

Conditioned Place Preference: Zebrafish

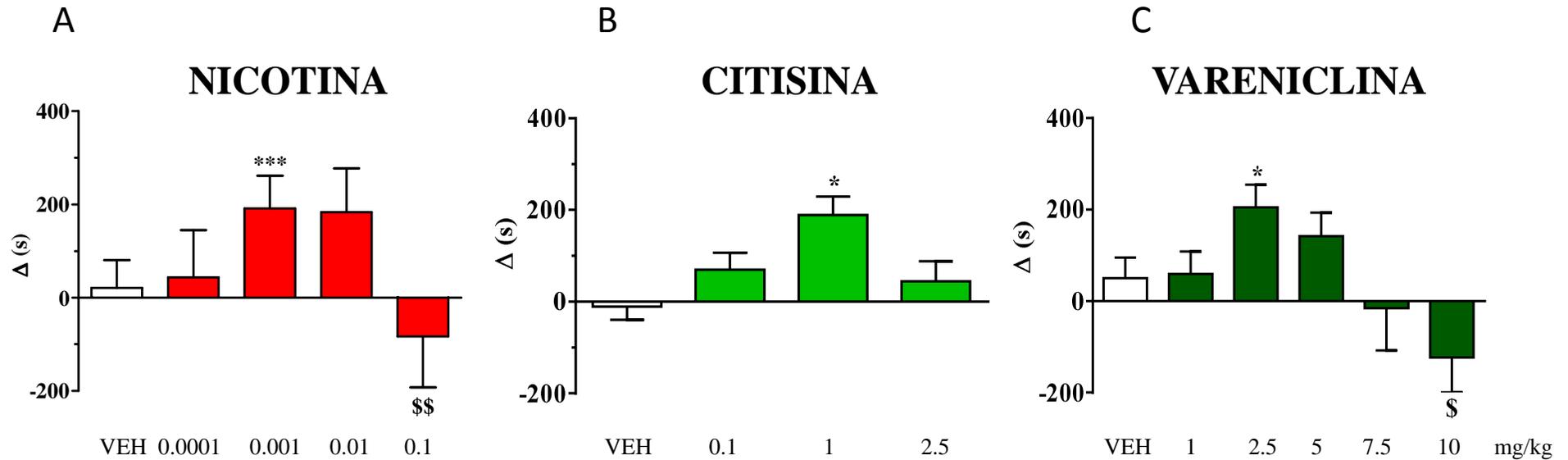


Fig. 1: Effetto di dosi crescenti di nicotina (A), citisina (B) e vareniclina (C) nel test della CPP, somministrate i.m. 20 minuti prima della fase di condizionamento, espresso come differenza (media \pm e.s.) del tempo speso nel compartimento associato alla droga durante il post- e il pre-condizionamento (Δ) nello *Zebrafish*.

N = 10 *Zebrafish* per ciascun gruppo

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs corrispettivo veicolo (VEH); \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ vs dose massimamente rinforzante (ANOVA seguita da test di Tukey).

Conditioned Place Preference: Zebrafish

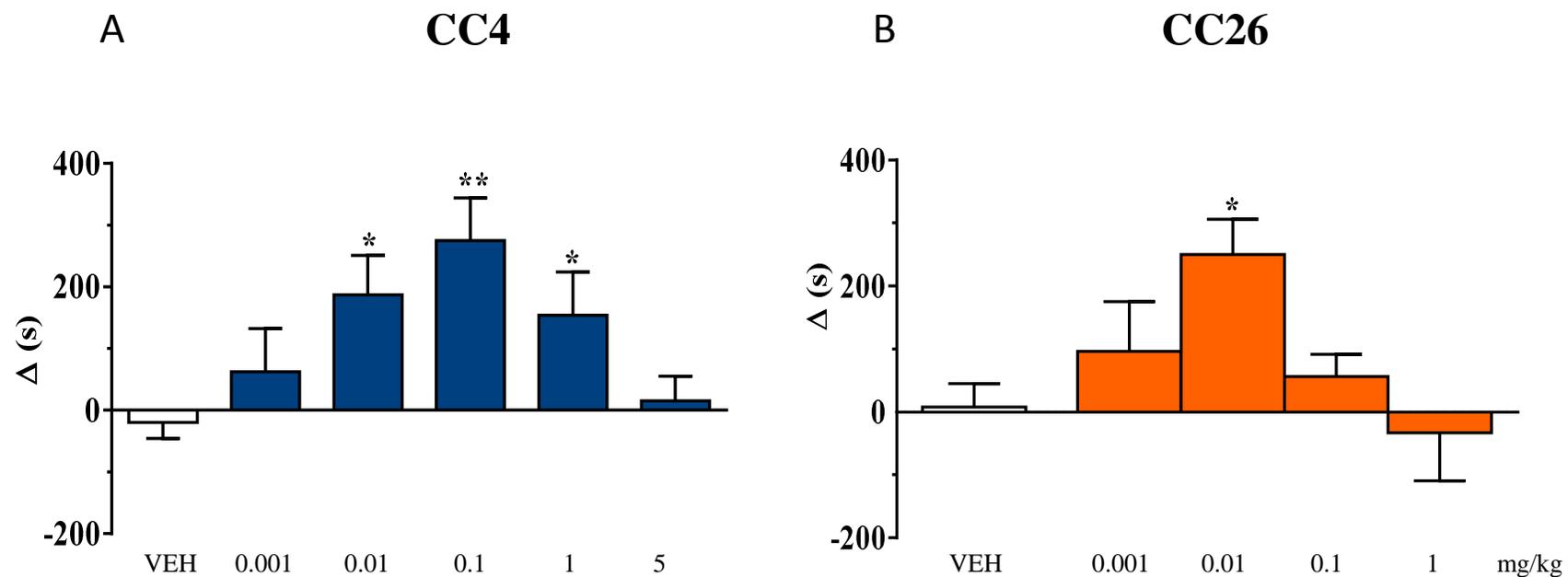


Fig. 2: Effetto di dosi crescenti di CC4 (A) e CC26 (B) nel test della CPP, somministrate i.m. 20 minuti prima della fase di condizionamento, espresso come differenza (media \pm e.s.) del tempo speso nel compartimento associato alla droga durante il post- e il pre-condizionamento (Δ) nello *Zebrafish*.

N = 10 *Zebrafish* per ciascun gruppo

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs corrispettivo veicolo (ANOVA seguita da test di Tukey).

Conditioned Place Preference: Zebrafish

Pretrattamento	Dose (mg/kg)	Trattamento	Dose (mg/kg)	Tempo (s) Δ
Veicolo	-	Veicolo	-	-2.07±15.28
Veicolo	-	Nicotina	0.001	236.30±46.86**
MLA	0.01	Veicolo	-	122.80±43.84*
MLA	0.1	Veicolo	-	27.60±49.76
MLA	1	Veicolo	-	-77.00±17.00*
MLA	0.01	Nicotina	0.001	139.40±51.63*
MLA	0.1	Nicotina	0.001	250.40±59.16**
MLA	1	Nicotina	0.001	-193.50±23.00* \$\$\$
MII	0.01	Veicolo	-	17.75±53.42
MII	0.1	Veicolo	-	-0.66±22.66
MII	1	Veicolo	-	87.00±26.40*
MII	0.01	Nicotina	0.001	188.60±42.60**
MII	0.1	Nicotina	0.001	219.00±42.20***
MII	1	Nicotina	0.001	184.80±50.20*
DH β E	0.001	Veicolo	-	-55.60±39.76
DH β E	0.01	Veicolo	-	152.00±67.56*
DH β E	0.1	Veicolo	-	67.00±47.56
DH β E	0.001	Nicotina	0.001	135.60±42.20
DH β E	0.01	Nicotina	0.001	-28.83±21.66\$\$\$
DH β E	0.1	Nicotina	0.001	-102.00±26.50\$\$\$

Tab. 1: Effetto degli antagonisti *methyllycaconitine* (MLA), *α -conotoxin MII* (MII), *dihydro- β -erythroidine* (DH β E) selettivi rispettivamente per i sottotipi recettoriali nicotinici α_7 , $\alpha_6\beta_2$ e β_2 , espresso come differenza (media \pm e.s.) del tempo speso nel compartimento associato alla droga durante il post- e il pre-condizionamento(Δ) nello *Zebrafish*. Gli antagonisti sono stati somministrati insieme alla nicotina (NIC) o al veicolo (VEH). N = 10 *Zebrafish* per ciascun gruppo

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs VEH + gruppo VEH; \$\$\$P<0.01, \$\$\$\$P<0.001 vs VEH + gruppo NIC (ANOVA seguita da test di Tukey).

Conditioned Place Preference: Zebrafish

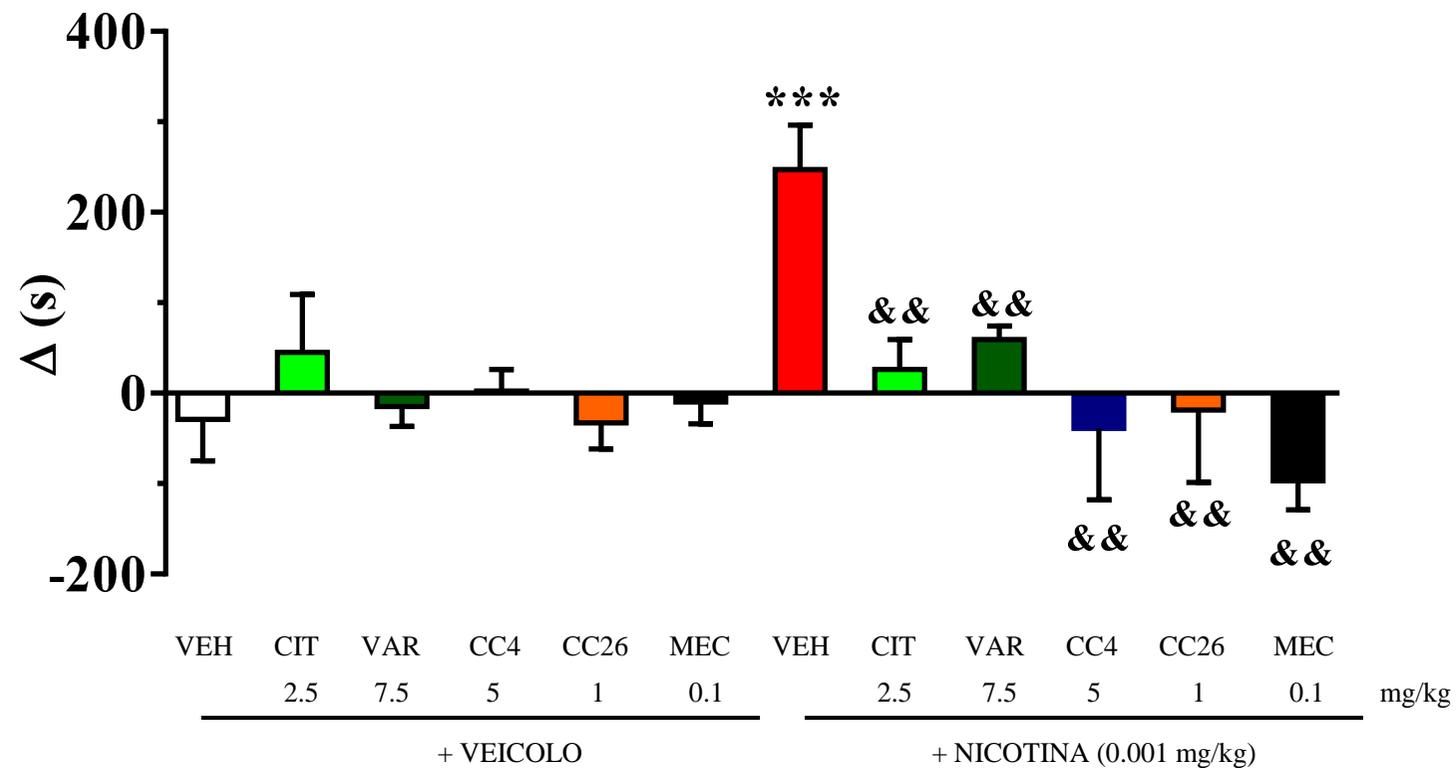


Fig. 3: Effetto di citisina (CIT, 2.5 mg/kg), vareniclina (VAR, 7.5 mg/kg), CC4 (5 mg/kg), CC26 (1 mg/kg) e mecamilamina (MEC, 0.1 mg/kg), somministrate da sole o in combinazione con la nicotina (0.001 mg/kg), nel test della CPP, espresso come differenza (media \pm e.s.) del tempo speso nel compartimento associato alla droga durante il post- e il pre-condizionamento (Δ).

N = 10 *Zebrafish* per ciascun gruppo

***P<0.001 vs corrispettivo veicolo (VEH); &&P<0.01 vs VEH + NIC (ANOVA seguita da test di Tukey).

Attività natatoria: Zebrafish

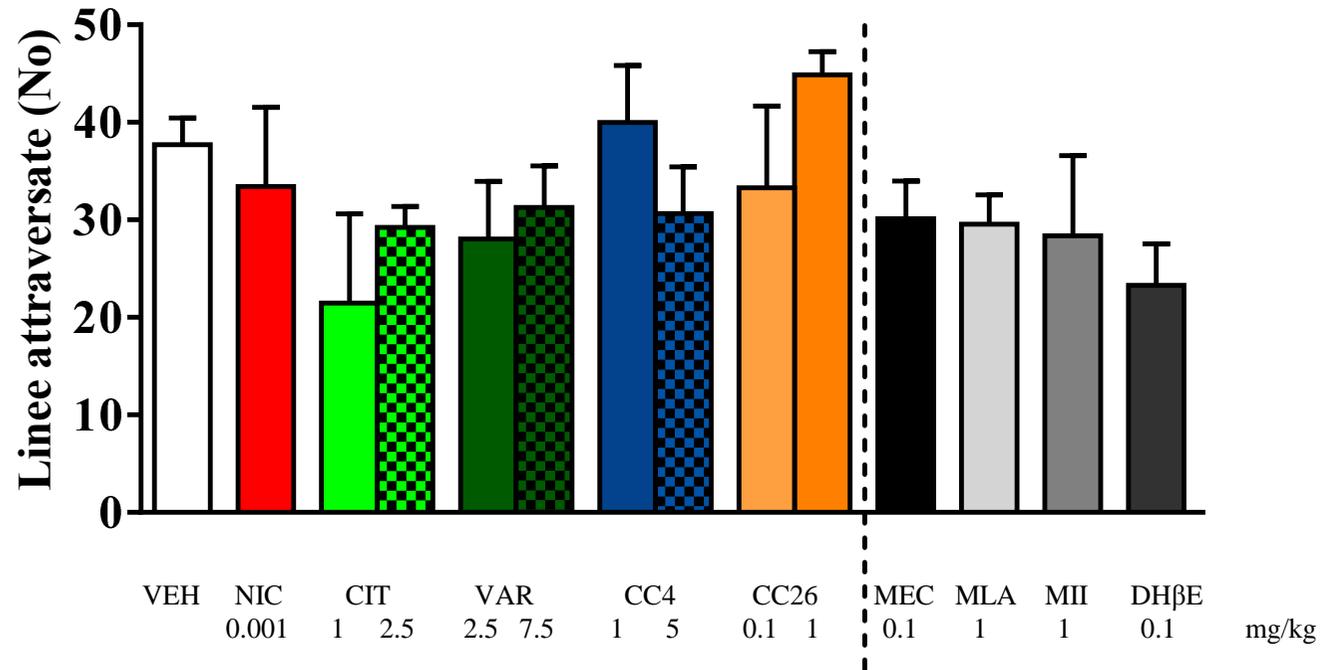


Fig. 4: Numero totale (media \pm e.s.) di linee attraversate, nell'arco di 30 secondi, ogni 5 minuti per un totale di 6 osservazioni, dopo somministrazione i.m. di veicolo (VEH), nicotina (NIC, 0.001 mg/kg), citisina (CIT, 1-2.5 mg/kg), vareniclina (VAR, 2.5-7.5 mg/kg), CC4 (1-5 mg/kg), CC26 (0.1-1 mg/kg), mecamilamina (MEC, 0.1 mg/kg), *methyllycaconitine* (MLA, 1 mg/kg), *α -conotoxin MII* (MII, 1 mg/kg) e *dihydro- β -erythroidine* (DH β E, 0.1 mg/kg), somministrati 20 minuti prima del test.

N = 10 *Zebrafish* per ciascun gruppo

Caratterizzazione biochimica-farmacologica: Zebrafish

Curve di saturazione

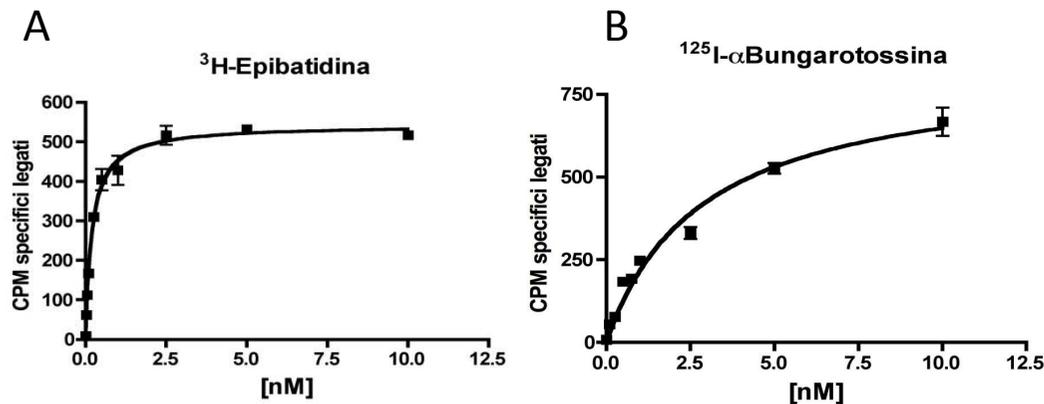


Fig. 5: Curve di saturazione della [^3H]-Epibatidina (A) e della [^{125}I]- α Bungarotossina (B) ottenute da omogenati di membrane del cervello dello *Zebrafish*.

(C) Valori di K_d e K_i determinati per i vari composti sui recettori eteromerici ed omomerici presenti nelle membrane di *Zebrafish*. I numeri tra parentesi rappresentano la percentuale del coefficiente di variazione (CV).

(D) Medie \pm SEM delle concentrazioni di nicotina riscontrate nel cervello e nei tessuti periferici dello *Zebrafish* in seguito a somministrazione i.m. di dosi crescenti di nicotina.

N = 10 *Zebrafish* per ciascun gruppo.

Competizione farmacologica

	[^3H]-Epibatidina	[^{125}I] α Bungarotossina
Affinità	0.026 (23)	0.42 (31)
Citisina	1.47(19)	37.4 (60)
CC4	11.9 (25)	234 (43)
CC26	5.38 (61)	126 (48)
Nicotina	11.8 (23)	213(59)
Vareniclina	1.1(24)	1.29(37)
DH β E	1780 (30)	3810(62)
α -Bgtx	1500	0.4 (54)
MII	1.9 (66)	224(46)
MLA	836 (67)	0.59 (40)
Mecamilamina	145000 (32)	498000(54)

D Valutazione dei livelli di nicotina

NIC doses administrated (mg/kg)	Brain (pmol/mg)	nM	Tissues (pmol/mg)	nM
0.001	13.25 \pm 1.75	81.7 \pm 10.7	3.5 \pm 0.5	21.6 \pm 3.1
0.01	20.25 \pm 1.8	124.9 \pm 11.5	56 \pm 0.6	345 \pm 3.5
0.1	36.0 \pm 4.3	222.0 \pm 27.0	77.7 \pm 6.1	481 \pm 382

Conditioned Place Preference: Ratto

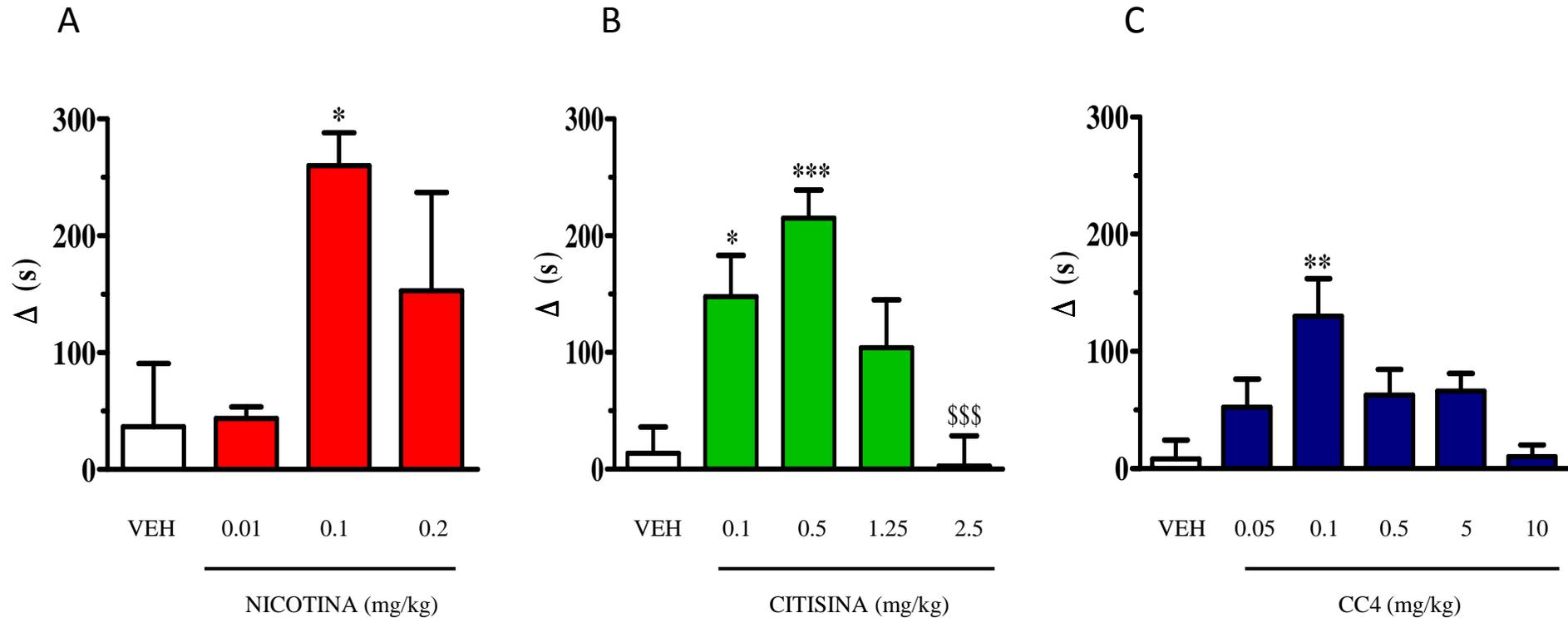


Fig. 6: Effetto di dosi crescenti di nicotina (A), citisina (B), e CC4 (C), somministrate i.p. 5 minuti prima di ciascuna sessione di condizionamento della CPP, espresso come differenza (media \pm e.s.) del tempo speso nel compartimento associato alla droga durante il post- e il pre-condizionamento (Δ).

N = 10 ratti per ciascun gruppo

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs corrispettivo veicolo; \$\$\$ $P < 0.001$ vs citisina 0.5 mg/kg (ANOVA seguita da test di Tukey).

Conditioned Place Preference: Ratto

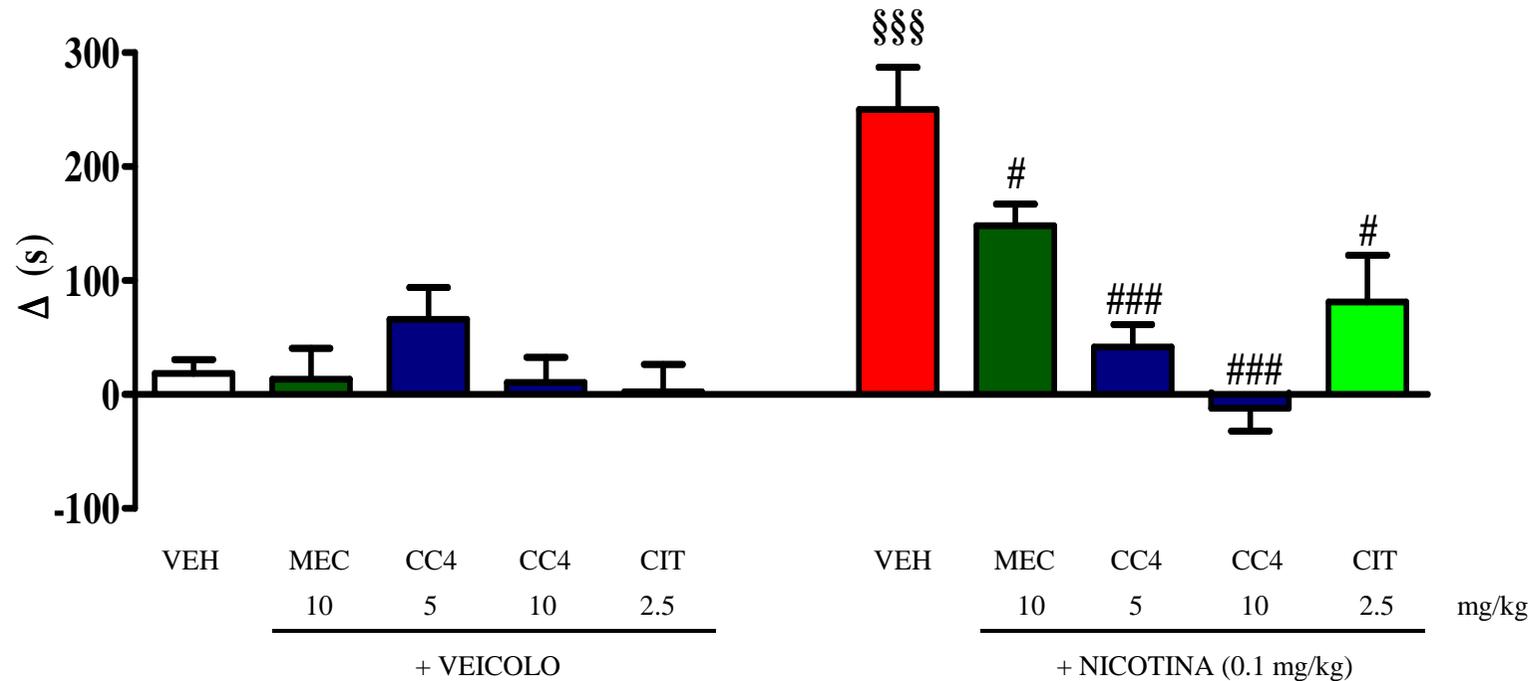


Fig. 7: Effetto della mecamilamina (MEC, 10 mg/kg), CC4 (5-10 mg/kg), citisina (CIT, 2.5 mg/kg), somministrate prima della nicotina (NIC, 0.1 mg/kg) durante ciascuna sessione di condizionamento della CPP, espresso come differenza (media \pm e.s.) del tempo speso nel compartimento associato alla droga durante il post- e il pre-condizionamento (Δ).

N = 10 ratti per ciascun gruppo

§§§§P<0.001 vs corrispettivo veicolo, MEC, CC4 (5-10 mg/kg) e CIT somministrate da sole; #P<0.05, ###P<0.01, ####P<0.001 vs VEH + nicotina (ANOVA seguita da test di Tukey).

Intracerebroventricular Self-Administration: Ratto

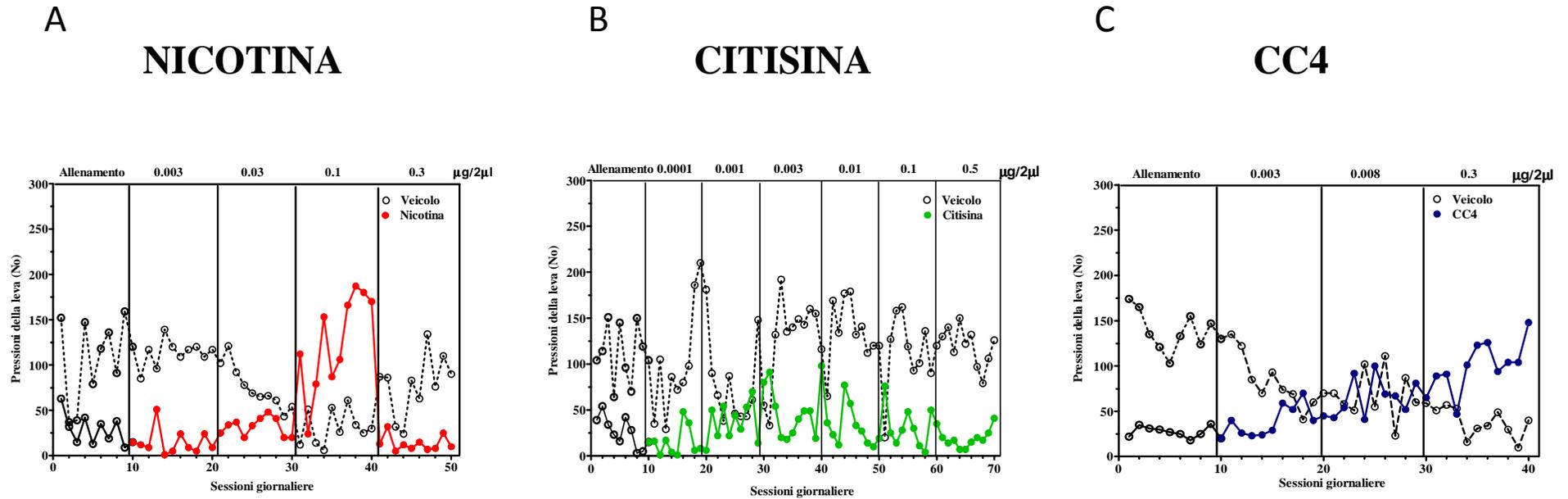


Fig. 8: Numero di battute della leva associata al veicolo e alla nicotina (A), alla citisina (B) e al CC4 (C) registrate in sessioni giornaliere di 1 ora di autosomministrazione icv, in tre ratti rappresentativi.

Intracerebroventricular Self-administration: Ratto

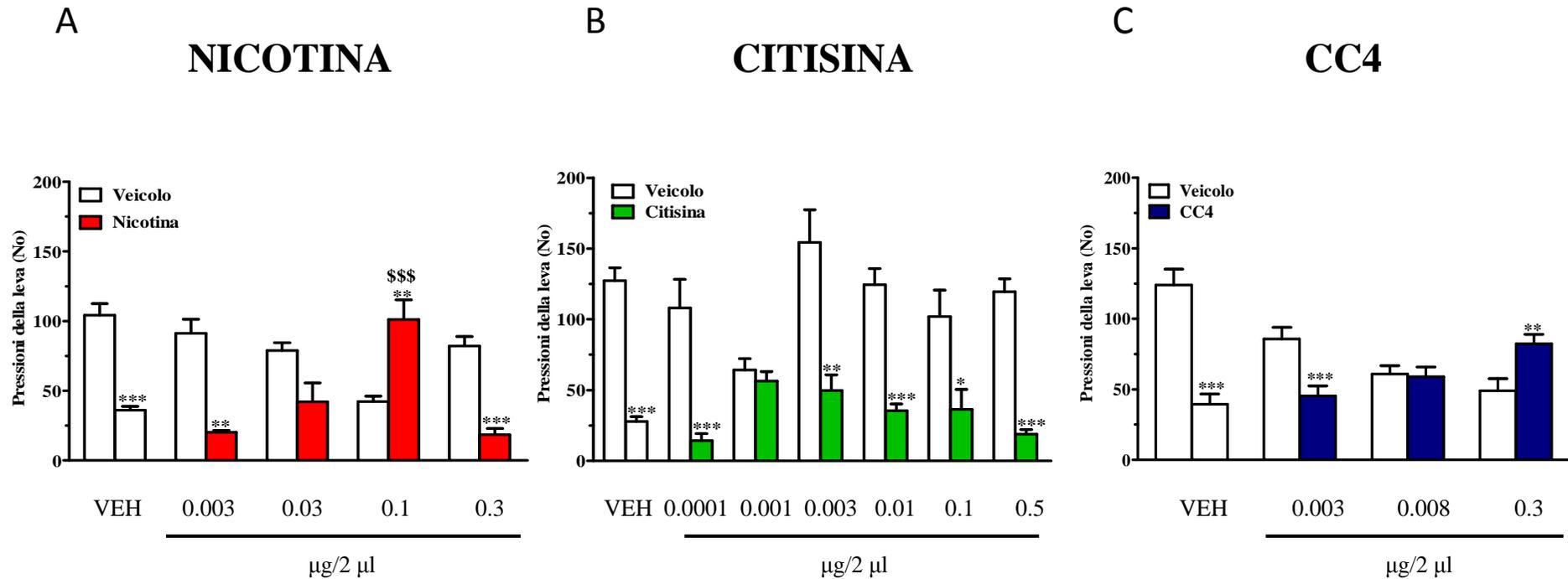


Fig. 9: Numero di battute (media \pm e.s.) della leva associata al veicolo e alla nicotina (A), alla citisina (B) e al CC4 (C) registrate in sessioni giornaliere di 1 ora di autosomministrazione icv e mediate con le ultime cinque sessioni giornaliere dopo 15-20 giorni di acquisizione.

N = 10 ratti per ciascun gruppo

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs corrispettivo gruppo veicolo; \$\$\$ $P < 0.001$ vs stessa leva del gruppo veicolo (ANOVA seguita da test di Tukey).

Intracerebroventricular Self-Administration: Ratto

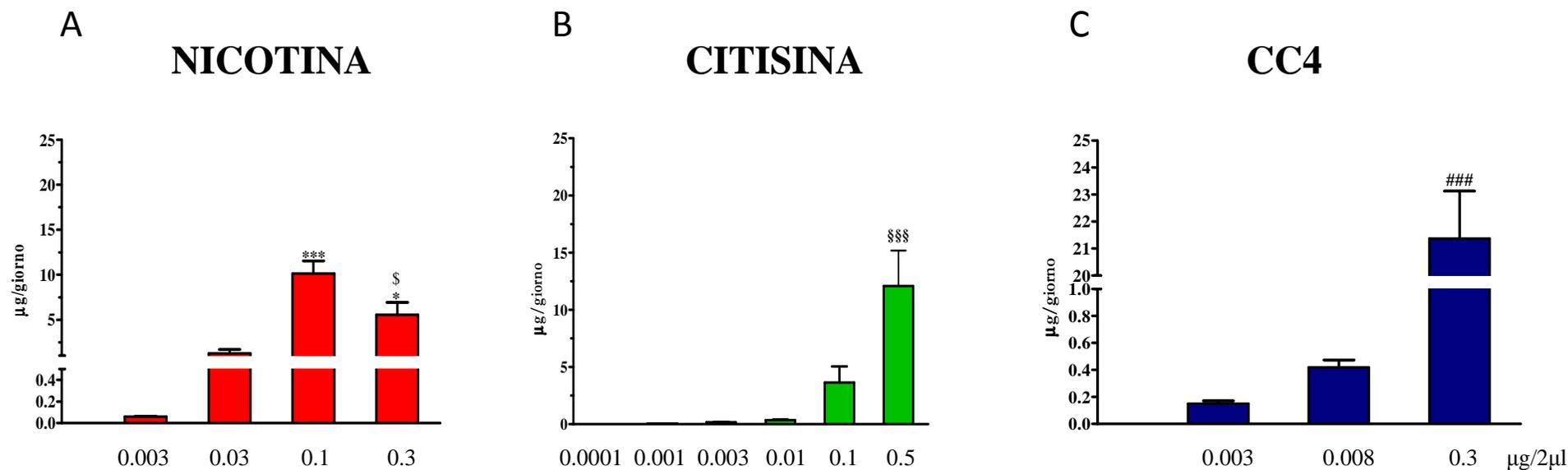


Fig. 10: Quantitativo giornaliero (media \pm e.s.) di nicotina (A), citisina (B) e CC4 (C), assunto al termine di ogni sessione negli ultimi 5 giorni di stabilità, dopo 15-20 giorni di acquisizione.

N = 10 ratti per ciascun gruppo

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs 0.003 e 0.03 μg di infusione di nicotina; \$ $P < 0.05$ vs 0.1 μg di infusione di nicotina; §§§ $P < 0.01$ vs altre dosi di citisina; ### $P < 0.01$ vs 0.003 e 0.008 μg di infusione di CC4 (ANOVA seguita da test di Tukey).

Intracranial Self-Administration: Ratto

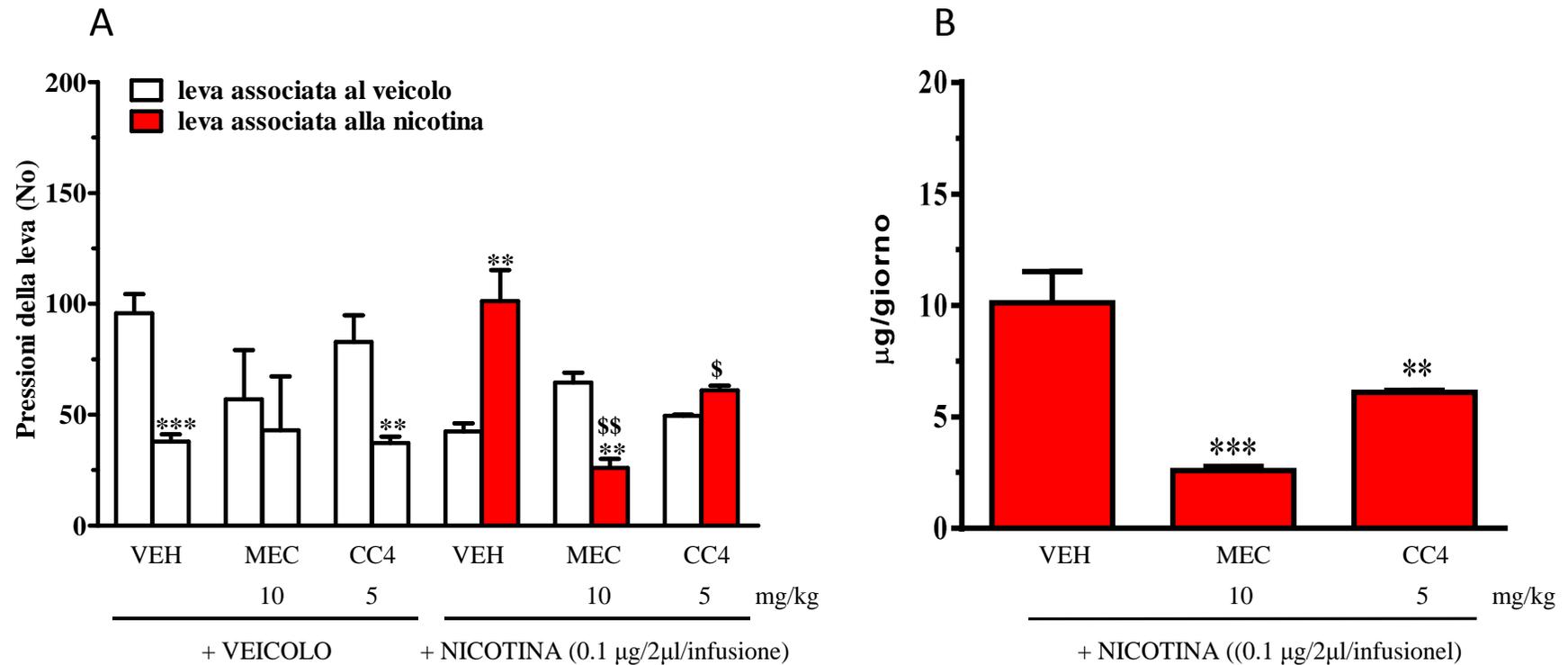


Fig. 11: (A) Numero di battute (media \pm e.s.) della leva associata alla nicotina (0.1 $\mu\text{g}/\text{infusione}$) e al veicolo (2 $\mu\text{l}/\text{infusione}$) durante gli ultimi 5 giorni di sessioni giornaliere, dopo 15-20 giorni di acquisizione. Il veicolo (VEH), la mecamilamina (MEC, 10 mg/kg) e il CC4 (5 mg/kg) sono state somministrate s.c. 30 minuti prima di ciascuna sessione giornaliera.

N = 10 ratti per ciascun gruppo

P<0.01, *P<0.001 vs corrispondente leva associata al VEH; \$P<0.05, \$\$P<0.01 vs stessa leva del gruppo nicotina + VEH;

(B) Quantitativo giornaliera (media \pm e.s.) di nicotina (0.1 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}/\text{infusione}$) assunto al termine di ogni sessione negli ultimi 5 giorni di stabilità, dopo 15-20 giorni di acquisizione, in seguito a pretrattamento con veicolo (VEH), mecamilamina (MEC, 10 mg/kg) e CC4 (5 mg/kg).

P<0.01, *P<0.001 vs gruppo nicotina + VEH (ANOVA seguita da test di Tukey)

Attività motoria: Ratto

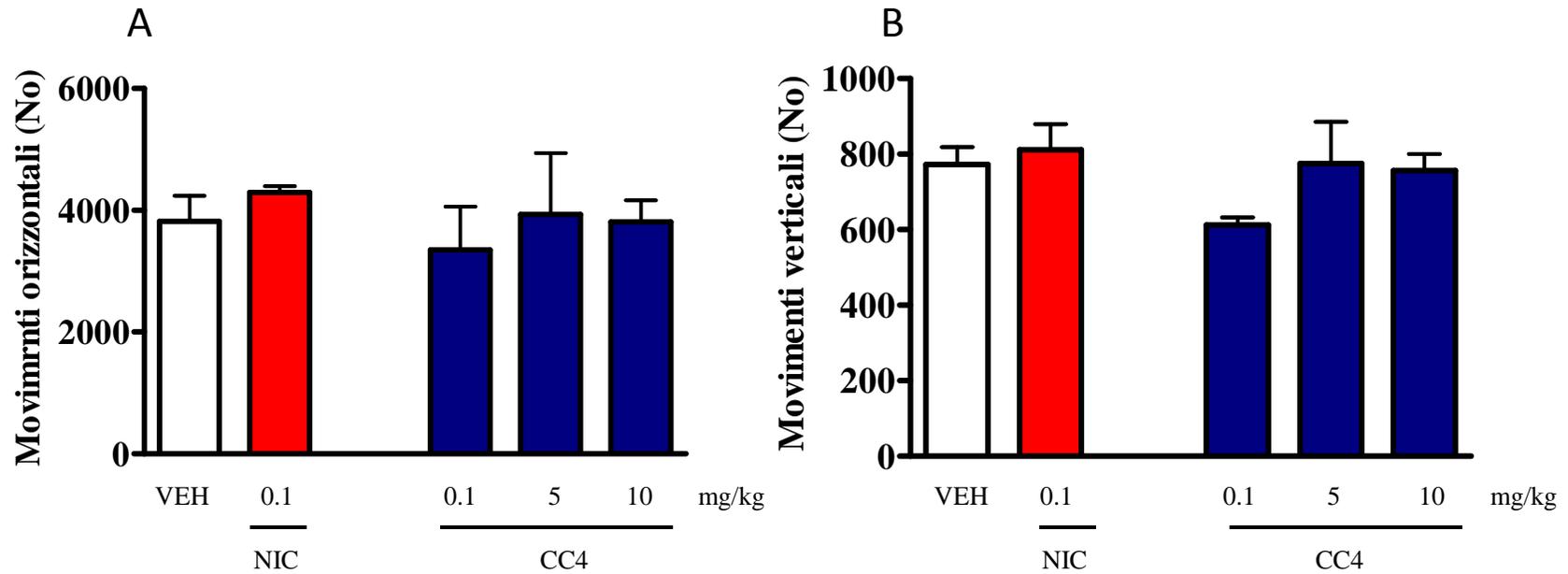


Fig. 12: Numero totale (media \pm e.s.) di movimenti orizzontali (A) e verticali (B), valutati per 30 minuti. La nicotina (NIC, 0.1 mg/kg) e il CC4 (0.1-10 mg/kg) sono state somministrate rispettivamente 20 e 30 minuti prima del test.

N = 10 ratti per ciascun gruppo.

Peso corporeo e consumo di cibo : Topo

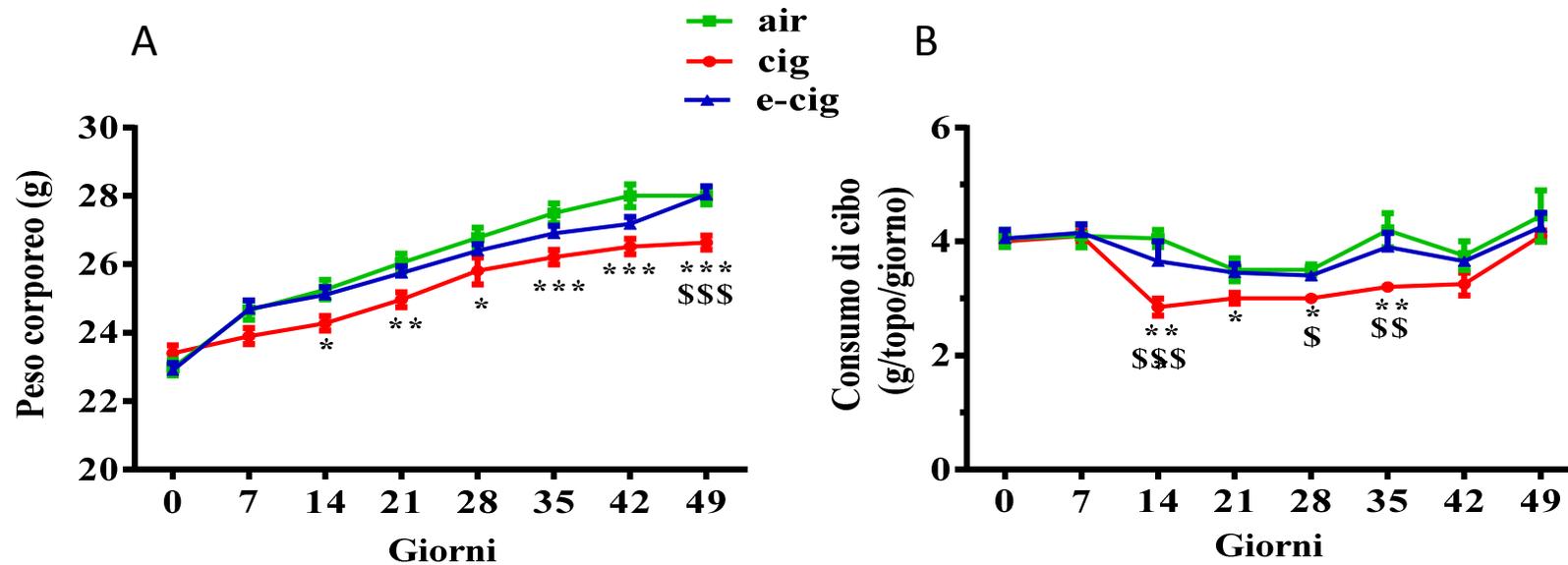


Fig. 13: Andamento del peso corporeo (A) e del consumo di cibo (B) (media \pm e.s.) registrato settimanalmente durante le 7 settimane di esposizione al fumo della sigaretta tradizionale (CIG) o al vapore della sigaretta elettronica (E-CIG) o all'aria (AIR).

N= 10 topi per gruppo

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs AIR corrispondente; \$P<0.05, \$\$P<0.01, \$\$\$P<0.001 vs AIR e E-CIG corrispondenti (ANOVA a 2 VIE seguita da test di Bonferroni).

Livelli urinari di cotinina: Topo

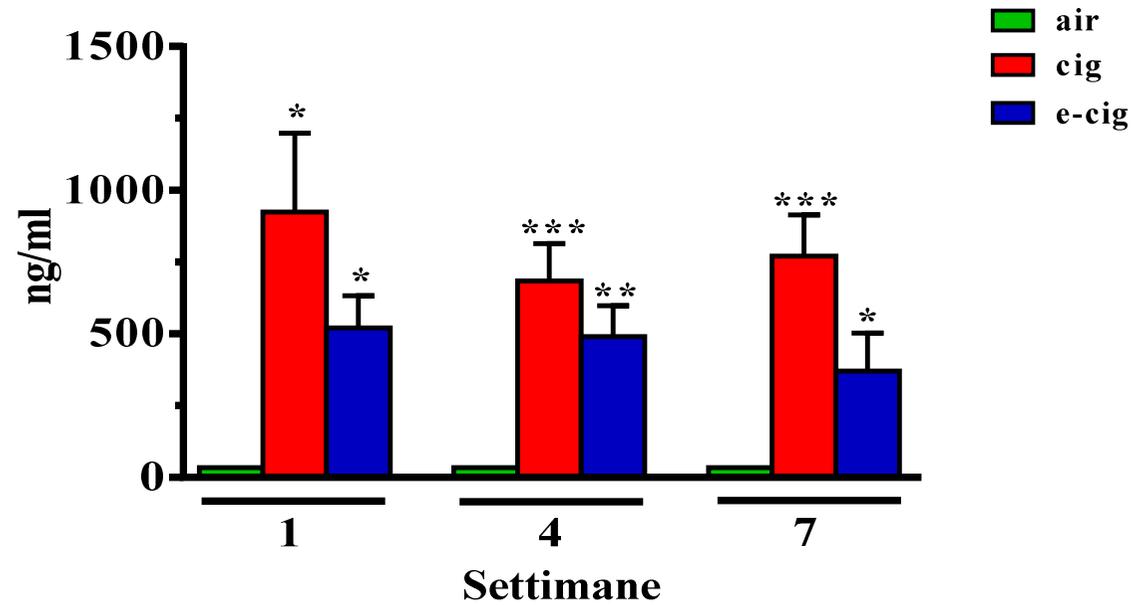


Fig. 14: Livelli urinari di cotinina (media \pm e.s.) registrati dopo la 1^o, la 4^o e la 7^o settimana di esposizione.

N= 10 topi per gruppo

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs AIR corrispondente (ANOVA seguita da test di Tukey)

Livelli cerebrali di nicotina e di cotinina: Topo

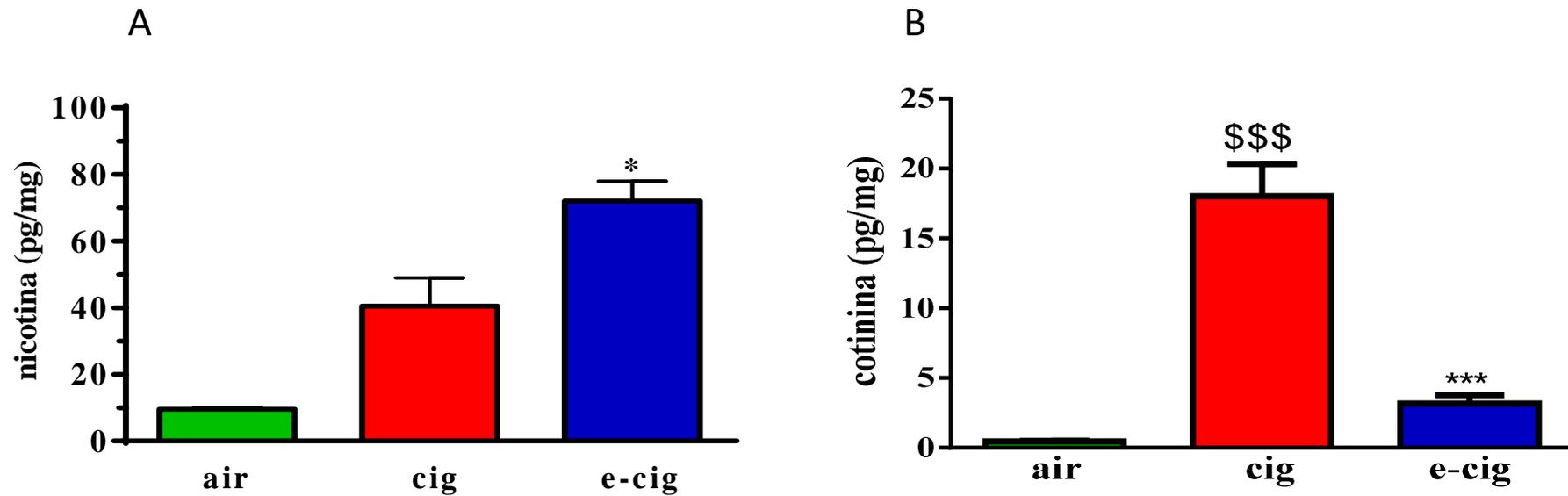


Fig. 15: Livelli cerebrali (media \pm e.s.) di nicotina (A) e di cotinina (B) registrati alla fine delle 7 settimane di esposizione.

N= 6 topi per gruppo

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs AIR corrispondente; \$\$\$ $P < 0.001$ vs AIR e E-CIG corrispondenti (ANOVA seguita da test di Bonferroni o t di Student)

Sindrome astinenziale: Topo

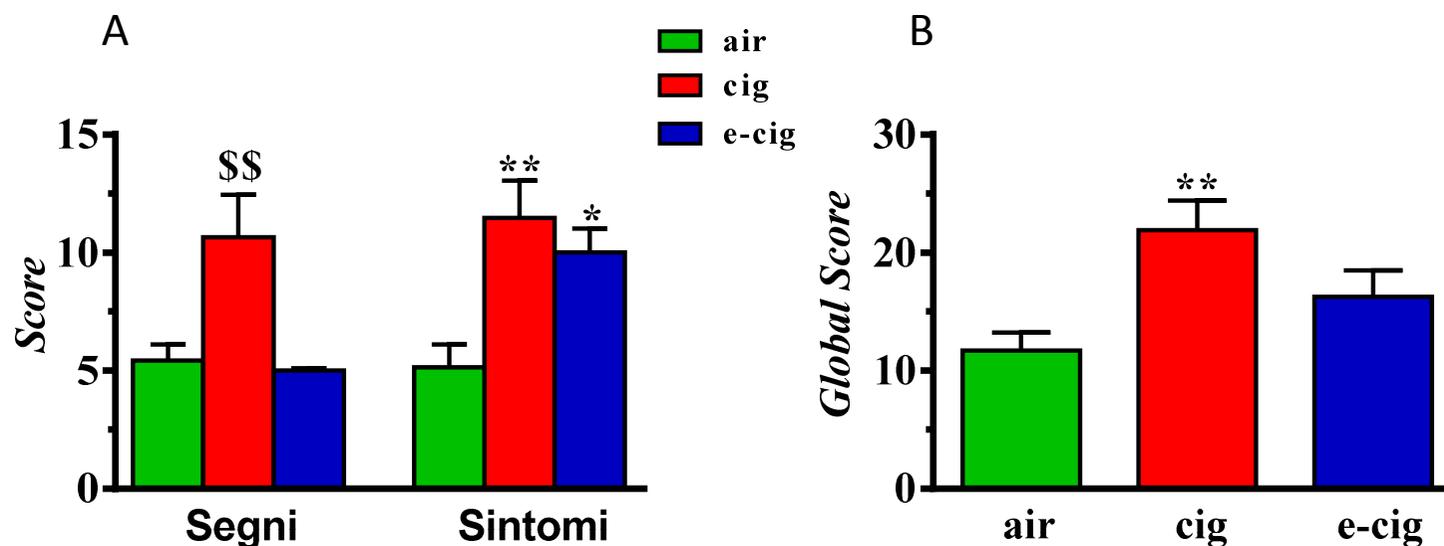


Fig. 16: Numero totale (media \pm e.s.) dei sintomi e dei segni (A) e del *global score* (B), osservati subito dopo trattamento s.c. con mecamilamina (1 mg/kg) per la valutazione della sindrome astinenziale. I segni astinenziali (*wet dog shakes*, *front paw tremors*, *sniffing* e *scratches*) e i sintomi (*body tremor*, *ptosis*, *wet dog shakes*, *teeth chattering*, *paw tremor*, *scratching*, *genital licks*, *sniffing* e *piloerection*) sono stati valutati ogni 5 minuti per 30 minuti totali.

N= 10 topi per gruppo

*P<0.05, **P<0.01 vs AIR corrispondente; \$\$P<0.01 vs AIR e E-CIG corrispondenti (ANOVA seguita da test di Tukey) .

Attività motoria con mecamilamina: Topo

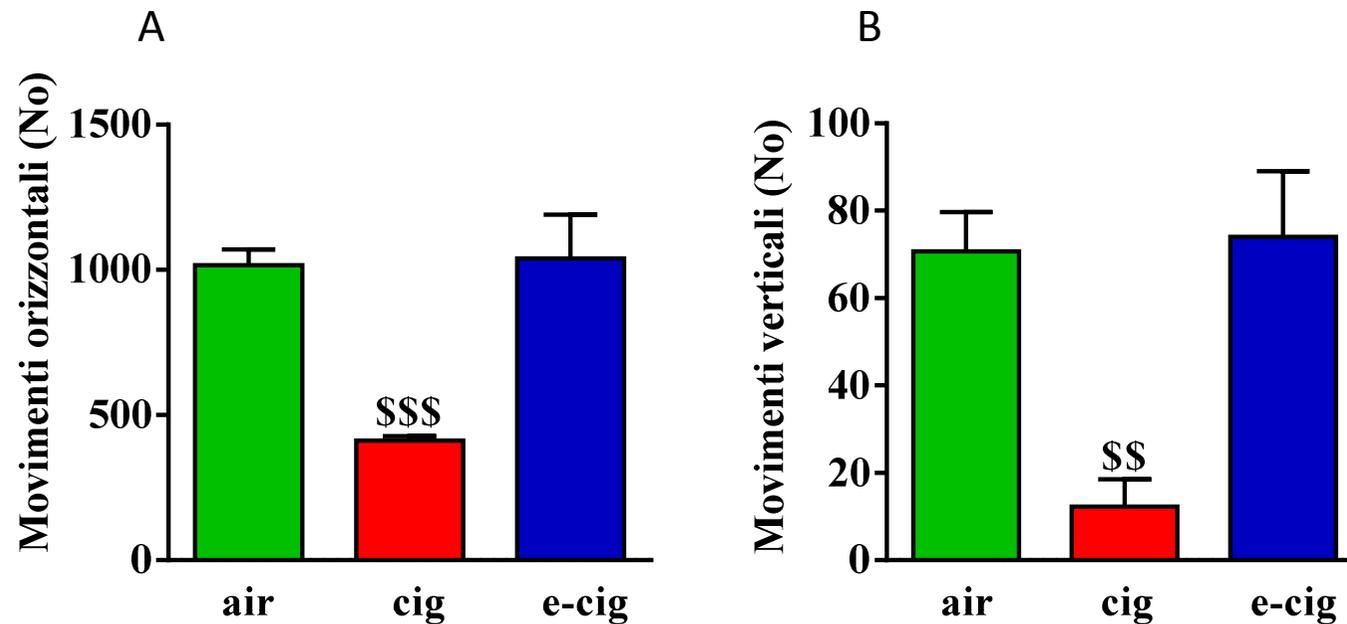


Fig. 17: Numero totale (media \pm e.s.) di movimenti orizzontali (A) e verticali (B), valutati per 15 minuti subito dopo la somministrazione s.c. di mecamilamina (1 mg/kg), nel test dell'Attività motoria.

N= 10 topi per gruppo

\$\$P<0.01, \$\$\$P<0.001 vs AIR e E-CIG corrispondente (ANOVA seguita da test di Tukey).

Studi di biochimici e farmacologici: Topo

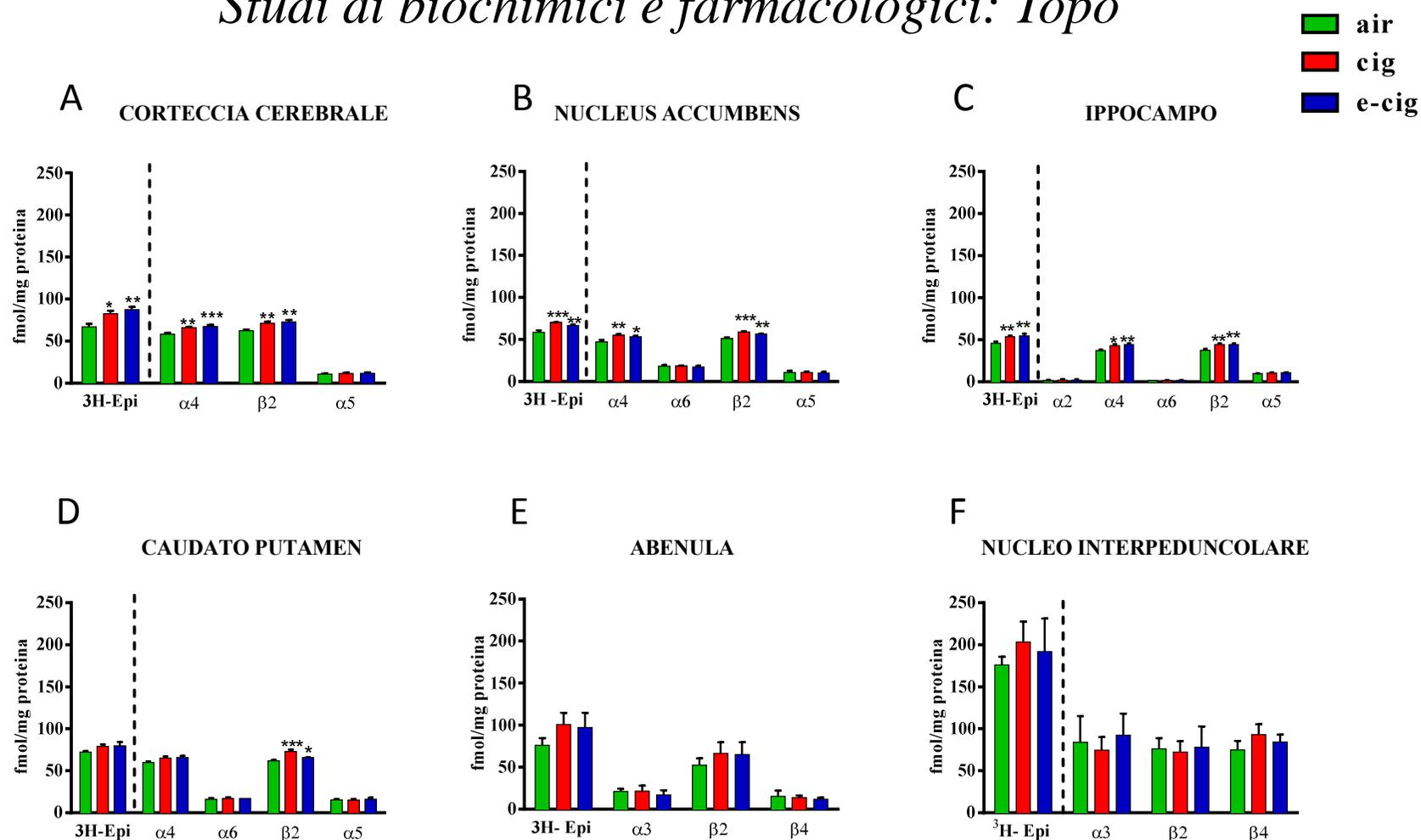


Fig. 18: Quantità (media \pm e.s.) di recettori nicotinici eteromerici e delle differenti subunità presenti a livello della corteccia (A), del *nucleus accumbens* (B), dell'ippocampo (C), del *caudato putamen* (D), dell'abenula (E) e del nucleo interpeduncolare (F), espressa come fmol/mg di proteine ed immunoprecipitazione delle subunità recettoriali.

N= 10 topi per gruppo

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs AIR corrispondente (ANOVA seguita da test di Tukey).

Attività motoria spontanea: Topo

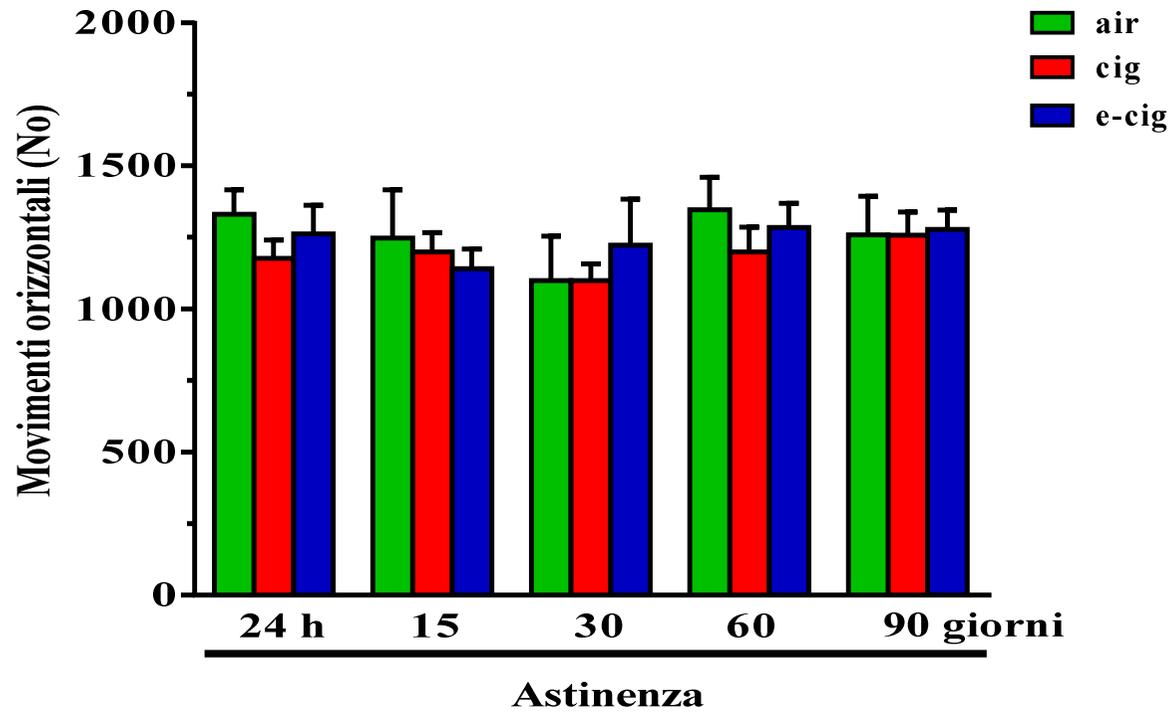


Fig. 19: Numero (media \pm e.s.) di movimenti orizzontali valutati per 15 minuti, 24 ore, 15, 30, 60 e 90 giorni dopo l'ultima esposizione nel test dell'Attività motoria.

N= 10 topi per gruppo

Spatial Object recognition: Topo

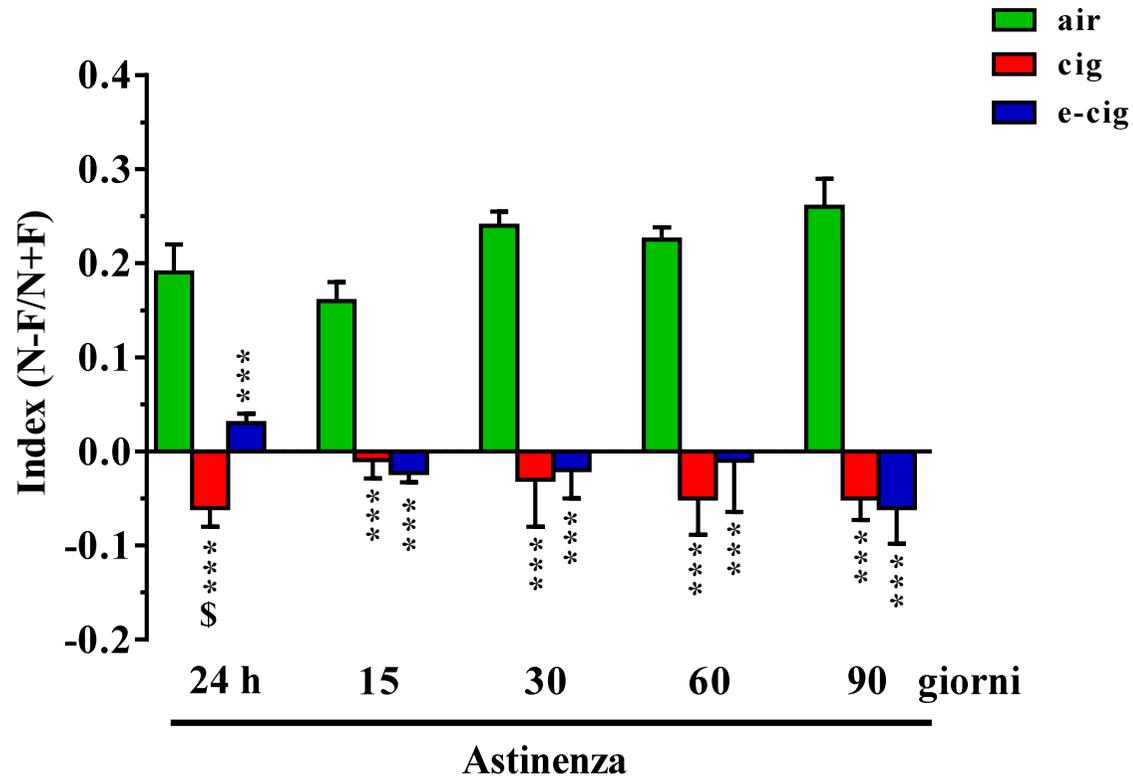


Fig. 20: Indice di discriminazione (media \pm e.s.), valutato a 24 ore, 15, 30, 60 e 90 giorni di astinenza nel test dello *Spatial Object Recognition*.

N= 10 topi per gruppo

***P<0.001 vs AIR corrispondente; \$P<0.05 vs E-CIG corrispondente (ANOVA seguita da test di Tukey).

Elevated Plus Maze: Topo

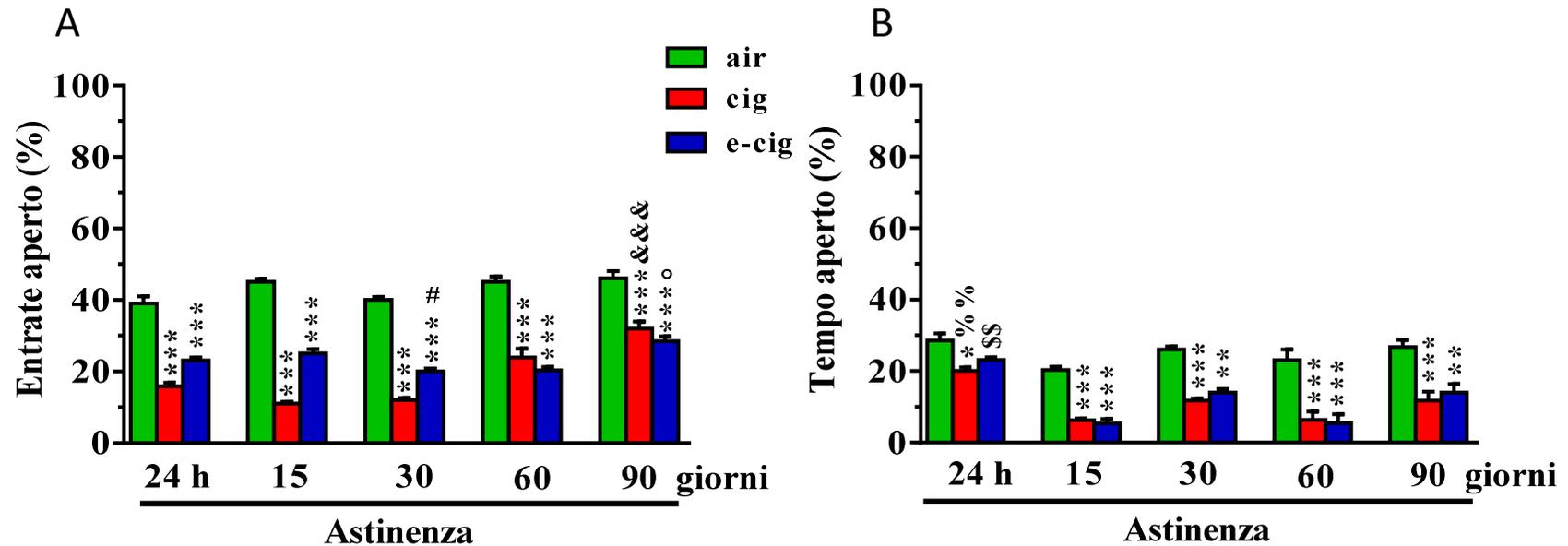


Fig. 21: Percentuale di entrate (A) e tempo speso nei bracci aperti (B), valutati 24 ore, 15, 30, 60 e 90 giorni dopo l'ultima esposizione nell'*Elevated Plus maze*.

N= 10 topi per gruppo

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs AIR corrispondente; #P<0.05 vs CIG corrispondente ; &&&P<0.01 vs CIG altri tempi corrispondenti

°P<0.05 vs E-CIG 30 e 60 giorni corrispondenti; %%P<0.01 vs CIG 15, 60 e 90 giorni corrispondenti; \$\$P<0.01 vs E-CIG altri tempi

corrispondenti; (ANOVA seguita da test di Bonferroni).

Marble burying test: Topo

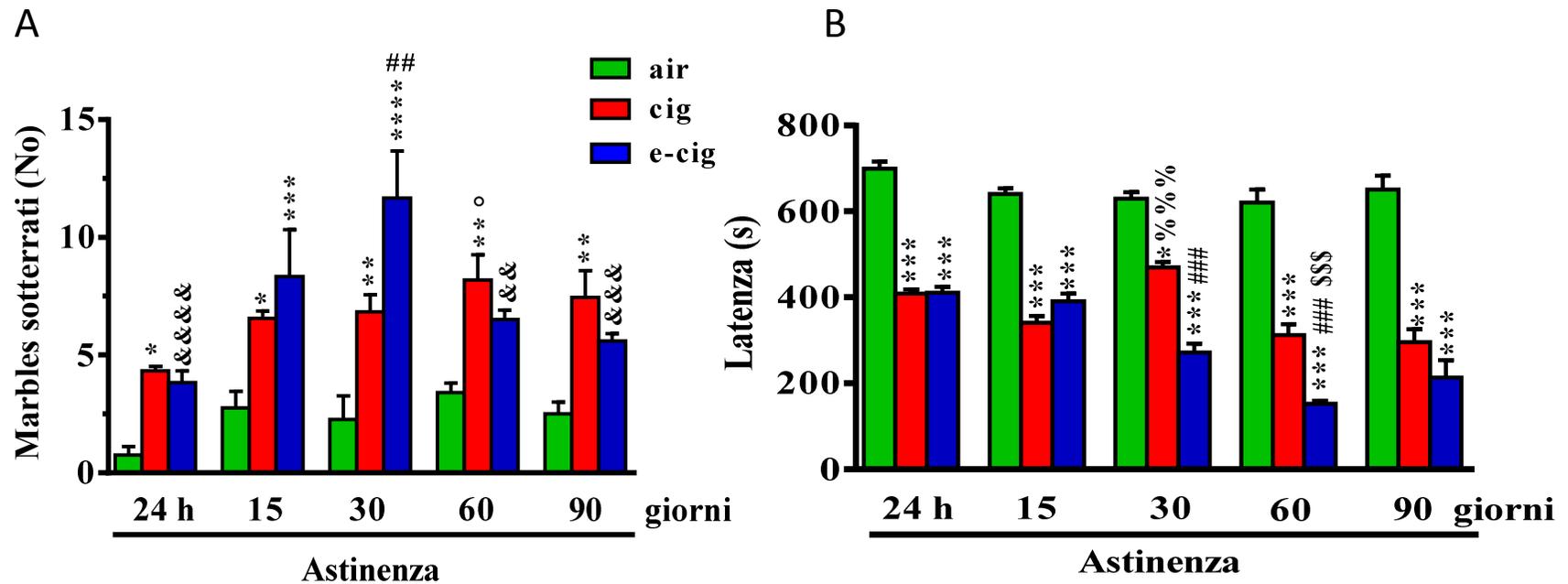


Fig. 22: Numero (media \pm e.s.) del numero di biglie sotterrate (A) e della latenza al primo sotterramento (B), valutati 24 ore, 15, 30, 60 e 90 giorni dopo l'ultima esposizione nel *Marble burying test*.

N= 10 topi per gruppo

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 vs AIR corrispondente; ###P<0.01, ####P<0.001 vs CIG corrispondente; &&P<0.01,

&&&P<0.001, &&&&P<0.0001 vs E-CIG 30 giorni corrispondente; °P<0.05 vs CIG 24 ore corrispondente; \$\$\$P<0.001 vs E-CIG 24 ore, 15

e 30 giorni corrispondenti ; %%%P<0.001 vs CIG 15, 60 e 90 giorni corrispondenti (ANOVA seguita da test di Bonferroni).

Tail suspension test: Topo

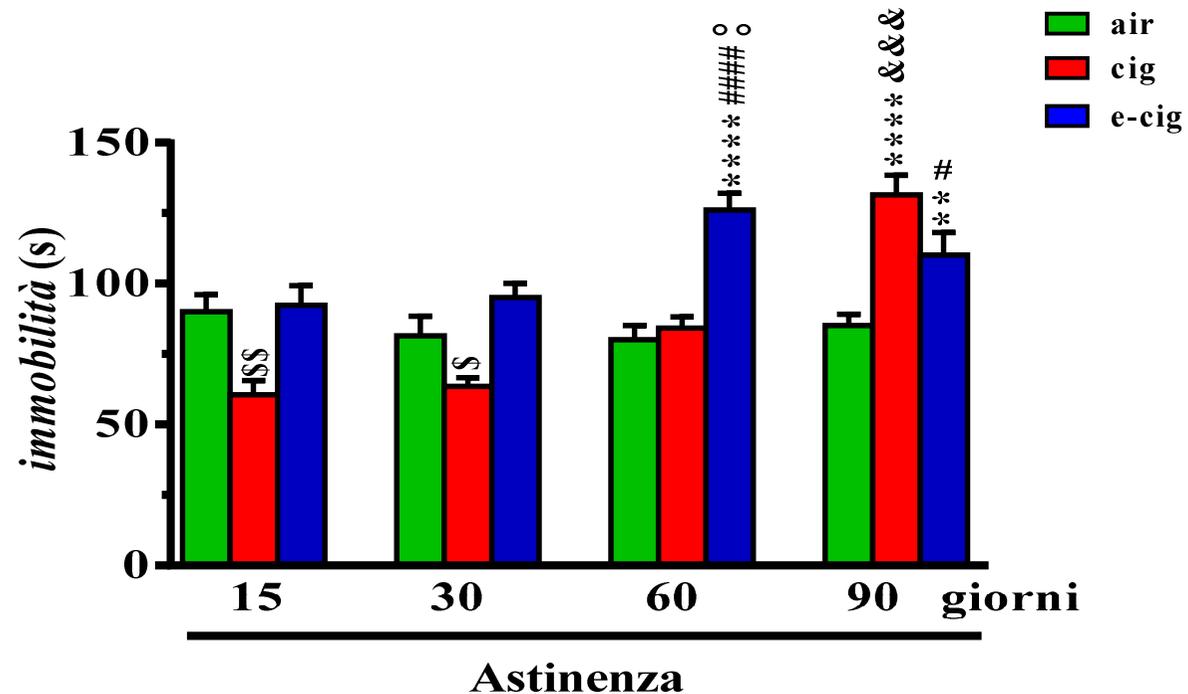


Fig. 23: Tempo di immobilità (media \pm e.s.) valutato 15, 30, 60 e 90 giorni dopo l'ultima esposizione nel *Tail Suspension test*.

N= 10 topi per gruppo

P<0.01,*P<0.0001 vs AIR corrispondente; \$P<0.05, \$\$P<0.01 vs AIR e E-CIG corrispondenti; #P<0.05, #####P<0,0001 vs CIG corrispondente; °°P<0.01 vs E-CIG 15 e 30 giorni corrispondenti; &&&P<0.001 vs CIG altri tempi corrispondenti (ANOVA seguita da test di Bonferroni).

Sucrose preference test: Topo

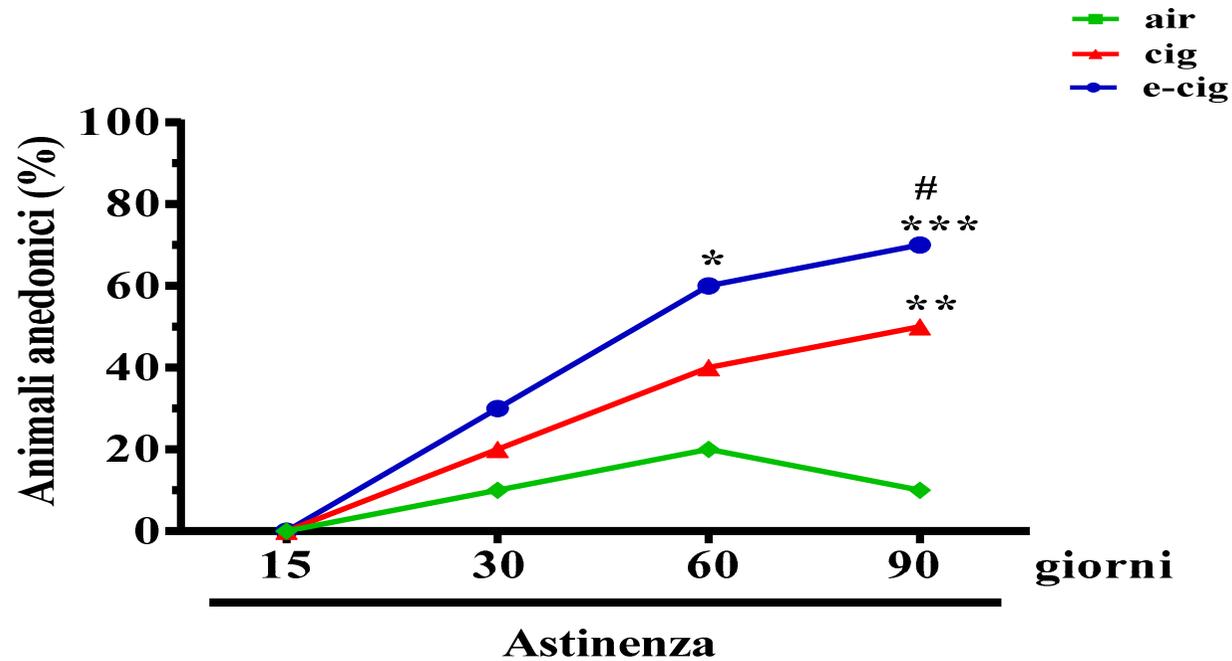


Fig. 24: Percentuale di animali anedonici, valutato 15, 30, 60 e 90 giorni dopo l'ultima esposizione nel *Sucrose Preference test*.

N= 10 topi per gruppo

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs AIR corrispondente; # $P < 0.05$ vs CIG corrispondente (ANOVA seguita da test di Fischer)