



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

Presidente del corso Prof. Paolo Castiglia

**Sviluppo e caratterizzazione di un biosensore
per il monitoraggio intracerebrale di etanolo
durante esperimenti di assunzione volontaria**

Relatore

Prof. Pier Andrea Serra

Correlatore

Dott.ssa Gaia Rocchitta

Tesi di Laurea di

Alberto Cossu

Anno Accademico 2016/2017

Sommario

| | |
|---|----|
| Introduzione | 2 |
| Dipendenza | 2 |
| Tossicologia dell'etanolo | 7 |
| Assorbimento | 7 |
| Distribuzione..... | 7 |
| Metabolismo | 8 |
| Effetti sistemici | 9 |
| Effetti nel Sistema Nervoso Centrale..... | 10 |
| Detection dell'etanolo | 13 |
| Biosensore..... | 15 |
| Modelli animali di dipendenza | 18 |
| Scopo della ricerca | 22 |
| Materiali e metodi | 23 |
| Costruzione e caratterizzazione dei biosensori..... | 23 |
| Costruzione Sensori..... | 23 |
| Sistema telemetrico | 25 |
| Chirurgia e impianto..... | 26 |
| Risultati | 28 |
| Caratterizzazione in vitro dei biosensori | 28 |
| Risposta all'etanolo..... | 28 |
| Interferenza dell'acido ascorbico..... | 29 |
| Monitoraggio dell'etanolo intracerebrale | 30 |
| Discussione | 32 |
| Riassunto | 34 |
| Bibliografia e Sitografia | 36 |

Introduzione

Dipendenza

La dipendenza da sostanze è un disordine psichiatrico caratterizzato da comportamenti disadattativi tali da inficiare il funzionamento sociale dell'individuo, tra questi si contano: l'utilizzo della sostanza anche quando sia fisicamente pericoloso (es. guidare sotto l'influenza di sostanze), anteporre l'assunzione o il reperimento della sostanza a responsabilità di vita maggiori (es. lavoro o famiglia) e il continuo uso anche quando da questo siano sorti problemi di natura sociale e relazionale. Questo quadro è definito dal termine inglese *addiction*. (Sadock et al., 2014)

Accanto a queste conseguenze comportamentali, nei pazienti affetti, si presenta il quadro di dipendenza fisica caratterizzato da tolleranza e sindromi d'astinenza. La dipendenza fisica è indicata dal termine inglese *dependence* ed è comune a molte sostanze psicoattive che non sono caratterizzate da disordini da abuso. La tolleranza è una forma di adattamento neurobiologico per il quale è necessaria una quantità maggiore di sostanza per evocare un effetto costante. Essa può essere legata a fattori metabolici (tolleranza farmacocinetica) e all'ipoespressione di recettori per la sostanza (tolleranza farmacodinamica). Quando cessa l'assunzione della sostanza si presentano i sintomi dell'astinenza. Le sindromi d'astinenza sono caratterizzate da sintomi peculiari della sostanza che le ha causate. (Katzung et al., 2012)

Nel mondo le persone tra i 15 e i 64 anni che hanno usato una sostanza illecita almeno una volta sono tra i 175 e i 250 milioni di individui (World drug report, OMS, 2009). All'interno di questo numero sono comprese sia persone che usano sostanze saltuariamente sia persone che ne sono dipendenti, stimate tra i 18 e i 38 milioni (di cui 15 milioni di utilizzatori intravenosi). Non sono tuttavia compresi gli individui che assumono sostanze contenenti alcolici, in quanto non compresa tra le sostanze illecite. I consumatori di alcol nel mondo sono il 38.3% della popolazione e consumano circa 17 litri di alcol puro all'anno (Global status report

on alcohol and health, OMS, 2014), con grandi differenze per area geografica, con un quarto di questi individui (25.7%) residenti in Europa. Le morti alcol correlate nel mondo sono all'anno 3.3 milioni, il 5.9% di tutte le morti (Epicentro, Istituto Superiore di Sanità, 2017). In Italia le persone di 11 anni o più che hanno consumato alcol almeno una volta sono circa 35 milioni o il 63% della popolazione. Tra questi si riconoscono consumatori a rischio, ossia che non si attengono alle direttive del Ministero della Salute per un consumo responsabile di bevande alcoliche. I consumatori a rischio sono in media 15.2% (22.7% degli uomini e l'8.2% delle donne). Inoltre il 6.2% della popolazione, il 10.6% in Sardegna, dichiara almeno un episodio di binge drinking, ossia consumare almeno 6 UA (Unità Alcoliche o 12 grammi di alcol puro) standard in un'unica occasione. (Epidemiologia e monitoraggio alcol-correlato in Italia e nelle Regioni, Osservatorio Nazionale Alcol, 2014)

Le dimensioni del fenomeno non sono, tuttavia, una sorpresa. Il genere umano, infatti, incorpora l'assunzione di sostanze attive sul sistema nervoso centrale nelle proprie cultura da millenni. Sostanze psicoattive sono utilizzate fin dalle società pre-agricole, principalmente sostanze allucinogene quali N,N-dimetiltriptamina (DMT), psilocina (peyote) e mescalina, con fini primariamente rituali o medicamentosi. La natura allucinogena di queste sostanze ne ha però impedito l'uso frequente. Si pensa che l'assunzione di alcol si sia evoluta nei primati a partire da frutti fermentati (Dudley, 2002), ma, a causa della complessità del processo di sintesi, non sia avvenuta su vasta scala fino all'invenzione dell'agricoltura. L'invenzione dell'agricoltura, l'addomesticamento delle piante dalle quali sono estratte queste droghe (tabacco, caffè, etc.) e la maggiore produzione (Wadley, 2016) permise il passaggio dall'uso di sostanze attive sulla percezione a quello di sostanze attive sull'umore.

La costante presenza e la parallela evoluzione dell'uomo e delle sostanze psicoattive è legato all'azione delle une sul comportamento dell'altro. Questo è dovuto all'attività di una struttura encefalica mediante la sensazione di ricompensa: il fascicolo prosencefalico mediale. Il ruolo evolutivistico di questa unità funzionale è inestimabile. La sua attività sembra fisiologicamente modulata dall'aspettativa di un risultato. Essa è maggiormente attivata da stimoli piacevoli

inaspettati e, successivamente, si attiva quando il soggetto si aspetta lo stimolo piacevole, inibendosi sotto la sua attività basale se l'aspettativa non è incontrata. Questa è la teoria della ricompensa inaspettata (*unexpected reward*). L'attivazione di questa via avviene inoltre quando uno stimolo negativo viene rimosso, come la cessazione di uno stimolo doloroso, o quando un bisogno è soddisfatto, come la fame o la sete (Lammel et al., 2014).

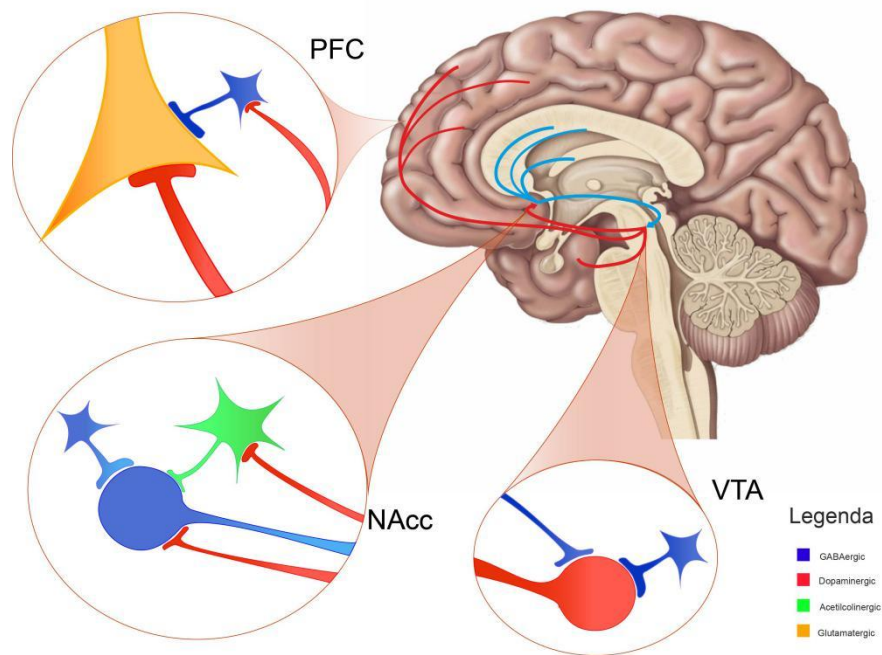


Fig.1 Rappresentazione del fascicolo prosencefalico mediale e delle popolazioni neuronali con le relazioni anatomico-fisiologiche

Anatomicamente il fascicolo prosencefalico mediale è costituito dagli assoni di una popolazione neuronale sintetizzante dopamina (DA) situata nell'area ventrale del tegmento (VTA). La DA è un neurotrasmettitore appartenente alla famiglia delle catecolamine. Quando è rilasciata tramite vescicole nel cleft sinaptico, si lega a due classi di recettori: i recettori D1-like e i recettori D2-like. I D1-like (D1, D5) sono recettori accoppiati a proteine G_p e G_q . Il legame della DA a questi recettori causa l'attivazione della PKA determinando una depolarizzazione. I recettori D2-like (D2, D3, D4) sono recettori accoppiati a proteine $G_{i/o}$ e causano una diminuzione dell'attività della PKA. Questi recettori possono essere espressi sul bottone post-sinaptico o sul terminale pre-sinaptico (normalmente si tratta di recettori D2 autolimitanti il *release*). Una volta estrinsecata la sua azione la DA viene liberata dal legame con il recettore e riassorbita all'interno degli astrociti,

oppure viene captata dal terminale presinaptico attraverso un trasportatore per la DA (DAT), o ancora da un trasportatore plasmatico delle monoamine (Torres et al., 2003). All'interno delle cellule la DA può essere metabolizzata attraverso l'enzima monoamino ossidasi (MAO) o ripompata attivamente all'interno delle vescicole presinaptiche attraverso il trasportatore VMAT2 (Eiden et al., 2004).

La popolazione neuronale della VTA non è, tuttavia, esclusivamente dopaminergica. Solo il 60% dei neuroni esprime infatti l'enzima tirosina idrossilasi (TH) all'immunoistochimica, mentre i restanti neuroni del nucleo sintetizzano acido γ -aminobutirrico (GABA) e/o presentano un trasportatore vescicolare del glutammato, il VGluT2. (Oliva et al., 2016). I neuroni dopaminergici del VTA sono riconosciuti per le loro peculiari attività elettriche: il potenziale trifasico; un pattern di scarica ciclico, auto-indotto (pacemaker), a bassa frequenza, regolato da un flusso di cationi in entrata denominata I_h (Neuhoff et al., 2002). Le efferenze principali dei neuroni dopaminergici del VTA si dirigono verso il Nucleo Accumbens (NAcc) e la corteccia prefrontale mediale. Il NAcc è una formazione grigia facente parte dei gangli della base che si trova nella formazione dello striato ventrale. È divisa in due parti: un'area più ventrale detta core, e un'area più dorsale detta shell, funzionalmente riconosciuta parte dell'*extended amygdala*. Il NAcc è formato per il 95% da neuroni spinosi sintetizzanti GABA (MSNs), e per il 2-3% da una popolazione di interneuroni colinergici. Inoltre circa l'1-2% dei neuroni del NAcc sono interneuroni GABAergici ad alta frequenza (FSIs). (Burkhardt et al., 2014) Tra i MSNs sono individuabili due sottopopolazioni: una esprime il recettore D1 per la DA e l'altra esprime il recettore D2. Il NAcc è fortemente connesso reciprocamente a numerose aree corticali, tra le quali anche la corteccia prefrontale, e alle altre formazioni striatali, tra cui lo striato dorsale. Esso proietta principalmente al Pallido Ventrale (VP) (che proietta a sua volta al talamo mediale e alla pars reticulata della substantia nigra) e al VTA tramite neuroni GABAergici (Kandel et al., 2014).

Le proiezioni dopaminergiche del fascicolo prosencefalico mediale, che dal VTA raggiungono la corteccia prefrontale, giocano un ruolo chiave nell'esecuzione di numerosi task cognitivi. In particolare la porzione mediale della corteccia

prefrontale è divisibile in una porzione dorsale e una porzione ventrale. La porzione dorsale, o giro cingolato anteriore, gioca un ruolo primario nelle decisioni guidate da stimoli emozionali. Più ventralmente la corteccia infralimbica proietta al NAcc e ne modula l'attività inibendo gli input di drug-seeking (Peters et al., 2008). La diversa espressione delle due classi di recettori dopaminergici a livello dei neuroni corticali glutammatergici causa diversi quadri di sincronizzazione che risultano in differenti pattern comportamentali. Uno stato, mediato da recettori D1-like, causa una sincronizzazione ampia determinando la concentrazione dello sforzo cognitivo su un unico bersaglio, raggiungendo l'obiettivo più efficientemente. Questo è causato da aumenti repentini e ingenti di DA (Kroener et al., 2009). Un altro stato, mediato da recettori D2-like, è imposto da livelli tonici di DA e permette di mantenere uno stato di concentrazione più duttile e flessibile, permettendo di riconoscere elementi su cui concentrarsi (Durstewitz et al., 2000). I recettori D2 sono espressi maggiormente su una classe di interneuroni GABAergici con un pattern caratterizzato da potenziali brevi e ad alta frequenza (Fast-Spiking InterNeurons-FSIN), legati all'attività di un canale per il potassio: Kv3.1/3.2 (Harvey et al., 2012). L'attività dei FSIN sembra giocare un ruolo chiave nel reclutamento e nella sincronizzazione di ampie aree della corteccia prefrontale e la stimolazione di FSIN da parte di recettori D4 è determinante in questo meccanismo (Curley et al., 2012; Trantham-Davidson et al., 2014).

La dipendenza da sostanze è un disordine cronico ad alta percentuale di ricadute. Queste sembrano essere mediate da stati di stress o da esposizione a stimoli che evocano ricordi dell'utilizzo della sostanza, come vedere la strumentazione necessaria. Questo suggerisce un ruolo adattativo e di apprendimento dei comportamenti dipendenti associato ad uno shift d'attività dallo striato ventrale e dal NAcc allo striato dorsale (Adermark et al., 2014).

Tossicologia dell'etanolo

Assorbimento

L'etanolo è una piccola molecola idrosolubile appartenente alla classe degli alcoli. La sua assunzione avviene, usualmente, per via orale anche se non esclusivamente. Una volta assunta, il suo assorbimento avviene in differenti quantità a livello gastrico e a livello del piccolo intestino.

L'assorbimento dell'etanolo è dipendente da vari fattori, primariamente la concentrazione di etanolo della bevanda. Bevande con concentrazioni medie (15-20%) sono assorbite più velocemente, mentre bevande più concentrate, come liquori (40%), rallentano lo svuotamento gastrico e, di conseguenza, l'assorbimento.

Lo stato di riempimento gastrico influenza in modo preponderante la farmacocinetica dell'etanolo. Le concentrazioni ematiche sono diminuite anche di tre quarti quando l'assunzione avviene a stomaco pieno rispetto che a stomaco vuoto. La natura del contenuto è un fattore importante, in quanto i carboidrati sono i più efficienti nel rallentare l'assorbimento.

Distribuzione

La distribuzione dell'etanolo avviene attraverso il circolo ematico. L'etanolo raggiunge il circolo sistemico attraverso la vena porta e i sinusoidi epatici, gettandosi nella vena cava inferiore. Durante questo passaggio parte dell'etanolo è metabolizzato dal tessuto epatico.

Essendo idrosolubile, l'etanolo si distribuisce in modo efficiente nei liquidi corporei, raggiungendo concentrazioni comparabili e quasi costanti in tutti i tessuti. Il volume di distribuzione è 0.5-0.7 L/Kg. Il picco di concentrazione ematica è raggiunto dopo 30-60 minuti dall'assunzione. Gli organi che ricevono maggiori percentuali di gittata cardiaca (come cervello, polmoni e tessuto muscolare) presentano maggiori concentrazioni.

L'etanolo non è distribuito in modo efficiente nel grasso corporeo. Questo, unitamente al minore volume ematico, causa maggiori concentrazioni, ematiche e tissutali, nelle donne rispetto agli uomini. Altri fattori che influenzano la distribuzione sono: il peso, la quantità di grasso corporeo, fase del ciclo mestruale, frequenza di assunzione e farmaci.

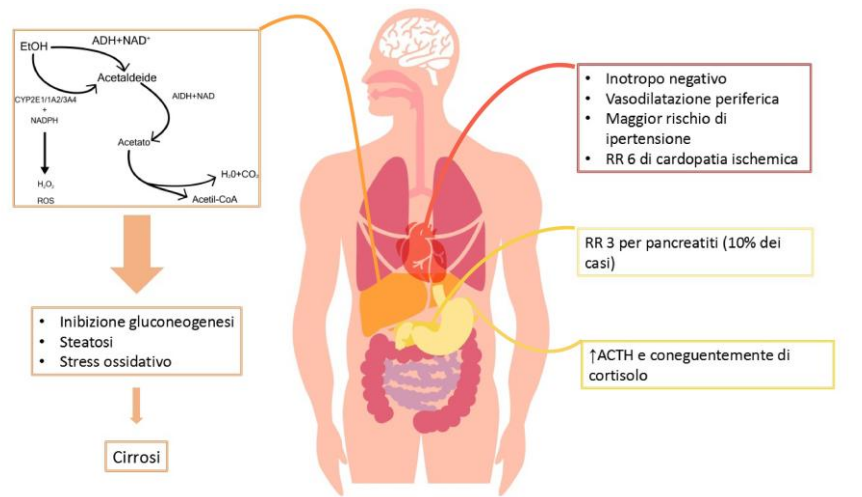


Fig.2 Pathway metabolico dell'etanolo nel fegato ed effetti sistemici dell'assunzione continuativa di più di 4 bicchieri al giorno

Metabolismo

Il 90% dell'etanolo ematico viene metabolizzato dal fegato, la quota restante è invece escreta inalterata dai polmoni e dai reni. Il metabolismo epatico è espletato attraverso due vie enzimatiche il cui risultato comune è l'acetaldeide, il prodotto dell'ossidazione dell'etanolo.

La via metabolica principale è quella dell'Alcol deidrogenasi (ADH) che catalizza l'ossidazione dell'etanolo attraverso lo scambio di uno ione idrogeno (H^+) tra la molecola di alcol e il cofattore Nicotinamide-adenina dinucleotide (NAD^+) e la formazione di NADH, un fattore riducente. Essendo l'alcol deidrogenasi un enzima citosolico, i prodotti della reazione ossidativa si accumulano nel citosol e l'aumento intracellulare di NADH, e più in generale l'aumento di fattori riducenti, sembra essere legato a multipli processi patologici tipici dell'alcolismo cronico.

La via enzimatica secondaria per l'ossidazione dell'etanolo è quella del citocromo P450 (nelle isoforme CYP2E1, 1A2 e 3A4). Questo enzima catalizza l'ossidazione dell'etanolo ad acetaldeide utilizzando NADPH come cofattore e causando la formazione di numerose specie reattive dell'ossigeno (ROS) come il

perossido di idrogeno (H₂O₂). Il sistema del citocromo P450 può essere indotto dall'uso cronico di etanolo, aumentando la velocità di metabolismo dello stesso e, conseguentemente, la concentrazione di ROS intracellulari, anch'esse tossiche. L'induzione del sistema delle ossidasi a funzione mista si ripercuote anche sul metabolismo di altri farmaci metabolizzati attraverso questa via, causandone una più veloce eliminazione.

Come detto precedentemente il principale prodotto del metabolismo dell'etanolo è l'acetaldeide. La via enzimatica attraverso la quale essa è metabolizzata è quella dell'Aldeide deidrogenasi (ALDH), che catalizza l'ossidazione dell'aldeide ad acetato utilizzando come cofattore NAD. L'acetato è a sua volta metabolizzato a CO₂ e H₂O o usato per sintetizzare acetil-CoA.

L'equilibrio tra la formazione di acetaldeide e il suo metabolismo è dato dalle diverse cinetiche dell'ADH e ALDH che sono a loro volta influenzate dalla grande variabilità dei geni sintetizzanti questi enzimi. Una maggiore formazione di acetaldeide o un rallentato catabolismo inducono un aumento delle concentrazioni in circolo, responsabili degli effetti tossici della sostanza, quali nausea, vomito, vampate al volto, vertigini e tachicardia. Queste variabili genetiche sono associate, in modo incostante, a diminuito rischio di abuso di alcol, tale effetto è replicato da inibitori dell'ALDH quali il Disulfiram e causato da altri farmaci quali: metronidazolo, ceftan, trimetoprim.

Effetti sistemici

Gli effetti acuti dell'assunzione dell'etanolo a livello sistemico sono molteplici, esso aumenta la liberazione ipofisaria di ormone adenocorticotropo (ACTH) e successivamente di cortisolo. Inibisce la gluconeogenesi epatica e l'assunzione cronica causa steatosi. L'aumentato carico metabolico epatico, in concerto con la steatosi, causa la formazione di cicatrici fibrotiche che evolvono in cirrosi franca. L'assunzione cronica aumenta inoltre di 3 volte il rischio di pancreatiti, dando conto del 10% dei casi. A livello cardiovascolare l'assunzione acuta di etanolo ha un effetto inotropo negativo e un'attività vasodilatatoria periferica, per questo un'assunzione saltuaria di etanolo è consigliata. La prolungata assunzione di almeno 4 bicchieri al giorno ha invece un effetto francamente negativo, causando

un aumento del rischio di ipertensione arteriosa e un rischio relativo pari a 6 per cardiopatia ischemica acuta. (Kasper et al., 2015)

Effetti nel Sistema Nervoso Centrale

Gli effetti comportamentali acuti a basse concentrazioni sono eccitamento e riduzione dell'ansia. Man mano che le concentrazioni aumentano, esso causa sedazione, difficoltà nell'eloquio, atassia e compromissione del giudizio; fino a giungere allo stato stuporoso e al coma. L'etanolo ha inoltre effetti acuti sul sonno, l'assunzione di alcol nelle ore serali può infatti facilitare l'addormentamento pur tuttavia in questi soggetti è riscontrata una ridotta durata della fase REM (Rapid Eye Movement) e della fase 4 del sonno profondo (Sadock et al., 2012). Gli effetti cronici si manifestano a livello clinico con la sindrome da astinenza, che si estrinseca nelle prime 12-48 ore dopo l'ultima assunzione. Essa è caratterizzata da: iperattività autonoma (sudorazione profusa e tachicardia), tremore delle estremità, insonnia, nausea e vomito, agitazione psicomotoria, ansia, allucinazioni uditive e visive e, nel 3% dei casi, crisi epilettiche tonico-cloniche generalizzate. È importante escludere che questi sintomi siano ascrivibili ad altre patologie di natura psichiatrica poiché è frequente la comorbidità tra dipendenza da alcol e disturbi d'ansia. La terapia acuta è la somministrazione di benzodiazepine con cui l'etanolo manifesta cross-tolleranza. (American Psychiatric Association, 2013).

Questi effetti acuti dell'etanolo sul sistema nervoso centrale (SNC) sono didatticamente riconosciuti conseguenza degli effetti dell'etanolo sulla trasmissione mediata dal glutammato e dall'acido γ -amminobutirrico (GABA), attraverso l'inibizione dei recettori dell'N-Metil-D-Aspartato (NMDA) per il glutammato e l'attivazione dei recettori GABA_A per il GABA. A differenza di altre sostanze d'abuso, tuttavia, per l'etanolo non sono state riconosciuti recettori specifici e determinati siti di legame, ma sono riconosciute alcune modifiche alla fisiologia di alcuni sistemi cardine. Gli effetti dell'etanolo sul sistema dopaminergico mesolimbico sono duplici: esso aumenta la frequenza del pacemaker nelle aree bersaglio aumentando la corrente I_h (Okamoto et al., 2006) e amplifica questo effetto inibendo l'attività GABAergica sui neuroni secernenti

DA con il suo effetto agonista sui recettori GABA_A. Questo effetto sembra essere mediato direttamente e indirettamente da suoi metaboliti attivi, prima tra tutti l'acetaldeide. Questo composto è da solo in grado di attivare il meccanismo della ricompensa (Karahanian et al., 2015) e di reagire per condensazione con la DA per formare salsolinolo (Myers, 1985). Quest'ultimo agisce come μ -agonista iperpolarizzando i neuroni GABAergici dell'AVT (Xie et al., 2012) rimuovendone l'inibizione sui neuroni dopaminergici. L'EtOH ha tuttavia un effetto paradossale di potenziamento dell'attività GABAergica con il suo effetto attivante sui canali ionotropici GABA_A (Xiao et al., 2008).

Gli effetti cronici dell'EtOH sembrano essere paradossalmente mediati da una diminuzione del *release* di DA. Ciò sembra essere dovuto a una diminuzione della corrente I_h risultante dall'astinenza (Diana et al., 1993). Inoltre la sensibilizzazione degli auto-recettori D2 per la DA diminuisce il *release* e aumenta il *reuptake* nel NAcc (Karkhanis et al. 2015). Questo suggerisce un effetto cronico che potrebbe dar conto degli effetti cognitivi cronici dell'EtOH nei pazienti in astinenza, siano essi emotivo-comportamentali (anedonia, aggressività) siano essi cognitivi (aumento del metabolismo nella PFC durante compiti di media complessità).

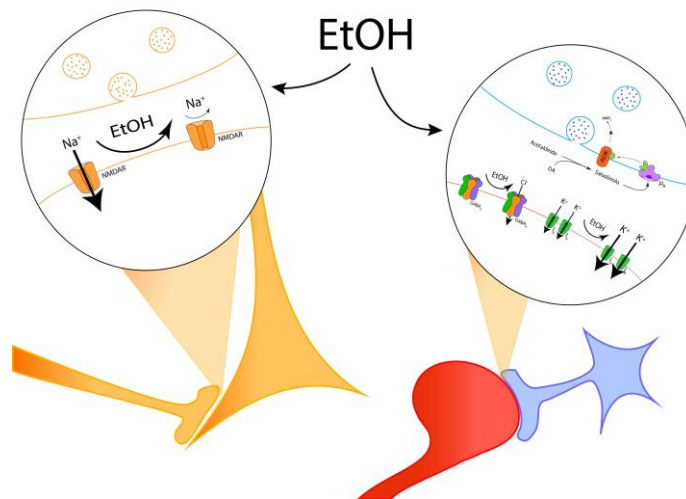


Fig.3 Effetti recettoriali dell'etanolo sui sistemi GABAergici e glutamatergici del Sistema Nervoso Centrale

L'etanolo ha inoltre effetto acuto e cronico sui sistemi glutamatergici. Il glutammato (Glu) è il neurotrasmettitore maggiormente rappresentato nell'encefalo dei vertebrati. Esso è utilizzato principalmente come

neurotrasmettitore eccitatorio da parte dei neuroni della corteccia e delle formazioni grigie sottocorticali. I suoi recettori sono divisi in due grandi classi: recettori ionotropici per il glutammato (iGluR), canali medianti correnti di ioni attraverso la membrana cellulare dipendenti dal glutammato; e recettori metabotropici per il glutammato (mGluR), recettori accoppiati a proteine G. I recettori ionotropici sono rappresentati da tre classi: recettori attivati dall'acido N-metil-D-aspartico (NMDAR), i recettori sensibili all'acido α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazopropionico (AMPA) e i recettori per il kainato (Ozawa et al. 1998). Essi sono permeabili a una serie di cationi (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) il cui flusso attraverso i questi canali determina un cambiamento del potenziale di membrana. Gli AMPAR mediano la veloce depolarizzazione di membrana, mentre gli NMDAR presentano un sito intracellulare di legame per il Mg^{2+} che ne inibisce l'attivazione. Il Mg^{2+} è scalzato dalla depolarizzazione, permettendo così il flusso di Ca^{2+} attraverso il canale (Moykkynen et al. 2012). Il Ca^{2+} è un importante secondo messaggero che ha effetto su numerose altre vie metaboliche, modulando la forza delle connessioni neuronali.

L'esposizione ad etanolo a dosi comprese tra 5 mM e 100 mM ha effetti inibitori dose dipendenti sui NMDAR (Ozawa et al., 1998). Gli effetti acuti sono reversibili e riproducibili. Il meccanismo attraverso il quale l'etanolo agisce su questi recettori non è del tutto chiarito, sono stati individuati alcuni domini transmembrana (TM) del NMDAR (TM3 e TM4) la cui alterazione della sequenza aminoacidica con mutazioni puntiformi modifica gli effetti dell'etanolo, amplificandoli o riducendoli (Smothers et al. 2006). È inoltre noto che alcoli con catene di carbonio più lunghe dell'etanolo hanno effetti maggiori sui NMDAR con effetti massimi per catene di sei-otto atomi (Peoples et al. 1995). Questi elementi potrebbero suggerire la presenza di una tasca, formata dai domini TM3 e TM4, le cui dimensioni permettono il legame dell'etanolo, che raggiunge i NMDAR da un ambiente lipidico della membrana cellulare (Moykkynen et al. 2012). L'inibizione dei NMDAR da parte dell'etanolo sembra essere mediata da un meccanismo calcio dipendente. Il legame della calmodulina al dominio intracellulare C0 del NMDAR ne causa l'inattivazione. Per il legame a tale dominio la calmodulina compete con una seconda proteina α -actina-2, il risultato

di questa competizione è dipendente dalla concentrazione intracellulare di Ca^{2+} (Ander et al 2000).

L'attività inibente dell'etanolo risente, inoltre, delle modifiche alle concentrazioni extracellulare di Mg^{2+} . L'aumento delle concentrazioni del catione aumenta la sensibilità dei NMDAR all'etanolo (IC_{50} da 107 mM a 47 mM) (Martin et al 1991).

Dal punto di vista clinico l'intossicazione acuta di etanolo si manifesta, quindi, primariamente con i suoi effetti sul sistema nervoso centrale con euforia, comportamenti aggressivi o coscienza alterata anche fino al coma, dipendentemente dalla quantità assunta. Vale quindi la pena citare l'importanza del monitoraggio della funzionalità respiratoria, con riguardo alla possibile depressione, e del compenso emodinamico legato all'effetto inotropo negativo e all'insorgenza di possibili aritmie maligne. L'astinenza invece si presenta tipicamente con tremori alle estremità, ansia, agitazione, insonnia, iperattività del sistema simpatico con sudorazione, palpitazione, iperpnea e aumento della temperatura. I sintomi si presentano dopo 5-10 ore di astinenza, raggiungono l'acme dopo 2-3 giorni e possono protrarsi anche per 4-6 mesi. Il 2% di questi pazienti presenta un eccesso epilettico concomitante ai sintomi dell'astinenza. Questa complicanza è più frequente in quadri complicati da altre patologie di interesse internistico. Le stesse complicanze possono aumentare il rischio di delirium tremens, uno stato in cui i sintomi dell'astinenza precedentemente descritti si sommano ad un calo delle funzioni cognitive e ad uno stato di coscienza allentante. (Kasper et al., 2015).

Detection dell'etanolo

Data l'importanza rivestita dall'etanolo e dalla complessità della sua farmacocinetica e tossicologia, nel corso degli ultimi decenni sono state sviluppate e utilizzate molte tecniche per la misurazione dell'etanolo *in vivo* e *in vitro*. Ciò che differenzia le metodiche di rilevamento sono l'invasività e le intrinseche caratteristiche di risoluzione temporale e quantitativa. La più popolare di queste tecniche è stata la microdialisi *in vivo*. La microdialisi è una metodica

minimamente invasiva il cui razionale è l'imitazione di un capillare sanguigno. La sonda da microdialisi è costituita da una membrana semipermeabile che divide due compartimenti: uno interno alla sonda e uno esterno (lo spazio extracellulare). La membrana permette il passaggio solo a sostanze dal basso peso molecolare secondo il loro gradiente di concentrazione. All'interno della membrana, di forma cilindrica, è inserita una cannula, che divide lo spazio interno in due compartimenti. Attraverso la cannula viene fatto scorrere un liquido che defluisce al di fuori della sonda attraverso l'intercapedine tra cannula e membrana dialitica. Controllando il flusso e la composizione del liquido è possibile estrarre dal liquido extracellulare alcune componenti per studiarne la concentrazione.

Similmente, attraverso la sonda, è possibile somministrare delle sostanze, per studiarne le caratteristiche tossicologiche o di farmacodinamica. Gli estratti microdializzati devono, inoltre, essere ulteriormente caratterizzati attraverso altre metodiche. I limiti intrinseci di questa tecnica sono: la sua invasività, è infatti necessario l'impianto della sonda nella zona desiderata, ma, soprattutto, la sua bassa risoluzione temporale. La diffusione dell'etanolo è infatti dipendente da numerosi fattori, tra cui la via di somministrazione e la dose. All'interno del dializzato finale è presente quindi il cui risultato di questi numerosi processi. Il liquido estratto è analizzato dalla maggior parte degli autori attraverso tecniche di gas-cromatografia o cromatografia liquida ad alta performance (HPLC). (Rocchitta et al., 2013)

Altra tecnica utilizzata per la lettura dell'etanolo *in vivo* specialmente in umani e primati è la spettroscopia in risonanza magnetica (MRS) che sfrutta la proprietà di spin nucleare di alcuni elementi, propriamente la loro frequenza di rivoluzione, sincronizzazione e rilassamento; per rilevarne le variazioni quantitative. Questa tecnica, accoppiata ad una più comune risonanza magnetica nucleare (NMR) per indagini anatomiche, fornisce importanti informazioni anche sui cambiamenti indotti dall'etanolo su altri sistemi del SNC. Per la lettura dell'etanolo con questa tecnica vengono sfruttati i due gruppi metilici e gli idrogeni che li compongono. Nell'ambito dell'*imaging* nucleare è utilizzata una tecnica che attraverso l'utilizzo di un apparecchio PET-Scan rileva molecole di etanolo formate da atomi di isotopi radioattivi del carbonio (C) tra cui ^{14}C , ^{13}C e ^{11}C . Questa tecnica fornisce

inoltre informazioni sui metaboliti dell'etanolo, sulla loro permanenza nell'organismo e la loro escrezione. (Xiang et al., 2011)

Biosensore

Negli ultimi decenni si è avuto un grande sviluppo di tecniche elettrochimiche per la rilevazione in tempo reale di parametri di varia natura in modelli animali. Queste tecniche si caratterizzano per l'alta risoluzione temporale e per l'elevata sensibilità, caratteristiche che le rendono particolarmente adatte per l'utilizzo *in vivo*. Recentemente sono stati sviluppati numerosi disegni di biosensori impiantabili, utili per il monitoraggio di numerose specie neurochimiche.

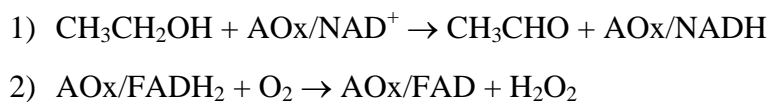
I biosensori sono dispositivi di rilevamento e quantificazione che sfruttano componenti biologiche nel loro funzionamento. Questa componente può variare nella sua complessità da una molecola fino a una cellula. Le varie tipologie di biosensori possono essere classificate in base al trasduttore che li compone in ottici, piezoelettrici, magnetici e elettrochimici. I sensori elettrochimici sfruttano il passaggio di elettroni che avviene tra specie chimiche in reazioni che coinvolgono la componente biologica del sensore. Tra questi riconosciamo i sensori impedenziometrici, quelli potenziometrici e quelli amperometrici. Quest'ultimi trasducono lo scambio di elettroni in una corrente elettrica misurata in Ampere. Più precisamente i sensori amperometrici sono utilizzati nelle tecniche voltammetriche quali la voltammetria ciclica (CV) (e tutte le tecniche ad essa correlate) e nella amperometria a potenziale costante (CPA). In questa metodica viene utilizzata una classica cella elettrochimica a tre elettrodi: un elettrodo di lavoro (WE), un elettrodo di riferimento (REF) e un elettrodo ausiliario (AUX). Nella CPA una differenza di potenziale costante è applicata tra l'elettrodo di lavoro, contenente effettivamente la componente biologica, e l'elettrodo di riferimento, generalmente in argento/cloruro d'argento (Ag/AgCl). Il ruolo dell'elettrodo ausiliario in questo sistema è fornire un flusso di elettroni nella cella che garantisca la costanza della differenza di potenziale che dipende dal flusso di elettroni generato tra i due elettrodi.

Sono state sviluppate diverse generazioni di biosensori amperometrici, la prima, la seconda e la terza che differiscono nella modalità di trasferimento degli elettroni

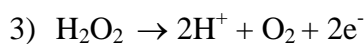
che si generano nelle reazioni di ossido-riduzione che si verificano nella cella elettrochimica. (Rocchitta et al., 2016)

L'utilizzo dei biosensori di prima generazione è basato sullo sfruttamento di reazioni di ossido-riduzione mediate da enzimi e trasdotte attraverso un sistema di lettura del flusso di elettroni generato direttamente sulla superficie del trasduttore. La corrente di elettroni generata risulta quindi proporzionale alla quantità di substrato presente nella soluzione analizzata e viene ottenuta dalla ossidazione diretta di un prodotto secondario che viene prodotto durante la reazione enzimatica, secondo una relazione descritta dalla cinetica enzimatica.

Nel caso dell'etanolo l'enzima più utilizzato è l'alcol ossidasi (AOx) che è capace di ossidare l'etanolo ad acetaldeide con la formazione di un *by-product*, il perossido di idrogeno (H₂O₂), secondo la seguente reazione:



H₂O₂ interagisce con la superficie del trasduttore, in questo caso un filo di platino/iridio (Pt/Ir), a cui è applicato un potenziale costante di +700 mV secondo la seguente reazione:



Il flusso di elettroni generato dalla ossidazione di H₂O₂ determina il parametro studiato che è la corrente espressa in Ampere. Il funzionamento ottimale del biosensore, poiché risulta essere dipendente dall'attività dell'enzima, è funzione del pH e della temperatura alle quali avviene la reazione. La quantità di H₂O₂ prodotto è proporzionale alla quantità di etanolo presente nella soluzione secondo una relazione descritta dalla cinetica enzimatica e a ogni molecola di H₂O₂ corrispondono due elettroni inseriti nel sistema. Ogni biosensore è quindi caratterizzato dalla cinetica dell'enzima che lo forma, descritta dall'equazione di Michealis-Menten:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Dove la velocità di formazione del prodotto è proporzionale alla concentrazione del substrato ($[S]$), alla velocità massima raggiungibile dalla reazione (V_{MAX}) e dalla costante di Michealis-Menten (K_M); definita come la quantità di substrato in grado di garantire il raggiungimento di metà della V_{MAX} . È possibile modulare l'attività dell'enzima tramite l'utilizzo, nella progettazione del sensore, di alcune sostanze che hanno la funzione di *enhancer* della funzione enzimatica, migliorandone l'efficienza. Esempi di queste sostanze sono la polietilenimina (PEI) e il glicerolo (Gly) che agiscono aumentando l'attività enzimatica in modo non ancora del tutto spiegato (Secchi et al, 2013)

Le reazioni descritte avvengono normalmente durante il metabolismo dell'etanolo, con la formazione degli stessi prodotti secondari (*by-product*). In vivo questi prodotti dell'ossidazione, sebbene tossici, sono tamponati da alcuni sistemi antiossidanti. La più importante sostanza con azione antiossidante nel SNC è l'acido ascorbico (AA). Il ruolo dell'AA è proteggere le componenti cellulari dalle ROS e dalle RNS. È, inoltre, implicato nella protezione dal danno eccitotossico da rilascio di alte concentrazioni di glutammato (Glu) nel liquido extracellulare. AA, non essendo sintetizzato dall'organismo, viene introdotto esclusivamente con la dieta e concentrato attivamente all'interno del neurone da una famiglia di trasportatori sodio dipendente (SVCTs) (Castro et al., 2009). L'AA si ossida ad acido diidroascorbico (DHAA) e viene poi captato all'interno dell'astrocita che lo riduce nuovamente ad AA, a discapito di altri antiossidanti quali il glutathione (Serra et al., 2002) permettendo il suo riutilizzo nella forma ridotta. Inoltre AA possiede un potenziale di ossidazione piuttosto basso, il che lo rende, anche in virtù delle sue concentrazioni extracellulari (che raggiungono l'ordine di circa 500 $\mu\text{mol/l}$), la sostanza maggiormente interferente nelle analisi di tipo elettrochimico.

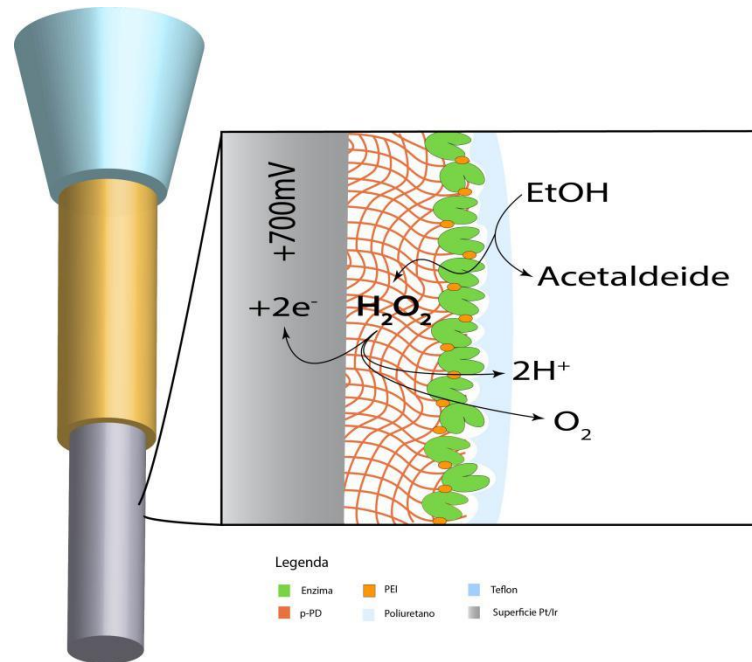


Fig.4 Rappresentazione grafica del biosensore e delle reazioni che avvengono sulla sua superficie

Affinché un biosensore possa essere utilizzato in vivo per la lettura dell'etanolo necessita, quindi, di una schermatura verso l'attività antiossidante dell'AA. Il sistema più usato per garantire questo è la deposizione, tramite polimerizzazione a potenziale costante, di un polimero di spessore nanometrico di poli-fenilendiammina (*p*-PD), a partire dal monomero di orto-fenilendiammina (*o*-PD). L'elettrodeposizione del polimero sulla superficie attiva dell'elettrodo di Pt/Ir impedisce la diffusione delle molecole di AA sulla stessa, determinando l'esclusione dell'interferenza dovuta alle correnti di ossidazione di AA e permettendo la lettura in maniera selettiva di H₂O₂ prodotta dalla reazione enzimatica. (Rocchitta et al., 2012)

Inoltre, l'utilizzo dei biosensori come metodica di rilevamento e quantificazione può essere implementata *in vivo* abbattendo la sua invasività con l'applicazione di sistemi telemetrici che raccolgono e inviano ad un sistema di elaborazione i dati in tempo reale. (Calia et al., 2009)

Modelli animali di dipendenza

La dipendenza è caratterizzata, come si è detto, da uno schema comportamentale complesso e per questo motivo difficile da caratterizzare e anche da riprodurre.

Un modello animale che riproduce totalmente la dipendenza umana da sostanze non è ancora stato individuato. Sono stati, tuttavia, sviluppati una serie di modelli animali e di metodiche sperimentali che permettono la riproduzione di alcune caratteristiche della dipendenza.

Molte specie comunemente utilizzate in campo di ricerca, tuttavia, non consumano spontaneamente alcol. Tra queste, le specie che esibiscono maggiormente comportamenti di consumo spontaneo appartengono all'ordine dei roditori (Richter et al., 1940). Attraverso la selezione artificiale, sono stati preferiti individui predisposti al consumo spontaneo di ingenti quantità di alcol e sono state sviluppate le due linee più usate nella dipendenza da etanolo: i ratti Alcohol-Prefering (P) e i ratti High-Alcohol-Drinking (HAD). Le linee sono state selezionate in base alla preferenza di etanolo, in soluzione acquosa al 10%, quando esso era presentato contemporaneamente ad acqua, eliminando i ratti predisposti al consumo di maggiori quantità di liquidi non necessariamente predisposti al consumo di alcol. Ratti P e HAD, inoltre, consumano un minimo di 5 g/Kg al giorno di etanolo e una preferenza quantitativa di etanolo:acqua pari a 2:1. Un ulteriore criterio utile ma non necessario è la concentrazione alcolica nel sangue (*Blood Alcohol Concentration*, BAC). Essa è ritenuta tossicologicamente rilevante se supera i 50 mg/100 ml, per quanto riguarda lo studio delle dipendenze; mentre i limiti per lo studio del ruolo sociale dell'alcol sono posti tra i 10 e i 50 mg/100ml. (McBride et al., 2013).

Per uniformare i vari modelli animali furono sviluppati dei criteri che ricalcano le principali caratteristiche della dipendenza da alcol. Gli animali devono infatti consumare alcol spontaneamente e la quantità ingerita deve garantire BAC farmacologicamente rilevanti. Inoltre l'etanolo dovrebbe avere un effetto di rinforzo positivo, gli animali devono ricevere una fonte di calorie alternativa e devono sviluppare gli effetti della tolleranza metabolica e farmacologica. In aggiunta gli animali devono presentare sintomi tipici dell'astinenza dalla sostanza. (Lester and Freed, 1973)

I ratti P e HAD sono utilizzati in alcune metodiche sperimentali che cercano di mimare le caratteristiche comportamentali tipiche della dipendenza.

La metodica alla base della ricerca preclinica sulla dipendenza è la metodica del *Free-choice bottle*, nella quale l'animale viene posto in un ambiente in cui ha accesso ad una bottiglia di acqua e una o più bottiglie con soluzioni di etanolo con concentrazioni variabili. È stata tuttavia dimostrata la virtuale inutilità tossicologica delle concentrazioni minori del 5%. Attraverso questa metodica possono essere misurati vari parametri tra, oltre ovviamente alla quantità totale di alcol consumato, la frequenza delle sessioni, la quantità di liquido ingerita ad ogni sorso e il numero di sorsi per sessione.

Altra tecnica è l'utilizzo di una dieta liquida costituita da soluzioni di etanolo al 9% arricchite con altri nutrienti e il cui carico calorico fosse per il 40 % costituito da etanolo. Attraverso questa tecnica i ratti consumano una quantità media di etanolo pari a 9 g/Kg/24 h, definita farmacologicamente sufficiente. Questa dieta permette un consumo di alcol durante la fase oscura del ciclo circadiano che garantisce una BAC di 352 mg/100 mL.

È possibile somministrare etanolo sotto forma di vapore. Questa metodica utilizza sistemi di vaporizzazione commerciali e permette il controllo del tempo di esposizione, la frequenza e la dose di alcol assunta, senza dipendere dalla volontà dell'animale. Questa tecnica viene normalmente utilizzata come condizionante per stabilire una dipendenza farmacologica dalla sostanza prima di esperimenti comportamentali, essendo dimostrato il suo effetto nell'aumentare l'attività finalizzata al consumo. (Gilpin et al, 2009)

La tecnica più diretta per l'investigazione comportamentale della dipendenza è la *Self-administration*. Questa tecnica è stata applicata ad una varietà di sostanze da abuso negli anni '60 tra cui: morfina, cocaina, anfetamine, eroina ed etanolo. Ne sono state sviluppate due varianti, una variante con somministrazione intravenosa e una variante con somministrazione orale. Nell'applicazione di questa tecnica l'animale viene posto in una gabbia di Skinner equipaggiata con delle leve operabili dall'animale. Alla pressione di una leva corrisponde la somministrazione della sostanza. La prima fase sarà quindi il rinforzo positivo mediato dalla sostanza e una seconda fase indaga l'effettiva motivazione all'assunzione. Questo può essere quantificato in base al numero di azioni finalizzate al consumo.

Un'altra tecnica comune per lo studio comportamentale è il *Place conditioning* o *Condition Place Preference* (CPP). In questa metodica l'animale è posto in un sistema con due locali divisi da una porta a ghigliottina. L'animale è lasciato acclimatare nel primo locale, dove viene somministrata una sostanza inerte, ed è poi fatto spostare nel secondo nel quale avviene la somministrazione della sostanza da abuso. In tal modo uno stimolo neutrale viene accoppiato ad uno stimolo incondizionato, la somministrazione della sostanza. Lo stimolo neutrale acquisisce quindi i caratteri di uno stimolo condizionato. Nella fase post-condizionamento l'animale preferirà trascorrere il tempo nel secondo locale, associato con il piacere della sostanza da abuso. (Planeta, 2013)

Scopo della ricerca

Per raggiungere il lontano orizzonte di una terapia farmacologica per la dipendenza da sostanze, lo studio della tossicologia ha un ruolo primario. La tossicologia dell'etanolo è la sfida principale, non solo per la sua complessità, ma, soprattutto, per l'ampio uso che si fa quotidianamente di questa molecola.

Successivamente allo sviluppo di una tecnica di rilevazione in tempo reale di etanolo, raggiunta con l'implementazione di biosensori con AOX, lo scopo che la presente tesi si prefigge è aumentare la sensibilità di questi biosensori per permettere la quantificazione di concentrazioni *in vivo* nell'ordine delle μM . Per fare questo è stata modificata la componente biologica del biosensore comparando ceppi di AOX provenienti da due diversi microrganismi (*Candida Boidinii* e *Pichia Pastoris*) con il precedente disegno di biosensore contenente AOX estratta da *Hansenula Polimorpha*.

Il disordine da abuso di alcol è una patologia caratterizzata da numerosi sintomi di natura comportamentale. Nello sviluppo di modelli animali che riproducessero questa patologia si è cercato, negli anni, di replicare questi comportamenti. L'auto-somministrazione della sostanza è quindi centrale nello studio a tutto tondo, non solo comportamentale, ma anche tossicologico, del disordine da abuso. Lo scopo della presente tesi è, quindi, rilevare in tempo reale l'etanolo intracerebrale, non passivamente somministrato, ma attivamente auto-somministrato dall'animale da esperimento. Questo obiettivo è centrale nell'implementazione *in vivo* del biosensore sviluppato. Per fare ciò gli animali oggetto dell'esperimento sono stati condizionati attraverso cicli di *self-administration* in gabbie di Skinner. Successivamente i biosensori sono stati impiantati bilateralmente nel NAcc ed è stato lasciato, agli animali, libero accesso ad etanolo in soluzione.

Materiali e metodi

Costruzione e caratterizzazione dei biosensori

I biosensori sono stati fabbricati utilizzando filo di Platino/Iridio (Pt/Ir) rivestito in Teflon™ acquistato da Advent Research Materials (90% platino, 10% iridio; $\varnothing_i=125 \mu\text{m}$). Tutte le procedure elettrochimiche in vitro sono state effettuate collegando gli elettrodi della cella elettrochimica ad un potenziostato a quattro canali (eDAQ QuadStat 410, eDAQ, Australia).

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). La soluzione salina a base di fosfati (PBS) è stata preparata sciogliendo NaCl (8.9 g), NaOH (1.76 g) and NaH_2PO_4 (6.89 g) in 1L di acqua bidistillata e tamponata a pH=7.4. Le soluzioni di etanolo (100 mM, 1 M e 10 M) e acido ascorbico (100 mM) sono state ottenute sciogliendo le polveri con acqua bidistillata e HCl 0.01 M, rispettivamente. La soluzione madre di *Candida Boidinii* è stata utilizzata a concentrazione di 200 U/mL, la soluzione di *Pichia Pastori* ad una concentrazione pari a 1020 U/mL, mentre la soluzione di *Hansenula Polimorpha* è stata preparata da uno stock sciolto in PBS per ottenere una soluzione a 200 U/mL.

La soluzione di polietilenimina (PEI) è stata ottenuta diluendo la soluzione madre (50% p/v) con acqua bidistillata.

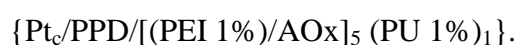
Costruzione Sensori

Per permettere l'impianto e la rimozione dei biosensori senza causare stress agli animali è stato ottimizzato un protocollo pubblicato in Bellesi et al 2016. Questo protocollo prevede l'utilizzo di una cannula fissata a dimora attraverso il tavolo cranico dell'animale e mantenuta pervia da un mandrino in acciaio accoppiato ad un estrattore durante il recupero post-operatorio. Al momento dell'esperimento il mandrino viene rimosso e il biosensore inserito al suo posto. Per fabbricare la cannula è stato usato un puntale da pipetta da 10 μl tagliato a 13 mm dalla punta. Il tappo e lo scheletro del biosensore sono stati fabbricati con puntali da pipetta da

10 µl tagliati alla lunghezza di 9 mm ed accoppiati con un tubicino di Kapton™ dal diametro esterno di 0.3 mm. All'interno dello scheletro del biosensore è stato inserito un filo di platino/iridio di 4 cm di lunghezza. Il filo di platino/iridio è stato saldato ad un filo di rame della lunghezza di 2 cm che servirà alla connessione al sistema telemetrico. L'estremità sporgente del filo di Pt è stata protetta dal suddetto tubicino di Kapton™ lungo 3 mm. L'eccesso di platino è stato tagliato affinché sporgesse di 2 mm dal capillare e il metallo è stato quindi esposto rimuovendo il teflon e liberando 1 mm di superficie cilindrica, che costituisce la superficie attiva del sensore. Il tutto è stato fissato con resina epossidica.

Le superfici attive sono state pulite inizialmente con acetone al fine di eliminare i residui eventualmente depositati sul metallo durante la fase di costruzione e preparate per la polimerizzazione dell'*o*-PD. La deposizione del polimero è stata eseguita tramite elettrosintesi. I sensori sono stati sottoposti ad un potenziale costante di +0.7 V vs Ag/AgCl e immersi in una soluzione satura di *o*-PD a 300 mM per 30 minuti. La soluzione è stata preparata immediatamente prima della polimerizzazione sciogliendo 646 mg di sostanza in 20 mL di PBS a pH 7.4.

La deposizione dell'enzima e dello stabilizzatore enzimatico PEI 1% sulla superficie attiva sono avvenute attraverso 5 immersioni consecutive nelle due soluzioni, intervallati da 5 minuti di asciugatura a temperatura ambiente (23± 2 °C). La permanenza dei vari strati è stata garantita con una singola immersione in una soluzione di poliuretano 1% in tetraidrofurano, lasciato ad asciugare per 30 minuti a temperatura ambiente (23± 2 °C). I sensori sono stati conservati a 4 °C. Il disegno ottimizzato del biosensore è rappresentato secondo lo schema:



Il giorno dopo la fabbricazione (giorno 1) i biosensori sono stati calibrati attraverso amperometria a potenziale costante applicando +0.7 V vs Ag/AgCl. La funzionalità del biosensore è stata testata, una volta raggiunta la stabilità della linea di base, con 8 iniezioni consecutive (0-1 M) di etanolo da soluzioni madre da 0.1 M, 1 M e 10 M, fino al raggiungimento della saturazione delle molecole di enzima presenti sul biosensore. Per indagare il processo di invecchiamento della componente biologica del biosensore, al quinto giorno (giorno 5) è stata effettuata una calibrazione in vitro con le stesse modalità. I parametri estrapolati tramite

analisi statistica sono stati V_{MAX} , K_M e Linear Region Slope (LRS), ovvero il coefficiente angolare della porzione della curva di Michaelis-Menten che risponde in modo lineare alla concentrazione del substrato. LRS quantifica l'efficienza del disegno di biosensore in uso. Questo parametro è misura della relazione univoca tra concentrazione e corrente, caratteristica che non è conservata in condizioni di saturazione dell'enzima.

Al giorno 1 è stata anche valutata la schermatura nei confronti dell'AA, esponendo i biosensori ad un intervallo di concentrazioni di AA tra 0 e 1 mM e andando a valutare i parametri di I_{lim} e ΔI . Mentre I_{lim} rappresenta la corrente attesa alle concentrazioni presenti negli spazi extracellulari, pari a 0.5 mM, e quantifica quindi l'interferenza sul segnale misurato, ΔI misura la differenza tra le correnti misurate a 1 mM e 0.5 mM, quantificando l'efficienza del polimero durante le fluttuazioni, ancorchè fisiologiche, di AA.

Nella presente tesi, sono state indagate le funzionalità di tre diversi ceppi di alcol ossidasi estratte da diversi micro-organismi: *C.Boidinii*, *P.Pastoris* e *H.Polimorpha*. I biosensori contenenti i tre diversi ceppi sono stati quindi costruiti e calibrati secondo il protocollo di disegno e calibrazioni precedentemente illustrato.

Sistema telemetrico

I dati di corrente letti dal biosensore sono stati registrati e inviati ad un personal computer per la registrazione e la rappresentazione grafica (e la successiva elaborazione statistica) attraverso l'utilizzo di un sistema telemetrico formato da tre componenti: un modulo amperometrico, un trasmettitore e un ricevitore. Il modulo amperometrico è formato da tre amplificatori operazionali con funzioni di potenziostato, inseguitore di tensione e convertitore corrente-tensione. Una componente principale del circuito è il diodo di Zener che ha la funzione di fornire un voltaggio costante da 1.22 V, che gioca un ruolo primario nel controllo del voltaggio applicato al WE. L'ingresso non invertente dell'amplificatore operazionale con funzione di potenziostato è stato collegato a massa per permettere al circuito di lavorare in ossidazione.

Il modulo amperometrico è stato assemblato utilizzando un quadruplo amplificatore operazionale MCP6044, due resistenze di feedback, due condensatori di feedback ed un diodo di Zener ZXRE4001. Il convertitore analogico-digitale era parte integrante del micro-controller utilizzato (PIC12F683, Arizona Microchip). Tutte le parti sono state saldate su una singola PCB. Il trasmettitore AM a 433.92 MHz era un RT4-433.93 mentre, come ricevitore è stato scelto un modulo RR3-433.92, entrambi equipaggiati con un'antenna esterna. Il convertitore serial-to-USB era un modulo FTDI-FT232R con un E₂PROM interno e un sintetizzatore di frequenza integrato. Tutte le resistenze erano a film spesso di ossido di metallo (250 mW, tolleranza 0.1% Ohmite, Rolling Meadows, IL, USA). Tutti i condensatori scelti erano di tipo NP0. (Calia et al ,2009)

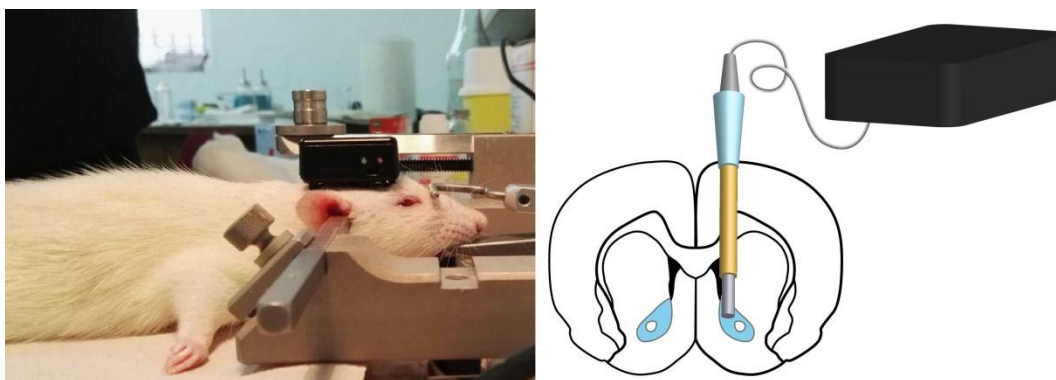


Fig.5 Sx: Ratto posizionato sullo stereotassico con sistema telemetrico in posizione. Dx: Schema dell'impianto del biosensore nel NAcc.

Chirurgia e impianto

Gli animali oggetto dell'esperimento sono stati condizionati al consumo di alcol nei giorni precedenti con sessioni quotidiane di *self-administration* della durata di 30 minuti.

Gli animali, del peso medio di 375 g, sono stati anestetizzati con una soluzione di cloralio idrato al 4% sciolto in soluzione fisiologica sterile; alla dose di 400 mg/kg.

Per tutta la durata della chirurgia gli animali sono stati mantenuti alla temperatura di 37°C con l'ausilio di un tappetino isoteramico. I ratti sono stati posizionati sul tavolo operatorio e tenuti in posizione con due barre auricolari e una dentale. In

sede di chirurgia sono state inserite le cannule secondo le seguenti coordinate dal Bregma: A/P +2; M/L \pm 2; D/V -6.9. Gli elettrodi ausiliari (AUX) e di riferimento (pREF) sono stati impiantati in corteccia parietale ed entrambi sono costituiti da un filo d'argento. Gli animali hanno trascorso il periodo post-operatorio in cilindri di plexiglass di 45 cm di diametro con libero accesso a cibo e acqua.

Il giorno precedente l'esperimento sono stati costruiti e calibrati i biosensori per l'impianto. 12 ore prima dell'esperimento all'animale è stato impedito l'accesso all'acqua.

La mattina dell'esperimento sono stati rimossi i tappi e inseriti i biosensori che, sporgendo sotto la cannula, hanno raggiunto il NAcc alla profondità di 7.9 mm dalla dura madre.

Gli animali sono stati connessi, tramite sistema telemetrico, ed è stato applicato il potenziale di +0.7 V, si è attesa la stabilizzazione della corrente di base nel mezzo extracellulare. Dopo aver ottenuto una linea di base soddisfacente, l'animale è stato reso libero di accedere ad una soluzione al 10% di etanolo.

Risultati

Caratterizzazione in vitro dei biosensori

Risposta all'etanolo

Nella presente tesi sono state indagate le funzionalità di due nuovi ceppi di AOx estratti da due diversi microorganismi: *Candida Boindinii* e *Pichia Pastoris*. Questi enzimi sono stati inseriti in un disegno di biosensore derivato da Rocchitta et al 2012 e i risultati ottenuti dalle calibrazioni sono stati confrontati con le performance dei biosensori presenti nel lavoro precedentemente citato, contenenti AOx derivati da *Hansenula Polimorpha*. Nella Tab.1 sono confrontati i parametri V_{MAX} , K_M e LRS dei tre biosensori.

| Tab.1 | $V_{MAX} \pm SEM$ | $K_M \pm SEM$ | LRS $\pm SEM$ |
|-----------------------------|--------------------|------------------|------------------|
| <i>Candida Boindinii</i> | 112.23 \pm 1.72 | 52.58 \pm 3.27 | 2.64 \pm 0.09 |
| <i>Pichia Pastoris</i> | 337.85 \pm 15.91 | 30.61 \pm 6.98 | 12.36 \pm 0.30 |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | 116.37 \pm 6.07 | 41.26 \pm 5.81 | 1.73 \pm 0.08 |

Tab.1. Rappresentati i valori delle calibrazioni con etanolo e le differenze in termini di performance dei tre ceppi di enzimi indagati.

Il gruppo di biosensori fabbricato con enzimi estratti da *P.Pastoris* (n=4) è stato calibrato al giorno 1 e al giorno 5. Le correnti risultanti dalle calibrazioni sono state comparate con la cinetica di Michaelis-Menten, al giorno 1 i sensori hanno mostrato una V_{MAX} = 337.85 \pm 15.91 nA e K_M = 30.61 \pm 6.98 mM. Al giorno 5, in accordo con l'invecchiamento fisiologico della componente biologica, gli stessi biosensori mostravano una V_{MAX} minore e una K_M maggiore (147.48 \pm 6.96 nA e 166.15 \pm 23.41 mM, rispettivamente).

Al giorno 1 i sensori presentavano un LRS= 12.36 ± 0.30 nA/mM e al giorno 5 un LRS= 1.70 ± 0.03 nA/mM. In questi sensori l'intervallo di linearità era compreso tra 0 e 10 mM di etanolo.

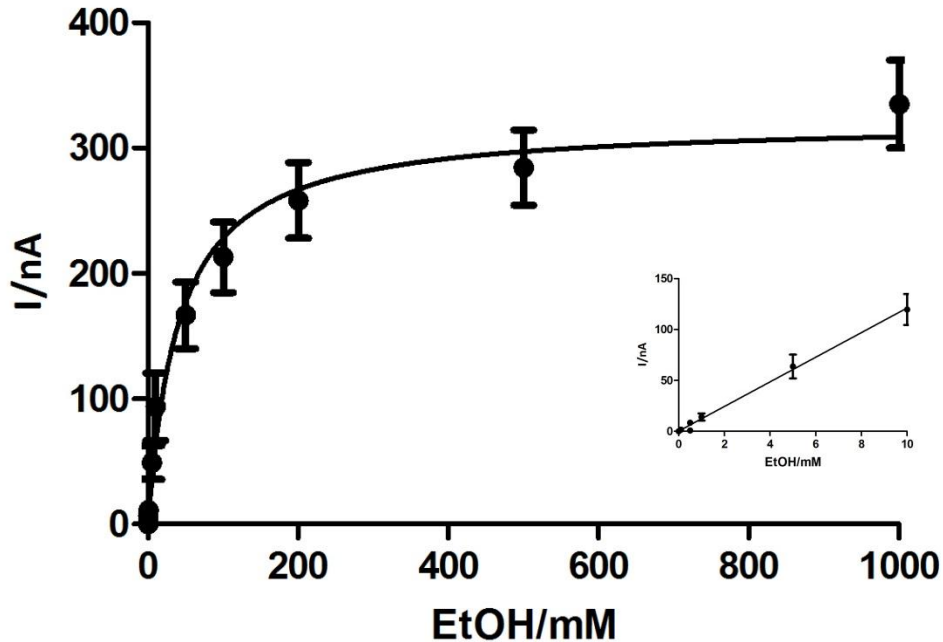


Fig.6 Calibrazione del biosensore con concentrazioni crescenti di etanolo con valori di $V_{MAX}= 337.85 \pm 15.91$ nA e $KM= 30.61 \pm 6.98$ mM. Nel grafico a destra isolamento della zona lineare della curva completa la cui inclinazione rappresenta il LRS pari a 12.36 ± 0.30 nA/mM.

Interferenza dell'acido ascorbico

Le correnti mostrate dalle calibrazioni ottenute esponendo i biosensori con enzimi di *Pichia Pastoris* a concentrazioni di AA comprese tra 0 e 1 mM hanno evidenziato i seguenti parametri ($I_{lim}=0.33 \pm 0.14$ nA; $\Delta I=0.15$ nA). L'andamento della curva di calibrazione è peculiare ed è da imputarsi al fenomeno del *self-blocking* (Craig et al 2003).

I biosensori contenenti alcol ossidasi estratte da *C. Boidinii* e *H.Polimorpha* hanno mostrato I_{lim} pari a 1.04 ± 0.76 nA e 1.10 ± 0.59 nA rispettivamente, mentre i valori di ΔI riscontrati sono stati 0.13 e 0.31.

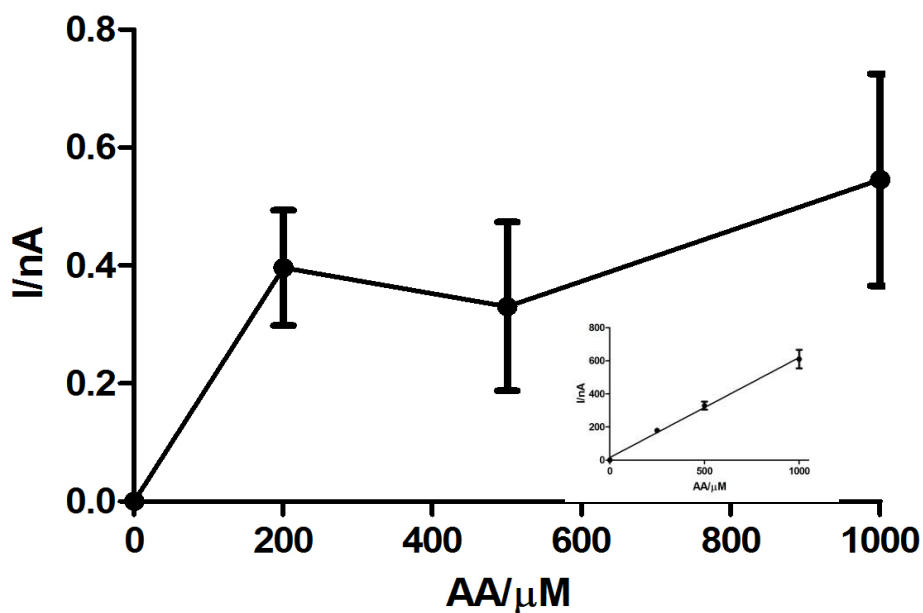


Fig.7 Calibrazione con AA in biosensore schermato con *p*-PD e contenente alcolossidasi estratta da *P.Pastoris* ($I_{lim}=0.33\pm 0.14$ nA; $\Delta I=0.15$ nA). Nel grafico a destra una calibrazione su platino nudo con slope pari a 604.35 ± 23.63 nA/mM.

Monitoraggio dell'etanolo intracerebrale

Per la costruzione dei biosensori destinati all'impianto *in vivo* è stato scelto il ceppo di AOx estratto da *P. Pastoris*. Del gruppo di biosensori costruiti e calibrati ($n=8$) sono stati scelti i 4 più efficienti in base ai parametri precedentemente citati. Dalle calibrazioni effettuate il giorno della costruzione (giorno 0) è stato calcolato il LRS che si è dimostrato essere pari a 11.02 ± 1.43 nA/mM.

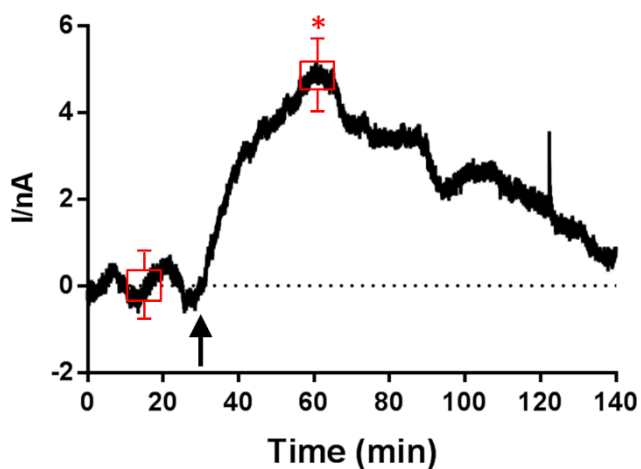


Fig.8 Tracciato medio delle correnti registrate durante l'assunzione volontaria di etanolo. La corrente è evocata dall'etanolo che diffonde nel NAcc. La corrente raggiunge, dopo 30 minuti circa dall'assunzione, un picco di 4.93 ± 0.94 nA

Nella fig.8 è riportato il tracciato medio delle correnti espresse in nA, in funzione del tempo, registrato durante l'esperimento. Dal tracciato si evince che, dopo circa 30 minuti, necessari per la stabilizzazione, si è verificato un aumento della corrente in corrispondenza all'auto-somministrazione di etanolo da parte dell'animale (Freccia). Tale corrente ha raggiunto un picco di 4.93 ± 0.94 nA dopo circa 30 minuti dall'assunzione di etanolo, corrispondenti, in funzione del LRS calcolato dalle calibrazioni pre-impianto, a 0.447 mM di etanolo presenti nel NAcc.

Discussione

La presente tesi si propone di esplorare una nuova tecnica di rilevazione e quantificazione, *in vivo* e in tempo reale, di etanolo. L'etanolo è una piccola molecola della classe degli alcoli capace di indurre un disordine da abuso di sostanze. Esso causa, infatti, un *release* di DA nel fascicolo prosencefalico mediale, attraverso i suoi effetti sui sistemi glutammatergici e GABAergici sia sottocorticali che corticali. Il ruolo della tecnica sviluppata nella presente tesi vuole essere primario nello studio della tossicologia dell'etanolo, studio che è la chiave per lo sviluppo di nuove terapie e strategie preventive.

Per raggiungere quest'obiettivo sono stati ottimizzati i disegni di biosensori precedentemente caratterizzati in altri lavori (Rocchitta et al., 2012) con l'applicazione di nuovi ceppi di AOX derivati da *Candida Boidinii* e *Pichia Pastoris* e il confronto delle performance dei tre biosensori. Come si evince dai risultati della Tab.1 le prestazioni dell'AOX estratto da *P.Pastoris* mostrano una significativa superiorità. La V_{MAX} di questi enzimi è, infatti, circa di tre volte maggiore rispetto alle V_{MAX} degli altri due enzimi. Ciò rispecchia una notevole efficienza dell'enzima nell'ossidazione dell'etanolo, efficienza che si conferma nel LRS. L'AOX estratto da *P.Pastoris* mostra infatti un LRS pari a 12.36 ± 0.30 , ossia circa 7 volte il LRS dell' *H.Polimorpha* e circa 4 volte superiore al LRS della *C.Boidinii*. La superiorità in questo particolare parametro, rende l'AOX estratta da *P.Pastoris* particolarmente adatto alla costruzione di biosensori per l'impianto *in vivo*, in quanto la relazione univoca tra corrente e concentrazione di substrato è conservata per range di concentrazione maggiori. Il disegno di biosensore contenente l'AOX estratta da *P.Pastoris* si è dimostrato quindi il più sensibile al mondo, secondo la letteratura.

Nella presente tesi questi biosensori sono stati impiantati in un modello animale riprodotto la dipendenza da alcol. Gli animali utilizzati sono stati condizionati attraverso dei protocolli di assunzione volontaria, sviluppando comportamenti di consumo compulsivo. I sensori sono stati quindi costruiti, calibrati e impiantati nel NAcc degli animali. Il giorno seguente i biosensori sono stati polarizzati e stabilizzati nella loro corrente di base. Gli animali hanno avuto libertà di

movimento grazie all'uso di un sistema telemetrico per l'applicazione del potenziale e la registrazione dei dati. Ai ratti è stato quindi permesso il libero accesso ad una soluzione di etanolo al 10% che si sono auto-somministrati.

Nei minuti successivi all'assunzione è stato effettivamente dimostrato un aumento delle correnti che ha raggiunto un acme, dopo circa 30 minuti, di 4.93 ± 0.94 nA. Attraverso i valori di corrente nelle calibrazioni pre-impianto è stato calcolato il LRS dei sensori. Ciò ci ha permesso di calcolare una concentrazione di 0.447 mM di etanolo nel NAcc degli animali oggetto dell'esperimento.

In conclusione possiamo affermare di avere rilevato e quantificato, *in vivo* e in tempo reale, l'etanolo assunto spontaneamente dagli animali. I dati di concentrazione estrapolati dalle correnti registrate sono congruenti con quanto ritrovato in letteratura, una volta corretti per quantità di etanolo e tempo di raccolta dei campioni (Schier et al 2012). Il vantaggio di questa tecnica, a fronte di una microinvasività comparabile con la microdialisi, è una risoluzione temporale altissima, permettendo il rilevamento in *real-time*, e una sensibilità altrettanto alta, potendo quantificare concentrazioni nell'ordine delle $\mu\text{moli/Litro}$.

Per la prima volta è stato quindi possibile rilevare e quantificare in tempo reale l'assunzione spontanea di etanolo in un modello animale di dipendenza. L'applicazione futura di questa metodica permetterà in futuro uno studio congiunto degli aspetti comportamentali e neurochimici della dipendenza, che ne sottolineerà la relazione nel determinare vari aspetti del disturbo da abuso.

Riassunto

Il consumo di alcol è stata una presenza costante nel cammino evolutivo dell'uomo e lo ha certamente influenzato. L'etanolo è tutt'oggi assunto anche a causa dei suoi effetti sul sistema nervoso centrale. Esso causa, infatti, un *release* di dopamina nel Nucleo Accumbens attivando il fascio prosencefalico mediale, meccanismo comune a molte sostanze da abuso e reputato alla base della dipendenza. Il disordine da abuso di alcol è una delle maggiori questioni sociali e di salute pubblica e, per questa ragione, è importante lo studio dei meccanismi alla base di questa patologia. Pertanto è di primaria importanza lo studio delle caratteristiche comportamentali dell'intossicazione da etanolo e quindi della sua tossicologia.

A tal fine sono state sviluppate numerose tecniche di rilevazione e quantificazione di etanolo, sia *in vivo* sia *in vitro*. Nel corso dei decenni la microdialisi è stata quella più ampiamente utilizzata, essa presenta il vantaggio di essere precisa nella determinazione degli analiti a fronte di una minima invasività. La microdialisi presenta, tuttavia, lo svantaggio di una bassa risoluzione temporale, richiedendo tempi di prelievo nell'ordine dei minuti. Per ciò negli ultimi anni è stata individuata una valida alternativa nei biosensori amperometrici, che sfruttano reazioni di ossido-riduzione catalizzate dalla loro componente biologica, per rilevare e quantificare l'analita. Essi presentano un'altissima risoluzione temporale a fronte di un'invasività paragonabile alla microdialisi.

In lavori precedenti sono stati sviluppati e caratterizzati dei disegni di biosensori per l'etanolo (Rocchitta et al., 2012; Secchi et al., 2013). Nella presente tesi i precedenti disegni, contenenti alcol-ossidasi estratte da *Hansenula Polimorpha*, sono stati comparati in termini di performance con due nuovi ceppi estratti da *Candida Boidinii* e *Pichia Pastoris*. Quest'ultimo si è dimostrato significativamente migliore in termini di V_{MAX} , K_M e LRS.

Il nuovo disegno sviluppato è stato utilizzato *in vivo* in un modello animale di dipendenza da alcol rappresentato da ratti condizionati con *self-administration*. I biosensori sono stati impiantati nel Nucleo Accumbens degli animali. Durante questi esperimenti ai ratti è stato lasciato libero accesso ad una soluzione al 10%

di etanolo. In corrispondenza con l'assunzione volontaria dell'etanolo da parte dell'animale si è riscontrato un aumento della corrente che ha raggiunto un acme dopo circa 30 minuti. Dai valori di corrente, che ha raggiunto i 4.93 ± 0.94 nA, è stata calcolata la concentrazione di etanolo intracerebrale grazie alla determinazione pre-impianto del LRS dei sensori. Nel nostro caso è stato stimato un valore di concentrazione pari a 0.447 mM.

Questi risultati dimostrano per la prima volta la quantificazione *in vivo* e in tempo reale della concentrazione intracerebrale di etanolo durante esperimenti di assunzione volontaria. Questo permetterà in futuro lo studio congiunto e istantaneo delle caratteristiche comportamentali e tossicologiche dell'assunzione di etanolo.

Bibliografia e Sitografia

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5°ed.). Autore, 2013.

Anders DL, Blevins T, Smothers CT, Woodward JJ. Reduced ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by deletion of the NR1 C0 domain or overexpression of alpha-actinin-2 proteins. *J Biol Chem*. 2000 May 19;275(20):15019-24;

Bellesi M, Tononi G, Cirelli C, Serra PA. Region-Specific Dissociation between Cortical Noradrenaline Levels and the Sleep/Wake Cycle. *Sleep*. 2016 Jan 1;39(1):143-54;

Burkhardt JM, Adermark L. Locus of onset and subpopulation specificity of in vivo ethanol effect in the reciprocal ventral tegmental area-nucleus accumbens circuit. *Neurochem Int*. 2014 Oct;76:122-30;

Calia G, Rocchitta G, Migheli R, Puggioni G, Spissu Y, Bazzu G, Mazzarello V, Lowry JP, O'Neill RD, Desole MS, Serra PA. 2002. Biotelemetric monitoring of brain neurochemistry in conscious rats using microsensors and biosensors. *Sensors (Basel)*. 2009;9(4):2511-23;

Castro MA, Beltrán FA, Brauchi S, Concha II. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *J Neurochem*. 2009 Jul;110(2):423-40;

Craig J.D., O'Neill R.D. Comparison of simple aromatic amines for electrosynthesis of permselective polymers in biosensor fabrication. *Analyst*. 2003;128:905–911;

Curley AA, Lewis DA. Cortical basket cell dysfunction in schizophrenia. *The Journal of Physiology*, 2012, 590(Pt 4), 715e724;

Diana M, Pistis M, Carboni S, Gessa GL, Rossetti ZL. Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1;90(17):7966-9;

Dudley R. Fermenting fruit and the historical ecology of ethanol ingestion: is alcoholism in modern humans an evolutionary hangover? *Addiction*. 2002 Apr;97(4):381-8;

Durstewitz D, Seamans JK, Sejnowski TJ. Dopamine-mediated stabilization of delay-period activity in a network model of prefrontal cortex. *J Neurophysiol*. 2000 Mar;83(3):1733-50;

Eiden LE, Schäfer MK, Weihe E, Schültz B. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):636-40;

Gilpin NW, Smith AD, Cole M, Weiss F, Koob GF, Richardson HN. Operant behavior and alcohol levels in blood and brain of alcohol-dependent rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009 Dec;33(12):2113-23;

Harvey M, Lau D, Civillico E, Rudy B, Contreras D. Impaired long-range synchronization of gamma oscillations in the neocortex of a mouse lacking Kv3.2 potassium channels. *Journal of Neurophysiology*, 2012 108, 827e833;

<http://www.epicentro.iss.it/alcol/EpidMondo.asp>. 17/07/2017.12:29;

Kandel E, Schwartz J, Jessel T, et al. *Principi di Neuroscienze*. CEA, 2014

Karahanian E, Rivera-Meza M, Tampier L, Quintanilla ME, Herrera-Marschitz M, Israel Y. Long-term inhibition of ethanol intake by the administration of an aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2)-coding lentiviral vector into the ventral tegmental area of rats. *Addict Biol.* 2015 Mar;20(2):336-44;

Karkhanis AN, Rose JH, Huggins KN, Konstantopoulou JK, Jones SR. Chronic intermittent ethanol exposure reduces presynaptic dopamine neurotransmission in the mouse nucleus accumbens. *Drug Alcohol Depend.* 2015 May 1;150:24-30;

Kasper D, Fauci A, Longo D, Hauser S, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison's principals of internal medicine.* McGraw-Hill Medical, 2015;

Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. *Basic and Clinical Pharmacology.* McGraw-hill Medical. 2012;

Kroener S, Chandler LJ, Philips PE, Seamans JK. Dopamine modulates persistent synaptic activity and enhances the signal-to-noise ratio in the prefrontal cortex. *PLoS One.* 2009 Aug 5;4(8):e6507;

Lammel S, Lim BK, Melinka RC. Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology.* 2014 Jan;76 Pt B:351-9;

Lester D, Freed EX. Criteria for an animal model of alcoholism. *Pharmacol Biochem Behav.* 1973 Jan-Feb;1(1):103-7;

Martin D, Morrisett RA, Bian XP, Wilson WA, Swartzwelder HS. 1991. Ethanol inhibition of NMDA mediated depolarizations is increased in the presence of Mg²⁺. *Brain Res.* 1991 Apr 19;546(2):227-34;

McBride WJ, Rodd ZA, Bell RL, Lumeng L, Li TK. The alcohol-preferring (P) and high-alcohol-drinking (HAD) rats e Animal models of alcoholism. Alcohol. 2014 May;48(3):209-15;

Moykkynen TP, Korpi ER. 2012. Acute effects of ethanol on glutamate receptors. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012 Jul;111(1):4-13;

Myers RD. Multiple metabolite theory, alcohol drinking and the alcogene. Prog Clin Biol Res. 1985;183:201-20;

Neuhoff H, Neu A, Liss B, Roeper J. I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. J Neurosci. 2002 Feb 15;22(4):1290-302;

Okamoto T, Harnett MT, Morikawa H. Hyperpolarization-activated cation current (I_h) is an ethanol target in midbrain dopamine neurons of mice. J Neurophysiol. 2006 Feb;95(2):619-26;

Oliva I, Wanat MJ. Ventral Tegmental Area Afferents and Drug-Dependent Behaviors. Front Psychiatry. 2016 Mar 7;7:30;

OMS, Global status report on alcohol and health. 2014;

OMS, World drug report. 2009;

Osservatorio nazionale alcol-CNESPS. Epidemiologia e monitoraggio alcol-correlato in Italia e nelle Regioni. 2014;

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. Prog Neurobiol. 1998 Apr;54(5):581-618;

Peoples RW, Weight FF. Cutoff in potency implicates alcohol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in alcohol intoxication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 28;92(7):2825-9;

Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ. Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. 2010 *Science*, 328, 1288e1290;

Peters J, LaLumiere RT, Kalivas PW. Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. *J Neurosci*. 2008 Jun 4;28(23):6046-53;

Planeta CS. Animal models of alcohol and drug dependence. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013;35 Suppl 2:S140-6;

Richter CP, Campbell KH. Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats. *Science*. 1940 May 24;91(2369):507-8;

Rocchitta G, Secchi O, Alvau MD, Migheli R, Calia G, Bazzu G, Farina D, Desole MS, O'Neill RD, Serra PA. Development and characterization of an implantable biosensor for telemetric monitoring of ethanol in the brain of freely moving rats. *Anal Chem*. 2012 Aug 21;84(16):7072-9;

Rocchitta G, Serra PA. Direct monitoring of ethanol in the brain. *OA Alcohol* 2013 Sep 01;1(2):15;

Rocchitta G, Spanu A, Babudieri S, Latte G, Madeddu G, Galleri G, Nuvoli S, Bagella P, Demartis MI, Fiore V, Menetti R, Serra PA. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors (Basel)*. 2016 May 30;16(6). pii: E780;

Sadock B.J., Sadock V.A., Ruiz P. Kaplan & Sadock's Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences / Clinical Psychiatry. Lippincott Williams and Wilkins, 2014;

Schier CJ, Mangieri RA, Dilly GA, Gonzales A. Microdialysis of Ethanol During Operant Ethanol Self-administration and Ethanol Determination by Gas Chromatography. *J Vis Exp.* 2012; (67): 4142;

Secchi O, Zinellu M, Spissu Y, Pirisinu M, Bazzu G, Migheli R, Desole MS, O'Neill RD, Serra PA, Rocchitta G. Further in-vitro characterization of an implantable biosensor for ethanol monitoring in the brain. *Sensors (Basel).* 2013 Jul 23;13(7):9522-35;

Serra PA, Sciola L, Delogu MR, Spano A, Monaco G, Miele E, Rocchitta G, Miele M, Migheli R, Desole MS. Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Induces Apoptosis in Mouse Nigrostriatal Glia. *J Biol Chem.* 2002 Sep 13;277(37):34451-61;

Smothers CT, Woodward JJ. Effects of amino acid substitutions in transmembrane domains of the NR1 subunit on the ethanol inhibition of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 Mar;30(3):523-30;

Torres GE, Carneiro A, Seamans K, Fiorentini C, Sweeney A, Yao WD, Caron MG. Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *J Biol Chem.* 2003 Jan 24;278(4):2731-9;

Trantham-Davidson H, Burnett EJ, Gass JT, Lopez MF, Mulholland PJ, Centanni SW, et al. Chronic alcohol disrupts dopamine receptor activity and

the cognitive function of the medial prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 2014, 34, 3706-3718;

Wadley G. How psychoactive drugs shape human culture: A multi-disciplinary perspective. *Brain Res Bull.* 2016 Sep;126(Pt 1):138-151;

Xiang Y, Shen J. In vivo detection of intermediate metabolic products of [1-(13) C]ethanol in the brain using (13) C MRS. *NMR Biomed.* 2011 Nov;24(9):1054-62;

Xiao C, Ye JH. Ethanol dually modulates GABAergic synaptic transmission onto dopaminergic neurons in ventral tegmental area: role of mu-opioid receptors. *Neuroscience.* 2008 Apr 22;153(1):240-8;

Xie G, Hipólito L, Zuo W, Polache A, Granero L, Krnjevic K, Ye JH. Salsolinol stimulates dopamine neurons in slices of posterior ventral tegmental area indirectly by activating μ -opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 Apr;341(1):43-50.