of ethanol-induced locomotor stimulation: partial reversal by L-dopa. *Psychopharmacology*, 37: 275–279.
- Evans, O., Rodríguez-Borillo, O., Font, L., Currie, P. J., & Pastor, R. (2020). Alcohol binge drinking and anxiety-like behavior in socialized versus isolated C57BL/6J mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 44: 244-254.
- Everitt, B. J., Belin, D., Economidou, D., Pelloux, Y., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2008). Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363 (1507): 3125-3135.
- Fares, R. P., Belmeguenai, A., Sanchez, P. E., Kouchi, H. Y., Bodennec, J., Morales, A., Georges, B., Bonnet, C., Bouvard, S., Sloviter, R. S., & Bezin, L. (2013). Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. *PLoS One*, 8: e53888.

- Foddai, M., Dosia, G., Spiga, S., & Diana, M. (2004). Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology*, 29 (3): 530-536.
- Fulenwider, H. D., Robins, M. T., Caruso, M. A., & Ryabinin, A. E. (2021). Social housing leads to increased ethanol intake in male mice housed in environmentally enriched cages. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15: 695409.
- Fuxe, K., Goldstein, M., Hokfelt, T., Jonsson, G., & Lidbrink, P. (1974). Dopaminergic involvement in hypothalamic function: extrahypothalamic and hypothalamic control. A Neuroanatomical Analysis. *Advances in Neurology*, 5: 405-419.
- Gessa, G. L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L., & Mereu, G. (1985). Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Research*, 348 (1): 201-203.
- Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13th edition. Chapter 23: Ethanol. 2021.
- Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons-3. evidence for electrotonic coupling. *Neuroscience*, 10: 333-348.

Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1984a). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *Journal of Neuroscience*, 4 (11): 2877-2890.

Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1984b). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *Journal of Neuroscience*, 4 (11): 2866-2876.

Grant, B. F., Goldstein, R. B., Saha, T. D., Chou, S. P., Jung, J., Zhang, H., Pickering, R. P., Ruan, W. J., Smith, S. M., Huang, B., & Hasin, D. S. (2015). Epidemiology of DSM-5 alcohol use disorder: results from the National Epidemiologic Survey on alcohol and related conditions III. *JAMA Psychiatry*, 72 (8): 757-766.

Han, B., Jones, C. M., Einstein, E. B., Powell, P. A., & Compton W. M. (2021). Use of medications for alcohol use disorder in the US: results from the 2019 National Survey on drug use and health. *JAMA Psychiatry*, 78 (8): 922-924.

Holgate, J. Y., Garcia H., Chatterjee, S., & Bartlett, S. E. (2017). Social and environmental enrichment has different effects on ethanol and sucrose consumption in mice. *Brain and Behavior*, 7, e00767.

Ikemoto, S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35 (2): 129-150.

- Jayaram-Lindström, N., Ericson, M., Steensland, P., & Jerlhag, E. (2016). Dopamine and alcohol dependence: from bench to clinic. In: recent advances in drug addiction research and clinical applications, William M. Meil and Christina L. Ruby, IntechOpen.
- Kazmaier, K., Butcher, R. E., Senter, R. J., & Stutz, R. M. (1973). Rearing conditions and ethanol consumption by rats. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol*, 34: 520-552.
- Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature Reviews Neuroscience*, 20: 235-245.
- Knox, J., Hasin, D. S., Larson, F. R. R., & Kranzler, H. R. (2019). Prevention, screening, and treatment for heavy drinking and alcohol use disorder. *Lancet Psychiatry*, 6 (12): 1054-1067.
- Kulkosky, P.J., Zellner, D.A., Hyson, R.L., & Riley, A.L. (1980). Ethanol consumption in individual, group, and colonial housing conditions. *Physiological Psychology*, 8: 56-60.
- Lammel, S., Lim, B. K., & Malenka, R. C. (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology*, 76 (Pt B): 351–359.

- Leggio, B., Masi, F., Grappi, S., Nanni, G., Gambarana, C., Colombo, G., & de Montis M. G. (2003). Sardinian alcohol-preferring and non-preferring rats show different reactivity to aversive stimuli and a similar response to a natural reward. *Brain Research*, 973 (2): 275-284.
- Lobina, C., Gessa, G. L., & Colombo, G. (2013). Anxiolytic effect of voluntarily consumed alcohol in Sardinian alcohol-preferring rats exposed to the social interaction test. *Journal of Alcoholism & Drug Dependence*, 1: 132.
- Lodge, D. J., & Lawrence, A. J. (2003). The effect of isolation rearing on volitional ethanol consumption and central CCK/dopamine systems in Fawn-Hooded rats. *Behavioral Brain Research*, 141: 113-122.
- Loi, B., Lobina, C., Maccioni, P., Fantini, N., Carai, M. A. M., Gessa, G.L., & Colombo, G. (2010). Increase in alcohol intake, reduced flexibility of alcohol drinking, and evidence of signs of alcohol intoxication in Sardinian alcohol-preferring rats exposed to intermittent access to 20% alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34 (12): 2147-2154.
- Lopez, M. F., & Laber, K. (2015). Impact of social isolation and enriched environment during adolescence on voluntary ethanol intake and anxiety in C57BL/6J mice. *Physiology & Behavior*, 148: 151-156.

- Lorrai I., Contini A., Gessa G.L., Mugnaini C., Corelli F., Colombo G., & Maccioni P. (2019). Operant, oral alcohol self-administration: sex differences in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol*, 79: 147-162.
- Lüscher, C., & Ungless, M.A. (2006). The mechanistic classification of addictive drugs. *PLoS Medicine*, 3, e437.
- Ma, H., & Zhu, G. (2014). The dopamine system and alcohol dependence. *Shanghai Archives of Psychiatry*, 26 (2): 61-68.
- Maccioni, P., Zaru, A., Loi, B., Lobina, C., Carai, M. A. M., Gessa, G. L., Capra, A., Mugnaini, C., Pasquini, S., Corelli, F., Hyytiä, P., Lumeng, L., & Colombo, G. (2012). Comparison of the effect of the GABA_B receptor agonist, baclofen, and the positive allosteric modulator of the GABA_B receptor, GS39783, on alcohol self-administration in three different lines of alcohol-preferring rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36: 1748-1766.
- Maccioni, P., Vargiolu, D., Thomas, A.W., Malherbe, P., Mugnaini, C., Corelli, F., Leite-Morris, K.A., Gessa, G.L., & Colombo G. (2015). Inhibition of alcohol self-administration by positive allosteric modulators of the GABA_B receptor in rats: lack of tolerance and potentiation of baclofen. *Psychopharmacology*, 232: 1831-1841.

- Maccioni, P., Lorrain, I., Contini, A., Leite-Morris, K., & Colombo, G. (2018). Microinjection of baclofen and CGP7930 into the ventral tegmental area suppresses alcohol self-administration in alcohol-preferring rats. *Neuropharmacology*, 136 (Pt A): 146-158.
- Marianno, P., Abrahao, K. P., & Camarini, R. (2017). Environmental enrichment blunts ethanol consumption after restraint stress in C57BL/6 mice. *PLoS One*, 12, e0170317.
- Marinelli, M., Cooper, D. C., Baker, L. K., & White, F. J. (2003). Impulse activity of midbrain dopamine neurons modulates drug-seeking behavior. *Psychopharmacology*, 168 (1-2): 84-98.
- Marinelli, M., Rudick, C. N., Hu, X. T., & White, F. J. (2006). Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS and Neurological Disorder - Drug Targets*, 5 (1): 79-97.
- Melis, M., Spiga, S., & Diana, M. (2005). The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *International Review of Neurobiology*, 63: 101-154.
- McCool, B. A., & Chappell, A. M. (2003). Early social isolation in male Long-Evans rats alters both appetitive and consummatory behaviors expressed during operant ethanol self-administration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33: 273-282.

- McMillan, D. E., McClure, G. Y., & Hardwick, W.C. (1995). Effects of access to a running wheel on food, water and ethanol intake in rats bred to accept ethanol. *Drug and Alcohol Dependence*, 40: 1-7.
- Melis, M., Pillolla, G., Perra, S., Colombo, G., Muntoni, A. L., & Pistis, M. (2009). Electrophysiological properties of dopamine neurons in the ventral tegmental area of Sardinian alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology*, 201 (4): 471-481.
- Melis, M., Sagheddu, C., De Felice, M., Casti, A., Madeddu, C., Spiga, S., Muntoni, A. L., Mackie, K., Marsicano, G., Colombo, G., Castelli, M. P., & Pistis, M. (2014). Enhanced endocannabinoid-mediated modulation of rostromedial tegmental nucleus drive onto dopamine neurons in Sardinian alcohol-preferring rats. *Journal of Neuroscience*, 34 (38): 12716-12724.
- Moench, K. M., & Logrip, M. L. (2021). Housing condition differentially impacts escalation of alcohol intake, relapse-like drinking, anxiety-like behavior, and stress history effects by sex. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 45: 480-489.
- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behavior. *Nature Reviews Neuroscience*, 18 (2): 73-85.

- Morè, L., Lauterborn, J. C., Papaleo, F., & Brambilla, R. (2020). Enhancing cognition through pharmacological and environmental interventions: examples from preclinical models of neurodevelopmental disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 110: 28-45.
- Morikawa, H., & Morrisett, R. A. (2010). Ethanol action on dopaminergic neurons in the ventral tegmental area: interaction with intrinsic ion channels and neurotransmitter inputs. *International Review of Neurobiology*, 91: 235-288.
- Murtha, S., Pappas, B. A., & Raman, S. (1990). Neonatal and adult forebrain norepinephrine depletion and the behavioral and cortical thickening effects of enriched/impooverished environment. *Behavioural Brain Research*, 39: 249-261.
- Nestler, E. J., & Lüscher, C. (2019). The molecular basis of drug addiction: linking epigenetic to synaptic and circuit mechanisms. *Neuron*, 102 (1): 48–59.
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 697-709.
- Oades, R. D., & Halliday, G. M. (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology anatomy and connectivity. *Brain Research*, 434: 117–165.

- Pan, Y., Berman, Y., Haberny, S., Meller, E., & Carr, K.D. (2006). Synthesis, protein levels, activity, and phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in mesoaccumbens and nigrostriatal dopamine pathways of chronically food-restricted rats. *Brain Research*, 1122: 135–142.
- Paxinos G., & Watson C. (2013). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 7th Edition. Academic Press, San Diego.
- Piazza, P. V., & Deroche-Gamonet, V. (2013). A multistep general theory of transition to addiction. *Psychopharmacology*, 229 (3): 387-413.
- Pontieri, F. E., Tanda, G., Orzi, F., & Di Chiara, G. (1996). Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature*, 382 (6588): 255-257.
- Redolat, R., & Mesa-Gresa, P. (2012). Potential benefits and limitations of enriched environments and cognitive activity on age-related behavioural decline. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, 10: 293-316.
- Reguilón, M. D., Ferrer-Pérez, C., Ballestín, R., Miñarro, J., & Rodríguez-Arias, M. (2020). Voluntary wheel running protects against the increase in ethanol consumption induced by social stress in mice. *Drug and Alcohol Dependence*, 212: 108004.

- Restivo, L., Ferrari, F., Passino, E., Sgobio, C., Bock, J., Oostra, B. A., Bagni, C., & Ammassari-Teule, M. (2005). Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102: 11557-11562.
- Richardson, N. R., & Roberts, D. C. (1996). Progressive ratio schedules in drug self administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *Journal of Neuroscience Methods*, 66: 1-11.
- Richter, R. M., Zorrilla, E. P., Basso, A. M., Koob, G. F., & Weiss, F. (2000). Altered amygdalar CRF release and increased anxiety-like behavior in Sardinian alcohol-preferring rats: a microdialysis and behavioral study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24: 1765-1772.
- Rockman G. E., Borowski T. B., & Glavin G. B. (1986). The effects of environmental enrichment on voluntary ethanol consumption and stress ulcer formation in rats. *Alcohol*, 3: 299-302.
- Rockman, G. E., Hall, A. M., Markert, L.E., & Glavin, G. B. (1988). Influence of rearing conditions on voluntary ethanol intake and response to stress in rats. *Behavioral and Neural Biology*, 49: 184-191.
- Rockman, G. E., Gibson, J. E., & Benarroch, A. (1989). Effects of environmental enrichment on voluntary ethanol intake in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 34: 487-490.

- Rockman, G. E., & Gibson, J. E. (1992). Effects of duration and timing of environmental enrichment on voluntary ethanol intake in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 41: 689-693.
- Rodríguez-Ortega, E., & Cubero, I. (2018). Environmental enrichment modulates drug addiction and binge-like consumption of highly rewarding substances: a role for anxiety and compulsivity brain systems? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12: 295.
- Rojas-Carvajal, M., Sequeira-Cordero, A., & Brenes, J. C. (2021). The environmental enrichment model revisited: a translatable paradigm to study the stress of our modern lifestyle. *European Journal of Neuroscience*, in press.
- Roman, E., & Colombo, G. (2009). Lower risk taking and exploratory behavior in alcohol-preferring sP rats than in alcohol non-preferring sNP rats in the multivariate concentric square field™ (MCSF) test. *Behavioral Brain Research*, 205: 249-258.
- Roman, E., Stewart, R. B., Bertholomey, M. L., Jensen, M. L., Colombo, G., Hyytiä, P., Badia-Elder, N. E., Grahame, N. J., Li, T. K., & Lumeng, L. (2012). Behavioral profiling of multiple pairs of rats selectively bred for high and low alcohol intake using the MCSF test. *Addiction Biology*, 17: 33-46.

- Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2009). Enrich the environment to empower the brain. *Trends in Neurosciences*, 32: 233-239.
- Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2014). Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiological Reviews*, 94: 189-234.
- Sale, A. (2018). A systematic look at environmental modulation and its impact in brain development. *Trends in Neurosciences*, 41: 4-17.
- Schuckit, M. A. (2006). Comorbidity between substance use disorders and psychiatric conditions. *Addiction*, 101 Suppl 1: 76-88.
- Schuckit, M. A. (2014). A brief history of research on the genetics of alcohol and other drug use disorders. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs Supplement*, 75 Suppl 17: 59-67.
- Scott, H., Tjernström, N., & Roman, E. (2020). Effects of pair housing on voluntary alcohol intake in male and female Wistar rats. *Alcohol*, 86: 121-128.
- Segovia, G., del Arco, A., & Mora, F. (2009). Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *Journal of Neural Transmission*, 116: 1007-1016.
- Slater, A. M., & Cao, L. (2015). A protocol for housing mice in an enriched environment. *Journal of Visualized Experiment*, 100, e52874.

- Smith, J. K., Neill, J. C., & Costall, B. (1997). Post-weaning housing conditions influence the behavioural effects of cocaine and *d*-amphetamine. *Psychopharmacology*, 131: 23-33.
- Solinas, M., Thiriet, N., Chauvet, C., & Jaber, M. (2010). Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Progress in Neurobiology*, 92: 572-592.
- Solinas, M., Chauvet, C., Lafay-Chebassier, C., Jaafari, N., & Thiriet, N. (2021). Environmental enrichment-inspired pharmacological tools for the treatment of addiction. *Current Opinion in Pharmacology*, 56: 22-28.
- Somkuwar, S. S., Fannon-Pavlich, M. J., Ghofranian, A., Quigley, J. A., Dutta, R. R., Galinato, M. H., & Mandyam, C. D. (2016). Wheel running reduces ethanol seeking by increasing neuronal activation and reducing oligodendroglial/neuroinflammatory factors in the medial prefrontal cortex. *Brain, Behavior, and Immunity*, 58: 357-368.
- Stairs, D. J., & Bardo, M. T. (2009). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92: 377-382.
- Stuber, G. D., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2005). Extinction of cocaine self administration reveals functionally and temporally distinct dopaminergic signals in the nucleus accumbens. *Neuron*, 46: 661–669.

Sztainberg, Y., & Chen, A. (2010). An environmental enrichment model for mice.

Nature Protocols, 5: 1535-1539.

Tanda, G., Pontieri, F. E., & Di Chiara, G. (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, 276: 2048-2050.

Tomas, D., Prijanto, A. H., Burrows, E., Hannan, A. J., Horne, M. K., & Aumann, T. D. (2015). Environmental modulations of the number of midbrain dopamine neurons in adult mice. *Journal of Visualized Experiments*, 95: 52329.

van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1: 191-198.

Vickstrom, C. R., Snarrenberg, S. T., Friedman, V., & Liu, Q. (2021). Application of optogenetics and in vivo imaging approaches for elucidating the neurobiology of addiction. *Molecular Psychiatry*, (Online ahead of print).

Wei, C., Han, X., Weng, D., Feng, Q., Qi, X., Li, J., & Luo, M. (2018). Response dynamics of midbrain dopamine neurons and serotonin neurons to heroin, nicotine, cocaine, and MDMA. *Cell Discovery*, 4, 60.

- West, A. R., & Grace, A. A. (2004). The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity states and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *Journal of Neuroscience*, 24 (8): 1924-1935.
- Will, B., Galani R., Kelche, C., & Rosenzweig, M. R. (2004). Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Progress in Neurobiology*, 72: 167-182.
- Wilson, D. I., & Bowman, E. M. (2006). Neurons in dopamine-rich areas of the rat medial midbrain predominantly encode the outcome related rather than behavioral switching properties of conditioned stimuli. *European Journal of Neuroscience*, 23: 205–218.
- Wolffgramm, J. (1990). Free choice ethanol intake of laboratory rats under different social conditions. *Psychopharmacology*, 101: 233-239.

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto la Dott.ssa Anna Lisa Muntoni, per avermi accolto come sua tirocinante, per avermi permesso di vivere questa significativa esperienza di tirocinio e per aver reso possibile, grazie al suo aiuto e ai suoi consigli, la realizzazione di questa tesi.

Ringrazio il Dott. Giancarlo Colombo, con il quale ho avuto il piacere di lavorare per la realizzazione di una sperimentazione. Lo ringrazio per la gentilezza, la disponibilità e per il prezioso contributo apportato alla stesura di questa tesi.

Ringrazio la Dott.ssa Paola Maccioni, per tutto ciò che mi ha insegnato, per il sostegno, i consigli e i numerosi spunti di riflessione.

Ringrazio Michele Santoni per avermi dedicato tempo e pazienza nel mio processo di apprendimento.

Ringrazio anche tutto il personale del CNR dell'Istituto di Neuroscienze di Cagliari perché in ognuno ho trovato disponibilità e cortesia.

Un ringraziamento speciale alla mia famiglia per avermi supportato costantemente durante tutto il percorso, che mi ha portato qui, oggi, 28 ottobre 2021.

Ringrazio Stefano, al mio fianco per sostenermi e incoraggiarmi in ogni momento.

Ed infine ringrazio me stessa, per essere cresciuta, anche attraverso le difficoltà incontrate, per aver fatto tesoro dei molteplici insegnamenti e soprattutto per essermi impegnata in ogni momento al meglio delle mie possibilità.