

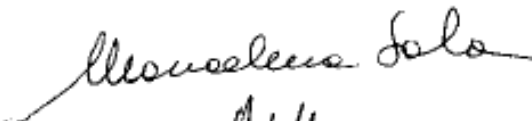

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**  
**Dottorato di ricerca in Scienze Farmacologiche Sperimentali e Cliniche**  
**Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari**  
**Ciclo XXVII**  
**BIO/14**



**Ruolo dei recettori nicotinici centrali nell'"addiction" e nella  
"dependence" da nicotina: potenziale strategia farmacologica di  
nuovi agonisti nicotinici parziali**

**Tutor: Dott.ssa Mariaelvina SALA**

**Direttore della scuola: Prof. Alberto PANERAI**

**Dottoranda:**  
**Luisa PONZONI**  
**Matricola R09755**

**Anno accademico 2013/2014**

*Alla mia Famiglia*

# *Indice*

Riassunto.....	pag.5
Introduzione.....	pag.11
La Tossicodipendenza.....	pag.12
Il tabagismo.....	pag.23
La nicotina.....	pag.43
Terapie per la disintossicazione da fumo di sigaretta.....	pag.92
Lo <i>Zebrafish</i> : un nuovo modello di studio.....	pag.122
Scopo della Ricerca.....	pag.136
Materiali e Metodi.....	pag.141
Risultati.....	pag.167
Discussione.....	pag.180
Bibliografia.....	pag.201
Figure.....	pag.274
Ringraziamenti	

*Riassunto*

I numerosi effetti della nicotina e del fumo sul cervello hanno incoraggiato la ricerca di nuove terapie farmacologiche in grado di ridurre il desiderio di fumare e di aumentare il tasso di successo sul lungo termine. Attualmente sono stati sintetizzati una serie di derivati e di analoghi della citisina, agonisti dei recettori nicotinici con un'elevata affinità per il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$ , quali potenziali agonisti selettivi per i sottotipi recettoriali nicotinici. Tra questi composti particolare interesse è costituito dall'*1,2-bis(citisi-12-yl)ethane* (CC4) e dall'*1,4-bis(citisi-12-yl)-butyne* (CC26), molecole costituite da 2 unità citisiniche connesse tramite una catena polimetilenica di diversa lunghezza. Nel mio percorso di dottorato mi sono proposta innanzitutto di indagare l'effetto rinforzante di questi due nuovi composti (CC4 e CC26), in comparazione con quello di due agonisti parziali nicotinici (citisina e vareniclina) e della stessa nicotina, utilizzando come modello animale lo *Zebrafish*, un piccolo pesce teleosteo tropicale d'acqua dolce, appartenente alla famiglia dei *Cyprinidae*, che negli ultimi anni è stato adottato per lo studio delle alterazioni indotte da sostanze d'abuso in alternativa ai roditori. A tale scopo è stato utilizzato il test della *Conditioned Place Preference* (CPP), che consiste nell'associare differenti dosi della sostanza in esame o il rispettivo veicolo a due ambienti diversi per caratteristiche visive. Dallo studio è emerso che la somministrazione i.m. di nicotina ha indotto un significativo aumento del tempo speso nel compartimento associato ad essa alle dosi di 0.001 mg/kg, mentre dosaggi inferiori o superiori non hanno alterato significativamente tale preferenza. Parallelamente, la citisina e la vareniclina, somministrate i.m., inducono un significativo aumento del tempo speso nel compartimento associato ad esso, alle dosi rispettivamente di 1 e 2.5 mg/kg. Il CC4 e il CC26 manifestano invece i loro effetti rinforzanti in un *range* di dosi molto minori, rispettivamente 0.01-1 mg/kg il CC4 e 0.01 mg/kg il CC26. In seguito, per verificare su quali sottotipi recettoriali agisse la nicotina nell'indurre gli effetti di *reward* nello *Zebrafish*, sono stati utilizzati differenti antagonisti nicotinici,  *$\alpha$ -conotoxin MII* (MII), *methyllycaconitine* (MLA) e *dihydro- $\beta$ -erythroidine* (Dh $\beta$ E) selettivi rispettivamente per i sottotipi  $\alpha_6\beta_2$ ,  $\alpha_7$  e  $\beta_2$ . I risultati ottenuti hanno dimostrato come l' MLA e il Dh $\beta$ E antagonizzano l'effetto rinforzante della nicotina, mentre l'MII risulta inefficace, dimostrando che gli effetti rinforzanti della nicotina, nello *Zebrafish* così come nei mammiferi, sono espliciti soprattutto sui sottotipi recettoriali  $\alpha_7$  e  $\beta_2$ .

Identificati i sottotipi recettoriali nicotinici coinvolti nei processi di *addiction* dello *Zebrafish*, è stata testata l'efficacia dei nuovi derivati della citisina (CC4 e CC26), in comparazione agli agonisti parziali (citisina e vareniclina) e ad un antagonista nicotinico non selettivo (mecamilamina), nel ridurre gli effetti rinforzanti della nicotina utilizzando sempre il test della CPP. I risultati ottenuti dimostrano che i diversi composti, somministrati i.m. a dosi in cui non inducono *reward*, sono in grado di ridurre le proprietà rinforzanti dell'alcaloide del tabacco.

Per verificare che gli effetti osservati nel test della CPP non fossero dovuti ad alterazioni dell'attività natatoria degli animali, è stato testato se le medesime sostanze potessero alterare le capacità natatorie basali dello *Zebrafish*. I risultati ottenuti non hanno evidenziato alcuna differenza significativa tra i vari gruppi di trattamento.

Successivi studi *in vitro*, condotti in collaborazione con la Dott.ssa Gotti, ci hanno permesso anche di valutare i livelli effettivi di nicotina, presenti sia a livello cerebrale che periferico degli *Zebrafish*, in seguito a somministrazioni di dosi crescenti di quest'alcaloide, determinando una chiara correlazione dose-risposta. Ulteriori studi *in vitro* hanno contribuito a caratterizzare i sottotipi recettoriali nicotinici presenti nel cervello dello *Zebrafish* mediante tecniche di *binding*. Questi studi dimostrano la presenza di almeno due classi di recettori nicotinici presenti a livello del SNC dello *Zebrafish*: i recettori che legano ad alta affinità l' $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-bungarotossina}$  ( $K_d = 0.42 \text{ nM}$ ) e quelli che legano ad alta affinità l' $[^3\text{H}]\text{-Epibatidina}$  ( $K_d = 0.026 \text{ nM}$ ). Inoltre dagli studi di competizione farmacologica emerge che la citisina possiede buona affinità per entrambi i sottotipi recettoriali, come indicato dalle  $K_i$  di  $1.47 \text{ nM}$  e di  $37.4 \text{ nM}$  rispettivamente per il recettore sensibile all' $[^3\text{H}]\text{-Epibatidina}$  e per quello sensibile all' $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-bungarotossina}$ . Viceversa il CC4 e il CC26 legano con alta affinità i recettori eteromerici ma con scarsa affinità quelli omomerici ( $\alpha_7$ ) come mostrato dalle rispettive  $K_i$  di  $11.9 \text{ nM}$  e  $234$  per il CC4 e di  $5.38 \text{ nM}$  e  $126 \text{ nM}$  per il CC26.

Sulla base di questi primi risultati ottenuti si può affermare che lo *Zebrafish* risulta un valido modello per mettere in luce gli effetti rinforzanti delle sostanze d'abuso e per lo studio degli antagonisti. In particolare, il CC4 e il CC26 si sono rilevati come dei nuovi composti  $\alpha_4\beta_2$  selettivi, in grado di bloccare questo sottotipo recettoriale, e potrebbero trovare un impiego terapeutico nello *smoking cessation*. Inoltre, la loro debole affinità per i recettori omomerici ( $\alpha_7$ ) potrebbe contribuire ad alleviare gli effetti collaterali, come la perdita di memoria, ai quali un paziente in cura con antagonisti nicotinici va inevitabilmente incontro.

Dal momento che i risultati ottenuti nello *Zebrafish* sembravano molto promettenti, il CC4 è stato testato anche nel ratto, per verificare se anche in questo modello animale fosse efficace nel contrastare il *reward* da nicotina. A tale scopo, l'effetto rinforzante della nicotina, della citisina e del CC4 è stato testato utilizzando due metodiche: il test della CPP e quello dell'*Intracerebroventricular Self Administration* (ICSA). La CPP nel ratto si basa sullo stesso principio di quella effettuata nello *Zebrafish*; l'ICSA consente invece all'animale di scegliere se somministrarsi la sostanza in esame o il veicolo mediante pressione di 2 leve. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la nicotina ( $0.01\text{-}0.2 \text{ mg/kg}$ ), la citisina ( $0.1\text{-}2.5 \text{ mg/kg}$ ) e il CC4 ( $0.05\text{-}10 \text{ mg/kg}$ ) sono in grado di indurre di per sè CPP in modo dose-dipendente; parallelamente anche

l'ICSA ha evidenziato che questi composti vengono autosomministrati in maniera dose-dipendente. Inoltre, il pretrattamento con mecamilamina (10 mg/kg) e CC4 (5 mg/kg), somministrate a dosi non rinforzanti, è risultato in grado di ridurre in modo significativo l'effetto di *reward* della nicotina sia nella CPP sia nell'ICSA, confermando i risultati ottenuti nello *Zebrafish*.

Infine per verificare che le sostanze utilizzate, anche nel ratto, non influissero sull'attività motoria, è stata monitorata la capacità motoria spontanea nell'arco di 30 minuti, rilevando il numero di movimenti orizzontali e verticali eseguiti in un'*activity cage*. I risultati ottenuti hanno dimostrato che questi composti non interferiscono sull'attività motoria spontanea degli animali. Questi risultati hanno dimostrato che anche nel ratto, come nello *Zebrafish*, il CC4 si profila come un nuovo composto  $\alpha_4\beta_2$  selettivo, che quindi potrebbe trovare un impiego terapeutico nell'*addiction* da nicotina.

La nicotina è stata somministrata mediante una via che non riproduceva l'assunzione dell'uomo. Oltretutto, la dipendenza non è data solo dalla nicotina ma dall'insieme di quasi 4.000 sostanze che costituiscono il fumo di sigaretta. Inoltre, recentemente è stato introdotto sul mercato un nuovo dispositivo elettronico che si sta diffondendo in tutto il mondo: la sigaretta elettronica. Questo dispositivo è stato inventato con lo scopo di imitare il sistema di inalazione della nicotina con la sigaretta tradizionale, evitando gli effetti dannosi derivanti dalla combustione del tabacco. Tuttavia al giorno d'oggi, mancano studi a lungo termine circa gli effetti fisici e l'eventuale impatto sulla salute provocato dalla cessazione del suo utilizzo. Inoltre, le metodiche presenti oggi in letteratura non riproducono la via di assunzione usata dall'uomo, risultano invasive, rendono i risultati ottenuti poco sovrapponibili a quelli dell'uomo e non consentono di studiare le differenze date dall'assunzione del fumo delle sigarette tradizionali rispetto al vapore delle sigarette elettroniche. Per questo motivo, ulteriore scopo di questo studio è stato quello di mettere a punto un nuovo modello murino di dipendenza da nicotina, che rendesse possibile lo studio diversificato degli effetti sia della sigaretta tradizionale sia di quella elettronica. È stato quindi validato un nuovo modello murino che prevedesse l'assunzione di nicotina attraverso il fumo di sigaretta tradizionale o il vapore della sigaretta elettronica, mimando il più possibile l'assunzione umana, ed è stato caratterizzato sia da un punto di vista comportamentale che biochimico, studiando gli effetti dell'esposizione a breve e a lungo termine. A questo scopo si è stabilito di sottoporre topi maschi del ceppo Balb/c a 7 settimane di esposizione al fumo di 7 sigarette tradizionali o al vapore della sigaretta elettronica, contenente lo stesso quantitativo di nicotina delle sigarette tradizionali (5.6 mg), per 3 volte al dì, per 5 giorni a settimana, mediante un ventilatore meccanico in grado di saturare l'ambiente in cui



venivano posti i topi; parallelamente, altri animali sono stati esposti ad aria semplice mediante lo stesso tipo di apparecchiatura (gruppo controllo). Durante il periodo di esposizione è stato monitorato l'andamento del peso corporeo e il relativo consumo di cibo: solo il gruppo esposto al fumo della sigaretta tradizionale ha mostrato un rallentamento nell'accrescimento corporeo e un minore consumo di cibo.

Al fine di verificare e monitorare la quantità di nicotina aspirata e metabolizzata, in collaborazione con l'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, dopo 1, 4 e 7 settimane di esposizione sono stati registrati i livelli di cotinina, principale metabolita della nicotina, presenti nelle urine degli animali. I risultati ottenuti hanno dimostrato che durante tutto il periodo di esposizione, sia il gruppo di topi esposti al fumo di sigaretta tradizionale che quello esposto al vapore della sigaretta elettronica mostrano un aumento statisticamente significativo di tale parametro, rispetto al gruppo controllo. Al termine delle 7 settimane di esposizione, in collaborazione con il laboratorio della Dott.ssa Gotti, sono stati misurati i livelli di nicotina e di cotinina presenti nel cervello degli animali esposti al fumo della sigaretta tradizionale, al vapore della sigaretta elettronica o ad aria. I risultati ottenuti hanno evidenziato come i topi esposti al vapore della sigaretta elettronica mostrano un aumento statisticamente significativo dei livelli di nicotina cerebrale, mentre il gruppo esposto al fumo della sigaretta tradizionale mostra un incremento significativo della concentrazione di cotinina.

Per la valutazione della sindrome astinenziale precipitata, immediatamente dopo l'ultima esposizione, un gruppo di animali è stato trattato con mecamilamina (1 mg/kg) per via sottocutanea e ne è stato valutato il comportamento e l'attività motoria. L'osservazione del comportamento ha evidenziato la presenza di segni tipici di una sindrome astinenziale nel gruppo esposto alla sigaretta tradizionale e di sintomi in entrambi i gruppi esposti a vapore o a fumo. L'attività motoria, registrata per 15 minuti in un'*activity cage*, evidenzia un decremento dei movimenti orizzontali e verticali solo negli animali esposti al fumo della sigaretta tradizionale.

Dal momento che studi in letteratura ci indicano che le proprietà rinforzanti della nicotina sono primariamente dovute ad un'aumentata neurotrasmissione via nAChRs nel *pathway* dopaminergico mesolimbico, sono stati eseguiti studi di *binding*. In particolar modo è stato evidenziato se si verificasse o meno un'alterazione del numero dei recettori nicotinici, soprattutto di quello del sottotipo recettoriale coinvolto nel processo di *addiction*: l' $\alpha_4\beta_2$  a livello cerebrale. Gli studi di *binding* recettoriale, effettuati al termine delle 7 settimane di esposizione, condotti in collaborazione con la Dott.ssa Gotti, hanno evidenziato una significativa *upregulation* dei recettori nicotinici a livello della corteccia cerebrale, del *nucleus accumbens* e dell'ippocampo, in particolare del sottotipo recettoriale  $\alpha_4\beta_2$ , sia negli animali esposti al fumo della sigaretta

tradizionale che negli animali esposti al vapore della sigaretta elettronica.

Per la valutazione della sindrome astinenziale spontanea, un altro gruppo di animali è stato sottoposto a differenti test comportamentali a partire dalle 24 ore fino ai 90 giorni dal termine dell'esposizione.

La valutazione dell'attività motoria spontanea non ha evidenziato nessuna alterazione tra i diversi gruppi di animali. La presenza di *deficits* cognitivi, valutata mediante il test dello *Spatial Object Recognition*, ha rilevato una difficoltà nel riconoscere la nuova posizione spaziale di un oggetto, a partire da 24 ore fino ad almeno 90 giorni di astinenza, in topi esposti al fumo della sigaretta tradizionale o al vapore della sigaretta elettronica. Alterazioni a livello emozionale, sono state valutate utilizzando l'*Elevated Plus Maze* e il *Marble burying test* per l'analisi dell'ansia, e il *Tail Suspension test* e il *Sucrose Preference test*, per lo studio di uno stato simil-depressivo. Dai nostri risultati emerge che negli animali esposti ai due tipi di sigaretta compare uno stato ansioso a partire da 24 ore, seguito, dopo 60 giorni per gli animali esposti al vapore della sigaretta elettronica e dopo 90 giorni per il gruppo esposto al fumo della sigaretta tradizionale, dalla comparsa di uno stato simil-depressivo.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti con la messa a punto di questo modello murino, questa innovativa procedura di esposizione da noi utilizzata si dimostra essere un modello valido per lo studio della dipendenza da nicotina, indotta sia dal fumo di sigaretta tradizionale che dal vapore della sigaretta elettronica.

Studi futuri saranno volti a proseguire l'analisi degli effetti dell'esposizione al fumo e al vapore per un arco di tempo più ampio (almeno 6 mesi); inoltre, verrà testata la capacità dei nuovi agonisti parziali nicotinici, la cui validità ed efficacia è già stata provata nello *Zebrafish* e nel ratto, anche in questo modello di esposizione che risulta essere più vicino all'uomo, per un potenziale futuro impiego terapeutico nello *smoking cessation*.

# *Introduzione*

# *La tossicodipendenza*

La tossicodipendenza è una complessa disfunzione del sistema nervoso centrale caratterizzata dalla necessità irrefrenabile e frequente di assumere una sostanza (in genere una droga) malgrado il danno fisico, psicologico, affettivo, emotivo e sociale che tale assunzione possa comportare come conseguenza. E' una sindrome generata dall'uso di sostanze stupefacenti e psicotrope, molte delle quali letali. La tossicodipendenza può diventare una malattia cronica con un alto tasso di recidività, anche dopo lunghi periodi di astinenza (Fiore, 2000). Infatti, un gruppo di esperti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito la tossicodipendenza come “uno stato psichico e talvolta anche fisico, risultante dall'interazione tra un organismo vivente ed una droga, caratterizzato da modificazioni del comportamento e da altre reazioni, che comprendono la pulsione ad assumere la droga in maniera continua o periodica, al fine di ritrovarne gli effetti psichici e di evitare i disturbi causati dalla sua privazione” (OMS, 1973). Nella suddetta definizione è implicito, anche se non espressamente dichiarato, il concetto che la tossicodipendenza comporta l'incapacità di mantenere uno stato di benessere fisico e mentale senza l'assunzione di una droga. Ne deriva che la tossicodipendenza è una malattia che, in maniera paradossale ma non insolita, è alleviata dallo stesso agente che ne costituisce la causa.

Le sostanze d'abuso (come gli oppiacei, la cocaina, l'alcool, etc), pur agendo con meccanismi farmacologici diversi, hanno in comune alcune caratteristiche:

- 1) possiedono spiccate proprietà gratificanti, sostituendosi ed agendo a livello cerebrale con meccanismi simili agli stimoli primari;
- 2) danno origine ad un vero e proprio disturbo della motivazione nel momento stesso in cui determinano la dipendenza;
- 3) sono tutte in grado di agire da rinforzo positivo, soprattutto sul comportamento di “procacciamento” della sostanza e inducono nell'uomo e nell'animale modalità di autosomministrazione e di assunzione simili, facendo supporre che i meccanismi biologici implicati non sono variati nel processo filogenetico evolutivo (Le Doux, 2002; Charlet *et al.*, 2013; Soderpalm *et al.*, 2013).

Le sostanze d'abuso sono perciò in grado di alterare le funzioni cerebrali che controllano il desiderio, l'umore, i processi dell'apprendimento e della memoria, le capacità di giudizio e la volontà.

Oggi sappiamo, inoltre, che l'uso cronico delle droghe altera le funzioni e la struttura dei neuroni di questi sistemi provocando cambiamenti che persistono per settimane, mesi, anni dopo l'assunzione dell'ultima dose e che sono alla base delle ricadute. Queste stesse alterazioni riducono gli effetti piacevoli dell'assunzione delle sostanze, aumentando contemporaneamente il desiderio spasmodico di riassumerle, facendo cadere il tossicodipendente in una spirale

distruttiva.

Le metodiche comportamentali maggiormente utilizzate nello studio delle sostanze d'abuso nei roditori sono il test della *Conditioned Place Preference* (CPP) e il test dell'autosomministrazione.

Nel test della CPP l'animale impara ad associare un iniziale stimolo/ambiente neutro (stimolo condizionante) all'assunzione della droga (stimolo incondizionato), e la preferenza è dedotta dalla differenza del tempo speso dall'animale nell'ambiente associato alla droga prima e dopo le sessioni condizionanti (Tzschentke, 1998). Ad esempio è stato dimostrato che diverse sostanze d'abuso come la cocaina, inducono CPP nei ratti (Prus *et al.*, 2009).

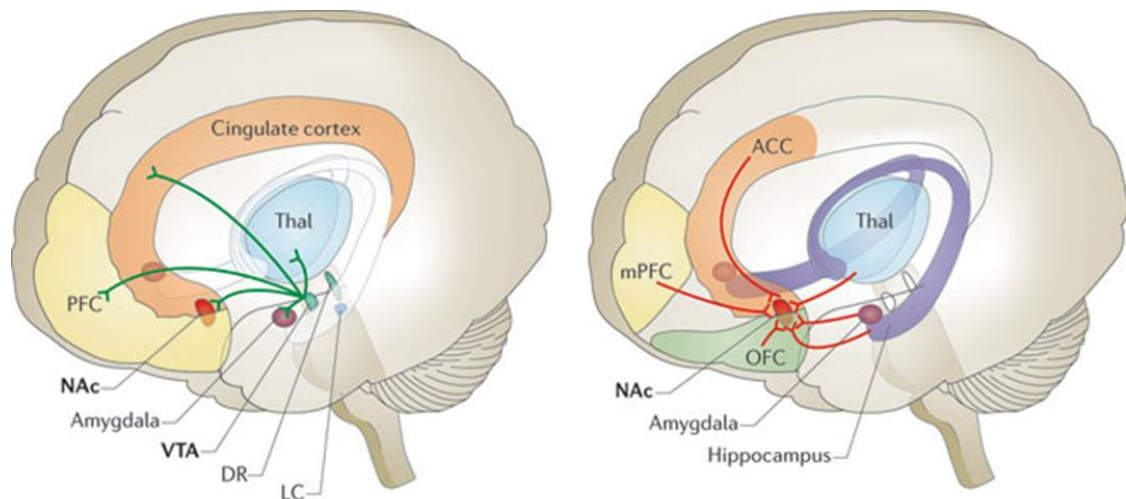
Per quanto riguarda il test dell'autosomministrazione, l'animale acquisisce la capacità di premere due leve e di associare la pressione della leva all'erogazione di acqua. Ogni volta che l'animale preme la leva, verrà infusa una determinata sostanza nei ventricoli del cervello. Ad esempio è stata ripetutamente dimostrata nella scimmia l'autosomministrazione intracerebroventricolare di  $\Delta^9$ -tetracannabinolo ( $\Delta^9$ -THC) (Tanda *et al.*, 2000; Justinova *et al.*, 2003, 2004) e nei roditori l'autosomministrazione di agonisti cannabinoidi (Braidà *et al.*, 2001; Fattore *et al.*, 2001).

## *Sistemi cerebrali coinvolti nelle dipendenze*

I centri cerebrali che controllano i meccanismi della gratificazione furono identificati nel 1954 da James Olds e Peter Milner. Essi osservarono che l'autostimolazione elettrica, tramite comportamento volontario e operante sulle aree cerebrali del sistema limbico, poteva dar luogo a un forte stimolo gratificante. Successivamente Wolfram Schultz e i suoi collaboratori dimostrarono che, a livello del mesencefalo, il *firing* dei neuroni dopaminergici aumentava in risposta agli stimoli di *reward* nei primati non umani (Schultz *et al.*; 1997, Schultz, 1998). In seguito, queste prime evidenze sperimentali furono dimostrate anche da studi di *imaging* condotti in umani (D'Ardenne *et al.*, 2008).

Oggi è noto che il sistema dopaminergico mesolimbico, soprattutto l'area tegmentale ventrale (VTA), e le strutture annesse al sistema limbico, quali il *nucleus accumbens* (NAC) e la corteccia prefrontale (PFC), è pesantemente coinvolto nei processi di ricompensa e di *addiction* (Lupica *et al.*, 2004; Joshua *et al.*, 2009; Schulz, 2013). Il circuito della ricompensa del cervello è costituito da neuroni per lo più dopaminergici e origina a livello di due nuclei del tronco encefalico, A9 e A10. Dal nucleo A9 tali neuroni proiettano verso il *caudato-putamen*; dal nucleo A10 (VTA) proiettano in una struttura complessa denominata amigdala estesa, che comprende il sistema mesolimbico (formato dal *nucleus accumbens*, dalla stria terminale e dal tubercolo olfattorio) e il

sistema mesocorticale (formato da aree della corteccia che controllano le funzioni cognitive) (Everitt *et al.*, 1999; Koob *et al.*, 2005; Hyman *et al.*, 2006; Bjorklund *et al.*, 2007; Koob *et al.*, 2010; Stuber *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2013; Nieh *et al.*, 2013, Taber *et al.*, 2014). Questi neurocircuiti risultano coinvolti nella risposta condizionata dello sviluppo della tossicodipendenza, nel desiderio e nella ricaduta (Camì *et al.*, 2003).



**Figura A:** Circuito di *reward*

Nature Reviews | Neuroscience

La neurotrasmissione dopaminergica in queste aree aumenta nelle ricompense naturali come il cibo, l'acqua, il sesso o anche di seguito all'assunzione di sostanze d'abuso, come gli oppiacei, l'etanolo o gli psicostimolanti (Spanagel *et al.*, 1999; Charlet *et al.*, 2013; Soderpalm *et al.*, 2013). Esiste però una profonda differenza fra gli effetti sulla trasmissione dopaminergica indotta nel sistema limbico dagli stimoli gratificanti naturali, come ad esempio il cibo, rispetto alle sostanze d'abuso. Già nel 1988, Di Chiara e collaboratori avevano dimostrato che l'attivazione della dopamina da parte degli stimoli naturali è caratterizzata dall'instaurarsi di una rapida abitudine, per cui lo stesso stimolo ripetuto più volte e a breve distanza di tempo non provoca più nelle successive somministrazioni un aumento di questo neurotrasmettitore. Questo spiega perché tutti i nuovi stimoli vengono percepiti dall'uomo e dall'animale come maggiormente appetibili. Le sostanze d'abuso, anche se somministrate ripetutamente, invece, agiscono aumentando sempre la trasmissione dopaminergica tanto che sul piano comportamentale e cognitivo l'esperienza del loro effetto può diventare per l'uomo un fine primario dell'esistenza al pari, se non superiore, a quello degli stimoli naturali, con la caratteristica di non essere soggetto ad abitudine. Tuttavia, non è ancora noto come sia gli stimoli naturali che soprattutto le sostanze d'abuso siano in grado di acquisire queste proprietà incentive

che coinvolgono in particolar modo la sfera cognitiva. Sicuramente le connessioni neurologiche fra il sistema limbico, l'amigdala e la corteccia prefrontale, le aree deputate alle emozioni, all'immagazzinamento della memoria, al ragionamento e alle capacità decisionali, sono alla base di questo processo.

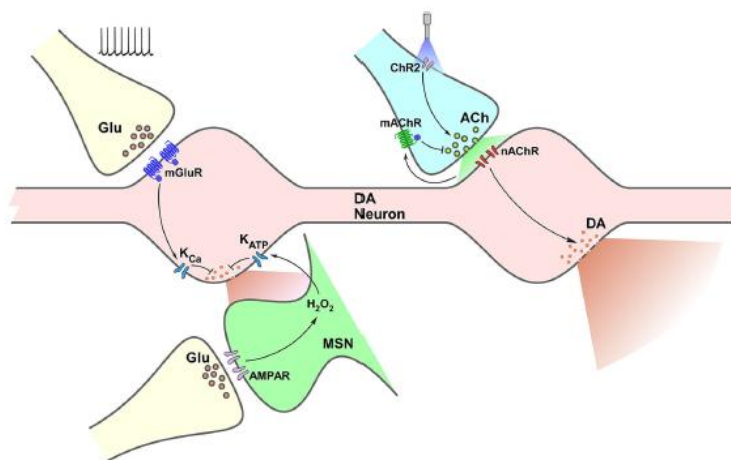
I recenti progressi nella comprensione dei meccanismi alla base dell'*addiction* confermano l'importanza del ruolo della dopamina anche per l'apprendimento *reward*-dipendente e forniscono consistenti evidenze a favore dell'ipotesi dell'*addiction*, quale fenomeno conseguente a un apprendimento patologico (Aguas, 2007). I maggiori substrati del persistente comportamento compulsivo delle sostanze d'abuso sono stati individuati, a livello cellulare e molecolare, in quei meccanismi che regolano i normali processi di memoria associativa a lungo termine nelle strutture correlate al *reward* (striato ventrale, striato dorsale, corteccia prefrontale) e che ricevono le proiezioni dai neuroni dopaminergici mesencefalici.

Numerosi studi hanno inoltre dimostrato come, oltre al sistema dopaminergico mesolimbico che controlla la motivazione per la ricerca dello stimolo gratificante, anche il sistema neurotrasmettitoriale oppioide e il sistema glutammatergico, rivestono un ruolo fondamentale nel processo dell'*addiction* (Aguas, 2007).

Infatti, il sistema oppioide media i processi di gratificazione conseguenti al consumo della sostanza, utilizzando come neurotrasmettitore i neuropeptidi oppioidi, le endorfine, le enkefaline e le dinorfine. Al contrario, quello glutammatergico modula il rilascio della dopamina a livello del sistema nervoso centrale, utilizzando come neurotrasmettitore il glutammato (Imperato *et al.*, 1990; Chermany *et al.*, 1991; Krebs *et al.*, 1991; Desce *et al.*, 1992). Quando le sostanze d'abuso aumentano il rilascio di dopamina a livello della VTA e del *nucleus accumbens*, sono in grado di modificare, per diversi giorni, anche la risposta al glutammato. Infatti, studi su modelli animali hanno dimostrato che i cambiamenti della sensibilità al glutammato a livello del circuito della gratificazione aumentano il rilascio di dopamina dalla VTA e la risposta della dopamina nel *nucleus accumbens*. Sembra che proprio questa alterata sensibilità al glutammato rinforzi le vie neuronali che collegano il ricordo dell'assunzione di droga a un elevato appagamento, alimentando il desiderio di ricerca della sostanza. Non è ancora noto come si verifica questa alterazione della sensibilità al glutammato nei circuiti della gratificazione, ma si è visto che questo neurotrasmettitore a livello dei neuroni dell'ippocampo, attivato da stimoli specifici a breve termine, dà luogo al fenomeno del *long term potentiation* (LTP), determinando così un aumento della risposta al glutammato per ore. Questo fenomeno, implicato nella formazione della memoria, sembra mediato dal traffico di alcuni recettori che dai "depositi" intracellulari, dove solitamente sono inattivi, raggiungono la membrana del neurone, dove reagiscono al



glutammato rilasciato nelle sinapsi, attivando dei geni che modificano la plasticità della cellula (Calabresi *et al.*, 1997) favorendo di conseguenza l'apprendimento associativo. Quindi, proprio l'interazione dopamina-glutammato nel *network* cortico-striatale, e le conseguenze di tale interazione a livello intracellulare e molecolare, svolge un ruolo chiave nei processi di apprendimento e gratificazione (Fuxe *et al.*, 2012). Questo dimostra che le sostanze d'abuso esercitano i loro effetti attraverso *pathways* e meccanismi in comune che sono importanti per i processi di apprendimento di stimoli dotati di proprietà di rinforzo e la cui disregolazione sarebbe alla base dello sviluppo di comportamenti compulsivi caratteristici della tossicodipendenza (*addictive behaviour*).



**Figura B:** Interazione tra i neuroni dopaminergici e quelli glutamatergici (Cachope *et al.*, 2014)

In particolare, i neurocircuiti principali implicati nei comportamenti di appetizione e ricerca di una sostanza sono tre:

- 1) un circuito che media gli effetti di rinforzo di una sostanza e che integra gli stimoli gratificanti o avversivi ad essa associata. Questo è il cosiddetto “circuito dell’amigdala estesa” che include il nucleo centrale dell’amigdala, il nucleo della stria terminale e la regione *shell* (ossia la parte più periferica) del *nucleus accumbens*. Si ipotizza, in questo circuito, il ruolo di diversi neuromodulatori, tra i quali la dopamina, i peptidi oppioidi e la noradrenalina;
- 2) un circuito implicato nelle ricadute, che nei modelli animali sono rappresentati dalla ripresa di un comportamento di autosomministrazione indotto dall’esposizione alla sostanza o a stimoli ad essa associati e che sarebbe indice di *craving*. Questo circuito comprende la corteccia prefrontale e le regioni ad essa annesse (corteccia cingolata anteriore, prefrontale, orbitofrontale) e la regione baso-laterale dell’amigdala;
- 3) un circuito implicato nella ricerca della sostanza (“compulsività”) che comprende il *nucleus accumbens*, il pallido-ventrale, il talamo, la corteccia orbito-frontale e la corteccia motoria.

Si ipotizza che il *nucleo accumbens* costituisca un'interfaccia funzionale fra il "sistema dell'amigdala estesa" e il sistema striato (ossia il circuito striato ventrale - pallido ventrale - talamo corteccia) (Rice *et al.*, 2008; Tritsch *et al.*, 2012).

Presumibilmente sono anche implicate altre strutture come l'ippocampo, che registra il ricordo delle esperienze e le vie nervose dopaminergiche e noradrenergiche delle aree corticali (Koob *et al.*, 2006; Gamberana, 2007). Infatti dalla letteratura è noto che la via mesolimbica dopaminergica si attiva anche nelle fasi di apprendimento e di stabilizzazione dei comportamenti di dipendenza dovuti all'assunzione delle droghe e risulta coinvolta anche in alcune patologie psichiatriche quali il disturbo ossessivo-compulsivo, il deficit motivazionale della depressione e il morbo di Alzheimer (Nestler, 2001; DeLong *et al.*, 2007; Money *et al.*, 2013; Ford, 2014). L'esistenza di queste connessioni anatomiche può spiegare in parte un altro fenomeno, tipico delle sostanze d'abuso, che osserviamo spesso nella clinica delle dipendenze: l'apprendimento incentivo. Questo meccanismo è caratterizzato dal fatto che stimoli neutri o secondari di varia natura, come un volto, una situazione, associati ripetutamente agli effetti gratificanti delle sostanze d'abuso, possono diventare capaci di per sé di scatenare un intenso desiderio della sostanza (*craving*) anche a distanza di anni dall'ultima assunzione, portando alla ricaduta. L'apprendimento incentivo, non avviene nel caso degli stimoli gratificanti naturali, per cui uno stimolo neutro ad essi associato rimane tale senza riuscire a scatenare *craving* (Robinson *et al.*, 1993). Il *craving*, definito come un forte e irrefrenabile desiderio di assumere una sostanza o più in generale di soddisfare un bisogno, può essere scatenato dalla droga o dalla presenza di uno stimolo neutro o secondario, ripetutamente associato all'effetto gratificante della stessa. Dal punto di vista neurobiologico i meccanismi di controllo del *craving* risiedono in alcune aree cerebrali come la corteccia prefrontale, il *nucleus accumbens*, l'ippocampo e l'amigdala. Si ipotizza che l'aumento della trasmissione dopaminergica in tali aree indotta dalle sostanze d'abuso si accompagna a un potenziamento delle proprietà emozionali e motivazionali delle stesse. La dopamina, quindi, sarebbe in grado di modulare, attraverso meccanismi molecolari e cellulari, l'archiviazione delle informazioni (in questo caso le sensazioni piacevoli indotte dalle droghe) a livello della corteccia cerebrale. In questo modo, le sostanze d'abuso, attraverso un potenziamento della trasmissione dopaminergica mesolimbica-corticale e del rilascio di determinati fattori, come l'ormone dello stress, indurrebbe nell'individuo un rinforzo nella memorizzazione degli effetti gratificanti indotti dal loro uso. In generale, la sequenza degli eventi che portano un individuo alla dipendenza potrebbe essere suddivisa in tre fasi che si fondano su:

- 1) l'effetto acuto o cronico delle sostanze stupefacenti;

- 2) l'interferenza di questo effetto coi meccanismi di apprendimento o memoria a lungo termine;
- 3) le conseguenze che determinano la condizione di autosomministrazione delle sostanze che possono essere di tipo cellulare, molecolare e morfologico.

Il circuito della gratificazione appare quindi molto complesso e si integra con varie regioni cerebrali, note essere necessarie per caratterizzare emotivamente la risposta dell'individuo verso attività piacevoli.

La tossicodipendenza è quindi considerata come un disordine neuroadattativo caratterizzato da disregolazione del sistema mesocorticolimbico dopaminergico di ricompensa (Nestler *et al.*, 1996).

## Le basi molecolari delle dipendenze

Per quanto riguarda gli studi a livello molecolare, attualmente la Ricerca scientifica è impegnata nell'individuare il *marker* biochimico che potrebbe mettere in relazione eventi, che avvengono in acuto a livello delle sinapsi cellulari, ma che comportano conseguenze a lungo termine, come la trascrizione dell'espressione genica dei processi di apprendimento e della plasticità sinaptica.

Ad esempio nei meccanismi di tossicodipendenza e ricaduta sembrano giocare un ruolo cruciale le chinasi che regolano il segnale extracellulare (*extracellular signal-regulated kinases, ERK*). Queste proteine appartengono alla famiglia delle proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPKs) e risultano coinvolte nella regolazione di molti processi tra cui la proliferazione cellulare, il differenziamento, la crescita e la morte (Kyosseva, 2004). Le *ERK* sono espresse in tutto il cervello (Ortiz *et al.*, 1995) e risultano particolarmente abbondanti nel sistema mesocorticolimbico dopaminergico; inoltre l'attivazione di queste chinasi nelle aree mesocorticolimbiche risponde specificatamente alle sostanze d'abuso (Valjent *et al.*, 2004; Corbillé *et al.*, 2007). Il sistema mesolimbico dopaminergico è criticamente coinvolto nell'attivazione del percorso del segnale di *ERK*. Dal momento che l'attivazione di *ERK* è un elemento chiave nel processo molecolare di ripristino della CPP e dell'autosomministrazione, si sostiene che la manipolazione farmacologica del percorso di *ERK* sia una strategia potenziale per il trattamento della tossicodipendenza (Zhai *et al.*, 2008).

Tuttavia, mentre si sono raggiunti risultati significativi nella comprensione dei meccanismi e dei substrati molecolari comuni all'*addiction*, all'apprendimento e alla memoria, per quel che riguarda gli effetti immediati di uno stimolo, non è altrettanto chiaro quali siano i substrati

coinvolti nel produrre cambiamenti stabili a livello cerebrale e che comportano modificazioni comportamentali permanenti, tipiche delle fasi avanzate dell'*addiction*. Sono stati effettuati studi riguardo alcuni fattori di trascrizione, che sono le proteine che regolano l'espressione o l'attività di geni specifici e dunque il comportamento globale della cellula nervosa, tuttavia non è ancora chiaro quale sia il processo che porti all'attivazione di questi fattori.

Quando un individuo consuma sostanze d'abuso, la concentrazione di dopamina nel *nucleus accumbens* aumenta e stimola i recettori D1 e D2 accoppiati a proteine G. Le cellule che rispondono a questo neurotrasmettitore sono indotte ad aumentare la produzione intracellulare di un altro messaggero, l'AMP ciclico. Questo secondo messaggero a sua volta attiva numerose chinasi quali la proteina chinasi A (PKA), la proteina chinasi C (PKC), la chinasi calcio-modulina e le chinasi regolate dai segnali extracellulari (ERK, MAPK, RSK) (Sweatt, 2004). Le chinasi agiscono modificando il controllo dei flussi dello ione  $Ca^{++}$  e l'attivazione di numerosi elementi trascrizionali quali CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*), che è un fattore di trascrizione (Carlezon *et al.*, 2005). CREB è anche definito “*detector di coincidenza molecolare*” ed è coinvolto nei processi dell'apprendimento associativo e della plasticità neuronale. Una volta attivato con la fosforilazione, CREB dimerizza e i suoi dimeri si legano a specifiche sequenze del DNA denominate CRE (*cAMP Response Elements*) nelle regioni regolatorie dei geni bersaglio stimolandoli a produrre le proteine sinaptiche per cui codificano. Alcune di queste proteine inducono la produzione di oppioidi, come ad esempio la dinorfina, che, a loro volta, agiscono modulando l'attività dei circuiti neuronali della gratificazione, contribuendo allo stabilirsi nel consumatore dei fenomeni di tolleranza e dipendenza.

Inoltre, è stato dimostrato che in alcune aree cerebrali, come il *nucleus accumbens*, CREB non solo è implicato nei processi mnemonici e dell'apprendimento ma è attivato anche direttamente dalle sostanze d'abuso, quindi risulta implicato anche nell'*addiction*. Infatti, nel 2002 Shaw-Lutchman e collaboratori hanno dimostrato che CREB nel *nucleus accumbens* viene indotto dalla somministrazione cronica di cocaina, di oppiacei e di altri psicostimolanti. Un aumento dell'attivazione di CREB nel *nucleus accumbens* riduce le risposte comportamentali degli animali agli effetti motivazionali positivi della cocaina e degli oppiacei (Carlezon *et al.*, 1998; Barrot *et al.*, 2002).

Tuttavia, CREB da solo non basta a spiegare la lunga durata dei cambiamenti comportamentali che si manifestano nei tossicodipendenti. Infatti l'attivazione di CREB riscontrabile dopo un periodo di somministrazione cronica, torna alla norma dopo un breve periodo di astinenza: ciò suggerisce che l'attivazione di questo elemento trascrizionale sia responsabile, attraverso la regolazione di altri geni, dell'innescare di cambiamenti molecolari stabili associati all'*addiction*,

all'apprendimento e alla memoria.

Nel 2001 Nestler ha dimostrato che, dopo somministrazione cronica di numerose sostanze d'abuso, a livello del *nucleus accumbens*, dello striato dorsale, dell'amigdala e della corteccia prefrontale, viene attivato il Delta FosB, fattore di trascrizione della famiglia di FOS. Elevati livelli di FosB, che è una proteina molto stabile, possono rimanere nel cervello per mesi dopo la cessazione dell'esposizione cronica alla sostanza. Tuttavia, i cambiamenti comportamentali che si manifestano nei tossicodipendenti, possono perdurare per tempi molto più lunghi rispetto alla durata del segnale di Delta FosB a livello cerebrale (Nestler *et al.*, 2008; Perrotti *et al.*, 2008). Dati recenti suggeriscono l'esistenza di un altro meccanismo attraverso cui la sensibilità potrebbe persistere anche dopo il ritorno a livelli normali di Delta FosB.

Inoltre, l'esposizione cronica ad alcune sostanze, tra cui la cocaina, è associata all'aumento della densità delle spine dendritiche nel *nucleus accumbens* e nell'ippocampo (McEwen, 1999; Robinson *et al.*, 2004) ma anche in questo caso i cambiamenti a livello delle spine dendritiche non hanno la caratteristica di durare sufficientemente a lungo da rendere conto dei fenomeni comportamentali a cui potrebbero essere associati. Sicuramente le nuove connessioni con gli altri neuroni sembrerebbero in parte responsabili dell'amplificazione dello scambio dei segnali tra le cellule; questo sistema potenziato risulterebbe, in parte, responsabile della reazione esagerata del cervello agli stimoli che ricordano la droga e potrebbe essere responsabile anche delle ricadute nella tossicodipendenza e della cronicizzazione dell'uso delle sostanze (Centoze *et al.*, 1997).

Tuttavia, la natura delle modificazioni molecolari e cellulari che può rendere conto dei durevoli cambiamenti comportamentali associati all'*addiction*, all'apprendimento e alla memoria risulta in gran parte ancora ignota.

Le sostanze d'abuso hanno profondi effetti sul *signaling* mediato dalle G proteine e in tal modo possono alterare le risposte neuronali a numerosi stimoli extracellulari (Hyman, 1996; Hyman *et al.*, 2006).

Infatti, l'esposizione ripetuta e cronica alle sostanze d'abuso altera in maniera significativa le proteine sinaptiche associate alle sinapsi dopaminergiche e glutammatergiche. Per esempio, dopo trattamento cronico con cocaina nella corteccia prefrontale e nel *nucleus accumbens* si riscontra una durevole *up-regulation* del fattore che attiva la proteina G, il fattore AGS3. Inoltre, è stato dimostrato che, sempre in seguito all'esposizione a cocaina, si verificano alterazioni a carico anche di un'altra famiglia di proteine regolatorie delle proteine G, le RGS: questo potrebbe suggerire che, in generale, le sostanze d'abuso siano responsabili di modificazioni molecolari ad un livello molto precoce del processo di *signaling* intracellulare (Bishop *et al.*, 2002; Rahaman *et al.*, 2003).

Inoltre, è stato dimostrato il ruolo critico delle riduzioni a lungo termine di un'altra proteina, la PSD95, coinvolta nel rimodellamento sinaptico (Yao *et al.*, 2004). In particolare, topi con ridotta espressione di PSD95, dopo trattamento cronico con cocaina, presentano aumentata plasticità sinaptica, misurata come *long term potentiation* (LTP), a livello delle sinapsi glutamatergiche del circuito corteccia prefrontale - *nucleus accumbens*, suggerendo che la *down-regulation* di questa proteina potrebbe contribuire ai processi adattativi a lungo termine dell'*addiction*.

Inoltre, è di grande rilevanza che persino dopo una singola esposizione a sostanze d'abuso possano aver luogo conseguenze a lungo termine; infatti una singola esposizione a cocaina, amfetamina, nicotina o morfina (ma anche una singola esposizione ad un evento stressante) sono in grado di determinare un potenziamento a lungo termine delle correnti AMPA nei neuroni dopaminergici (Saal *et al.*, 2003). Analogamente, una singola esposizione al  $\Delta^9$ -THC è in grado di alterare la plasticità sinaptica sia nel *nucleus accumbens*, sia nell'ippocampo (Mato *et al.*, 2004).

L'instaurarsi di singoli meccanismi adattativi nelle aree cerebrali coinvolte nei meccanismi alla base dei comportamenti motivati e dei processi di apprendimento e memoria suggerisce che una caratteristica fondamentale dell'*addiction* sia proprio quella di essere un processo di nuovo e alterato apprendimento conseguente alla ripetuta autosomministrazione di una sostanza in particolari circostanze e contesti, sia emozionali che ambientali.

# *Il tabagismo*

Il tabagismo, meglio conosciuto come “l’azione del fumare”, è l’atto di bruciare le foglie secche della pianta del tabacco e di inalare il fumo derivato dalla sua combustione per piacere, rituale o come abitudine e dipendenza. Il problema del tabagismo scaturisce dal consumo del tabacco da fumo, prevalentemente in sigarette. Secondo il rapporto “Il fumo in Italia 2014” effettuato i primi mesi del 2014 dalla DOXA per conto dell’Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l’Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, in Italia fumano circa 11.3 milioni di persone (il 22% della popolazione), di cui il 25.4% maschi e il 18.9% femmine. Gli ex-fumatori sono 6.6 milioni (il 12.8%), 4.6 milioni di uomini e 2 milioni di donne. L’analisi della prevalenza del fumo di sigarette tra gli uomini e le donne di varia età mostra che la percentuale di fumatori è ancora superiore a quelle delle fumatrici in tutte le fasce di età. Infatti diversi studi dimostrano che gli uomini e le donne differiscono nel loro comportamento nei confronti del tabacco e la causa fondamentale può essere la differenza nella sensibilità alla nicotina. Gli studi del comportamento sembrano indicare che le donne fumano meno sigarette al giorno, tendono ad usare sigarette con un contenuto minore di nicotina e non inalano tanto profondamente come gli uomini. Se questo si debba a differenze nella sensibilità alla nicotina, è un’importante domanda, alla quale tutt’oggi non c’è una chiara risposta. Alcuni studiosi trovano che le donne possano essere più influenzate da altri fattori, come gli aspetti sensoriali del fumo o fattori sociali.

La classe di età più rappresentativa dei fumatori si trova tra coloro che hanno un’età compresa tra i 25 e i 44 anni (di cui il 32.3% sono uomini, e il 26% donne) tuttavia, il tabagismo sta diventando sempre più diffuso anche tra le giovani generazioni ed in particolare nella fascia di età tra i 15 e i 24 anni, in cui fuma il 20.9% dei maschi e il 16% delle femmine. Il consumo medio di sigarette al giorno si aggira intorno alle 13. Oltre il 70% di fumatori consuma più di 10 sigarette al giorno e il 28.5% più di un pacchetto. Ne fuma meno di 9 soltanto il 26%. Aumentano i forti fumatori, soprattutto tra i giovanissimi. Compare quest’anno un 1,3% di persone che fuma più di 25 sigarette (nel 2013 il dato era pari a zero), dimostrando la gravità del fenomeno. L’indagine effettuata dalla DOXA rileva inoltre che generalmente si inizia a fumare tra i 15 e i 20 anni e il 13.2% anche prima dei 15 anni. La motivazione principale della “caduta nel tabagismo” rimane, costantemente nel tempo, l’influenza dei pari; sono importanti il bisogno di adattamento alle mode, la ricerca di atteggiamenti per darsi contegno e la ricerca di aiuti/stimoli per superare le pressioni dell’ambiente. Nell’adolescente il fumo nel gruppo dei pari può veicolare l’affermazione di sé mediante la progressiva differenziazione delle figure genitoriali e l’appartenenza al gruppo dei coetanei. Anche nell’adulto il fumo può svolgere un ruolo “sociale” importante nelle amicizie, mediante, ad esempio, l’offerta delle sigarette per rompere il ghiaccio o per iniziare una conversazione.



Infine, rispetto alla tipologia di prodotti acquistati si osserva quest'anno il raddoppio della percentuale di fumatori che scelgono le sigarette fatte a mano (18% contro il 9.6% del 2013). Questo dato è confermato anche dall'aumento delle vendite di trinciati (circa 400% rispetto al 2005). Il consumo di sigarette fatte a mano è significativamente più diffuso tra i giovani di età compresa tra i 15 e i 20 anni (34.3%).

Inoltre il fenomeno del tabagismo è in decisa crescita anche nei Paesi in via di sviluppo dove il tabacco rappresenta una delle più importanti coltivazioni e costituisce per alcuni la principale fonte di reddito (Bartecchi *et al.*, 1994; Arricci, 1999).

L'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) definisce il tabacco come una sostanza psicoattiva il cui uso può causare disturbi mentali e comportamentali oltre che fisici. Il tabagismo appartiene, per la sua estensione e per la gravità dei danni alla salute che comporta, ai grandi problemi con i quali la società odierna è chiamata a confrontarsi. Infatti, rappresenta un grande problema di sanità pubblica a livello mondiale ed è uno dei maggiori fattori di rischio nello sviluppo di patologie neoplastiche, cardiovascolari respiratorie, a carico dell'apparato ginecologico e gastrointestinale (in particolare forme tumorali a polmone, faringe, laringe, esofago, pancreas, rene, vescica, cervice uterina e colon) (Siegel, 1993; Agatu *et al.*, 2014). Le conseguenze mediche dell'esposizione al fumo di tabacco, derivano dagli effetti delle sostanze in esse contenute così come dal modo in cui le si assume (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2010).

Secondo i dati dell'OMS il fumo di tabacco rappresenta la seconda causa di morte nel mondo e la principale causa di morte evitabile: è stato infatti calcolato che quasi 6 milioni di persone perdono la vita ogni anno per i danni da tabagismo. In Italia si stima che siano attribuibili al fumo di tabacco dalle 70.000 alle 83.000 morti all'anno, di cui il 25%, è compreso tra i 35 e i 65 anni di età (ISTAT, 2012). Un'indagine dell'*American Cancer Society* su più di un milione di uomini e donne oltre i 35 anni ha rilevato un aumento della mortalità dei fumatori, rispetto a chi non fuma, per neoplasie del polmone, della bocca e delle prime vie respiratorie, della vescica e del pancreas, attribuite al fumo. Per quanto riguarda il cancro al polmone, studi scientifici hanno riconosciuto al fumo di tabacco una percentuale di rischio pari all'85% nell'uomo e al 77% nella donna. Un individuo che fuma per tutta la vita ha il 50% di probabilità di morire per una patologia direttamente correlata al fumo e la sua vita potrebbe non superare un'età compresa tra i 45 e i 54 anni (*US Department of Health and Human Services*, 2014). Il tabagismo, infatti, nei Paesi sviluppati, causa da solo più decessi e malattie di tutti gli altri fattori ambientali insieme, comprendenti l'alcool e le altre droghe, gli incidenti automobilistici e lavorativi, gli incendi, gli avvelenamenti, gli omicidi, i suicidi e l'Aids.

Fra le vittime oltre 600.000 sono non fumatori esposti al fumo passivo, ossia quello che viene inalato involontariamente ed è il principale inquinante degli ambienti chiusi, come la propria casa o i luoghi di lavoro. L'inquinamento ambientale da tabacco (ETS, *Environmental Tobacco Smoke*) è costituito infatti da due parti: il fumo diretto o centrale (*mainstream smoke*) che è quello inspirato ed espirato dal fumatore e il fumo indiretto o laterale (*sidestream smoke*) che si genera dalla combustione di una sigaretta. Il fumo di seconda mano è quindi dato dalla combinazione del fumo indiretto e di quello espirato dal fumatore. Il fumo passivo contiene le stesse sostanze di quello attivo, ma in proporzione diversa; essendo inoltre generato a temperature più basse e in condizioni differenti dal fumo tradizionale, contiene concentrazioni molto più elevate di alcune sostanze irritative, ossidanti e cancerogene. Evidenze scientifiche dimostrano che il fumo involontario sia nocivo per la salute; tuttavia, essendo diluito nell'aria dell'ambiente ha un minore impatto sul non fumatore rispetto al fumo attivo. L'esposizione dipende, inoltre, dal numero dei fumatori e dalle sigarette fumate, dalle dimensioni del luogo in cui ci si trova, dalla mancata ventilazione e dal tempo trascorso nel locale inquinato: più intensa e prolungata è l'esposizione e maggiori sono le conseguenze derivate dalla nocività.

Il fumo non è responsabile solo del tumore al polmone, ma rappresenta anche il principale fattore di rischio per le malattie respiratorie non neoplastiche, fra cui la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) (Andreas *et al.*, 2008) e l'enfisema (Washko *et al.*, 2011). Il fumo di sigaretta è in grado di causare infiammazione e rimodellamento dei tessuti polmonari dei fumatori, fenomeni che sono dovuti, almeno in parte, ad un meccanismo di stress ossidativo, sia direttamente dagli ossidanti contenuti nel fumo di sigaretta stessa sia indirettamente attraverso la risposta infiammatoria. Infatti, il fumo di sigaretta contiene una grande quantità di potenti ossidanti ed è in grado di aumentare la produzione endogena di specie reattive all'ossigeno (ROS) da parte delle cellule delle vie respiratorie, tra cui i macrofagi alveolari ed i neutrofili. Il risultato finale di tale cascata di eventi è la generazione di circoli viziosi che, attraverso meccanismi paracrini e/o autocrini, mantengono ed amplificano i processi infiammatori associati alla BPCO. Nei pazienti con BPCO esiste un'amplificazione della normale risposta infiammatoria al fumo di sigaretta e, l'amplificata risposta di infiammazione cronica causata dal fumo di sigaretta è stata associata ad un aumentato rischio di tumori polmonari (Corti *et al.*, 2004).

Il fumo di sigaretta è inoltre uno dei più importanti fattori di rischio cardiovascolare (Bakhru *et al.*, 2005; Csiszar *et al.*, 2009). Infatti, già negli anni 40' si dimostrò per la prima volta la relazione tra il tabagismo e le malattie cardiocircolatorie. A causa degli effetti della nicotina (restringimento dei vasi sanguigni, aumento dell'adesività delle piastrine, accumulo di placche di

grasso sulle pareti interne dei vasi) è ben documentato come l'abitudine al fumo contribuisca all'aumento della pressione arteriosa, all'alterazione del ritmo cardiaco (aumento della frequenza cardiaca e aritmie) e accresca sostanzialmente il rischio di infarto, di malattie vascolari, di ictus ed emorragia cerebrale (Teo *et al.*, 2006; Thun *et al.*, 2013). Un fumatore ha un rischio di mortalità, soprattutto a causa della coronaropatia, superiore da 3 a 5 volte rispetto a un non fumatore.

In generale, va considerato che la qualità di vita di un fumatore è seriamente compromessa, a causa della maggiore frequenza di patologie respiratorie (tosse, catarro, bronchiti ricorrenti, asma, etc.) e cardiache (ipertensione, ictus, infarto, etc.) che possono limitare le attività della vita quotidiana (Thun *et al.*, 2013). Per quanto riguarda il sesso femminile, diversi studi epidemiologici mostrano che mediamente le fumatrici impiegano più di un anno a concepire, con un consistente ritardo rispetto alle non fumatrici (Weinberg *et al.*, 1989; Rogers, 2008). Si ritiene che l'infertilità e il ritardo nel concepimento siano il risultato dell'influenza del fumo sulla gametogenesi, sulla fecondazione, sul processo di impianto e sulle perdite sub-cliniche molto precoci di embrioni dopo l'impianto. Nelle donne incinte l'inalazione del fumo di tabacco interferisce anche con la somministrazione di ossigeno al feto, determinando un ritardo nello sviluppo del SNC del neonato (Fogelman, 1980; Dwyer *et al.*, 2008; Counotte *et al.*, 2012; Goriounova *et al.*, 2012). Inoltre, le donne che fumano durante la gravidanza hanno maggiori probabilità rispetto alle non fumatrici di avere un parto prematuro ed esiste il rischio che i bambini nati a termine abbiano un basso peso neonatale (Butler *et al.*, 1973; Kallen, 2000; Lindley *et al.*, 2000; DiFranza *et al.*, 2004). In Italia si stima che circa il 20% delle giovani donne fumi (dati ISTAT) e un'uguale percentuale è riscontrabile tra le donne che iniziano una gravidanza. Gli effetti avversi del tabagismo possono manifestarsi in ogni trimestre della gravidanza e fluttuano tra aborti spontanei, nel primo trimestre, fino a tassi elevati di parti prematuri ed una diminuzione nel peso del bambino alla nascita, nell'ultimo trimestre. La diminuzione nel peso, che si osserva nei bambini di madri che fumano, riflette la relazione che quanto più la donna fuma durante la gravidanza, maggiore è la diminuzione nel peso natale infantile (Peterson *et al.*, 2006). Al contrario, le donne che smettono di fumare all'inizio della gravidanza, hanno bambini con pesi simili a quelli le cui madri non fumano (Smedberg *et al.*, 2014).

Il problema del tabagismo interessa sia la persona del fumatore, sia i rapporti sociali tra fumatore e non fumatore. Da una parte c'è il fumatore che, anche se è consapevole dei rischi ai quali va incontro, rivendica la facoltà di assumere una sostanza tossica, ma allo stesso tempo legalmente in commercio ed appartenente ormai ad abitudini quotidiane consolidate (Serpelloni *et al.*, 2005).

Non è secondario, nello stesso tempo, che il godimento di questo bene sia associato a gravi danni per la salute, accertati, solo in epoche relativamente recenti, e riguardanti sia il fumatore, sia chi è esposto passivamente al fumo. Infatti, gli studi scientifici hanno dimostrato che il 70% delle persone sane che vivono accanto ai fumatori soffre di irritazione e infiammazioni oculari, mal di testa, riniti e infiammazioni delle prime vie respiratorie (Hsieh *et al.*, 2014). Nelle persone che già soffrono di malattie cardiovascolari o polmonari (soprattutto se di natura allergica), il fumo passivo può causare crisi asmatiche o spasmi coronarici. I non fumatori che soffrono di ipertensione e hanno un elevato tasso di colesterolo nel sangue, rischiano di sviluppare malattie dell'apparato cardiocircolatorio (aterosclerosi, ischemia, infarto); il rischio di morte per malattie cardiache è superiore di circa il 30% per le persone esposte al fumo passivo in casa. In Italia sono stati condotti numerosi studi sugli effetti del fumo passivo a carico dei bambini e degli adolescenti, e si è rilevato come il fattore principale di esposizione sia il fumo dei genitori (Hisam *et al.*, 2014). I bambini sono particolarmente sensibili agli effetti del fumo perché il loro apparato respiratorio e il sistema immunitario non sono ancora completamente sviluppati. Si calcola che circa il 50% dei bambini italiani è esposto al fumo passivo da almeno un genitore, e questi hanno dal 20 al 40% di probabilità in più di ammalarsi di polmoniti e bronchiti gravi entro il primo anno di vita, sono più soggetti al rischio di tosse, otiti, infezioni dell'orecchio medio, tonsilliti, tracheiti e difficoltà respiratorie, infezioni acute delle basse vie respiratorie (bronchiti e polmoniti) e possono avere un incremento del rischio di asma del 50%. L'esposizione al fumo passivo è stata posta in relazione anche alla sindrome "morte improvvisa" del neonato. Inoltre, i danni possono manifestarsi anche a distanza di tempo: circa il 17% dei tumori polmonari nei non fumatori possono essere la conseguenza di alti livelli di esposizione passiva al fumo durante l'infanzia e l'adolescenza. Inoltre, è dimostrato che l'abitudine al fumo predispone i figli a iniziare a loro volta a fumare. Studi di psicologia infantile hanno rilevato che il bambino piccolo associa l'odore del fumo (soprattutto se a fumare è la madre) ad una sensazione di sicurezza e di affetto.

Il fumo passivo è stato inserito nell'elenco delle sostanze catalogate come sicuramente cancerogene per l'uomo dalla IARC (*International Agency for Research on Cancer*). Diversi studi epidemiologici hanno dimostrato la correlazione fra tumore ed esposizione al fumo passivo, evidenziando come il rischio aumenti in base alla durata dell'esposizione. Secondo tali studi, un non fumatore esposto al fumo del coniuge fumatore aumenta il rischio di cancro polmonare del 30% se è maschio, del 20% se è femmina, mentre l'esposizione al fumo passivo in ambito lavorativo accresce tale rischio del 16-19%.

Un altro problema legato al consumo di tabacco, è il rapporto esistente tra il consumo delle

sigarette e l'aumento della povertà nei paesi in via di sviluppo, lo sfruttamento minorile ed l'impovertimento delle risorse nazionali (Prabhat *et al.*, 2000; Serpelloni *et al.*, 2005). Le importanti direttive nazionali ed europee riguardanti il divieto di pubblicizzare, di sponsorizzare e di promuovere il consumo di tabacco, hanno portato ad una stagnazione nelle vendite delle sigarette in Europa. Ciò ha persuaso le grossi multinazionali, già da diversi anni, ad orientare le loro strategie di promozione al consumo di sigarette, verso un enorme mercato alternativo di potenziali fumatori: gli abitanti dei paesi in via di sviluppo. Tutti i mezzi che nei nostri paesi occidentali sono oramai proibiti, in questi stati sono purtroppo consentiti. Ciò sta provocando inesorabilmente un cambiamento nei comportamenti e negli stili di vita di queste popolazioni. L'OMS avverte che il 50% degli uomini e il 9% delle donne dei paesi in via di sviluppo sono fumatori, contro il 35% degli uomini e il 22% delle donne nei paesi industrializzati. Il consumo di sigarette pro capite l'anno è di 2061 in Polonia, 1849 in Perù e di 1791 in Cina. Si stima che le famiglie povere spendano per i prodotti del tabacco circa il 4-5% di tutto il loro reddito familiare (Beyer *et al.*, 2001). In Bulgaria le famiglie con basso reddito e con la presenza di almeno un fumatore, spendono circa il 10.4% del loro reddito per acquistare sigarette, mentre in Cina i fumatori spendono il 17% del loro reddito familiare. Addirittura in Bangladesh, dove la gente vive con 1 euro al giorno, se i due terzi dei soldi fossero spesi per acquistare cibo anziché sigarette, si potrebbero salvare più di 10 milioni di persone dalla malnutrizione (Efroymsen *et al.*, 2001). Strettamente correlato al tema della povertà, è la diffusione dello sfruttamento minorile nella raccolta e nella lavorazione del tabacco. L'UNICEF stima che nel mondo circa 211 milioni di bambini e bambine sotto i 14 anni invece di andare a scuola, giocare, avere tempo per riposare, lavorano nei campi, nelle discariche, sulla strada, ovunque ci sia l'opportunità di guadagnare qualcosa per aiutare le famiglie. Anche se è impossibile conoscere con precisione quanti bambini lavorano nelle piantagioni di tabacco, si stima che in alcuni dei principali paesi coltivatori (Argentina, Brasile, Cina, India, Indonesia, Malawi e Zimbabwe) le percentuali più elevate di lavoro minorile si collochino proprio nelle industrie di tabacco. L'UNICEF già nel 1990 aveva denunciato che addirittura il 72% dei bambini si occupava a tempo pieno o a tempo parziale della lavorazione di questa pianta. Bambini dai 5 ai 16 anni sono purtroppo costretti a lavorare per contribuire al mantenimento della loro famiglia, perché spesso la loro paga è fondamentale per la sussistenza dell'intero nucleo familiare. In Malawi (Africa), migliaia di coltivatori di tabacco, tra cui moltissimi bambini, sono stati ridotti alla condizione di schiavitù dai loro padroni, che decidono ogni aspetto della loro vita. Maltrattamento, sfruttamento e oppressione sono all'ordine del giorno. In India circa 44 milioni di bambini tra i 5 e i 14 anni lavorano in condizioni di quasi schiavitù, spesso "affittati" dai loro stessi genitori a imprese

industriali o mediatori che ne sfruttano il lavoro fino al limite delle possibilità. Molti di loro lavorano nelle fabbriche che producono “bidi”, la tipica sigaretta indiana che viene preparata a mano, una per una, arrotolata, riempita di tabacco, chiusa e annodata. Dalle testimonianze dei bambini “sfruttati” si viene a conoscenza dei massacranti turni a cui vengono sottoposti: almeno 18 ore al giorno di lavoro in ambienti estremamente pericolosi e a contatto con sostanze nocive. Tali condizioni non solo compromettono la loro salute (aumentando la probabilità di malattie, ferite, ustioni, avvelenamento da nicotina, malnutrizione), ma a volte sono talmente pericolose da mettere a rischio la vita stessa (Gajalakshmi *et al.*, 2000).

La lavorazione del tabacco, inoltre, necessita di grandi quantità di legno. Ogni anno per questo motivo vengono sacrificati 2.5 milioni di ettari di foresta per produrre e seccare il tabacco. Uno studio recente dell’OMS ha concluso che nei paesi in via di sviluppo circa il 5% del disboscamento generale è dovuto alla coltura di tabacco. Così il Malawi ha già distrutto un terzo delle sue foreste, mentre la Tanzania abbatte il 12% dei suoi alberi ogni anno per la produzione del tabacco. Questa deforestazione accelera la distruzione del suolo, porta alla desertificazione, mette a rischio oltre 2 milioni di specie animali e mette in crisi intere comunità locali che vivono e lavorano in queste zone. Un altro impatto ambientale negativo è quello riferito all’uso di pesticidi nelle coltivazioni di tabacco. In soli 3 mesi vengono effettuati ben 16 applicazioni tra pesticidi, fertilizzanti e antiparassitari. L’uso di queste sostanze, molto tossiche, provoca: avvelenamento dei suoli, delle acque, degli animali; intossicazioni acute nell’uomo; aumento delle nascite di neonati con malformazioni nelle aree in cui i pesticidi vengono usati più frequentemente; uccisione degli insetti che si cibano delle larve delle zanzare responsabili della diffusione della malaria, provocando un riacutizzarsi di questa malattia.

Infine, ma non per ordine d’importanza, si consideri inoltre che il tabagismo, che va obbiettivamente annoverato tra le tossicofilie, è contraddistinto da un grado particolarmente severo della dipendenza che, oltre a configurarsi in sé e per sé come un danno alla salute, ostacola il fumatore che intenda smettere, limitandone la libertà. Ecco allora che, accanto alla facoltà di fumare, emerge la domanda di essere aiutati a smettere quando si vorrebbe, ma da soli non ci si riesce. Il bene della salute, la cui tutela rientra tra i diritti fondamentali della persona umana, va salvaguardato assistendo il fumatore nella sua interezza: non solo, quindi, a livello dei danni, spesso irreparabili, associati alla sua condizione, ma anche curandolo come “malato di dipendenza”.

Per questo motivo, in questi anni, a livello sia nazionale che internazionale, si stanno quindi sempre più sviluppando interventi di prevenzione e di cura per affrontare questa problematica in modo complessivo. Tuttavia, nonostante abbia dimensioni drammatiche, il tabagismo è tuttora

largamente sottovalutato, non solo dalla gente comune, ma spesso anche da chi ha il compito e la responsabilità di combatterlo. La spiegazione va cercata nel fatto che la dannosità del tabagismo consiste prevalentemente in danni organici non incombenti, che potrebbero anche non verificarsi mai. Questo carattere ne facilita l'accettazione fatalistica.

## Il tabacco e le sigarette

Tabacco è il termine generico con cui si fa riferimento ad un genere di piante a foglia corta appartenente alla famiglia delle *Solanacee* originariamente diffuse nel Nord e Sud America. I popoli originari del continente americano impararono a fumare ed esportarono la pratica in Europa, dove divenne in breve tempo enormemente popolare. Dal momento che assunzioni di dosi molto elevate di tabacco provocano effetti di tipo allucinogeno, i nativi americani non lo usavano per scopi ricreativi, ma per provocare stati di *trance* a scopo rituale e religioso.

Il tabacco fu reso popolare tra la nobiltà europea da Caterina de Medici, allora regina madre di Francia, che aveva ricevuto alcune foglie da Jean Nicot. Nel secolo successivo, però, si cercò di arginarne l'uso. Il papa Urbano VIII minacciò la scomunica e lo Zar Michele, nel 1643, e impose che venisse tagliato il naso a chiunque fosse stato visto fiutare il tabacco. Tentativi che andarono a vuoto.

Oggi la diffusione del tabacco ha assunto una dimensione globale, infatti non ci sono paesi al mondo che non ne conoscano l'esistenza e non si trovino quindi a confrontarsi e a gestire, loro malgrado, il fenomeno del tabagismo.

Il tabacco può essere consumato, usato come pesticida organico e, in forma di tartrato di nicotina, è utilizzato in alcuni farmaci. Altre forme di consumo comprendono il tabacco per uso orale (come il tabacco da masticare) o l'aspirazione di polvere di tabacco (tabacco da fiuto); più comunemente viene usato come componente base di sigarette e sigari o bruciato nelle pipe. La nascita della sigaretta si colloca tra il 1820 e il 1830 mentre la sua produzione industriale e la sua commercializzazione iniziano nel 1885.

Il fumo principale delle sigarette, ossia quello che viene assorbito dal fumatore, è un aerosol complesso costituito da una fase vapore e una fase particolata in cui sono distribuiti i costituenti del fumo (Bi *et al.*, 2005; Polzin *et al.*, 2007). La responsabilità della tossicità del fumo di tabacco non è attribuibile ad un unico componente, ma a quel complesso di 12000 sostanze che si sviluppano con la combustione, di cui solo 4000 individuate (Adami, 1960; Figà-Talamanca *et al.*, 1989; Matta *et al.*, 2007; Diordjevic *et al.*, 2009), la maggior parte delle quali è presente in forma di particelle il cui diametro medio è inferiore al micron, tale quindi da consentire loro di

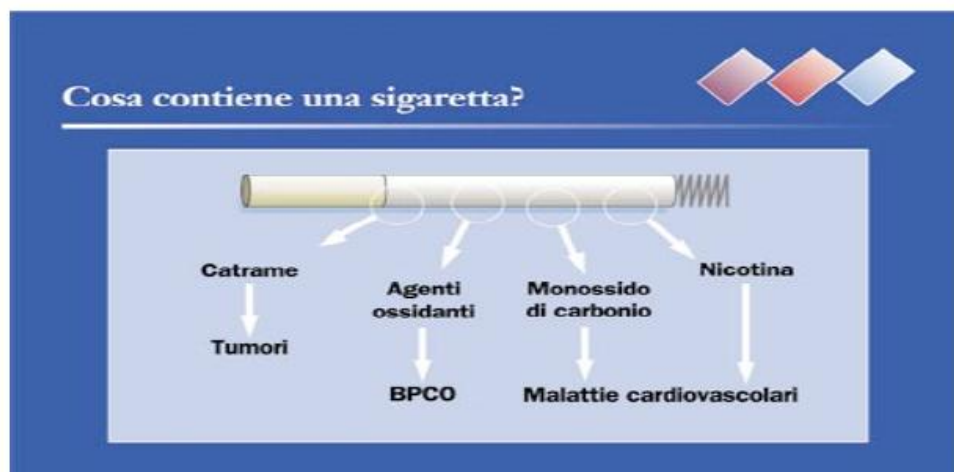
raggiungere le zone più periferiche dell'apparato respiratorio. I componenti del fumo di tabacco non sono tutti contenuti nelle foglie di tabacco, ma gran parte si originano durante la combustione che avviene a temperature che variano dai 600 agli 800 °C. Inoltre le sigarette commerciali sono costituite assemblando diversi tipi di foglie di tabacco e di tabacco trattato (Carmines, 2002). Durante questi processi di trattamento vengono addizionati umettanti come il glicerolo e il glicole propilenico al fine di aumentare la capacità di miscelamento del tabacco mentre gli ingredienti aromatici vengono utilizzati per completare le caratteristiche soggettive del fumo (Rustemeier *et al.*, 2002). Questi ingredienti includono composti non volatili come zucchero e liquirizia e composti volatili altamente aromatici come il mentolo, l'anisolo, l'alcool benzilico, la vanillina e alcuni olii essenziali. Molti di questi composti sono naturalmente presenti nella foglia di tabacco. Altri tipi di ingredienti, utilizzati per aumentare l'aromaticità del tabacco, sono alimenti quali il cioccolato e il cacao e le spezie come la vaniglia, la crema di nocciole e lo zenzero (Vanscheeuwijck *et al.*, 2002). La maggior parte degli ingredienti volatili aggiunti al tabacco nelle sigarette non subiscono pirolisi ma vengono trasferiti immutati al fumo di sigaretta (Smith *et al.*, 2000). Per essere analizzati questi composti vengono raccolti con la macchina del fumo (*Puffing machine*) su un filtro. La macchina aspira fumo elettricamente e viene impostata seguendo una serie di parametri convenzionalmente accettati (Stabbert *et al.*, 2003; Hammond *et al.*, 2007). I composti vengono estratti da una sigaretta definita *standard*, e prodotta solo per la macchina da filtro. Queste sigarette sono IR4F e IR5F riferendosi rispettivamente ad un contenuto leggero e ultra-leggero di tabacco (Borgerding *et al.*, 1998; *International Organization for Standardization*, 2000; Che *et al.*, 2003).

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha inserito il fumo di sigaretta e il fumo passivo nel primo gruppo delle sostanze ambientali nocive (Wang *et al.*, 2012). Alla luce di quanto detto, risulta chiaro che è difficile predire che il danno da esposizione a fumo di sigaretta sia prodotto da una sostanza piuttosto che da altre, in quanto i componenti sono responsabili in uguale misura del danno e al tempo stesso nessuno di essi da solo è direttamente responsabile dell'interazione con siti bersaglio predefiniti. La tossicità effettiva di un costituente chimico è funzione della concentrazione, del destino metabolico e della capacità di raggiungere tessuti *target*. La lipofilità è causa anch'essa dell'effetto tossico del fumo di sigaretta. Infatti i composti che hanno alta lipofilità possono superare le barriere ad alto contenuto di lipidi, come la barriera ematoencefalica (Hauptmann *et al.*, 2001) e la placenta (Seller *et al.*, 1995), e accumularsi anche nel fegato, dove i composti vengono modificati per permettere l'escrezione più rapida da parte dell'apparato renale. Tuttavia proprio questo tentativo di detossificazione, porta invece alla formazione di metaboliti elettrofilici reattivi che possono legare DNA e



proteine. Quindi molti composti idrofobici che di per sé sarebbero innocui perché non in grado di raggiungere un sito di azione, con la modificazione del metabolismo di passaggio epatico, diventano invece potenzialmente dannosi. L'idrofobicità inoltre favorisce l'induzione del cit-P450; infatti, i composti idrofobici in concentrazione elevata possono anche svolgere una tossicità non specifica perturbando il doppio strato lipidico che circonda le cellule (Hansch *et al.*, 1995; Pappas *et al.*, 2012).

Tuttavia, per analizzare le problematiche connesse agli effetti del fumo di tabacco sull'organismo e le conseguenti patologie, possiamo suddividere i più di 4000 componenti del fumo in quattro principali categorie alle quali fanno riferimento quattro tipi di patologie importanti: le sostanze ad azione cancerogena; le sostanze irritanti, che danneggiano l'apparato respiratorio; l'ossido di carbonio, che sostituendosi all'ossigeno, ne riduce la disponibilità per i tessuti; la nicotina, responsabile degli effetti sull'apparato cardio-vascolare e sul sistema nervoso centrale (Csiszar *et al.*, 2009), che verrà analizzata nel capitolo successivo.



**Figura C:** Componenti di una sigaretta convenzionale

## GLI INGREDIENTI DELLA SIGARETTA

### LE SOSTANZE AD AZIONE CANCEROGENA

Il fumo di tabacco è considerato l'unica sostanza conosciuta che abbia un potere cancerogeno completo (in grado cioè sia di causare sia di favorire l'insorgenza di tumori), in quanto costituito da diverse sostanze a diversa azione cancerogena. In particolare le principali sostanze cancerogene che si originano dalla combustione del tabacco sono: gli idrocarburi aromatici policiclici (IPA), provenienti dalla combustione sia della carta sia del tabacco, che comprendono numerosi composti tra cui: il naftalene, il fluorene, il fenantrene, l'antracene, il fluorantene, il

pirene, il benzoantracene, il crisene, le nitrosamine tabacco specifiche (NTS); le ammine aromatiche; le N-nitrosammine e in particolare la 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), la N-nitrosodiethylamine (DEN) e la N-nitrosornicotina (NNN) (che legano e attivano i recettori nicotinici e hanno un ruolo molto importante nell'eziologia e nello sviluppo dei tumori polmonari); il benzopirene; il catrame; il biossido di azoto, il benzene; i metalli pesanti, tra cui: il nichel, il cromo, il selenio, l'arsenico, il piombo e il cadmio (responsabile della diminuzione della capacità antiossidante dell'organismo) (Navas-Acien *et al.*, 2004; Egleton *et al.*, 2008; Shuller, 2009; Kalantari-Dehaghi *et al.*, 2012; Fresquez *et al.*, 2013); i composti radioattivi tra cui il polonio 210 che con il fumo passa nell'apparato respiratorio, dove viene trattenuto dal muco bronchiale. Questi composti chimici in parte vengono acquisiti durante i processi di lavorazione, in parte le quantità che si ritrovano sono già presenti nelle foglie di tabacco che risentono dell'inquinamento ambientale. Inoltre, la gran parte di queste sostanze si formano a causa delle elevate temperature di combustione del tabacco (*tobacco burning*). Anche il processo di aspirazione e di combinazione con l'ossigeno nei polmoni può modificare le sostanze: un esempio importante è costituito dalla conversione dell'NO in NO<sub>2</sub> che è significativamente differente nell'aerosol di sigaretta rispetto ad un sistema comprendente solo NO e O<sub>2</sub>.

Inoltre il fumo di tabacco contiene polveri sottili altamente cancerogene, il cui insieme è chiamato PM10 (*particulate matter*). Le polveri fini penetrano in profondità nei polmoni, alcune attraversano anche gli alveoli polmonari, arrivano al sangue, si depositano lungo le arterie e nel cuore, impregnando vari organi. Il fumo marginale, quello sviluppato dalla parte finale della sigaretta che brucia, contiene infatti quantità di agenti chimici cancerogeni superiore a quelle riscontrate nel resto del fumo, e questo spiega gli effetti negativi del fumo passivo sulla salute degli individui che, pur non fumando direttamente, respirano l'aria contaminata dal fumo altrui. Infatti alcuni tra i più importanti enti impegnati nella protezione della salute, in particolare l'Agenzia Statunitense per la Protezione ambientale (*U.S. Environmental Protection Agency, EPA*), l'Agenzia Internazionale di Ricerca sul Cancro (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) che fa parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e il *National Toxicology Program*, hanno classificato il fumo passivo come un agente cancerogeno umano. Un programma con lo scopo di valutare agenti e sostanze che potrebbero essere tossiche per la salute umana, il *National Toxicology Program* del Dipartimento di Salute e Servizi Umani degli Stati Uniti (*U.S. Department of Health and Human Services*), ha stimato che almeno 250 sostanze chimiche presenti nel fumo di seconda mano sono dannose e di queste 50 sono considerate sostanze cancerogene. L'Ufficio del *Surgeon General* del Dipartimento di Salute e Servizi

Umani degli Stati Uniti, in un *report* del 2006, ha concluso, sulla base di prove scientifiche, che non esiste un livello senza rischio di esposizione al fumo passivo; anche una minima quantità può essere dannosa. In particolare, tra le sostanze ad azione cancerogena, le ammine aromatiche sono ben rappresentate sia nel fumo di sigaretta attivo sia in quello passivo. Si utilizzano come intermedi di fabbricazione nella confezione dei pesticidi, nei prodotti cosmetici e infine anche in alcuni composti farmaceutici. Tali composti si ritrovano in diversi tipi di sigarette. Tuttavia, la formazione delle ammine aromatiche cambia a seconda del tipo di sigaretta fumata. Tali composti passano attraverso la barriera emato-encefalica e producono danni anche a quel livello, come ha dimostrato un lavoro di Bhagwat che ha ricercato gli effetti della nicotina e di un composto chiamato 4-N-metil-N-nitrosamino-1-3-piridil-1-butanone (NNK), una nitrosammina, ritrovata nel cervello di ratto dove era in grado di produrre stress ossidativo a livello cellulare e mitocondriale (Bhagwat *et al.*, 1998).

Per quanto riguarda il benzopirene, la sua cancerogenicità è aumentata quando applicato come “iniziatore” di una reazione chimica a catena seguito poi dall’applicazione ripetuta di un promotore. Ciò indica che i promotori hanno un ruolo fondamentale nella progressione della cancerogenesi.

Dato che il fumo di sigaretta coinvolge l’esposizione protratta ai costituenti del fumo, i co-carcinogeni simulano tale effetto. In un lavoro di Rubin (2001) una serie di 21 componenti del tabacco sono stati testati per verificare se mostravano un’attività co-carcinogenica. Le classi dei composti esaminati erano quelle dei fenoli, degli idrocarburi alifatici, degli idrocarburi aromatici non cancerogeni, degli acidi e degli alcoli a lunga catena (catecolo, pirogallolo, decano, benzopirene e un estere del forbolo). Secondo i risultati ottenuti da Rubin, il catecolo, il fenolo più abbondante nel fumo di sigaretta, ha una forte attività co-carcinogenetica, ma non un’attività promuovente l’insorgenza dei tumori. Sette dei 21 composti testati hanno un’attività co-carcinogenetica; nessuno di questi però ha mostrato un’attività statisticamente significativa come promotore tumorale da solo. Questi risultati hanno valore nell’ottica di simulare l’esposizione simultanea ai componenti del fumo per lunghi periodi di tempo. Il meccanismo d’azione dei co-carcinogeni è sconosciuto, ma ciò che è sicuro è che, trattandosi di composti diversi, i meccanismi d’azione non possono essere simili ma soltanto comparabili. Inoltre, l’analisi ha riportato che alcuni composti esaminati (i composti fenolici, l’esculina, la quercetina e l’idrocarburo alifatico squalene e l’acido oleico, un acido grasso a lunga catena alifatica) avevano la capacità di inibire completamente l’attività del benzopirene (Rubin, 2001). Un altro studio condotto da Luo e collaboratori nel 2004 ha riportato che il condensato del fumo di sigaretta risulta in grado di contribuire alle aberrazioni cromosomiche nelle cellule. Infatti questi

ricercatori hanno osservato che il fumo di sigaretta induce dei ponti anafasici in cellule umane in coltura, che in breve condurrebbero ad uno squilibrio genomico. La frequenza dei ponti indotti all'interno dell'intera popolazione decresce col tempo, e questo decremento non è dipendente dal *pathway* apoptotico mediato dalla proteina p53. Inoltre, secondo questo studio, il fumo di tabacco è in grado di produrre danni alla doppia elica di DNA, sia nelle cellule in coltura che nel DNA purificato. Questo effetto viene mediato attraverso la produzione di specie ossigeno-reattive, dato che alcuni *scavenger* di ROS come la 2'deossiguanosina-5'-monofosfato (dGMP) previene la formazione del ponte anafasico e lo squilibrio genomico (Luo *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2012).

Un'ulteriore considerazione da aggiungere è che nei composti del fumo non sono presenti solo sostanze tossiche ma anche sostanze che hanno effetti anticancerogeni e antimutageni. Infatti in base alla classificazione eseguita da Rodgam e collaboratori nel 2003, tra le sostanze contenute nel fumo di tabacco sono comprese anche quelle che contrastano gli effetti di altri composti cancerogeni. Gli idrocarburi alifatici saturi sono, ad esempio, scarsamente reattivi e per questo non sono tossici. Il D-limonene è un composto attivo contro le nitrosammine. Benzene, naftalene e antracene, che di per sé sono sostanze che hanno un'attività tossica notevole, sono tuttavia utili perché riducono la tossicità degli idrocarburi aromatici policiclici. I fenoli, a loro volta, abbassano la reattività degli idrocarburi policiclici e delle nitrosammine (Lu *et al.*, 2007).

## LE SOSTANZE IRRITANTI

Inoltre, nel fumo di tabacco, ci sono anche numerose sostanze irritanti e tossiche, quali l'acido cianidrico, l'acetaldeide, l'acroleina (aldeide irritante dei bronchi e principale causa delle bronchiti croniche), la formaldeide (aldeide ad azione irritante che danneggia la mucosa delle labbra, della lingua e del palato, traumatizzando la gola, la trachea e le corde vocali), l'ammoniaca, l'ossido di azoto, i fenoli e gli idrocarburi a basso peso molecolare. Queste sostanze alterano la mucosa bronchiale provocando una maggiore produzione di catarro e in genere infiammazione della mucosa bronchiale. L'effetto continuo di questi agenti chimici origina nel tempo una serie di patologie (asma, bronchite cronica ed enfisema) che vengono definite con il termine comprensivo di broncopneumopatie croniche ostruttive (BCO), che provocano quadri più o meno gravi di insufficienze respiratorie. L'azione tossica viene esercitata direttamente sulle mucose respiratorie e, indirettamente, mediante l'alterazione dei meccanismi di difesa delle prime vie respiratorie che quindi non riescono più a svolgere in maniera efficace la loro funzione. Ad esempio, le sostanze che vengono inalate fumando sono in grado di paralizzare le cellule ciliate di cui sono tappezzate le vie aeree che, con il loro movimento, hanno

il compito di espellere le sostanze nocive intrappolate nel muco. L'inefficienza di questo sistema di protezione permette agli agenti tossici e infettivi di penetrare indisturbati nel nostro organismo rendendo i polmoni più vulnerabili alla loro azione nociva.

## IL MONOSSIDO DI CARBONIO

Il monossido di carbonio è un tossico respiratorio che deriva dalla combustione incompleta del tabacco. Questo gas ha un'affinità maggiore, rispetto all'ossigeno, nei confronti dell'emoglobina (250 volte superiore). Questo significa che chi fuma ha un'alta percentuale di monossido di carbonio nel sangue che, sostituendosi all'ossigeno e formando la carbosiemoglobina, fa sì che venga trasportato meno ossigeno in tutto l'organismo. Infatti, in seguito, al legame del monossido di carbonio all'emoglobina, i globuli rossi perdono il 15% della loro capacità di trasportare ossigeno, riducendo così la quantità disponibile per tutte le cellule dell'organismo (muscoli, cuore, cervello, apparato sessuale, fegato, reni, etc.), provocando ingiallimento della pelle, indebolimento dei capelli, invecchiamento precoce, riduzione del rendimento muscolare con una diminuzione delle prestazioni fisico-atletiche, intellettuali e sessuali (Bailey *et al.*, 2012). Il monossido di carbonio accelera la formazione delle placche aterosclerotiche nei vasi sanguigni, elevando il rischio di infarto del miocardio e ictus cerebrale. Queste lesioni possono oggi essere osservate con numerose metodiche, sia direttamente con l'angiografia e l'ecodoppler, che indirettamente attraverso indagini cardiovascolari come l'esame della pressione arteriosa anche in modalità continua (Holter pressorio), l'ECG, la valutazione nel siero della proteina C reattiva e dell'omocisteina (Di Carlo *et al.*, 2003). Va comunque considerato che questi parametri consentono solo di valutare l'entità del danno quando esso è divenuto ormai irreversibile, per cui l'eventuale terapia può intervenire solo come prevenzione secondaria nei confronti degli ulteriori rischi vascolari. Peraltro le tecniche sono poco utili nel valutare il danno da fumo nelle fasi iniziali o sub-cliniche, la cui durata è generalmente di anni/decenni e la cui conoscenza rivestirebbe invece notevole valore ai fini della prevenzione (Di Carlo, 2005). Inoltre, la carenza di ossigeno nel sangue della donna fumatrice in gravidanza, è una delle cause principali di seri problemi al feto: aborto spontaneo, parti prematuri, malformazioni, nascita di bambini ipotrofici con un peso ridotto di circa 200 g ed incremento dei decessi perinatali (Butler *et al.*, 1973; Anblagan *et al.*, 2013; Loy *et al.*, 2014; Stone *et al.*, 2014).

## I DANNI DEL FUMO DI SIGARETTA

Gli effetti negativi del fumo possono ricondursi a molti fattori di rischio (Erhardt, 2009). In generale il fumo di sigaretta, con tutti i suoi componenti, è considerato il fattore di rischio

dell'insorgenza dell'aterosclerosi, patologia causata dal restringimento delle arterie e dalla formazione di placche ateromasiche che, quando diventano eccessive, comportano gravi conseguenze per l'organismo, come patologie importanti dei vasi coronarici, angina pectoris, infarto e arresto cardiaco per la carenza e insufficiente circolazione, debolezza cardiaca, restringimento delle arterie renali con ipertensione e insufficienza renale, restringimento dei vasi delle gambe e di quelli che forniscono sangue al cervello con conseguenti disturbi all'udito, vertigini, ictus ed emiparesi (Lakier, 1992; McGinnis *et al.*, 1999; Pipe *et al.*, 2010; Csordas *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014). Inoltre, il fumo favorisce la calcificazione dei vasi sanguigni, perciò spesso i fumatori soffrono di disturbi circolatori alle gambe e sviluppano quella condizione morbosa nota con il nome di "gambe del fumatore": questa patologia consiste nel restringimento e nell'occlusione delle arterie delle gambe, con conseguente manifestazione dolorosa durante la deambulazione, perché il fabbisogno di ossigeno nel muscolo aumenta, ma questo non può essere soddisfatto a causa della diminuita capacità dei vasi sanguigni (tromboangioite obliterante o sindrome di Burger). Il dolore che compare all'improvviso mentre si cammina, segnale questo della deficienza di ossigeno, costringe la persona a fermarsi per alcuni minuti, poi si riprende a camminare per fermarsi nuovamente alla successiva manifestazione dolorosa. Il fumo di sigaretta ha inoltre numerosi effetti anche sull'apparato digerente. Infatti il fumo può causare gastrite, favorendo l'accumulo di secrezioni acide e provocando bruciore di stomaco, creando così le condizioni favorevoli per lo sviluppo di un'ulcera. Infatti il tabagista soffre frequentemente di ulcere gastriche e intestinali, perché il fumo influisce sulla produzione degli acidi gastrici e inibisce la guarigione delle ulcere. Ennesimo male, presente quasi esclusivamente nei fumatori, è quello che gli americani chiamano *Trench Mouth*, una forma di gengivite necrotizzante ulcerativa che include appunto ulcerazione, dolore, sanguinamento e un cattivo odore nella bocca (Mirbod *et al.*, 2000; Taybos, 2003; Metelitsa *et al.*, 2010). Questa infiammazione delle gengive, che si insinua gradualmente nei tessuti più profondi del paradonto, può causare anche la caduta dei denti (Napolitano, 2009). Il fumo esplica i suoi effetti anche sulla pelle: infatti il melanoma non è l'unico danno provocato dalla sigaretta alla pelle. I fumatori accaniti vanno incontro anche a gravi altri rischi cutanei (Smith *et al.*, 1996; Freiman *et al.*, 2004). Sebbene una relazione tra fumo e cute fosse stata ipotizzata fin dal 1856, la certezza che esso sia causa dell'invecchiamento precoce del viso si deve a Ippen e Ippen, i primi, nel 1965, a identificare le nefaste modificazioni nel volto del 79 % delle fumatrici abituali contro il 19 % delle non fumatrici e a coniare il termine di "*smoker's face*" (Morita, 2007). Nel 1969 lo studio del dottor Harry Daniell, in doppio cieco, dimostrò che i fumatori, fra i 40 e i 49 anni, avevano la stessa intensità di rughe dei non fumatori di ven'anni

più vecchi e, addirittura, che l'esposizione del volto al sole creerebbe meno danni per l'invecchiamento della pelle di quanti ne procuri il fumo. Il tipico aspetto del fumatore, oltre a manifestare solchi e rughe marcate, disposte in forma radiale soprattutto attorno alle labbra e agli angoli degli occhi, presenta un aspetto scarno con forte prominente del contorno osseo e talvolta anche un lieve afflosciamento delle guance (Bernhard *et al.*, 2007). Un'altra visibile trasformazione dovuta al fumo è la decolorazione accentuata delle unghie delle dita che sorreggono la sigaretta, tanto evidente che, se si interrompe immediatamente di fumare, si sviluppa una distinta linea di demarcazione sulle unghie macchiate.

Se assorbiti per via sistemica, i circa 4000 componenti tossici del fumo possono comportare preoccupanti danni al tessuto epidermico e modificazioni vascolari (Caminiti, 2010). Come accennato in precedenza, il fumo di sigaretta ha numerosi effetti anche sul sesso femminile. Sembra infatti che il tabagismo diminuisca la fecondità: un vasto studio ha dimostrato che, mentre solo il 5% delle non fumatrici non ha concepito nei 5 anni seguenti l'interruzione della contraccezione, la percentuale arriva all'11% nelle forti fumatrici. Le fumatrici presentano un rischio due volte più grande di gravidanze extrauterine; sono maggiormente esposte alla dismenorrea, al cancro del collo dell'utero ed entrano in menopausa due anni prima; l'osteoporosi è più precoce (Stone *et al.*, 2014). Anche il feto è esposto ad una serie di rischi importanti e l'aborto spontaneo è più frequente (Loy *et al.*, 2014). Tra le fumatrici che assumono contraccettivi orali, il rischio di crisi cardiache, ictus trombotici venosa profonda ed embolie è più elevato, particolarmente dopo i 40 anni.

Infine uno studio effettuato alla *Harvard School of Public Health*, mostra che il fumo incrementa quasi tutti i maggiori ormoni androgeni, inclusi DHEA, l'androstenedione, il testosterone e il diidro-testosterone (DHT), l'ormone maggiormente responsabile della calvizie androgenetica. E' ben conosciuto che i livelli più alti di testosterone e di DHT sono associati a livelli più alti nella caduta dei capelli. Uno studio del *Far Eastern Memorial Hospital di Taipei* (Taiwan) condotto su un campione di 740 uomini ha appurato che le sigarette influiscono sul funzionamento del microcircolo, alterando il modo in cui il sangue viene pompato verso i follicoli del cuoio capelluto e aumentando così la gravità di un principio di calvizie (Su *et al.*, 2007). Un altro danno correlato al fumo è l'impotenza nell'uomo; un'inchiesta condotta in America dimostra che questa è più frequente del 50% tra i fumatori che non tra coloro che non fumano. L'alta incidenza di disturbi sessuali è da mettere in relazione con i problemi circolatori causati dal fumo. Circa il 44% degli uomini fumatori soffre di disfunzioni erettile che, in casi non rari, possono trasformarsi in un completo *KO* del sistema riproduttivo.

Il fumo non danneggia un solo organo ma nuoce a più sistemi organici importanti per la vita,

alterando così le funzioni e aprendo la vita a molte patologie (Chang *et al.*, 2014).

Le sostanze cancerogene del tabacco vengono eliminate attraverso i reni e la vescica, così tra i fumatori si nota un'elevata frequenza di tumori a carico di questi organi, ma specialmente alla vescica, probabilmente a causa della ritenzione prolungata di urina al suo interno. Le ossa non sono esenti dai danni del tabagismo, infatti il fumatore spesso soffre di dolori alla schiena a causa dell'effetto che i componenti del fumo hanno sulla circolazione del sangue. I dischi intervertebrali non ricevono una quantità di sangue e di nutrimento sufficienti, degenerano e diventano lentamente più sottili.

La vera pericolosità del fumo è però ignorata da molti, anche perché i rischi reali spesso sono velati dalla falsa verità che la pericolosità effettiva del fumo non sia ancora scientificamente dimostrata. Gli effetti del fumo sono stati sottovalutati fino agli anni 90', ma oggi dopo lunghi studi si può affermare che il fumo è il maggior pericolo per la nostra vita che uccide più vite umane di qualunque altra malattia. Come accennato precedentemente, migliaia di morti per cancro sono dovute al fumo di tabacco: infatti nel tabagista il carcinoma polmonare ha una frequenza 20 volte superiore che non tra i non fumatori e circa il 90 % di tutte le patologie cancerose polmonari riguarda i fumatori di sigarette (Hecht, 2012). La probabilità di ammalarsi di questa patologia aumenta di 10/15 volte fumando 20 sigarette al giorno e di 5 volte già con 10 sigarette. Il rischio in definitiva aumenta in rapporto ad un consumo maggiore (Das, 2003). Inoltre, le cellule precancerose, a causa del tabacco, possono sfuggire al controllo del sistema immunitario. Una ricerca dell'Università di New York pubblicata dal *Journal of Immunology* ha mostrato che a causa delle sigarette le difese del corpo non sono in grado di segnalare all'organismo se è stato attaccato da cellule tumorali.

Infine, la sigaretta più dannosa sembra essere la prima del mattino: i ricercatori del *College of Medicine* della *Pen State University Hersey* (USA) hanno dimostrato che quella che si fuma nei primi 30 minuti della giornata pare che aumenti del 79 % il rischio di tumore ai polmoni rispetto a chi aspetta almeno un'ora. E' certo che il fumo abbrevia la vita dei fumatori di circa 8.3 anni secondo alcuni studi, altri parlano di un accorciamento della vita di 12 anni, ma tutti sono concordi nel dire che i fumatori muoiono precocemente sacrificando una buona parte della loro vita al piacere del fumo.

## NORMATIVA EUROPEA CIRCA LE SIGARETTE

L'attuale direttiva europea 2001/37/CE, recepita in Italia con il decreto legislativo n. 184 del 24 giugno 2003 pubblicato in G.U. n. 169 del 23 luglio 2003 ha fissato il limite massimo di catrame a 10 mg/sigaretta e introdotto, per la prima volta, i limiti massimi di nicotina (1 mg/sigaretta) e



per il monossido di carbonio (10 mg/sigaretta). Con questa direttiva, inoltre, i fabbricanti e gli importatori dei prodotti di tabacco debbono trasmettere l'elenco di tutti gli ingredienti utilizzati con le relative quantità. Tutte queste sostanze contenute nel tabacco da sigaretta sono comprese nella lista degli "analiti di Hoffmann", una serie di composti chimici che Hoffmann e i suoi collaboratori di New York già nella metà degli anni 70' proposero di analizzare nel fumo di sigaretta, in quanto una serie di evidenze scientifiche ne sottolineavano la tossicità.

Oggi, la maggior parte delle sigarette rappresentative del mercato italiano riportano le seguenti concentrazioni di composti: la concentrazione delle NTS, famiglia di composti che deriva dalla nitrosazione della nicotina e degli altri alcaloidi ad essa associati, che varia tra 37.8 e 259.5 ng/sigaretta e quelle ammine aromatiche, derivati dalla pirolisi delle proteine presenti nel tabacco, che varia da 6.3 a 22.1 ng/sigaretta. I metalli sono una classe di composti molto particolari in quanto il rischio non è sempre dato dal metallo in sé ma dalla forma chimica con la quale, a seguito della combustione, esso viene inalato. La loro presenza nel tabacco, e di conseguenza nel fumo, è dovuta alle pratiche agricole e alle condizioni in cui viene coltivato il tabacco. Per quanto riguarda il cadmio, le concentrazioni possono variare da 15.9 a 39.5 ng/sigaretta. Infine la concentrazione media del benzene, sostanza volatile che si forma quando materiali ricchi di carbonio subiscono una combustione incompleta, varia da 7.5 a 36.6 µg/sigaretta. Per avere un'idea della tossicità delle sostanze presenti nel fumo di sigaretta la *Environmental Protection Agency* degli Stati Uniti ha redatto una tabella con un indice di rischio di cancro per vari costituenti chimici presenti nel fumo di sigaretta, considerando il fumo di una sola sigaretta al giorno.

Inoltre, una molteplicità di additivi viene aggiunta legalmente nel tabacco per sigarette dagli stessi produttori. Tra questi ci sono gli ingredienti che conferiscono sapore (miscela di aromi, spezie, zucchero, miele, estratti vegetali), sostanze umidificanti (glicerina, propilenglicolo, acido o-fosforico), sostanze sbiancanti le ceneri (allume, idrossido e silicati di alluminio, ossido di alluminio e di magnesio, talco, acido silicico, acidi e Sali di ammonio), sostanze conservanti (acido benzoico, acido formico, acido propionico) e sostanze adesive e leganti (collodio, cellulosa, gommalacca). Tra le probabili 600 sostanze circa che vengono aggiunte al momento della produzione, ve ne sono tuttavia alcune che non sono regolate giuridicamente. Esse hanno soprattutto lo scopo di rendere più tollerabile la sgradevolezza del fumo di tabacco ed accelerare l'assorbimento della nicotina.

Per quanto riguarda il consumo delle sigarette, nel Gennaio 2005 in Italia è entrata in vigore la legge antifumo Sirchia, secondo cui non è possibile fumare in luoghi pubblici; tuttavia la media dei fumatori nel nostro Paese continua a essere alta.

Costituenti fumo principale	CRI per sigaretta/giorno
1,3-Butadiene	3.02E-04
Acrlonitrile	1.29E-04
Arsenico	1.16E-04
Acetaldeide	9.18E-05
Benzene	6.71E-05
Acetammide	4.70E-05
NNN	3.80E-05
N-Nitrosopirrolidina (NP)	3.39E-05
Cromo (esavalente)	3.15E-05
Cadmio	2.16E-05
Formaldeide	9.90E-06
Idrazina	8.33E-06
NNK	7.80E-06*
N-Nitrosodimetilammina (NDMA)	5.58E-06
DDT	4.61E-06
N.Nitrosodietilammina (NDEA)	4.27E-06
Benzo(a)pirene	1.93E-06
N-Nitroso-N-dibutilammina	1.89E-06
N-Nitrosoetil-metilammina	1.89E-06
Dibenzo(a,j)pirene	1.38E-06
N-Nitrosodietanolammina	1.20E-06
N-Nitrosopiperidina	6.04E-07
Urtano	4.14E-07
4-Amminobifenile	3.60E-07
Benzo(j)fluorantene	3.30E-07
Benzo(a)antracene	2.48E-07
Dibenzo(a,h)antracene	2.40E-07
2-Amminonaftalene	1.80E-07
Benzo(b)fluorantene	1.65E-07
Nichel	1.43E-07
Indeno(1,2,3-cd)pirene	6.60E-08
N-Nitroso-N-propilammina	5.00E-08
Benzo(k)fluorantene	4.95E-08
7H-Dibenzo(c,g)-carbazolo	3.85E-08
Cloruro di vinile	3.35E-08
5-Metilcrisene	3.30E-08
Benillio	3.00E-08
Crisene	2.75E-08
Dibenzo(a,j)acridina	1.49E-08
Piombo	7.68E-09
Dibenzo(a,h)acridina	5.50E-10

\*non è disponibile il valore dell'unità di rischi cancro per NNK. CRI del NNN è usato come surrogato per questa NTS.

**Tabella A:** Indice di rischio di cancro per i costituenti chimici presenti nel fumo di sigaretta

# *La nicotina*

Il termine *Nicotiana* (così come *Nicotina*) fu introdotto in onore di Jean Nicot, ambasciatore francese in Portogallo, che nel 1559 fece pervenire un esemplare della pianta di tabacco, considerandola una medicina, alla corte di Caterina de' Medici (Dani *et al.*, 2012). La nicotina ha una lunga e interessante storia scientifica che origina dagli studi di Posset e Reimen i quali per primi isolarono la nicotina dalle foglie di *Nicotiana Tabacum* nel 1828. Da questo momento in poi l'interesse per la nicotina e per le sue azioni fisiologiche è aumentato gradualmente e si è sviluppato fino ad oggi. I primi esperimenti farmacologici che coinvolgevano la nicotina cominciarono con Orfina nel 1843. A tali studi seguirono quelli di Langley e Dickinson i quali identificarono il primo sito di interazione della nicotina all'interno del sistema nervoso degli animali.

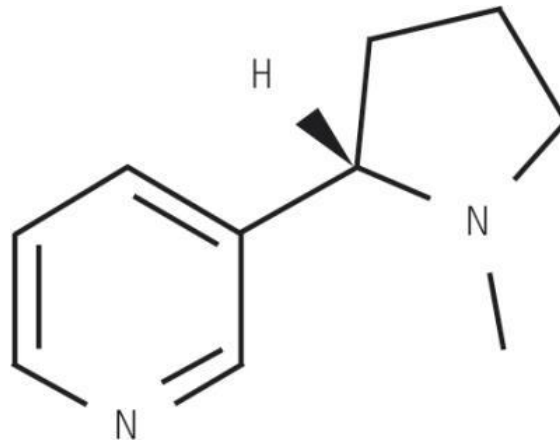
La nicotina è un composto organico, un alcaloide contenuto naturalmente nelle foglie della pianta di tabacco *Nicotiana Tabacum*. Sebbene si trovi in tutte le parti della pianta, è particolarmente concentrata nelle foglie di cui costituisce circa l'0.17-5% del peso secco (Djordjevic *et al.*, 2009). La sua biosintesi avviene nelle radici ed essa viene poi accumulata nelle foglie (Hoffmann *et al.*, 1998). La nicotina pura, è un liquido denso, oleoso, incolore, che all'aria imbrunisce, divenendo giallo-marrone e acquisendo l'odore tipico del tabacco che impregna gli abiti, i capelli e le abitazioni dei fumatori che permane per molto tempo. Questo odore è detto fumo di terza mano (*thirdhand smoke*). Da uno studio pubblicato sulla rivista *Proceedings of the National Academy of Science* è emerso che la nicotina rilasciata in aria può reagire con altri inquinanti *indoor*, formando potenti cancerogeni noti come nitrosammine, che potrebbero essere inalate, ingerite o assorbite. Il "fumo di terza mano" sembra quindi avere effetti dannosi per la salute quanto il fumo passivo (*secondhand smoke*).

La nicotina è un potente veleno naturale che era incluso nella formulazione di vari insetticidi (usato in agricoltura organica) (Perfetti *et al.*, 2008). Negli spray insetticidi, la nicotina può essere molto tossica, causando vomito, tremori, convulsioni e morte. Si sono visti casi di avvelenamento da nicotina attraverso l'ingestione accidentale di prodotti insetticidi in adulti e per l'ingestione di tabacco in bambini ed animali. La morte sopravviene in pochi minuti a causa di un arresto respiratorio causato da paralisi.

Oltre alle piante del tabacco, la nicotina è presente in quantità minori in altri membri della famiglia delle Solanacee, che include il pomodoro, la patata, la melanzana e il peperone (Zaniewska *et al.*, 2009). Fumare sigarette però costituisce la forma predominante di assuefazione alla nicotina. Nel tabacco di sigaretta in genere è contenuto il 2-2.5% di nicotina, in quello da sigari il 1.4% e in quello da pipa il 2% (Matta *et al.*, 2007). La maggioranza delle sigarette contiene tra i 0.5 e 1 mg di nicotina, a seconda della marca (Lippi *et al.*, 2013).

Quantificare la dose di nicotina, che deriva dal fumo di sigaretta durante l'inalazione, è un problema davvero complesso. Un sistema per calcolare la quantità di nicotina che si assorbe consiste nel misurare le differenze tra la nicotina inalata e quella esalata, che ovviamente si riduce per l'assorbimento nel tessuto polmonare. Ad ogni modo questa serie di studi comportano un problema di quantificazione analitica del reale assorbimento della nicotina. Si sta cercando in qualche modo di stabilire il livello di nicotina trattenuta in seguito ad un'inalazione. I fattori più importanti da prendere in considerazione sono costituiti dal sito di *uptake* della nicotina e se effettivamente essa viene assorbita come bolo. Questi due parametri hanno effetti significativi sulla natura e l'interpretazione dei dati farmacocinetici (Goodman *et al.*, 1999). Approssimativamente, sembrerebbe che inalando il fumo, il fumatore medio ingerisce circa 0.95-1 mg di nicotina per sigaretta, ossia una sigaretta fornisce 10-30 mg/kg di nicotina che significa una concentrazione plasmatica al picco di circa 0.31  $\mu\text{M}$  (tra 10 e 50 ng/ml). Nel latte materno la concentrazione di nicotina è di tre volte maggiore di quella plasmatica (a causa del suo pH più acido) e in una fumatrice può raggiungere un valore medio di 100 ng/ml. Nel cervello di un fumatore la concentrazione si aggira intorno a 1  $\mu\text{M}$ . Nei liquidi polmonari dopo la fumata di una sigaretta si può arrivare a una concentrazione tra 6 e 60  $\mu\text{M}$  (mediana 33  $\mu\text{M}$ ) (Clunes *et al.*, 2008). Al giorno d'oggi sono disponibili dati sulla farmacocinetica della nicotina in molti animali da esperimento in modo da poter confrontare la dose utilizzata con quella assunta dall'uomo (Matta *et al.*, 2007).

La nicotina è una base debole ( $\text{pK}_a = 8$ ) la cui formula bruta è  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$ . E' composta da un anello piridinico cui è legato in posizione meta un anello pirrolidinico che presenta un azoto legato ad un gruppo metilico. Si tratta di una base biterziaria levogira, mentre i suoi sali sono destrorigiri. La nicotina può assumere differenti conformazioni, a seconda che il carbonio 3 dell'anello pirrolidinico si trovi dalla parte dell'idrogeno 4 dell'anello piridinico (conformazione I), o si trovi dal lato del carbonio 2 dell'anello piridinico (conformazione II). Il conformero I è più stabile del conformero II, tuttavia la conformazione preferita in soluzione è la II. La molecola della nicotina è chirale; l'enantiomero presente in natura è quello S(-). Durante la combustione del tabacco avviene una parziale racemizzazione: il fumatore è quindi esposto anche all'enantiomero R(+). L'enantiomero S(-) si lega ai recettori nicotinici, mentre l'enantiomero R(+), fisiologicamente meno attivo, è un antagonista dei recettori colinergici. La nicotina è solubile in acqua e, per ossidazione controllata, si trasforma in nicotirina; in seguito l'acido nitrico o il permanganato la ossidano, trasformandola in acido nicotinic (Le Foll *et al.*, 2009).



**Figura D:** Struttura chimica della nicotina

La nicotina si assorbe attraverso la pelle e la mucosa orale e nasale o si inala attraverso i polmoni, dove viene assorbita, entra nella circolazione sanguigna venosa, poi passa nella circolazione arteriosa e giunge al sistema nervoso centrale e al cuore in non più di 7 secondi. Questo fenomeno prende il nome di “contingenza”, infatti il breve tempo che trascorre tra l’assunzione e il beneficio è comune alle altre sostanze d’abuso che creano dipendenza. La stretta associazione temporale tra l’atto di aspirare e gli effetti piacevoli della sostanza d’abuso è l’elemento fondamentale per lo stabilirsi di un comportamento compulsivo di uso ed abuso di una droga. Inoltre, la velocità con cui la nicotina arriva ai vari organi ha fatto pensare che inalare fumo equivale ad iniettare nicotina direttamente nell’arteria carotide (Benowitz *et al.*, 1997; Hukkanen *et al.*, 2005). Infatti nel 2008 Benowitz ha dimostrato che il fumo di sigaretta produce elevate concentrazioni di droga nel cervello, paragonabili a quelle osservate dopo somministrazione endovenosa.

Il comportamento del fumare è regolato accuratamente sia come frequenza che come intensità in un modo tale da mantenere stabili i livelli plasmatici della nicotina (Corrigall, 1999). Questi crescono durante la mattinata fino a raggiungere un valore stabile nel corso della giornata. Durante la notte i livelli plasmatici di nicotina si riducono a zero (l’emivita di eliminazione della nicotina è di circa due ore) portando a quella che viene definita astinenza notturna (Benowitz, 2009). Nell’uomo sono stati effettuati studi campionando il sangue dei fumatori prima e dopo aver fumato una sigaretta; i valori di nicotina nel plasma aumentano in un *range* 0-50 ng/ml. Basandosi su questa osservazione è possibile fare alcune estrapolazioni per stimare il destino e la distribuzione della nicotina assorbita. Assumendo una media del peso corporeo di 70 kg, il

volume corrispondente di sangue è di circa 4 litri con un picco medio di 25 ng/ml dopo aver fumato 1 mg di nicotina rilasciato dalla sigaretta (Benowitz, 1990). Di solito le concentrazioni più alte si registrano a livello del cervello, dei polmoni e della milza. Infatti, la nicotina è una sostanza dotata di forte lipofilia e ciò le consente, indipendentemente dalla via di assunzione, di raggiungere rapidamente il Sistema Nervoso Centrale (SNC) a livello del quale esplica le sue funzioni eccitatorie e di accumularsi nei tessuti ricchi di lipidi. Queste proprietà fisico-chimiche, le quali sono pH-dipendenti, hanno un ruolo importantissimo sul tipo e sul modo di utilizzo dei prodotti del tabacco e sono intimamente connesse ai processi biologici che avvengono nell'organismo. La nicotina determina effetti fisiologici, farmacologici, psicologici, biochimici e tossicologici. E' in grado di agire sulla termoregolazione, inducendo ipotermia nell'animale da laboratorio, a livello del sistema cardiocircolatorio aumenta la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa con vasocostrizione dei piccoli vasi, induce inoltre dilatazione dei piccoli bronchi, diminuzione della motilità gastrointestinale, rallentamento della sintesi del glicogeno e aumento degli acidi grassi liberi nel sangue. Le vie cataboliche che quest'alcaloide può percorrere sono diverse, con formazione di diversi prodotti intermedi, dotati anch'essi di attività stimolatoria. La maggiore via di metabolizzazione nel corpo umano coinvolge la C-ossidazione attraverso l'enzima CYP2A6, ed in particolare attraverso l'isoforma P4502A6, per formare la cotinina, che è il principale metabolita della nicotina nel cervello, e una serie di composti minori (Soto-Otero *et al.*, 2002; Matta *et al.*, 2007). Successivamente la cotinina viene glucoronata attraverso UGT 1A4, 1A9 e 2B10. Il ruolo della glucoronazione può essere più rilevante negli individui nei quali il CYP2A6 sia deficitario. I numerosi polimorfismi dei due sistemi di eliminazione possono influire sul metabolismo della nicotina e giustificare le variabilità individuali o razziali alla risposta alla nicotina (Nakajima *et al.*, 2001). Per esempio negli USA, gli afroamericani e gli asiatici metabolizzano meno la nicotina rispetto agli ispanici e ai caucasici (Perez-Stable *et al.*, 1998; Benowitz *et al.*, 2002; Hukkanen *et al.*, 2005).

Inoltre, la donna metabolizza la nicotina più rapidamente dell'uomo e il metabolismo è aumentato in gravidanza e se vengono assunti contraccettivi contenenti estrogeni (Hukkanen *et al.*, 2005). Infine, il metabolismo della nicotina può essere aumentato da parte di desametasone, fenobarbital, rifampicina, diossina, etc., o inibito da succo di pompelmo, mentolo, dallo stesso fumo o durante patologie epatiche.

Principalmente la biotrasformazione avviene nel fegato, ma anche, in misura minore, nei polmoni, nei reni e nel cervello (Hukkanen *et al.*, 2005; Pogocki *et al.*, 2007). La conversione metabolica della nicotina a cotinina è un processo relativamente lento paragonato alla distribuzione totale della nicotina all'interno del corpo. A questo proposito alcuni studi mostrano

la distribuzione utilizzando sigarette con nicotina marcata. Simultaneamente la formazione della cotinina viene determinata allo stesso modo e con questo metodo si valuta la velocità di conversione della nicotina a cotinina. In condizioni normali, ciascuna sigaretta aumenta la dose di nicotina nel corpo e ciò contribuisce al *pool* di cotinina e di altri metaboliti. Mentre l'emivita della nicotina è di due ore, quella della cotinina è di circa 16 ore (Benowitz, 2009). Solo il 5% della nicotina introdotta viene escreta nelle urine non metabolizzata (Hukkanen *et al.*, 2005). La nicotina penetra anche nell'organismo del feto attraversando la barriera placentare e compare in tutti i liquidi corporei, compreso il latte materno. E' necessario ricordare che la nicotina si concentra di più nel feto, a causa del pH più acido del feto rispetto alla madre. Questo aspetto è da tenere seriamente presente nelle mamme gravide fumatrici che assumono nicotina per via inalatoria dall'ambiente.

A seconda di come si assume il tabacco, la nicotina può arrivare rapidamente a livelli molto alti nel sangue e nel cervello. Per esempio fumare sigarette può portare a una distribuzione rapida di nicotina per tutto il corpo, arrivando al cervello in 10 secondi dopo essere stata inalata. D'altra parte i fumatori di sigari o pipa generalmente non inalano il fumo, così che la nicotina si assorbe più lentamente attraverso le mucose della bocca. Questa precisazione è necessaria in quanto la cinetica di assorbimento è rilevante per gli effetti della nicotina. L'introduzione per via inalatoria dà picchi più elevati di quelli di un'infusione per via endovenosa e molto più alti di quelli di una nicotina presa per bocca o per via transcutanea.

Gli effetti della nicotina sono dose-dipendenti. A basse dosi questa sostanza crea dipendenza e ha effetto stimolante: aumenta l'attenzione, la concentrazione, l'apprendimento e la memoria; inoltre provoca tachipnea, tachicardia, ipertensione e riduzione dell'appetito. Ad alte dosi determina stanchezza e *deficit* di memoria e concentrazione. Dosi estremamente elevate sono in grado di provocare nausea, vertigini, mal di testa, tremori e confusione e nei casi più gravi perdita di coscienza, convulsioni e persino la morte (Le Foll *et al.*, 2009). La depressione (grave) si verifica con dosi molto elevate e comunque sempre dopo una fase di stimolazione. La dose letale di nicotina nei non fumatori è di 50-100 mg, mentre nei fumatori è più alta a causa dello sviluppo della tolleranza (Zaniewska *et al.*, 2009).

Da quando la nicotina fu identificata per la prima volta agli inizi del secolo XIX, è stata studiata estensivamente e si è dimostrato che ha numerosi effetti complessi e non prevedibili sul cervello e sul corpo tra cui il principale è la sua dipendenza (Stolerman *et al.*, 1991; Dani *et al.*, 1996; Balfour *et al.*, 2000; Di Chiara, 2000; Dani *et al.*, 2001). La medicina ufficiale solo nel 1988 ha affermato che la nicotina dava dipendenza come le altre droghe (*General Surgeon USA*, 1988). Tuttavia le industrie del tabacco conoscevano le qualità farmacologiche della nicotina dal 1963



ma in pubblico continuavano ad affermare che questa sostanza non dava dipendenza ma era un componente molto importante per il gusto.

## EFFETTI DELLA NICOTINA A LIVELLO DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

### EFFETTI SUL SISTEMA CARDIOCIRCOLATORIO

Nell'uomo le azioni della nicotina si manifestano come alterazioni della fisiologia del sistema nervoso, sia centrale che periferico. A livello di quest'ultimo, gli effetti svolti da questo alcaloide sono numerosissimi.

Per esempio la nicotina è in grado di influire sul sistema cardiocircolatorio attraverso 3 meccanismi principali:

- per via centrale attraverso l'attivazione di particolari sottotipi recettoriali nicotinici presenti in vari centri e nell'area midollare depressiva caudale ventrolaterale responsabile delle risposte cardiovascolari della stimolazione dei barorecettori (Alberger *et al.*, 2001);
- attraverso la modulazione del sistema nervoso autonomo favorendo la liberazione di neurotrasmettitori dalle terminazioni sinaptiche. La stimolazione dei nAChRs porta quindi ad una secrezione di catecolamine, con ipertensione, tachicardia, aumento della forza contrattile e quindi della richiesta di ossigeno, costrizione dei vasi cutanei e delle coronarie (Li *et al.*, 2010). Inoltre la nicotina, attraverso la stimolazione simpatica può essere uno dei fattori che porta ad aritmie (D'Alessandro *et al.*, 2012).

- attraverso le cellule endoteliali, modificandone la forma, aumentandone la proliferazione e aumentando l'iperplasia dell'intima (Pipe *et al.*, 2010). Inoltre i recettori nicotinici endoteliali sono degli stimolanti dell'angiogenesi sia *in vitro* che *in vivo*, favorendo l'entrata di calcio, la produzione di nitrossido (NO) e la liberazione di fattori di crescita, in particolare il *Fibroblast Growth Factor* (FGF) e il *Vascular Endothelial Growth* (VEGF) (Cooke *et al.*, 2008; Konoishi *et al.*, 2010). L'esposizione cronica a nicotina sembra desensitizzare i recettori endoteliali e produrre effetti diversi sull'angiogenesi rispetto a una somministrazione acuta (Konoishi *et al.*, 2010).

Sembra perciò che la nicotina da sola abbia tutti i requisiti per essere responsabile di molti, se non tutti, gli effetti cardiovascolari del fumo di tabacco. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per confermare ciò.

## EFFETTI SULLA CUTE

Mentre è ben noto l'effetto negativo del fumo sulla cute e sulle mucose (come spiegato in precedenza: aumento della senescenza, della colorazione, dei tumori, difficoltà di guarigione delle ferite) (Ortiz *et al.*, 2012), i dati sugli effetti della nicotina sono più contraddittori e meno chiari. Nei vecchi formulari la nicotina per via topica era riconosciuta come un farmaco che aiutava nella guarigione delle ferite, ma era anche riportata la sua azione inibente e irritante.

Diverso è l'effetto se la nicotina è somministrata per via generale e in modo cronico. La base biologica per l'azione della nicotina risiede nella presenza di numerosi recettori nicotinici nei cheranociti, nei fibroblasti, nelle fibre nervose sensitive, nelle cellule dendritiche e nei linfociti cutanei (Misery, 2004). Anche nei vasi cutanei si riscontrano le alterazioni delle cellule endoteliali e muscolari dovute all'assunzione di nicotina che portano ad una alterazione della parete vasale ed a una diminuzione dell'irrorazione.

In letteratura, tuttavia, si riscontrano numerosi dati contrastanti; questi, probabilmente sono dovuti alle diverse modalità di trattamento della nicotina che potrebbero portare ad una attivazione oppure ad una desensitizzazione dei nAChR (Wang *et al.*, 2005; Grando, 2006).

## EFFETTI PROTUMORALI

Come riportato prima, uno degli effetti più importanti del fumo di tabacco è la facilitazione dell'insorgenza di tumori. La responsabilità maggiore è da attribuire alle nitrosammine e alle ammine eterocicliche presenti nel fumo di tabacco, ma anche la nicotina vi può contribuire in modo non lieve (Egleton *et al.*, 2008). Per quanto riguarda i tumori epiteliali meritano particolare attenzione il carcinoma cutaneo a cellule squamose, i papillomi genitali e i tumori del cavo orale. La nicotina stimola l'attività mitotica delle cellule epiteliali basali, inibisce l'apoptosi, stimola l'invasività delle cellule tumorali, aumenta l'espressione dei fattori di crescita e favorisce l'angiogenesi (Ortiz *et al.*, 2012). Inoltre l'effetto immunosoppressivo, proinfiammatorio della nicotina sulle cellule dendritiche, sui macrofagi e sulle cellule immunocompetenti cutanee certamente facilitano gli effetti protumorali.

## EFFETTI SUL SISTEMA GASTROINTESTINALE

La nicotina ha un'azione importante sulla funzionalità del sistema gastrointestinale sia attraverso il sistema autonomo, sia interagendo con i recettori nicotinici presenti nelle cellule del sistema gastrointestinale. Essa stimola le secrezioni e la motilità, potenzia gli stimoli ulcerogeni diminuendo i fattori protettivi e difensivi. Inoltre potrebbe essere coinvolta nei meccanismi di

inizio e promozione dei tumori gastrointestinali connessi con il fumo di tabacco (Wu *et al.*, 2004). D'altra parte, però, la nicotina potrebbe essere responsabile degli effetti benefici del fumo nella colite ulcerosa, e in questo senso sono in corso degli studi clinici promettenti (Bastida *et al.*, 2011).

## EFFETTI DELLA NICOTINA A LIVELLO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE E POTENZIALI USI TERAPEUTICI

La nicotina agisce a diversi livelli (molecolare cellulare e neuroanatomico) ed esercita un suo effetto farmacologico sui processi cognitivi, come l'attenzione, l'apprendimento e la memoria (Barik *et al.*, 2009). Sembra inoltre che questi effetti si mantengano a lungo anche dopo la sospensione del trattamento nicotinicco (Gotti *et al.*, 2004; Newhouse *et al.*, 2004; Benowitz, 2009; Newhouse *et al.*, 2011; Poorthuis *et al.*, 2013). In generale, dal punto di vista fisiologico, si definisce un effetto di miglioramento dei processi cognitivi quando si osserva oggettivamente un aumento dell'*information processing*: gli stimoli nervosi sia afferenti che efferenti sono elaborati con maggiore velocità ed efficienza in base alla valutazione comportamentale (*performance*). Gli effetti della nicotina sulla *performance* cognitiva sono stati studiati nell'uomo e nell'animale da laboratorio, ed i meccanismi sottostanti sono stati indagati a livello molecolare e cellulare (Newhouse *et al.*, 1997; Barik *et al.*, 2009). In generale si pensa che gli effetti sulla memoria e sull'apprendimento siano mediati dai recettori  $\alpha_7$ , anche se i recettori  $\alpha_4$  hanno un ruolo in alcune aree. Tuttavia, i dati sono spesso discordanti a seconda del modello sperimentale utilizzato; anche nell'uomo i dati non sono sempre concordanti per la difficoltà di reclutare gruppi omogenei e ben caratterizzati nell'abitudine al fumo, per le dosi di nicotina non sempre controllate oggettivamente (per esempio controllando le concentrazioni di cotinina) e per le diverse vie di somministrazione della nicotina che portano cinetiche diverse (Matta *et al.*, 2007). In particolare, la nicotina migliora l'attenzione selettiva, la vigilanza, l'orientamento e varie forme di memoria e di lavoro. Gli studi preclinici sul comportamento delle cavie (sia roditori che primati) hanno permesso, in parte, di confermare questi dati indicando dei meccanismi neurobiologici sottostanti agli effetti della nicotina sulla funzione cognitiva. Si è visto che la nicotina è efficace in diversi modelli comportamentali di apprendimento e memoria nella cavia, e come questi effetti siano mediati da aree cerebrali, come l'ippocampo e la corteccia cerebrale. Queste aree del cervello sono ricche di recettori colinergici di tipo nicotinicco e, proprio a questo livello, il legame della nicotina con i propri recettori regola direttamente la funzione neuronale, oppure aumenta il rilascio di altri neurotrasmettitori (es. glutammato), coinvolti nei processi

neuronalmente che portano ad apprendimento e memoria. Infatti, si è visto che anche molecole selettive per i recettori nicotinici, in particolare quelli specifici per le subunità  $\beta_2$  ed  $\alpha_7$ , si sono dimostrati efficaci in diversi modelli sperimentali. Queste sostanze sono ad oggi oggetto di ricerca farmaceutica per lo sviluppo di farmaci che possano migliorare la funzione cognitiva in patologie come la demenza senile, il morbo di Alzheimer, il Morbo di Parkinson e la schizofrenia. In generale i dati presenti in letteratura suggeriscono che i recettori nicotinici neurali nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo sembrano essere coinvolti negli effetti mnemonici della nicotina, migliorando la *performance* in compiti che richiedono uno sforzo cognitivo sia nell'animale sia nell'uomo. La somministrazione di nicotina, infatti, migliora la *performance*, di pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD) in compiti cognitivi quali apprendimento e memoria verbale, attenzione nei test di *performance* continua e accuratezza nei test di attenzione visiva (Levin, 2002). Inoltre pazienti affetti da malattia di Parkinson (PD), che abbiano ricevuto nicotina sotto forma di *patch* o abbiano fumato una sigaretta, mostrano significativi miglioramenti in funzioni cognitive. Il trattamento con mecamilamina, antagonista nicotinico, peggiora in maniera dose-dipendente, la *performance* in una batteria di test cognitivi. Studi nell'animale da laboratorio suggeriscono possibili meccanismi sottostanti gli effetti cognitivi della nicotina. Ad esempio, il trattamento sia acuto sia cronico con nicotina abbassa la soglia per l'induzione della *long term potentiation* (LTP) nell'area CA1 dell'ippocampo del ratto anziano (Picciotto *et al.*, 2002).

Tuttavia, molti studi preclinici e clinici hanno prodotto dati negativi sui potenziali effetti della nicotina sulla *performance* cognitiva. Le ragioni sono diverse e dipendono dalla scelta della variabile in studio, dalle funzioni modulate dei soggetti umani, dal test o modello sperimentale, dai sondaggi utilizzati. La scelta dei dosaggi e dei soggetti sono apparsi gli elementi più critici. La nicotina è una sostanza psicoattiva che manifesta i suoi diversi effetti ai dosaggi più elevati. Questa relazione dose-risposta si osserva per esempio come differenza nella risposta positiva sulla memoria verbale nei pazienti affetti da Alzheimer, ma non nei pazienti parkinsoniani. Soggetti diversi possono rispondere in modo diverso a seconda se presentano già dei *deficit* cognitivi o no. In particolare, l'esempio dei fumatori, in astinenza o no, è emblematico. Nei fumatori si pensa che gli effetti positivi sulla funzione cognitiva, memoria e attenzione, riportati soggettivamente, siano oggettivamente solo un effetto antagonista del *deficit* di *performance* che si instaura come conseguenza all'astinenza. Infatti, quando i livelli plasmatici di nicotina scendono al di sotto di un certo valore, si incominciano a manifestare i sintomi d'astinenza, inclusa la difficoltà di attenzione e concentrazione.

Gli effetti cognitivi della nicotina in persone sane e non fumatrici sono modesti, questi sono più

rilevabili in persone con risposte cognitive subottimali. Studi di *imaging* non invasivo suggeriscono che la nicotina abbia un effetto deattivante sulle strutture corticali mediane responsabile dell'attività cerebrale a riposo, mentre attiva le strutture corticali connesse con l'esecuzione di compiti (Newhouse *et al.*, 2004, 2011). Questo processo di deattivazione-attivazione sembrerebbe orientare la corteccia all'elaborazione più attenta degli stimoli esterni a scapito di quelli interni. La nicotina, inoltre, sarebbe importante nel modulare i processi neurali connessi con gli stimoli emozionali, soprattutto quelli negativi, aumentando il loro processamento (Newhouse *et al.*, 2011). Ricerche recenti di grande interesse, svolte negli animali ma confermate nell'uomo, suggeriscono che la nicotina abbia effetti sulla capacità di prendere decisioni importanti, soprattutto favorendo la possibilità di scelta di soluzioni rischiose e ben remunerate in confronto a soluzioni meno rischiose, ma anche meno remunerate. In questi effetti sarebbero implicati l'ippocampo sinistro, l'insula e l'amigdala (Mitchell *et al.*, 2012; Kobiella *et al.*, 2013).

Sotto forma di cerotto o inalatore, la nicotina è stata studiata nel miglioramento dell'attenzione anche in soggetti sofferenti di disturbi di ipercinetismo e attenzione, i cosiddetti pazienti ADHD (Levin *et al.*, 1996) ed in pazienti con Morbo di Alzheimer (Conners *et al.*, 1996), dove in questi ultimi si è osservato anche un miglioramento dei tempi di reazione, dell'apprendimento e della memoria sia a breve che a lungo termine (Jones *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1995). Si è visto inoltre che la nicotina migliora il consolidamento della memoria e di compiti di concentrazione (Rusted *et al.*, 1998) nella categoria dei pazienti affetti da demenza senile. La somministrazione dell'antagonista nicotinico mecamilamina, al contrario, in soggetti di media età e in pazienti affetti da Alzheimer, ha mostrato un indebolimento cognitivo progressivo (Newhouse *et al.*, 2000). Inoltre, sebbene studi epidemiologici mostrino dati conflittuali in merito al fatto che il fumo potrebbe rallentare l'insorgenza dell'Alzheimer (Van Duijn *et al.*, 1991), i dati sperimentali suggeriscono invece che gli effetti positivi contro la  $\beta$ -amiloide potrebbero essere ottenuti stimolando il recettore nicotinico dell'ACh (Kihara *et al.*, 1997; Zamani *et al.*, 1997), cosa che potrebbe avere grosse implicazioni per il futuro.

Da un punto di vista epidemiologico si è riscontrato che il fumo di tabacco potrebbe avere effetti protettivi sullo sviluppo del Morbo di Parkinson (Fratiglioni *et al.*, 2000). Ancora non è noto se questo effetto sia ottenibile anche attraverso la sola nicotina, ma ricerche *in vitro* e su animali da esperimento sembrano supportare questa ipotesi (Picciotto *et al.*, 2008).

Un'altra categoria di soggetti che sembrano beneficiare degli effetti della nicotina sono gli schizofrenici, dove è nota la carenza della funzione colinergica e dove l'incidenza di fumatori è molto alta (80-90%), suggerendo così che il fumare tabacco sia una sorta di automedicazione per

contrastare i *deficit* cognitivi che caratterizzano la malattia (Rezvani *et al.*, 2001).

## I recettori nicotinici

La nicotina esplica i suoi effetti centrali attivando i recettori nicotinici neurali (nAChR) ionotropici, il cui ligando endogeno è l'acetilcolina (ACh). I recettori che legano l'ACh si distinguono in muscarinici e nicotinici e sono distribuiti sia a livello periferico, nelle giunzioni neuromuscolari, nei gangli e nelle cellule cromaffini, che nel sistema nervoso centrale (SNC). Il sistema colinergico, infatti, può essere considerato il più importante e vecchio sistema dal punto di vista filogenetico. La sintesi e il rilascio del neurotrasmettitore ACh ad opera dei neuroni colinergici è fondamentale per numero processi.

I recettori muscarinici (mAChR), così definiti per la loro sensibilità alla muscarina, alcaloide estratto dal fungo *Amanita muscaria*, sono presenti in tutti gli organi innervati dal sistema parasimpatico e ne mediano le azioni; sono, infatti, coinvolti in molte delle funzioni riguardanti la trasmissione colinergica del SNC. I mAChR, di cui sono stati identificati 5 sottotipi (M<sub>1-5</sub>), fanno parte della superfamiglia di recettori metabotropici accoppiati a proteine G.

I nAChRs, così chiamati per la loro sensibilità alla nicotina, sono recettori canale specifici per i cationi, ossia la loro attivazione, stimolata dall'ACh o dalla nicotina, determina l'apertura di un canale ionico per i cationi, con conseguente depolarizzazione e risposta del neurone effettore (Albuquerque *et al.*, 1997; Broide *et al.*, 1999; Paterson *et al.*, 2000; Dani *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2005). Essi prendono il nome dalle prime esperienze di John N Langley, uno dei padri della farmacologia che, all'inizio del ventesimo secolo, scoprì che la nicotina aveva un'azione prima stimolante e poi inibente sulla trasmissione nervosa nei gangli simpatici. Questi recettori sono presenti nei gangli autonomi a livello del sistema nervoso periferico (SNP), sui nervi sensoriali, sulle terminazioni di alcuni nervi periferici e soprattutto in numerose aree del sistema nervoso centrale dove agiscono a livello della trasmissione colinergica (Gotti *et al.*, 2004). A livello neuromuscolare e gangliare i nAChR mediano la trasmissione sinaptica veloce; a livello centrale, invece, l'innervazione colinergica regola numerosi processi tra cui il rilascio di neurotrasmettitori, l'eccitabilità cellulare, l'integrazione cellulare, la capacità di trasmissione sinaptica agli organi periferici, la proliferazione e il differenziamento dei progenitori neurali, la migrazione, la maturazione e la degenerazione neuronale (Broide *et al.*, 1999; Dani, 2001; Liu *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2010). A livello funzionale queste azioni si riflettono su meccanismi fisiologici che governano diversi stati dell'individuo: la regolazione della temperatura, il

controllo della motilità, la sensibilità al dolore, il sonno, la fatica, l'ansia il panico, l'assunzione di cibo e numerose attività cognitive (Hogg *et al.*, 2003; Gotti *et al.*, 2004). Inoltre, i nAChR mediano il fenomeno dell'*addiction* che fa seguito al consumo cronico di tabacco (Dani *et al.*, 2001; Hogg *et al.*, 2003; Gotti *et al.*, 2004; Hogg *et al.*, 2004; Laviolette *et al.*, 2004; Gotti *et al.*, 2006). Questi recettori sono particolarmente importanti in due periodi cruciali dello sviluppo cerebrale: durante la formazione del circuito pre- e perinatale e durante la degenerazione cellulare età-dipendente (Gotti *et al.*, 2006). I nAChR sono coinvolti anche nella sopravvivenza neuronale ed è stata osservata, in modelli *in vitro* e *in vivo*, la capacità neuroprotettiva di diversi agonisti nicotinici che interagiscono con tali recettori. Inoltre, è sempre più evidente come un'alterazione della trasmissione colinergica possa portare a diverse patologie durante lo sviluppo, la vita adulta e la vecchiaia (Changeux *et al.*, 2001; Picciotto *et al.*, 2002). I nAChR, localizzati a livello del SNC, sono presenti principalmente nei siti presinaptici o preterminali, dove il loro significato è quello di modulare il rilascio dei neurotrasmettitori, siano essi eccitatori o inibitori (Gotti *et al.*, 2006; Exley *et al.*, 2008). Talvolta sono anche situati sul corpo cellulare o sui dendriti, dove hanno il compito di mediare gli effetti postsinaptici o somatodendritici, come gli effetti di depolarizzazione, incremento del *firing* neuronale e potenziamento a lungo termine nella trasmissione del segnale (LTP) (Hurst *et al.*, 2013).

I recettori nicotinici sono coinvolti nella patogenesi di numerose malattie a carico del SNC. Tali patologie possono essere divise in due gruppi: quelle in cui è mutato il gene codificante per una subunità del recettore e ciò comporta un'alterazione funzionale (es. l'epilessia autosomica dominante del lobo frontale) e quelle in cui si verifica un'alterazione del numero di recettori (es. schizofrenia, sindrome di *Tourette*, ADHD, autismo, depressione, ansia e malattie neurodegenerative come Alzheimer e Parkinson) (Gotti *et al.*, 2006).

## STRUTTURA E PROPRIETA' BIOFISICHE DEI nAChRs

I recettori nicotinici formano una classe molto eterogenea di sottotipi recettoriali, ciascuno dei quali ha caratteristiche farmacologiche e fisiologiche differenti e tessuto-specificità relativa ai siti di distribuzione. Questi recettori ionotropici possiedono una struttura pentamerica che forma un canale permeabile a ioni monovalenti ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) e bivalenti ( $\text{Ca}^{++}$ ) (Gotti *et al.*, 2006; Gotti *et al.*, 2012). Alcuni studi hanno dimostrato l'eterogeneità dei recettori nicotinici. Esistono 12 geni che codificano per le subunità del recettore nicotinico. Ad oggi sono state identificate varie isoforme ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) a seconda della diversa localizzazione anatomica dei recettori, presenti in

un rapporto stechiometrico di 2,1,1,1. Attualmente si conoscono 9 subunità neuronali  $\alpha$  ( $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$ ), maggiormente coinvolte nel legame di agonisti ed antagonisti competitivi, e 3 subunità  $\beta$  ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ) con prevalenti funzioni di tipo strutturale (Cooper *et al.*, 1991; Elgoyen *et al.*, 1994; Lindstrom, 2000; De Biasi, 2002; Champiaux *et al.*, 2002; Le Novère *et al.*, 2002; Dani *et al.*, 2007) mentre non sono note isoforme per le  $\gamma$ ,  $\delta$  ed  $\epsilon$  (Lukas *et al.*, 1999). Le diverse subunità derivano tutte da un progenitore ancestrale comune, altamente conservato nel corso dell'evoluzione. In specie diverse la stessa subunità presenta un livello d'identità nella sequenza aminoacidica superiore all'80% (Le Novere *et al.*, 1995).

Le subunità  $\alpha$  presentano due cisteine adiacenti, omologhe a quelle in posizione 192-193 della subunità  $\alpha_1$  del recettore muscolare nicotinicco, coinvolte nella specificità di legame dell'agonista; mentre le subunità  $\beta$ , seppur ne sono prive, partecipano anch'esse alla determinazione delle caratteristiche farmacologiche dei recettori che le contengono (Changeux *et al.*, 1998; Changeux *et al.*, 2005). Le diverse subunità possono combinarsi tra loro formando potenzialmente un numero elevatissimo di configurazioni recettoriali, caratterizzate da profonde differenze in termini di ligando-interazione, farmacologia, cinetica di attivazione, desensitizzazione e permeabilità cationica (Luetje *et al.*, 1991; Corringer *et al.*, 2000; Klink *et al.*, 2001; Gotti *et al.*, 2007); in realtà i recettori espressi nelle cellule nervose o muscolari o di altro tipo sono di numero non alto, ben definito e con una topografia precisa. Infatti nel muscolo si trova un recettore composto da  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  o  $\gamma$  durante lo sviluppo; nel cervello, invece, abbiamo due sottotipi rilevanti: gli eteromerici composti da  $\alpha_4\beta_2$  e gli omomerici composti da  $\alpha_7$  o  $\alpha_8$ ; nei gangli sono presenti soprattutto recettori di tipo  $\alpha_3\beta_4$ . A queste subunità possono essere anche associate altre subunità (per es.  $\alpha_5$  e  $\beta_3$ ) chiamate accessorie in quanto non partecipano direttamente alla formazione del sito di legame ma regolano la farmacologia, la funzione e la localizzazione dei recettori (Gotti *et al.*, 2007).

Gli effetti che la nicotina esercita in varie aree del cervello variano quindi in funzione non solo dell'area cerebrale considerata ma anche in funzione del sottotipo di recettore nicotinicco presente in quella determinata area (De Biasi, 2006). Infatti, la varietà della composizione in subunità si riflette: nelle proprietà biofisiche del canale; in una farmacologia diversa, anche se la differenza di specificità verso i ligandi forse è troppo piccola tra i vari recettori eteromerici neurali per poter essere sfruttata da un punto di vista farmacologico; nella localizzazione cellulare che sembra essere influenzata da particolari subunità accessorie.

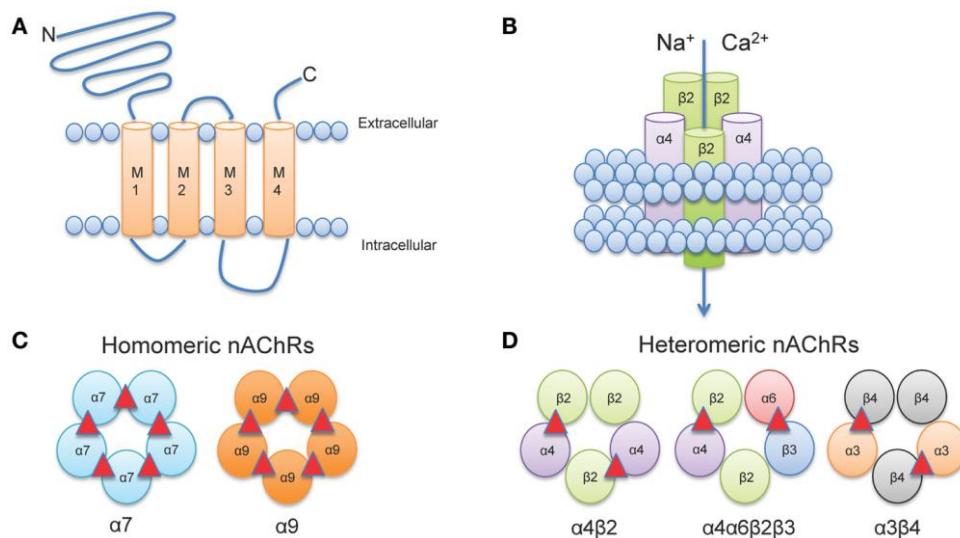
I recettori neuronali nicotinici sono una famiglia eterogenea ampiamente distribuita nel SNC, in cui si possono individuare due sottofamiglie: quella dei recettori eteromerici, con classica struttura pentamerica derivante dalla combinazione delle subunità  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ) con le



subunità  $\beta$  ( $\beta_2$ ,  $\beta_4$ ), talvolta con la partecipazione delle subunità  $\alpha_5$  e  $\beta_3$ , e con elevata affinità per la (*S*)-nicotina; quella dei recettori omooligomericici, costituiti da 5 subunità  $\alpha_7$  o  $\alpha_8$ ,  $\alpha_9$ ,  $\alpha_{10}$  ad elevata affinità per la ( $\alpha$ )-bungarotossina, una tossina estratta dal veleno dei serpenti del genere *Bungarus*. Studi di *binding* suggeriscono che i nAChR cerebrali possono essere classificati come recettori ad “alta” e “bassa” affinità. I recettori ad alta affinità comprendono gli assemblaggi etero-oligomericici con vari riarrangiamenti stechiometrici, con il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$  maggiormente espresso. I recettori a bassa affinità sono principalmente assemblaggi omomericici di subunità  $\alpha_7$ , benché sia stata suggerita la presenza di altre subunità in recettori di alcune popolazioni neuronali del SNC (Gotti *et al.*, 1985; 1991). La nicotina è in grado di spiazzare i ligandi per i recettori nicotinici dai sottotipi recettoriali ad alta e bassa affinità.

Le risposte farmacologiche ai diversi farmaci nicotinici, le caratteristiche funzionali e le proprietà biofisiche dipendono strettamente dalla composizione in subunità del sottotipo recettoriale (Gotti *et al.*, 2000; Gotti *et al.*, 2006). Solo di recente si è cominciato a delineare il ruolo fisiologico di queste subunità, grazie soprattutto alla creazione di diverse linee di animali transgenici. Si presume che sia le subunità omomeriche che eteromeriche del recettore della nicotina abbiano una struttura pentamerica, con le subunità organizzate intorno ad un canale centrale: i recettori omo-oligomericici hanno cinque siti di legame identici per l'ACh, mentre i recettori etero-oligomericici hanno due subunità  $\alpha$  e tre  $\beta$  e quindi ci sono due siti di legame per molecole localizzate all'interfaccia tra le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  (Gotti *et al.*, 2006). Ogni subunità è costituita da un'unica catena polipeptidica lunga 500-600 residui amminoacidici che, ripiegandosi su se stessa, attraversa la membrana plasmatica quattro volte ( $M_1$ - $M_4$ ) (Improgo *et al.*, 2010). Su di essa si identifica un dominio extracellulare (ECD) costituito da un residuo ammino-terminale e carbossi-terminale; in particolare, il residuo ammino-terminale è costituito da un numero maggiore di amminoacidi e racchiude la tasca necessaria per il legame con l'ACh. La catena ammino-terminale, ripiegandosi su se stessa, crea un ponte disolfuro tra due residui di cisteina, fondamentale per mantenere l'adeguata conformazione della catena. L'altro dominio è quello transmembrana (TDM), formato dai quattro segmenti  $M_1$ - $M_4$  uniti tra loro da tre anse, due delle quali intracellulari e l'altra extracellulare. La seconda ansa intracellulare che unisce  $M_3$  con  $M_4$  è costituita da una catena amminoacidica più lunga rispetto alle altre. Le anse  $M_2$  di ogni subunità sono quelle che circoscrivono il poro del recettore a livello della sezione transmembrana; le dieci  $\alpha$ -eliche  $M_1$  e  $M_3$  formano un cerchio esterno, mentre le cinque  $\alpha$ -eliche  $M_4$  sono posizionate alla periferia del canale ionico. La parte extracellulare delle  $\alpha$ -eliche  $M_2$  si inclina verso l'interno, radialmente verso il punto medio dove è piegato in due posizioni (a Pro 265 e Leu 251). Le altre tre  $\alpha$ -eliche sono invece inclinate radialmente verso e tangenzialmente

all'asse centrale. Tra le  $M_2$  e le altre ( $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_4$ ) vi sono delle cavità piene d'acqua essenziali per il blocco del segnale del recettore poiché forniscono lo spazio necessario per i cambiamenti conformazionali del canale ionico indotti dall'agonista (Brejc *et al.*, 2001). I cationi entrano nel poro ionico del nAChR attraverso il vestibolo extracellulare formato dall'ECD o attraverso aperture laterali sulle interfacce delle subunità. In sezione, il canale ionico appare costituito da anelli apolari di residui alifatici rappresentati nel lume dalle cinque  $\alpha$ -eliche  $M_2$  (Corringer *et al.*, 2000; Hogg *et al.*, 2004). Considerando la non polarità del canale, il rivestimento del poro ionico non rappresenta un ambiente particolarmente favorevole per l'ingresso dei cationi, tuttavia residui carichi negativamente sono localizzati sia all'estremità intra- che extracellulare. I nAChRs sono permeabili a determinati cationi mono- e bivalenti; la permeabilità aumenta col diametro del catione nei monovalenti e diminuisce nei bivalenti, pertanto il dominio TMD discrimina tra ioni in base alla loro carica e dimensione (Miyazawa *et al.*, 2003). Numerosi studi hanno identificato la piccola sequenza peptidica situata sul bordo intracellulare di  $M_2$  come "filtro carica selettiva", che determina caratteristica e grandezza degli ioni (Keramidas *et al.*, 2004; Dani *et al.*, 2007).



**Fig. E:** Struttura dei nAChR (Hendrickson *et al.*, 2013)

**A:** Subunità nAChR, contenente 4 domini trans membrana ( $M_1$ - $M_4$ ), un dominio extracellulare ammino- e carbossi-terminale e un *loop* intracellulare

**B:** Coassemblamento di 5 subunità

**C:** Esempi di recettori omomerici

**D:** Esempi di recettori eteromerici

La concentrazione dei recettori nicotinici a livello della superficie cellulare dipende da un equilibrio tra quanti recettori vengono inseriti e quanti ne vengono rimossi attraverso l'endocitosi. Il recettore raggiunge la membrana plasmatica attraverso molte tappe sequenziali che comprendono la sintesi a livello dei ribosomi nel reticolo endoplasmatico, il controllo di qualità, l'uscita dal reticolo ed infine il passaggio alla membrana plasmatica attraverso il Golgi. Tutte queste tappe sono o possono essere influenzate da numerosi farmaci (Gaimarri *et al.*, 2007). La nicotina e molti farmaci nicotinici aumentano il numero di recettori alla superficie e si pensa che questo sia il meccanismo cellulare responsabile della dipendenza. Il processo di *up-regulation* dipende soprattutto da un aumento del traffico intracellulare dei recettori. Questo effetto è caratteristico dei farmaci nicotinici che passano all'interno della cellula, non dipende da segnali recettoriali di membrana, ma è prodotto dal legame sui siti ortosterici dei recettori che si stanno sintetizzando nel reticolo (Riganti *et al.*, 2005; Gaimarri *et al.*, 2007; Mazzo *et al.*, 2012). Probabilmente il legame della nicotina produce una maggiore stabilizzazione dei recettori, un'uscita dal reticolo più efficiente e favorisce una stechiometria particolare delle subunità.

Da un punto di vista funzionale, i diversi sottotipi recettoriali, secondo la teoria allosterica, possono esistere in quattro distinte conformazioni: a riposo (R), attivo aperto (A) e due stati in cui i canali chiusi sono desensitizzati, I o D, che risultano refrattari all'attivazione rispettivamente nell'ordine di millisecondi (I) o di minuti (D), e che presentano alta affinità per gli agonisti. In questo modo modulano il passaggio dei cationi attraverso la membrana. In assenza di ligando il canale è chiuso e il recettore si trova in stato R; una breve esposizione all'agonista ne induce un riarrangiamento strutturale che determina l'apertura del canale con successivo influsso di ioni carichi positivamente all'interno della cellula, spostando il recettore nello stato A. Dopo pochi millisecondi tuttavia il recettore cambia conformazione e, o ritorna allo stato originale, chiuso ma capace di legare un agonista, o entra nella conformazione di recettore desensitizzato (D) insensibile all'agonista nonostante questo sia ancora legato con alta affinità (pM-nM). Quando quest'ultimo si protrae per lungo tempo il recettore passa nel suo stato inattivo (I) (Gotti *et al.*, 2004; Taly *et al.*, 2009). La cinetica con cui questi canali si alternano è strettamente dipendente dalla specifica combinazione delle subunità e dalla natura chimica dell'agonista che si lega al dominio di legame del ligando (Hurst *et al.*, 2013), ma è regolata anche dall'attività svolta da chinasi e fosfatasi, suggerendo la possibilità di una modulazione dinamica della funzione del recettore (Changeux *et al.*, 1998; Quick *et al.*, 2002). Inoltre, le subunità di cui è composto il recettore influenzano la velocità di attivazione, l'ampiezza delle correnti ioniche, il grado di desensitizzazione, la velocità con cui il recettore recupera dallo stato desensitizzato, nonché il suo profilo farmacologico. Agonisti totali o parziali legano e

stabilizzano lo stato aperto, antagonisti competitivi o non competitivi stabilizzano lo stato chiuso. Modulatori allosterici positivi o negativi facilitano o rendono più difficile la transizione da uno stato conformazionale all'altro. Gli effetti che la nicotina esercita in varie aree del cervello variano quindi in funzione non solo dell'area cerebrale considerata, ma anche in funzione del sottotipo/i di recettore nicotinico presente in quella determinata area. Tuttavia i tre principali stati conformazionali del recettore nicotinico (chiuso, aperto e desensitizzato) non sono sufficienti a giustificare completamente il loro comportamento. Esistono infatti molteplici stati di desensitizzazione, sia di lunga che di breve durata (Fenster *et al.*, 1999; Dani *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Dani *et al.*, 2007). Pertanto, ad ogni istante la popolazione di recettori nicotinici si distribuisce tra i vari possibili stati conformazionali. Il legame di agonisti o la presenza di modulatori allosterici altera ulteriormente la distribuzione fra i vari stati conformazionali (Buisson *et al.*, 1998; Changeux *et al.*, 1998; Changeux *et al.*, 2005). Per comprendere il processo di desensitizzazione dei recettori-canali colinergici è necessario tenere in considerazione la probabilità di trovare il recettore in una determinata conformazione che dipende da diversi fattori: dalla concentrazione e dalla natura dell'agonista, dalla velocità con cui avviene l'esposizione all'agonista. Tuttavia, è necessario mettere in luce le sostanziali differenze tra una sinapsi in cui interviene l'agonista endogeno (ACh-recettore) e una sinapsi in cui interviene la nicotina.

Una tipica sinapsi misura circa un micron; la concentrazione di acetilcolina rilasciata dal neurone presinaptico è all'incirca di 1 mM e il tempo di permanenza del neurotrasmettitore nel terminale sinaptico si aggira intorno ai 2 millisecondi, prima che un enzima predisposto, l'acetilcolinesterasi, degradi il neurotrasmettitore in acetato e colina per permettere un nuovo ciclo. Questa rapida interazione recettore-ligando, non permette una vera e propria desensitizzazione dei canali nelle vicinanze. Non succede allo stesso modo per le interazioni nicotina-recettore. Innanzitutto la nicotina ha una concentrazione molto più bassa nello spazio sinaptico, intorno a 0.1 mM, ma ciò che differisce e gioca un ruolo fondamentale nel processo è il tempo di permanenza. La nicotina infatti raggiunge i terminali più lentamente. Tutto ciò determina un tempo di interazione con il recettore di gran lunga superiore: a concentrazioni più basse quindi vi è una probabilità più alta di desensitizzare i recettori presenti, anche in virtù del fatto che l'affinità del recettore verso l'agonista è maggiore per la conformazione desensitizzata rispetto a quella di canale aperto o chiuso. Il fatto che le concentrazioni di nicotina contenute in una sigaretta siano in grado prima di attivare e poi desensitizzare i recettori nicotinici ha implicazioni dirette per i meccanismi che portano all'abitudine del fumo (Pidoplichko *et al.*, 1997). Tale fenomeno fa sì che gli effetti di una seconda dose di nicotina siano inferiori a quelli

della prima. Inizialmente il cervello non contiene nicotina e i recettori nicotinici rispondono normalmente agli stimoli legati alla normale attività colinergica. Quando esposti alla nicotina i recettori nicotinici sono in un primo momento attivati e producono depolarizzazione della membrana neuronale e una scarica di potenziali d'azione. Tale processo avviene in tutte le aree del cervello con conseguenze diverse. La desensitizzazione produrrà tolleranza acuta alla nicotina contenuta nelle sigarette fumate successivamente. Tuttavia, la desensitizzazione dei recettori nicotinici non è mai completa, e dipende dalla natura della subunità che li formano. Infatti ogni sottotipo recettoriale possiede le sue proprietà biofisiche e farmacologiche: il preciso ordine e la stechiometria delle subunità  $\alpha$  e  $\beta$  determinano differenti profili di risposta, ragion per cui in un determinato momento la desensitizzazione può non essere completa. Ad esempio i recettori che hanno un'elevata affinità per la nicotina e contengono la subunità  $\alpha_4$  e  $\beta_2$ , hanno una maggiore probabilità di diventare desensitizzati (Fenster *et al.*, 1999). Inoltre stesse regioni del SNC esprimono diverse qualità di recettori che determinano diverse conseguenze nei processi neurali (Dani *et al.*, 2000), nonché la loro alterata risposta anche al ligando endogeno acetilcolina nella normale attività sinaptica. Perciò il livello di desensitizzazione dei recettori nicotinici può essere alquanto diverso, con conseguenze diverse sui vari processi neurali (Dani *et al.*, 2000). Questo perché la desensitizzazione riduce la capacità dei recettori nicotinici di rispondere non solo alla nicotina, ma anche all'acetilcolina endogena rilasciata durante la normale attività sinaptica. Ad esempio la forma stechiometrica  $\alpha_4\beta_2$  mostra una sensibilità 10 volte superiore alla forma  $\alpha_3\beta_2$  così che solo la prima volta ha una sensibilità tale da permettere l'attivazione del canale a concentrazioni di nicotina nel *range* 0.1-1  $\mu\text{M}$  prodotte da un moderato consumo di tabacco (Miwa *et al.*, 2011).

Un altro aspetto importante dell'esposizione prolungata al fumo di sigaretta è che la nicotina aumenta il numero di recettori nel cervello di diverse specie animali, incluso l'uomo (Wonnacott *et al.*, 1990; Marks *et al.*, 1992; Perry *et al.*, 1999). Il fenomeno dell'*up-regulation* non è stato ancora sufficientemente chiarito, ma sicuramente la desensitizzazione prolungata è uno dei possibili meccanismi che ne spiegherebbero l'insorgenza (Lester *et al.*, 1994; Pidoplichko *et al.*, 1997; Fenster *et al.*, 1999). Infatti, le subunità che formano i nAChR sono espresse in modo specifico nelle diverse cellule in modo da poter formare nei momenti adatti e nei siti opportuni sottotipi recettoriali cellula-specifici.

Un paradigma generalmente accettato nello studio dei recettori di membrana è che l'iperstimolazione indotta da agonisti induce una riduzione del numero di recettori espressi in superficie mentre l'inattivazione prolungata indotta dagli antagonisti ha effetto opposto (Gentry *et al.*, 2002). Studi sul cervello di pazienti fumatori e su animali cronicamente esposti a nicotina

hanno dimostrato che i nAChR non seguono questa regola generale perché un'esposizione a lungo termine alla nicotina induce spesso un aumento del numero di recettori nicotinici, chiamato *up-regulation* (Buisson *et al.*, 2002; Gentry *et al.*, 2002).

In generale, infatti, la presenza prolungata di un agonista, come la nicotina, porterà in un primo momento ad *up-regulation* recettoriale, ossia un aumento del numero di recettori, seguita poi da desensitizzazione (Rollema *et al.*, 2007; Dani *et al.*, 2011). I recettori ad alta affinità che contengono  $\alpha_4$  e  $\beta_2$  sono quelli che aumentano maggiormente durante l'esposizione prolungata alla nicotina (Yates *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998; Fester *et al.*, 1999; Buisson *et al.*, 2001; Nashmi *et al.*, 2007). Nel cervello dei fumatori, infatti, i recettori nicotinici sono aumentati dal 20 al 100% rispetto ai non fumatori (Perry *et al.*, 1999). Non è ancora chiaro come tale fenomeno possa avvenire ma la desensitizzazione è uno dei possibili meccanismi (Lester *et al.*, 1994; Pidoplichko *et al.*, 1997; Fesnster *et al.*, 1999). Nella conformazione desensitizzata i recettori nicotinici sono riciclati nella membrana cellulare molto più lentamente, e questo porterebbe ad un aumento della loro densità alla superficie della cellula (Peng *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 1997; Changeux *et al.*, 2005). Infatti, quando le concentrazioni di nicotina nel cervello diminuiscono, l'eccesso di recettori espressi a livello della membrana esce dallo stato desensitizzato, con conseguente ipereccitabilità dei processi colinergici controllati dai recettori nicotinici; come conseguenza la condizione di astinenza porterà i recettori ad uscire dalla condizione desensitizzata per il fatto che l'assenza di nicotina (quindi di agonista) riporterà i recettori nello stato attivo per ristabilire una sorta di equilibrio e funzionalità sinaptica (Peng *et al.*, 1997). Il processo continuo di desensitizzazione e successiva *up-regulation*, concorre a modificare la plasticità sinaptica e partecipa verosimilmente nelle modificazioni che a lungo termine sono associate alla dipendenza (Mansvelder *et al.*, 2000; Dani *et al.*, 2001).

Questa ipereccitabilità delle sinapsi colinergiche potrebbe spiegare il nervosismo e la tensione che spingono il fumatore a consumare la successiva sigaretta. Una delle cose che la seconda sigaretta fa è "medicare" il fumatore attraverso la desensitizzazione dei recettori nicotinici in eccesso, riportando così l'attività dei processi nicotinergici a livelli più normali.

In base a queste informazioni è possibile indagare le abitudini dei fumatori. La maggior parte dei fumatori riporta che la prima sigaretta del giorno è la più piacevole (Russell, 1989). Dopo una notte di astinenza dal fumo le concentrazioni di nicotina si trovano al livello più basso della giornata. Pertanto la prima sigaretta è quella in grado di attivare maggiormente i recettori nicotinici e produrre la sensazione più piacevole legata al fumo. Dopo una o due sigarette il numero di recettori nicotinici desensitizzati aumenta, causando tolleranza acuta alla nicotina e diminuzione dell'aspetto gratificatorio del fumo. Questo processo continuo di attivazione e

desensitizzazione dei recettori nicotinici influenza la plasticità sinaptica del cervello. Verosimilmente partecipa anche nelle modificazioni a lungo termine dell'attività sinaptica che sono associate alla dipendenza (Mansvelder *et al.*, 2000; Dani *et al.*, 2001; Ji *et al.*, 2001). Un altro fattore determinante sono l'agitazione e il nervosismo che deriverebbero dall'eccesso di recettori nicotinici e dall'iperattivazione dei circuiti neuronali nicotinergici. Infatti, tra una sigaretta e l'altra, spesso passano da due a cinque ore, periodo durante il quale i livelli plasmatici di nicotina hanno il tempo di diminuire, favorendo il recupero di una porzione di recettori dallo stato di desensitizzazione (Dani *et al.*, 1996; Balfour *et al.*, 2000; Jarvik *et al.*, 2000). Questo spiegherebbe il perché i fumatori spesso riportano che il fumare durante il giorno li aiuta a concentrarsi e a mantenersi rilassati (Benowitz *et al.*, 1989; Russell 1989). L'esposizione prolungata alla nicotina fa sì che una porzione della popolazione di recettori nicotinici sia sempre nello stato desensitizzato, e questo promuove l'aumento del numero dei recettori nicotinici a livello della membrana neuronale. Se però la nicotina viene evitata per alcune settimane, il numero dei recettori nicotinici ritorna ai livelli normali, pre-nicotina (Pauly *et al.*, 1996; Trauth *et al.*, 1999; Buisson *et al.*, 2001).

In base a queste osservazioni, smettere di fumare non dovrebbe pertanto essere difficile; tuttavia, la maggior parte dei tentativi fallisce. La ragione di questo fenomeno non è ancora chiara ed è oggetto di intensa ricerca (Balfour *et al.*, 1996; Dani *et al.*, 2001). Le alterazioni a livello cellulare si tradurrebbero in una serie di comportamenti in parte associati al fumo, ma in parte anche associati al contesto in cui il fumare avviene (luoghi, persone, etc). Poiché questi comportamenti sono rinforzati dal fumo e sono legati a particolari stimoli sensoriali, il desiderio di fumare sparisce molto lentamente e spesso non del tutto. Infatti, il desiderio di fumare una sigaretta può persistere anche dopo anni che si è smesso di fumare.

Questi concetti saranno poi ampliati in seguito nei capitoli successivi.

#### RECETTORI ( $\alpha$ Bgtx)-SENSIBILI E ( $\alpha$ Bgtx)-NON SENSIBILI

Sono state identificate due principali sottofamiglie di recettori nicotinici neurali: recettori  $\alpha$ bungarotossina ( $\alpha$ Bgtx)-sensibili e recettori  $\alpha$ Bgtx- non sensibili. Quelli  $\alpha$ Bgtx-sensibili possono essere sia eteropentamerici ( $\alpha_{7-8}$  e  $\alpha_{9-10}$ ) che omopentamerici ( $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$  e  $\alpha_9$ ) mentre quelli  $\alpha$ Bgtx-non sensibili sono solo eteropentamerici, formati dalle subunità  $\alpha_2$ - $\alpha_6$  e  $\beta_{2-4}$  e legano nicotina ed epibatidina ad alta affinità (Gotti *et al.*, 1991; Lindstrom, 1997; Corringer *et al.*, 2000; Gotti *et al.*, 2006).

E' stato recentemente dimostrato che nei recettori insensibili alla Bgtx più di una subunità  $\alpha$  o  $\beta$  può essere presente nel medesimo recettore, allargando considerevolmente il numero di possibili

combinazioni (Balestra *et al.*, 2000). Questo ha importanti implicazioni di tipo funzionali perché la presenza o meno di una determinata subunità può sensibilmente modificare le proprietà del recettore e potrebbe anche spiegare le differenze osservate tra recettori nativi e recettori espressi in sistemi eterologhi (Clementi *et al.*, 2000).

Inoltre, l'espressione delle subunità  $\alpha_7$ - $\alpha_9$  da sole produce canali a recettore omomero, attivati da ACh e bloccati da concentrazioni nano molar di alfa-bungarotossina, che presentano inoltre, alta affinità al calcio e vengono rapidamente desensitizzati (Gotti *et al.*, 2004). A questo proposito recenti studi sui recettori  $\alpha_7$  hanno mostrato che essi sono altamente permeabili allo ione calcio, come i recettori per l'NMDA, ma a differenza di questi ultimi non richiedono la depolarizzazione della membrana plasmatica per promuovere l'influssi di calcio. Alte concentrazioni di calcio, infatti, facilitano il rilascio del neurotrasmettitore: quando i recettori  $\alpha_7$  sono attivati, il calcio entrante depolarizza le cellule post-sinaptiche e agisce come secondo messaggero per iniziare processi cellulari importanti, tra cui la sopravvivenza neuronale (Messi *et al.*, 1997). Le funzioni del recettore  $\alpha_7$  sono modulate anche da altri ioni divalenti come zinco, magnesio, piombo e cadmio (Hogg *et al.*, 2003).

## SITI DI LEGAME

Studi strutturali e di cristallizzazione delle proteine leganti l'ACh (proteine solubili omopentameriche che hanno una struttura simile al recettore  $\alpha_7$ ), provenienti dal mollusco *Lymnaea stagnalis*, hanno permesso di comprendere i dettagli molecolari del sito di legame dei recettori nicotinici (Gotti *et al.*, 2006).

Il sito di legame per l'agonista è posizionato in tasche idrofobiche situate all'interfaccia tra due subunità adiacenti, ossia tra la subunità  $\alpha$  e una subunità adiacente che può essere un'altra subunità  $\alpha$  identica (nei recettori  $\alpha_7$  e  $\alpha_8$  omomero), una diversa subunità  $\alpha$  nei recettori eteromero sensibili alla  $\alpha$ Btx ( $\alpha_{7-8}$  o  $\alpha_{9-10}$ ) o una subunità  $\beta$  nei recettori eteromero sensibili alla  $\alpha$ Bgtx (Gotti *et al.*, 2006). Il sito di legame per l'ACh ha una componente primaria e una componente complementare. Nei recettori eteromero insensibili all' $\alpha$ Bgtx la componente primaria è portata dalla subunità  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  o  $\alpha_6$ ) e la componente complementare è portata da una subunità  $\beta$  ( $\beta_2$  o  $\beta_4$ ), mentre nei recettori omomero  $\alpha_7$ , la stessa subunità  $\alpha$  porta entrambe le componenti che andranno a formare il sito principale e complementare in due siti di legame distinti per l'ACh (Corringer *et al.*, 2000; Changeux *et al.*, 2001; Broadbent *et al.*, 2006; Taly *et al.*, 2009). E' noto che i recettori eteromero, siano essi neurali o muscolari, presentano due siti di legame. Tali siti sono localizzati tra una subunità  $\alpha$ , la subunità primaria, e una subunità  $\beta$ ,



ovvero la subunità complementare. La quinta subunità, invece, non partecipa direttamente alla formazione del sito di legame ed è definita accessoria ( $\alpha_5$  e  $\beta_3$ ). Questa subunità tuttavia svolge un ruolo importante, in quanto è in grado di modulare e influenzare numerose caratteristiche recettoriali quali la sensibilità agli agonisti, la cinetica del canale, la permeabilità al calcio, il corretto assemblaggio e la sua localizzazione all'interno della membrana plasmatica (Taly *et al.*, 2009; Hurst *et al.*, 2013). In particolare,  $\beta_3$  è associato prevalentemente con la subunità  $\alpha_6$  e la presenza di  $\beta_3$  è importante per la formazione e la localizzazione dei recettori  $\alpha_6$  nei diversi domini del neurone; infatti in topi KO per  $\beta_3$  i nicotinici  $\alpha_6$  sono presenti in numero molto minore e sono meno trasportati nei terminali (Gotti *et al.*, 2005). Per quanto riguarda  $\alpha_5$ , è noto che la presenza di questa subunità cambia le proprietà funzionali dei nicotinici eteromericici che la contengono, inoltre studi in topi KO per questa subunità hanno dimostrato che i recettori  $\alpha_5$  sono responsabili delle proprietà aversive della nicotina e quindi responsabili della dipendenza da fumo di sigaretta (Picciotto *et al.*, 2013). Inoltre, una serie di studi di *linkage* genetici hanno recentemente dimostrato che una mutazione della subunità  $\alpha_5$ , che determina una ridotta funzionalità del recettore che la contiene, correla positivamente con lo sviluppo della dipendenza da tabacco e lo sviluppo di tumori polmonari (Improgo *et al.*, 2010).

#### LOCALIZZAZIONE ANATOMICA DEI DIFFERENTI SOTTOTIPI DEL nAChR

Il recettore nicotinico è ampiamente rappresentato nelle varie aree del SNC e la loro composizione in subunità è cellula- e regione- specifica. Nei vertebrati, la maggior parte dei recettori presenti nel sistema nervoso è eteromericica e di questi il 90% circa è costituito dal sottotipo  $\alpha_4\beta_2$ .  $\alpha_3\beta_4$  invece è il sottotipo maggiormente espresso nel sistema nervoso periferico nei gangli, nella midollare del surrene, così come in gruppi di neuroni del SNC nell'abenula mediale, nella ghiandola pineale e nella retina (Gotti *et al.*, 2004). Sia il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$  che il sottotipo  $\alpha_3\beta_4$  possono contenere la subunità  $\alpha_5$  che sembra conferire al canale una maggiore capacità di desensitizzazione e di permeabilità al calcio (Lindstrom, 2000). Per quanto riguarda, invece, i recettori  $\alpha$ -Bgtx sensibili che contengono la subunità  $\alpha_7$ , la loro distribuzione è stata studiata mediante esperimenti di *binding*. I risultati ottenuti mostrano un'alta espressione di questi recettori a livello non solo della corteccia, ma anche di ippocampo, regioni limbiche subcorticali, mentre sono meno espressi nelle regioni talamiche e nei gangli della base (Gotti *et al.*, 2006). I recettori che legano la  $\alpha$ -Bgtx contenenti le subunità  $\alpha_9$  e/o  $\alpha_{10}$ , non sono presenti nel cervello e sono espressi solo nella coclea e in determinati gangli dove il sottotipo  $\alpha_9$  forma canali omomericici, mentre  $\alpha_{10}$  risulta funzionale ed attivo solo se co-espresso con la subunità  $\alpha_9$ .

I dati relativi alla distribuzione dell'mRNA dei sottotipi recettoriali contenenti le subunità  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_4$  mostrano che la loro espressione è più circoscritta e ristretta: infatti i recettori  $\alpha_6\beta_3$  si trovano in neuroni dopaminergici mesencefalici, mentre quelli  $\alpha_3\beta_4$  sono localizzati nell'abenula mediale e nel nucleo interpeduncolare (IPN).

I recettori contenenti la subunità  $\alpha_6$  hanno una localizzazione pre-sinaptica nelle vie mesostriatali e visive. Grazie all'impiego di anticorpi subunità-specifici sono stati identificati due sottotipi recettoriali  $\alpha_6$  presenti nelle cellule dopaminergiche dello striato, nel collicolo superiore (CS) e nel nucleo genicolato laterale (NGL):  $\alpha_6\beta_2\beta_3$  e  $\alpha_4\alpha_6\beta_2\beta_3$  (Zoli *et al.*, 2002).

La nicotina e i relativi agonisti sono noti per attivare i recettori nAChRs che hanno un impatto significativo sulla *performance* cognitiva, sull'attività locomotoria, sulla temperatura corporea e sulla percezione del dolore (Lloyd *et al.*, 2000). Studi elettrofisiologici hanno rivelato che due sottotipi dei recettori nicotinici predominano nel cervelletto:  $\alpha_4\beta_2$  nel soma e nei dendriti dei neuroni granulari (De Filippi *et al.*, 2001),  $\alpha_7$  situato principalmente in neuroni Purkinje (Caruncho *et al.*, 1997; Besson *et al.*, 2012).

La subunità  $\alpha_8$  è espressa solo nel SNC aviario dove forma recettori omomerici ed eteromerici  $\alpha_{7-8}$ , ma non è stata mai trovata nei mammiferi. Si conosce ancora poco della distribuzione subcellulare dei nAChR nel singolo neurone, ma il *loop* intracellulare tra i domini trans membrana M3 e M4 delle subunità nicotiniche è importante per il loro *targeting* e la loro localizzazione.

## MECCANISMO D'AZIONE DEI nAChR

Per quanto riguarda le funzioni dei diversi sottotipi recettoriali nicotinici, esse dipendono dal sottotipo e dalla loro localizzazione sulla membrana plasmatica, in particolare dalla presenza in domini pre- o post-sinaptici, nelle zone attive della sinapsi o in domini extrasinaptici. La funzione classica è quella di mediare la trasmissione sinaptica rapida attraverso l'aumento della permeabilità della membrana plasmatica per il  $\text{Na}^+$ : tuttavia l'attivazione dei nAChR non solo permette la trasmissione sinaptica rapida ma induce anche effetti a lungo termine nei neuroni riceventi, contribuendo all'attivazione di vie di trasduzione del segnale intracellulari responsabili di fenomeni quali la sopravvivenza e la migrazione neuronale, soprattutto durante lo sviluppo e la morte cellulare programmata (apoptosi), nonché la facilitazione del rilascio di neurotrasmettitori alle sinapsi. Tutti questi fenomeni sono almeno in parte mediati dall'entrata di ioni calcio attraverso i recettori nAChR e dall'attivazione di canali per il calcio voltaggio dipendenti (VSCC) dovuta alla depolarizzazione provocata dall'influsso di ioni  $\text{Na}^+$  (Kulak *et al.*, 2001). Inoltre l'entrata di calcio all'interno del neurone induce un ulteriore aumento di calcio

intracellulare mediante il rilascio di questo attraverso i recettori della rianodina e dell'inositolo trifosfato dai depositi intracellulari. Questi meccanismi possono essere fisiologicamente complementari e avere un ruolo importante nella trasduzione del segnale attivando diverse vie intracellulari (Dajas-Bailador *et al.*, 2004).

#### FUNZIONI DEI DIVERSI SOTTOTIPI DEI nAChRs

L'identificazione della nicotina come componente psicoattiva del fumo di sigaretta, ha spinto molti ricercatori a cercare di capire le basi neurofarmacologiche, anatomiche e comportamentali dei suoi effetti.

Gli effetti rinforzanti della nicotina sono stati dimostrati utilizzando test di autosomministrazione in animali mediante sia iniezione sistemica (Corrigall *et al.*, 1989; Corrigall *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 1997; Cadoni *et al.*, 2000; Laviolette *et al.*, 2004; Pons *et al.*, 2008), che locale direttamente nella VTA (Maskos *et al.*, 2005). Inoltre gli studi comportamentali in topi WT e KO per la subunità  $\beta_2$  hanno mostrato che la sostituzione della cocaina con la nicotina in topi che si autosomministrano la cocaina, determina autosomministrazione di nicotina nei topi WT ma non negli animali KO, indicando quindi il ruolo fondamentale dei recettori contenenti la subunità  $\beta_2$  nel determinare le proprietà rinforzanti della nicotina (Picciotto *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2006; Changeux, 2010). I topi KO per la subunità  $\beta_2$ ,  $\alpha_4$  e  $\alpha_6$  non sono più in grado di autosomministrarsi nicotina per via sistemica ma la riespressione, tramite vettori virali, delle rispettive subunità nella VTA ripristina l'autosomministrazione dello stimolante (Rosa *et al.*, 2000; Marubio *et al.*, 2003; Pons *et al.*, 2008; Exley *et al.*, 2011). La delezione della subunità  $\alpha_7$  invece, non interferisce con il meccanismo di autosomministrazione di nicotina (Besson *et al.*, 2012).

Gli effetti gratificanti della nicotina sono stati valutati anche utilizzando test comportamentali come la *Conditioned Place Preference* (CPP). Topi mancanti della subunità  $\beta_2$  non mostrano valori di CPP elevati, mentre i topi  $\alpha_7$  KO prediligono gli ambienti associati alla nicotina dimostrando un effetto piacevole della sostanza (Walters *et al.*, 2006; Besson *et al.*, 2012). I topi transgenici che esprimono una subunità  $\alpha_6$ L9S mutata, che rende il recettore maggiormente sensibile alla nicotina, mostrano invece valori significativi di CPP con dosi di nicotina molto minori rispetto agli animali WT (Jackson *et al.*, 2008). Quindi le subunità  $\alpha_4$ ,  $\beta_2$ , e in qualche misura  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  e  $\beta_4$  mediano gli effetti gratificanti della nicotina mentre il ruolo dei recettori  $\alpha_7$  risulta ancora oggi poco chiaro.

Quindi i sottotipi  $\alpha_4\beta_2$  e  $\alpha_6\beta_2$  (ma non gli  $\alpha_7$ ) sono necessari e sufficienti per gli effetti di rinforzo della nicotina (Walters *et al.*, 2006); nei paradigmi di autosomministrazione intracranica la

subunità  $\beta_2$  ha un'importanza fondamentale se espressa con  $\alpha_4$  nel determinare alti livelli di nicotina autosomministrata. In particolare per quanto riguarda i recettori contenenti la subunità  $\alpha_6$ , questi sono presenti soprattutto nello striato, nella via dopaminergica connessa con “il piacere”, sia nel corpo cellulare dei neuroni dopaminergici della VTA sia nelle loro terminazioni nel *nucleus accumbens*, dove modulano il rilascio di dopamina (Zoli *et al.*, 2002; Champiaux *et al.*, 2003; Gotti *et al.*, 2010).

La delezione della subunità  $\alpha_5$  o la sovraespressione della subunità  $\beta_4$  aumentano i livelli di nicotina assunti (Picciotto *et al.*, 2012), suggerendo un ruolo modulatorio di queste subunità nei circuiti della dipendenza da nicotina. Il ruolo della subunità  $\alpha_5$  potrebbe essere dovuto alla sua presenza nel sottotipo  $\alpha_4\alpha_5\beta_2$  nei terminali dopaminergici dello striato o glutammatergici della via abenulo-interpeduncolare dove partecipa al rilascio dei neurotrasmettitori (Klink *et al.*, 2001). Recenti studi hanno identificato polimorfismi di un singolo nucleotide (SNPs) nel *cluster* genico  $\alpha_3$ - $\alpha_5$ - $\beta_4$  localizzato sul cromosoma 15 che sembrano correlati con l'aumento del rischio di *tobacco addiction*. In particolare uno SNP nel gene CHRNA5 incrementa il rischio di dipendenza del 30% negli individui portatori di un'unica copia della variante, e più del 50% in coloro che portano entrambi gli alleli mutati (Bierut *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Questa variante è associata a fumo cronico ed intenso e ad un esordio precoce dello *smoking behaviour*. Inoltre, è un fattore di rischio genetico per il cancro ai polmoni e per la BPCO nei fumatori (Amos *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Essendo questo sottotipo recettoriale presente sia nelle terminazioni GABAergiche che su quelle dopaminergiche del *caudato putamen*, soggetti portatori di questa mutazione presenterebbero da un lato una forte riduzione del rilascio di GABA che causa un aumento del rilascio di dopamina, dall'altro la necessità di una maggiore quantità di nicotina per evocare il rilascio di dopamina.

Come accennato nel capitolo precedente, numerosi sottotipi recettoriali, localizzati a livello del sistema cardiocircolatorio, influiscono sugli effetti dell'assunzione di nicotina. Per esempio l'attivazione del sottotipo  $\alpha_7$  e  $\alpha_3\beta_4$  risulta responsabile delle risposte cardiovascolari indotte dalla stimolazione dei barorecettori (Alberger *et al.*, 2001). Questi recettori controllano anche la trasmissione nei gangli ortosimpatici, mentre gli  $\alpha_4\beta_2$  regolano quella dei gangli parasimpatici (Li *et al.*, 2010). Infine il sottotipo  $\alpha_7$ , presente a livello endoteliale, stimola l'angiogenesi favorendo così la liberazione di numerosi fattori di crescita (Brown *et al.*, 2012).

Per quanto riguarda i recettori nicotinici presenti a livello della cute, questi sembrano essere degli efficaci controllori della coesione delle cellule epiteliali e della riepitelizzazione cutanea delle ferite (Grando, 2006). In particolare le subunità  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_4$  modulano la matrice attraverso il controllo dei fibroblasti e della loro espressione di collagene, metalloproteasi ed

elastina (Ortiz *et al.*, 2012); le subunità  $\alpha_7$  e  $\alpha_9$ , invece, aumentano il differenziamento dei cheratinociti, controllano l'adesione tra di loro e con la matrice attraverso i desmosomi, diminuiscono la loro mobilità attraverso la produzione e l'attività della catenina e della caderina (Misery, 2004; Grando, 2006), modulano i geni del ciclo cellulare e dell'apoptosi.

Studi di *genome-wide association* hanno anche mostrato che i geni che codificano per le subunità  $\alpha_3$  e  $\beta_4$  formano un *cluster* genico che è stato associato al cancro al polmone (Improgo *et al.*, 2010). Infatti, negli ultimi anni, una serie di analisi hanno indicato anche un possibile ruolo per le subunità  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  e  $\beta_4$  di nAChR non solo nella dipendenza da nicotina ma anche nel cancro al polmone; tuttavia, non è ancora chiaro se il rischio di cancro al polmone sia diretto o se esista un effetto di dipendenza dalla nicotina (Improgo *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda i tumori polmonari si è osservato che i tumori più legati al fumo sono i carcinomi che contengono nAChR di tipo  $\alpha_7$  e  $\alpha_3\beta_4$  (Gotti *et al.*, 1997; Improgo *et al.*, 2011). In linee cellulari derivate da questi tumori sono espresse praticamente tutte le subunità nicotiniche, eccetto le muscolari, anche se non si conosce con esattezza i sottotipi e la loro composizione in subunità (Egleton *et al.*, 2008). La stimolazione dei nAChR aumenta la proliferazione cellulare sia direttamente che attraverso la stimolazione di un *loop* autocrino serotoninergico (Cattaneo *et al.*, 1993) ed esplica un effetto antiapoptotico. Inoltre, le nitrosamine più importanti e cancerogene presenti nel fumo (NNK, NNN, DEN) hanno affinità per i recettori nicotinici. Ma il dato che più fortemente connette gli nAChR con il tumore polmonare è l'associazione di questo tumore e della dipendenza da nicotina con alcuni polimorfismi del *locus* 15q24-25 del cromosoma 15 che contiene i geni per le subunità nicotiniche  $\alpha_5$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  (Improgo *et al.*, 2011). Anche uno studio italiano ha trovato una forte correlazione tra questo *locus* e l'adenocarcinoma polmonare (Falvella *et al.*, 2009). Gli effetti causati da questi polimorfismi non sono tutti chiariti, alcuni provocano delle alterazioni funzionali del recettore, altri modificano l'espressione di questi geni. Il meccanismo con il quale i recettori nicotinici innescano un processo tumorale è attraverso l'entrata di  $\text{Ca}^{2+}$  nelle cellule mediante il recettore stesso o canali voltaggio dipendenti, e la seguente attivazione delle vie di segnale PI3K/Akt (antiapoptosi), ERK (proliferazione-invasione), produzione di VGF (angiogenesi) (Egleton *et al.*, 2008; Improgo, 2011). La presenza quindi di una concentrazione sufficiente di nicotina a livello dei liquidi bronchiali potrebbe certamente favorire l'attivazione dei nAChR e la proliferazione e il differenziamento di cellule bronchiali epiteliali o neuroendocrine.

Per quanto riguarda il SNC, tra tutti i *marker* colinergici studiati finora, l'alterazione maggiormente osservata in tutte le forme di demenza umana è una diminuzione marcata dei nAChR nella regione telencefalica. In numerosi modelli sperimentali di morte neuronale, sia *in*

*vivo* che *in vitro*, si è visto che la nicotina e gli agonisti dei nAChR svolgono una funzione protettiva. In particolare, in lesioni eccitotossiche, i nAChR possono indurre neuroprotezione con un meccanismo dipendente dal calcio e che non coinvolge il blocco della funzionalità dei recettori per il glutammato. Al contrario, l'attivazione di segnali più a valle sembra necessaria per prevenire la morte neuronale. Ad esempio, in modelli di lesione eccitotossica, la nicotina induce neuroprotezione attraverso l'attivazione della fosfatidil-inositolo chinasi 3 (PIP3K) e di ERK/MAPK o l'attivazione calcio dipendente della fosfatasi calcineurina. Infine, la stimolazione di nAChR previene la morte neuronale attraverso una diminuita attività delle caspasi e conseguente inibizione dell'apoptosi (Hejmadi *et al.*, 2003). Inoltre, la migrazione neuronale può essere in parte regolata dal calcio citosolico, l'entrata di calcio attraverso i nAChR rappresenta l'evento principale per la regolazione della migrazione cellulare nelle regioni del sistema nervoso centrale dove i nAChR sono maggiormente espressi (Zoli *et al.*, 2005).

Infine, i nAChR presenti nel *nucleus magnus* del rafe sembrano, invece, mediare gli effetti antinocicettivi.

I recettori nAChRs sono ampiamente rappresentati anche sui neuroni dopaminergici localizzati nei circuiti centrali di gratificazione, in quell'insieme di aree cerebrali denominate "sistema mesolimbico" deputate alla mediazione degli effetti di rinforzo positivo, e quindi gratificanti, della nicotina e della maggior parte delle altre sostanze d'abuso (Di Chiara, 2000; Mansvelder *et al.*, 2002; Mena-Segovia *et al.*, 2008).

#### IL SOTTOTIPO $\alpha_4\beta_2$

Il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$  dei nAChR è ampiamente distribuito nel cervello, in particolare nella zona del mesencefalo, ed è coinvolto nella mediazione degli effetti rinforzanti della nicotina (Maskos *et al.*, 2005; Leslie *et al.*, 2013). Utilizzando modelli animali di roditori geneticamente modificati, è stato osservato che la soppressione della subunità  $\beta_2$  diminuisce la sensibilità agli effetti di rinforzo della nicotina (Picciotto *et al.*, 1998; Marubio *et al.*, 2003; Tapper *et al.*, 2004; Changeux, 2010). Dal momento che tali studi non sono etici per l'uomo, per verificare quest'ipotesi, sono stati utilizzati maschi adulti di *squirrel monkeys* che avevano imparato ad autosomministrarsi la sostanza (Spealman *et al.*, 1982; Le Foll *et al.*, 2007). L'osservazione che una bassa espressione basale di nAChRs nel mesencefalo è associata ad un'elevata motivazione ad autosomministrarsi nicotina è coerente con i risultati ottenuti precedentemente con i recettori della dopamina e la dipendenza da psicostimolanti. Per esempio, l'espressione di bassi livelli di recettori della dopamina  $D_2$  sono associati con una maggiore preferenza per l'uso di

psicostimolanti negli esseri umani (Volkow *et al.*, 1999) e una maggiore motivazione ad autosomministrarsi cocaina nelle scimmie (Nader *et al.*, 2006).

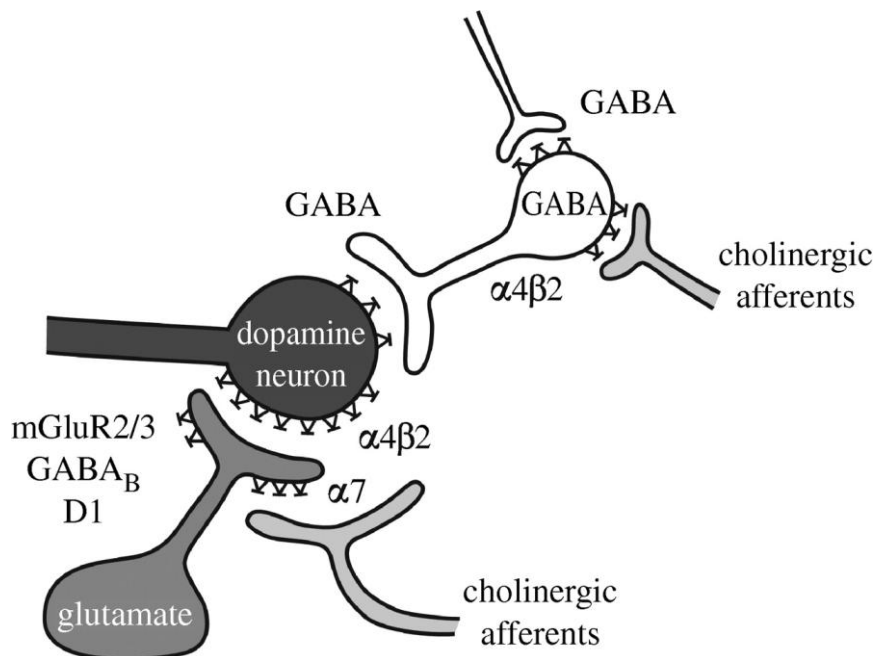
Nel loro insieme, tali studi della trasmissione dopaminergica e colinergica della nicotina, suggeriscono una correlazione inversa tra la disponibilità dei recettori che mediano il rinforzo e la motivazione a prendere droga tra i diversi sistemi di neurotrasmettitori (Le Foll *et al.*, 2009). Un livello ridotto del sottotipo recettoriale  $\alpha_4\beta_2$  potrebbe essere uno dei fattori predisponenti per la dipendenza da nicotina; inoltre i livelli di nAChR e i fattori genetici che controllano i livelli basali di  $\alpha_4\beta_2$  depongono a favore di una valutazione del rischio individuale di sviluppare una dipendenza da tabacco, che resta la causa principale di morte nei paesi sviluppati (Le Foll *et al.*, 2007).

Anche se partecipano molte aree del cervello, il sistema dopaminergico mesocorticolimbico ha un ruolo fondamentale per l'acquisizione di comportamenti che vengono impropriamente rafforzati da farmaci psicostimolanti, tra cui la nicotina (Dani *et al.*, 1996; Corrigall, 1999; Di Chiara, 2000; Mansvelder *et al.*, 2002; Balfour, 2004). Ad esempio il blocco del rilascio di dopamina nel nucleo *accumbens* in seguito a lesioni o somministrazione di antagonisti, attenua gli effetti gratificanti della nicotina, come indicato da una riduzione delle autosomministrazioni (Stolerman *et al.*, 1991; Corrigall, 1999; Changeux, 2010). Questo risultato è coerente con la constatazione generale che la dipendenza da droghe (come cocaina, eroina e anfetamine) aumenta la dopamina nel nucleo *accumbens* (Di Chiara, 2000; Di Chiara *et al.*, 2004; Mena-Segovia *et al.*, 2008). La nicotina aumenta quindi il rilascio di dopamina e migliora l'attenzione, gli stessi effetti sono prodotti da sostanze stimolanti usate per trattare l'ADHD (*Attention-deficit/hyperactivity-disorder*).

Il sottotipo recettoriale  $\alpha_4\beta_2$  è stato il primo a essere caratterizzato biochimicamente e farmacologicamente. E' il principale recettore nicotinico per l'acetilcolina a livello della corteccia, dello striato, del collicolo superiore, del nucleo genicolato laterale e del cervelletto (Gotti *et al.*, 2006). Il sottotipo recettoriale  $\alpha_4\beta_2$  ha un ruolo determinante nel mediare gli effetti della nicotina come dimostrato da studi condotti con topi KO per una o entrambe le subunità. Di conseguenza  $\alpha_4\beta_2$  nAChR è diventato il *target* molecolare per l'individuazione di molecole che possano avere un ruolo nel contrastare la dipendenza da fumo di sigaretta (Rollema *et al.*, 2007). La nicotina inalata tramite il fumo di sigaretta impiega pochi secondi per arrivare al cervello e raggiunge la concentrazione massima entro due minuti (Benowitz *et al.*, 1988). Agisce a livello dei neuroni dopaminergici e gabaergici del sistema mesolimbico nell'area tegmentale ventrale (VTA). La nicotina è in grado di attivare o desensitizzare questi recettori a seconda della concentrazione e della durata di esposizione. L'attivazione dei nAChRs sui neuroni

dopaminergici mesolimbici consente il rilascio di dopamina (DA), mentre la desensitizzazione dei nAChRs sui neuroni gabaergici attenua l'inibizione mediata dal GABA. Inoltre la nicotina agisce sui nAChRs sui neuroni glutamatergici e regola l'attività dei neuroni dopaminergici e gabaergici nell'area ventrale tegmentale. L'attivazione o la desensitizzazione di questi recettori induce o inibisce il rilascio di dopamina a livello del *nucleus accumbens* che è la struttura anatomica più implicata nell'indurre dipendenza da nicotina. L'espressione mirata della subunità  $\beta_2$  a livello dell'area ventrale tegmentale ripristina la dipendenza da nicotina e il rilascio di dopamina indotto dalla nicotina (Maskos *et al.*, 2005). La dipendenza fisica da nicotina è da associarsi al ricorrente e transitorio aumento di dopamina a livello mesolimbico in seguito ad esposizioni ripetute all'alcaloide del tabacco. Questo incremento di dopamina è alla base degli effetti di *reward* che in seguito ad esposizioni ripetute porteranno alla dipendenza fisica e psichica della sostanza (Stolerman *et al.*, 1991; Corrigall *et al.*, 1994).

Agonisti parziali per il recettore  $\alpha_4\beta_2$  possono essere utilizzati nella terapia di disintossicazione da tabacco. Infatti queste molecole attivano i nAChRs sufficientemente per evitare i sintomi della crisi di astinenza al momento dell'interruzione del fumo ma, riducendo il rilascio di dopamina nel *nucleus accumbens*, impediscono alla nicotina di esercitare un effetto rinforzante se somministrati contemporaneamente (Rollema *et al.*, 2007).



**Fig. F:** Interazione, a livello della VTA, dei neuroni dopaminergici con quelli glutamatergici e GABAergici (Markou, 2008)



## *La dipendenza da nicotina*

Solo recentemente la nicotina è stata dichiarata ufficialmente una droga a tutti gli effetti, nonostante i dati sul suo elevato potere di indurre dipendenza fossero noti da decenni ai ricercatori dell'industria del tabacco. Oggi la nicotina viene collocata al primo posto nella lista delle sostanze che vengono assunte come fumo o inalate, classificate in base alla loro capacità e velocità nel creare dipendenza. Il fumo inoltre è l'unica dipendenza per cui ci si somministra la sostanza d'abuso 20-40 volte al giorno con un comportamento ossessivo-compulsivo e ciò rende il tabagismo un vera patologia cronica per cui è necessaria una terapia nel senso più stretto del termine. In questi ultimi anni, la ricerca scientifica ha infatti rivolto particolare attenzione agli effetti centrali della nicotina e quindi anche al suo potenziale abuso. E' stata ormai dimostrata la capacità di questa sostanza di fungere da rinforzo positivo sia nell'uomo che nell'animale da laboratorio e indurre dipendenza fisica oltre che psicologica (Hughes *et al.*, 1988). Oltre a comparire tra le droghe nel *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV Edizione (DMS-IV)* e nel *Pocket Guide to the ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders* (1994), come accennato in precedenza, la nicotina è stata classificata come tale anche dall'Organizzazione Mondiale della Sanità in una categoria speciale.

Nell'uomo la dipendenza da nicotina è un processo complesso. La nicotina, componente psicoattivo del tabacco, sembra svolgere un ruolo importante nella dipendenza dal tabacco stesso. I consumatori abituali di nicotina sviluppano una forte dipendenza psichica alla sostanza, simile alla dipendenza generata dall'eroina e dalla cocaina, alla quale si aggiunge una più o meno forte dipendenza fisica. Gli studiosi hanno individuato quattro segni tipici della dipendenza fisica da nicotina: la necessità di fumare sempre più per avere lo stesso effetto, la sensazione di assuefazione al tabacco, la perdita del controllo del numero di sigarette fumate e il disagio, anche dopo una breve astinenza, che porta al tentativo continuo di trovare sollievo al desiderio di fumare. Per valutare la dipendenza fisica da nicotina viene utilizzato il "Test di Fagestrom", che serve a stabilire il grado di dipendenza farmacologica.

La dipendenza psicologica è strettamente legata alla dipendenza fisica. Il periodo iniziale di sviluppo della dipendenza è legato alle proprietà rinforzanti della sostanza stessa. La nicotina infatti è al tempo stesso uno stimolante e un rilassante. In primo luogo causando un rilascio di glucosio dal fegato ed epinefrina (adrenalina) dalla midollare del surrene, provoca stimolazione. Infatti gli effetti positivi del fumare sono ascrivibili ad una serie di modifiche dell'umore, dell'attenzione, dell'emotività. Dalle descrizioni soggettive dei fumatori, ma anche dalle misure

oggettive effettuate sperimentalmente, fumare tabacco porta ad un aumento della sensazione di energia e vigore, dell'allerta, dell'attenzione, della capacità di concentrazione e della *performance* psicomotoria. Al tempo stesso, i fumatori rilevano anche un senso di rilassamento, di nitidezza mentale, di calma, di diminuzione dell'appetito, d'alleviamento dello stress e di buon umore. Tutte queste sono conseguenze positive che inducono benessere psichico e sono i motivi che spingono il fumatore ad accendere un'altra sigaretta (Walters *et al.*, 2000). Questi effetti piacevoli del fumare diventano un rinforzo comportamentale, aumentano cioè la probabilità di continuare a fumare permettendo il mantenersi di un comportamento compulsivo protratto nel tempo (Heishman *et al.*, 1994; Berridge, 2012). Diversi studi hanno indicato come la nicotina sia essa stessa provvista di proprietà di rinforzo, analogamente a quanto descritto per gli oppiacei e gli psicostimolanti (Perkins, 1999). Un'altra caratteristica comune tra la nicotina e le sostanze che inducono dipendenza è quello di raggiungere velocemente il cervello, entro pochi secondi dall'inalazione. In genere, giunge al cervello dove subito stimola il rilascio di messaggeri chimici tra cui l'acetilcolina, la norepinefrina, l'epinefrina, la vasopressina, l'arginina, la dopamina, gli agenti autocrini e la beta-endorfina. Questo rilascio di neurotrasmettitori e ormoni è responsabile della maggior parte degli effetti della nicotina. Infatti questa sostanza sembra aumentare la concentrazione e la memoria grazie all'aumento di acetilcolina; sembra anche migliorare la vigilanza grazie al rilascio non solo di acetilcolina ma anche di noradrenalina. L'acetilcolina e la beta-endorfina sono responsabili anche della riduzione del dolore. Un'altra azione della beta-endorfina è la diminuzione dei livelli di ansia. La nicotina estende anche la durata degli effetti positivi della dopamina e aumenta la sensibilità nei sistemi di ricompensa del cervello. La ricerca suggerisce che, quando i fumatori vogliono ottenere un effetto stimolante eseguono brevi inspirazioni di fumo, che producono un basso livello di nicotina nel sangue: questo stimola la trasmissione nervosa. Infatti, a basse dosi la nicotina potenzia notevolmente l'azione della noradrenalina e della dopamina nel cervello, causando un effetto tipico delle droghe psicostimolanti. Agisce anche sugli etero recettori nicotinici che si trovano sulle fibre presinaptiche dei neuroni dopaminergici, con un effetto di modulazione positiva, cioè con un aumento di dopamina. Inoltre, molti alcaloidi presenti nel tabacco sono potenti inibitori delle MAO: le sigarette non solo stimolerebbero i neuroni dopaminergici a liberare dopamina, ma limiterebbero anche la sua degradazione enzimatica. Al contrario, quando i fumatori vogliono rilassarsi, aspirano il fumo molto più a fondo, e ciò produce un elevato livello di nicotina nel sangue, che deprime il passaggio degli impulsi nervosi, producendo un lieve effetto sedativo. Questi effetti gratificanti dati dalla nicotina, tuttavia, sono in parte ingannevoli: la verità è che quando si fuma si alleviano i sintomi da carenza di nicotina e si

interpreta questo breve sollievo come piacere o rilassamento. Infatti dopo 15-20 minuti dall'ultima "dose" inizia una nuova crisi di astinenza con sintomi più intensi. Accendendo un'altra sigaretta si allevia di nuovo il desiderio di nicotina e ci si tranquillizza, credendo così che il fumo sia rilassante. Questo circolo vizioso si crea senza rendersene conto e porta a credere che fumare sia piacevole.

Dopo aver fumato centinaia o forse migliaia di sigarette non ci si deve stupire di aver sviluppato una gestualità e delle abitudini ben consolidate, ossia una vera e propria dipendenza gestuale: fumare prima di alzarsi dal letto, dopo il caffè, con una birra o durante una telefonata, sono tutte situazioni che diventano inscindibilmente associate al fumo. Il gesto di portare la sigaretta alla bocca si inserisce nei vari momenti della giornata del fumatore, nel suo essere presente in società e nel rapporto con gli altri. La sigaretta scandisce, in modo automatico, il ritmo delle pause lavorative e del tempo libero; si accompagna alle abitudini rientrando nella globalità dello stile di vita della persona.

Oltre alla capacità della nicotina di dare assuefazione, altri fattori da considerare sono la sua facile acquisizione, le poche conseguenze legali e sociali legate al suo utilizzo ed i metodi molto sofisticati di *marketing* e pubblicità che vengono utilizzati dalle multinazionali del tabacco. Anche fattori sociali (come la pressione del gruppo) e fattori genetici sono importanti in questo processo: è noto che i fumatori giovani sono più vulnerabili a sviluppare velocemente la dipendenza (Kalman, 2002; Picciotto, 2003; Harvey *et al.*, 2004; Sieminska, 2005; Markou, 2008; Le Foll *et al.*, 2009). Infatti, la dipendenza da nicotina, come spiegato in precedenza, è sia un processo fisico (alterato stato biologico) sia un processo psichico (alterato stato psichico e comportamentale). La dipendenza fisica, prodotta essenzialmente dai condizionamenti neurobiologici, è superabile con relativa facilità; la dipendenza psichica richiede invece interventi terapeutici lenti e complessi. Le forme più gravi comportano dipendenza fisica e psichica con compulsività, cioè il bisogno di assunzione ripetuta di nicotina, per risperimentare l'effetto psichico ed evitare la sindrome di astinenza. Infatti una brusca interruzione dell'uso di tabacco provoca una forte sindrome astinenziale: un fumatore tende ad evitare questi effetti negativi fumando un'altra sigaretta.

Uno degli elementi cruciali nella dipendenza da nicotina è lo sviluppo della tolleranza, condizione che richiede dosi sempre più alte di una sostanza per produrre la stessa stimolazione iniziale e che induce un fumatore cronico a fumar ancor più frequentemente. Nella dipendenza da nicotina si sono notati due tipi di tolleranza di cui uno a livello molecolare ed uno a livello neurofisiologico (Pomerleau, 1995). Quest'ultimo consiste in una riduzione degli effetti spiacevoli ed avversivi comunemente descritti alle prime esperienze con le sigarette (nausea,

vomito, tosse, capogiro, etc). Gli effetti periferici della nicotina (a livello delle strutture periferiche del sistema autonomo) giocano un ruolo importante nell'indurre questi disturbi e pare che l'instaurarsi di una rapida tolleranza a questi effetti faciliti la ripetizione dell'assunzione. La tolleranza di tipo molecolare consiste invece in una desensitizzazione dei recettori nicotinici cerebrali che assumono una conformazione caratterizzata da maggiore affinità all'agonista ma con canale cationico chiuso (Wang *et al.*, 2005). L'organismo attua allora una compensazione funzionale con una risultante *up-regulation* dei recettori nicotinici.

In passato, tuttavia, non è stato facile dimostrare gli effetti rinforzanti della nicotina negli animali da laboratorio o nei soggetti umani. Infatti, diversi sono i fattori che possono influenzare la capacità della nicotina di indurre CPP: il ceppo di ratti, la dose utilizzata, la durata delle singole sessioni di condizionamento, la presenza di un periodo di pre-esposizione all'apparecchio prima di iniziare il condizionamento (Le Folle *et al.*, 2009). Nella maggior parte degli studi la nicotina è stata somministrata immediatamente prima del collocamento nell'apparecchiatura, e ciò sembra essere più efficace nell'indurre CPP (Fudala *et al.*, 1985). Tra i fattori chiaramente coinvolti nella capacità di una droga di indurre CPP, la scelta delle dosi è molto importante (Bardo *et al.*, 1995). In uno studio condotto per valutare gli effetti di un ampio *range* di dosi di nicotina nel test della CPP in ratti *Sprague-Dawley* la nicotina ha presentato l'effetto maggiore ad una dose di 0.1 mg/kg, mentre una successiva dose più bassa di 0.04 mg/kg non ha prodotto effetti significativi (Le Folle *et al.*, 2009). Così è stato proposto che la nicotina possa indurre sia effetti gratificanti che avversivi (Goldberg *et al.*, 1981; Laviolette *et al.*, 2002; Laviolette *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2004; Natarajan *et al.*, 2011). I risultati di questi studi supportano l'ipotesi che la nicotina è in grado di produrre sia effetti gratificanti che avversivi a seconda della dose e delle misure adottate. Precedenti risultati ottenuti nelle scimmie e nell'uomo, hanno dimostrato che alcune dosi di nicotina risultano avere effetti rinforzanti se somministrate con procedure di autosomministrazione ma anche effetti avversivi se invece somministrate in altre condizioni (Le Folle *et al.*, 2005).

Inoltre, le difficoltà incontrate nel dimostrare gli effetti gratificanti della nicotina, rispetto alle altre sostanze d'abuso, possono essere dovute ai più deboli effetti rinforzanti primari, agli effetti avversivi, o ad un più critico contributo degli stimoli ambientali nel drogarsi con la nicotina rispetto che con altre sostanze d'abuso. Nonostante in passato siano stati ottenuti risultati contraddittori su topi e ratti, non ancora completamente convalidati nei primati o sui soggetti umani, la nicotina si comporta come una tipica sostanza d'abuso (Le Foll *et al.*, 2009). Essa manifesta proprietà psicofarmacologiche simili a quelle di farmaci psicostimolanti d'abuso, come anfetamina e cocaina (Balfour *et al.*, 2000), provocando eccitazione e stimolazione

dell'attività locomotoria, quando somministrati ad animali da esperimento o a soggetti umani. Dati epidemiologici indicano che chi consuma tabacco generalmente è un *poly-drug user* (consuma anche alcool o cocaina) oppure è un paziente depresso, schizofrenico o portatore di ADHD (Levin *et al.*, 2006; Myers *et al.*, 2006; Pogocki *et al.*, 2007). Infatti la dipendenza da nicotina progredisce rapidamente nelle persone più vulnerabili che hanno malattie psichiatriche o altri problemi legati all'abuso di sostanze stupefacenti; queste persone possono essere più sensibili alla dipendenza da nicotina perché il tabacco fornisce influenza positiva sull'umore (Quattrocci *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2001).

La dipendenza da nicotina insorge nel momento in cui il sistema di *reward* è distorto. Il sistema di *reward* è un importante sistema funzionale del cervello che è fisiologicamente responsabile di numerosi comportamenti. Anche se partecipano molte aree del cervello, il sistema dopaminergico mesocorticolimbico ha un ruolo fondamentale nella dipendenza da nicotina. La nicotina, come in generale tutte le sostanze d'abuso, attivando artificialmente il sistema mesolimbico della dopamina, porta l'individuo a identificare la droga come sorgente di ricompensa e all'instaurarsi dei processi di dipendenza da droga. Quindi, l'attivazione del suddetto sistema causa sia il desiderio di autosomministrarsi ulteriore nicotina, ottenendo una ricompensa positiva, sia la tendenza ad evitare il disagio psicofisico dovuto alla mancanza di nicotina, evitando una ricompensa negativa e portando così al consumo di ulteriori sigarette. Infatti in passato numerosi studi hanno fornito chiare prove che le proiezioni dopaminergiche al *nucleus accumbens* svolgono un ruolo fondamentale nel rispondere alla dipendenza di farmaci psicostimolanti, compresa la nicotina (Corrigall *et al.*, 1992, 1994).

## SOTTOTIPI RECETTORIALI NEI CIRCUITI CENTRALI DI GRATIFICAZIONE

Sebbene sia stato dimostrato che ciascuna delle subunità  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  o  $\alpha_4$  in combinazione con le subunità  $\beta_2$  o  $\beta_3$  possa formare recettori pentamerici funzionali, da numerose evidenze sperimentali si evince che i recettori nicotinici maggiormente implicati negli effetti gratificanti e nella dipendenza da nicotina siano i sottotipi  $\alpha_4\beta_2$  (Shoaib *et al.*, 2002), come riportato nel capitolo precedente, e quello omomeroico  $\alpha_7$ . Ciascuno di questi 2 sottotipi di recettori nicotinici mostra un distinto profilo farmacologico, avendo la nicotina un'affinità nanomolare (nM) per il recettore  $\alpha_4\beta_2$ , il quale si desensitizza in tempi relativamente lunghi, ed un'affinità micro molare ( $\mu\text{M}$ ) invece, per il recettore  $\alpha_7$ , il quale tipicamente si desensitizza piuttosto rapidamente dopo la sua attivazione (Wooltorton *et al.*, 2003). E' importante notare però come concentrazioni basse di nicotina, come quelle che si ottengono dal fumo di tabacco, non desensitizzano in maniera significativa il recettore  $\alpha_7$ .

Ulteriori distinzioni possono essere fatte poi in base alle potenze relative degli antagonisti nei confronti dei due tipi di nAChR, in quanto la di-idro-beta-eritroidina (DH $\beta$ E) è ad esempio un antagonista che mostra una selettività 100 volte superiore per il recettore  $\alpha_4\beta_2$  piuttosto che per l' $\alpha_7$ , mentre l' $\alpha$ -bungarotossina ( $\alpha$ -Bgtx) e la metillicaconitina (MLA) mostrano una spiccata selettività per l' $\alpha_7$ .

Come si può facilmente immaginare vi è un notevole interesse nell'identificazione dei ruoli funzionali di ciascuna subunità recettoriale, dovuta soprattutto all'ampio spettro di effetti che la nicotina esercita sul comportamento.

### GLI EFFETTI DELLA NICOTINA SUL SISTEMA DOPAMINERGICO MESOLIMBICO E SUL *LOCUS COERULEUS*

Nel sistema nervoso centrale la maggior parte dei recettori nicotinici è localizzata a livello presinaptico, dove la loro attivazione favorisce il rilascio di numerosi neurotrasmettitori tra cui il glutammato, il GABA, la dopamina e la norepinefrina (Gray *et al.*, 1996; Albuquerque *et al.*, 1997; Alkondon *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Mansvelder *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2001; Miwa *et al.*, 2011). Sebbene i meccanismi cellulari di tale fenomeno non siano ancora stati completamente chiariti, il consenso è che la dipendenza da nicotina sia originata, anche se non esclusivamente, dall'azione di questa sostanza sui neuroni dopaminergici del sistema mesolimbico (Pidoplichko *et al.*, 1997; Leshner *et al.*, 1999; Picciotto *et al.*, 2002, 2013). Il sistema dopaminergico mesolimbico è costituito dai neuroni dopaminergici localizzati nell'area ventro-tegmentale (VTA) e dalle loro proiezioni a livello dello striato e delle aree limbiche, quali il *nucleus accumbens*, il tubercolo olfattorio, l'amigdala, la corteccia prefrontale e il setto (Koob, 1992). Il *nucleus accumbens* funge da interfaccia tra il sistema mesolimbico, deputato all'elaborazione delle informazioni emozionali, e il sistema motorio extrapiramidale, che gestisce l'attività motoria motivata (Mogenson *et al.*, 1980; Le Moal *et al.*, 1991). La corteccia, l'amigdala e l'ippocampo assolvono invece funzioni modulatorie sul *nucleus accumbens*. Nell'attivazione del sistema dopaminergico da parte della nicotina, per esempio, l'ippocampo dorsale sembra mediare gli effetti discriminativi di questa sostanza, mentre il nucleo mesopontino del tegmento sembra responsabile degli effetti antinocicettivi dati da questo alcaloide.

Anni di sperimentazione hanno indicato che le sostanze d'abuso come la cocaina, le anfetamine e la nicotina esercitano le loro proprietà rinforzanti attraverso il sistema dopaminergico mesolimbico, inducendo un aumento di dopamina nel *nucleus accumbens* della porzione ventrale dello striato (Wise *et al.*, 1987; Merlo Pich *et al.*, 1999; Picciotto *et al.*, 2013). Il *nucleus*

*accumbens* è il centro cerebrale del piacere e della gratificazione, la sua stimolazione è responsabile della dipendenza in quanto il soggetto cerca di ritrovare l'effetto euforizzante della sostanza. La nicotina è in grado di esercitare quest'effetto sia *in vitro* (Rowell *et al.*, 1987) che *in vivo* (Imperato *et al.*, 1986; Corrigall *et al.*, 1992). Il coinvolgimento del sistema dopaminergico mesolimbico nell'effetto gratificante indotto dalla nicotina è stato dimostrato anche tramite lesioni del *nucleus accumbens* mediante la 6-idrossidopamina. Negli animali lesionati, o in seguito ad iniezione di antagonisti, è stata osservata infatti una riduzione dell'iperattività motoria (Clarke *et al.*, 1988) e del comportamento di autosomministrazione indotto dalla nicotina nel ratto (Singer *et al.*, 1982; Stolerman *et al.*, 1991; Corrigall, 1999). Inoltre studi di risonanza magnetica funzionale hanno indicato come la nicotina induca un'attivazione metabolica di queste aree cerebrali nei fumatori (Stein *et al.*, 1998). Gli studi di autosomministrazione nell'animale da laboratorio hanno permesso di studiare il comportamento compulsivo di assunzione della nicotina con protocolli che mimano le diverse condizioni osservate nei fumatori. Per esempio, si è visto come cavie addestrate ad autosomministrarsi nicotina acquisiscano un comportamento ripetitivo e protratto per mesi. Questi risultati hanno contribuito alla formulazione dell'ipotesi che il rinforzo positivo provocato dalle sostanze psicostimolanti sia associato ad un aumento dei livelli di dopamina in aree specifiche del cervello (Wise *et al.*, 1987; Mansvelder *et al.*, 2002). Utilizzando questi modelli animali si è potuto effettuare la mappatura delle aree cerebrali attivate durante il comportamento compulsivo dell'autosomministrazione di nicotina. Come *markers* sono state studiate delle molecole associate all'espressione genica, quindi alla regolazione dei processi di nuova sintesi di proteine ed enzimi. Le cavie che assumevano la nicotina analogamente ai fumatori hanno mostrato una specifica espressione di questi *markers* in aree del sistema mesolimbico, indicando un'elevata probabilità che processi di neuroadattamento possano aver preso luogo (Merlo Pich *et al.*, 1997).

L'attivazione dei neuroni dopaminergici nella VTA è ritenuta far parte dei processi biochimici necessari per rafforzare i comportamenti che sono necessari per la sopravvivenza della specie. Stimoli essenziali alla sopravvivenza, quali ad esempio quelli per l'assunzione di cibo, la procreazione o il riconoscimento di situazioni pericolose hanno la capacità di innescare una sequenza di risposte comportamentali che risultano o nella prolungata esposizione allo stimolo, se questo è gratificante, o ad un allontanamento, se questo è spiacevole o doloroso. Una visione semplificata dei meccanismi di dipendenza da nicotina è che questa sostanza, come gli stimoli legati alla sopravvivenza della specie, aumenta i livelli di dopamina nel *nucleus accumbens* e questo effetto promuoverebbe il consumo di tabacco, specie nella fase di acquisizione. Tale teoria è suffragata da esperimenti in cui il blocco del rilascio di dopamina nel *nucleus accumbens*

con antagonisti o microlesioni attenua le proprietà gratificatorie, provocando una diminuzione dell'autosomministrazione in animali da esperimento (Stolerman *et al.*, 1991; Corrigall, 1999). Un'ipotesi alternativa sul ruolo del sistema mesolimbico nei fenomeni di dipendenza vede la dopamina come un segnale della novità ed un indice dell'anticipazione della gratificazione. Una terza prospettiva è che la funzione della dopamina nel sistema mesolimbico corticale coinvolgerebbe per prima cosa l'integrazione di informazioni salienti provenienti dall'ambiente; successivamente la stessa area parteciperebbe nella preparazione, nell'inizio e nell'esecuzione degli atti necessari ad ottenere il *goal* desiderato (Martin-Soelch *et al.*, 2001; Kelley *et al.*, 2002). In questa nuova interpretazione il segnale dopaminergico partecipa nel continuo apprendimento indotto da comportamenti che sono mirati all'adattamento all'ambiente come esplorato dall'animale che di continuo aggiorna la sua esperienza.

Un'altra area cerebrale molto importante per la quale sono noti gli effetti della nicotina è il *locus coeruleus*, responsabile dello stato di veglia e vigilanza. Il *locus coeruleus* del ponte (centro della vigilanza) è il centro principale della cosiddetta reazione d'allarme: la sua stimolazione comporta un'attivazione del sistema noradrenergico con aumento dello stato di vigilanza ed effetti positivi sulle capacità intellettive e cognitive, sui meccanismi dell'apprendimento e della memoria (Watkins, 2000). L'attivazione di questo centro potrebbe essere mediata, durante il fumo di sigaretta anche da riflessi che partono dalle vie respiratorie (fibre efferenti C). Il meccanismo riflesso rende la risposta rapida e potrebbe essere importante come base per l'autosomministrazione. Inoltre, l'attivazione di questo centro fa sì che, a differenza di quanto si verifica con altre droghe, la nicotina non generi turbe psichiche e comportamentali né disadattamento sociale.

Infine altri sistemi neurotrasmettitoriali sono influenzati dal fumo di sigaretta: una riduzione della concentrazione di serotonina a livello dell'ippocampo potrebbe contribuire all'effetto ansiolitico mentre un'inattivazione delle monoamino-ossidasi (MAO), peraltro indipendente dalla nicotina, potrebbe essere implicata negli effetti sull'umore (Chiamulera, 2001). A questo proposito studi scientifici hanno dimostrato che probabilmente la nicotina non è l'unica sostanza psicoattiva presente nel tabacco. Usando tecniche avanzate che permettono di ottenere immagini del funzionamento cerebrale, gli scienziati hanno trovato una marcata riduzione nei livelli della MAO, un enzima responsabile della degradazione della dopamina. Il cambiamento nelle MAO deve essere causato da qualche componente nel fumo di tabacco distinto dalla nicotina, poiché è noto che la nicotina in sé non altera in misura significativa i livelli di questi enzimi. Pertanto, la diminuzione in due forme della MAO, A e B, determina livelli più elevati di dopamina e può essere un'altra ragione per la quale i fumatori continuano a fumare.



I PROCESSI PSICO-COMPORTAMENTALI INDOTTI DALLA NICOTINA: IL *CRAVING*

Si è visto come molti degli effetti psico-comportamentali del fumare tabacco hanno un'origine comune a livello delle azioni molecolari e cellulari della nicotina; analogamente, la sindrome d'astinenza non è altro che la manifestazione di un neuroadattamento come risposta agli effetti cronici della nicotina sui processi neurobiologici. Categorizzazioni come “dipendenza fisica” e “dipendenza psichica” si dimostrano limitate per descrivere la complessità del fenomeno del tabagismo (dipendenza da nicotina), tanto che si preferisce analizzare il tutto come un *continuum* che dalle molecole al comportamento, attraverso i meccanismi cellulari, permetta di comprendere meglio i diversi fenomeni.

Un fenomeno tipico, di natura psicologica e comune anche ad altre dipendenze, è il *craving*, soggettivamente descritto come un forte desiderio incontrollabile di fumare. Parecchi dibattiti si sono tenuti in merito alla sua natura, descrizione, e definizione operativa. Vi è tuttavia concordanza nel ritenere che il *craving* sia il principale fattore determinante la ricaduta all'uso della droga, come pure il fallimento della dissuefazione da fumo (O'Brien *et al.*, 1992). Va ricordato che il fenomeno della ricaduta si può presentare anche a distanza di lunghi periodi di astinenza. Sia la ricerca che la pratica clinica hanno identificato le situazioni in cui viene indotto il *craving* per la sigaretta. Ricca è la letteratura scientifica riguardo la potente reattività agli stimoli condizionati dei fumatori (*cue reactivity*), intesa come la suscettibilità agli stimoli associati al fumare nell'indurre il *craving* (Niaura *et al.*, 1988). La *cue reactivity* è stata recentemente indagata mediante l'utilizzo di tecniche di visualizzazione cerebrale (Domino *et al.*, 2000), con risultati che suggeriscono degli specifici correlati neuroanatomici e molecolari, come il coinvolgimento di zone della corteccia prefrontale, dell'amigdala, dei gangli della base. Queste aree sono deputate all'integrazione di ricordi ed emozioni.

Numerose sono le evidenze sperimentali che indicano come diversi circuiti nervosi siano coinvolti nel processo di elaborazione delle informazioni provenienti dall'ambiente in modo da attivare le relative risposte condizionate.

Una recente ipotesi sulla *cue reactivity* (il modello *multiple action*) indica, tra gli altri, l'interazione tra il sistema dopaminergico e colinergico, come il meccanismo che sottende ai processi attenzionali per gli stimoli associati alla sigaretta, ipotizzando un neuroadattamento con diverse modalità di funzionamento (Chiamulera, 2005). Si ipotizza un neuroadattamento in questi circuiti stabilendo così nel tempo una diversa modalità di funzionamento.

Fumare, quindi assumere nicotina, non solo induce gratificazione in diverse situazioni ambientali favorevoli alla formazione di ricordi piacevoli, ma anche alla creazione ed al rafforzamento del

ricordo stesso (Hyman *et al.*, 2006; Dezfouli *et al.*, 2012). La nicotina, e forse anche altri mediatori, favoriscono la formazione di questi ricordi piacevoli. Questo tipo di effetto “cognitivo” della nicotina va considerato importante non solo nell’ambito del tabagismo, ma anche nei potenziali coinvolgimenti delle patologie neuropsichiatriche. Si è visto cioè che la nicotina esercita effetti migliorativi sulle *performance* cognitive in pazienti psichiatrici come gli schizofrenici. In base ad una recente ipotesi, non si possono non scindere i vari effetti farmacologici che la nicotina esercita in contemporanea anche sulle sfere affettiva e motivazionale. Quindi, gli eventuali effetti di potenziamento potrebbero essere associati alla sinergia, od anche all’automedicazione, di concomitanti stati psicologici.

#### DIFFERENTE SUSCETTIBILITA’ ALLA DIPENDENZA DA NICOTINA

I modelli animali permettono di focalizzarsi su specifiche componenti dell’*addiction*, dalle risposte in acuto a comportamenti più complessi come il *craving*, l’autosomministrazione e il *relapse* (ricaduta). Ogni modello comportamentale animale ha i suoi vantaggi e i suoi svantaggi, tuttavia tutti i modelli esistenti cercano, chi più chi meno, di avvicinarsi a quello che è il modello umano.

Studi in modelli animali suggeriscono che differenze interindividuali nella sensibilità alla nicotina dipendono da diverse variabili, come l’attività locomotoria, la risposta a nuovi stimoli e all’ambiente, e il livello di impulsività. Inoltre queste differenze di risposta hanno contribuito a comprendere il concetto di vulnerabilità: il livello basale di attività locomotoria, la risposta ad un nuovo ambiente, l’impulsività, la *novelty seeking* in una tavola a buchi e la *rearing activity* in uno spazio aperto sono buoni predittori per la valutazione della suscettibilità individuale agli effetti della nicotina nei roditori (Redolat *et al.*, 2009). E’ stato osservato ad esempio che gli animali con un’alta attività locomotoria basale, sono molto più propensi ad autosomministrarsi nicotina rispetto agli animali con una bassa attività locomotoria; questo risultato dimostra che un’elevata attività locomotoria come risposta ad un nuovo ambiente predice la maggiore vulnerabilità ad autosomministrarsi nicotina (Suto *et al.*, 2001). La vulnerabilità della *drug addiction* è influenzata anche dalla combinazione di fattori genetici e ambientali (Lathe, 2004; Bartolomucci *et al.*, 2005; Jama *et al.*, 2008). Pochi studi hanno analizzato la relazione tra differenze individuali nella *novelty seeking*, il comportamento e gli effetti neurochimici della nicotina. Abreu-Villaça e collaboratori nel 2006 hanno dimostrato che differenze individuali possono predire il consumo di nicotina in topi C57BL/6J adolescenti: dividendo i topi in *high* (HN) o *low* (LN) *novelty seekers* a seconda della loro reazione al nuovo ambiente (nell’*hole board test*) hanno osservato che i topi HN incrementano la preferenza per la nicotina orale.

## MODELLI ANIMALI DI DIPENDENZA DALLA NICOTINA

I modelli animali cercano di riprodurre aspetti della dipendenza come la tolleranza, l'astinenza, l'uso continuo e l'incapacità di smettere. Considerando che un fumatore ha libero accesso alle sigarette e può fumare quando vuole, dal momento che non ci sono restrizioni sociali/legali, un modello ideale di *tobacco addiction*, dovrebbe permettere all'animale libero accesso alla nicotina 24 ore al giorno, per molte settimane, partendo da differenti stati dello sviluppo.

Come accennato precedentemente, i tre modelli animali più comunemente utilizzati per studiare le proprietà rinforzanti della nicotina sono la *self administration* (SA), la *conditioned place-preference* (CPP) e l'*intracranial self-stimulation* (ICSS) (O'Dell *et al.*, 2009).

La SA è una forma di *operant conditioning* in cui la ricompensa per un gesto compiuto dall'animale (ad esempio la pressione di una leva) è la somministrazione di una dose di nicotina. La via di somministrazione più comunemente utilizzata nei modelli animali è l'intravenosa (IV), dal momento che riesce a mimare al meglio la distribuzione rapida della nicotina nel cervello attraverso la via inalatoria. L'autosomministrazione intravenosa è stata sperimentata per prima nei primati non umani (Goldberg *et al.*, 1981) e successivamente i parametri sono stati ottimizzati per poterla utilizzare anche nei roditori. In passato gli animali venivano sottoposti ad una restrizione alimentare per motivarli a premere una leva e ricevere così cibo e la droga in questione (es. nicotina). Tuttavia per capire se la nicotina sia di per sé un rinforzo positivo, oggi gli studi evitano la restrizione di cibo durante il periodo di auto somministrazione e concedono all'animale un accesso libero ed esteso alla nicotina: gli animali hanno libero accesso per 23 ore alla droga in una stanza in cui son presenti sia cibo sia acqua. Si pensa che questo modello si avvicini alla realtà dell'uomo che può liberamente disporre della droga in questione. Questi studi mostrano che i ratti si autosomministrano più nicotina per via intravenosa durante la fase buia/attiva del *light cycle*, e che la dose giornaliera è 0.18-1.5 mg/kg, molto vicina alla dose giornaliera assunta dai fumatori (LeSage *et al.*, 2003). Inoltre è stato dimostrato che i ratti, a cui è stato concesso libero accesso alla nicotina, sviluppano dipendenza e dopo l'interruzione brusca dell'esposizione mostrano i tipici segni di astinenza e un incremento dell'*intake* di nicotina dopo un periodo di astinenza (O'Dell *et al.*, 2007). Questo effetto che segue la deprivazione di nicotina dopo un periodo di astinenza, riflette l'incremento del consumo di tabacco nei momenti di *relapse* dei fumatori in astinenza. Pochi sono gli studi di autosomministrazione condotti con i topi, a confronto con quelli con i ratti. L'autosomministrazione intravenosa (IVSA) di nicotina è stata studiata in topi che erano stati precedentemente allenati a premere una leva per ricevere cocaina (Picciotto *et al.*, 1998). Questo modello rispecchia come, nella realtà, il tabacco sia

consumato comunemente in combinazione con altre droghe di abuso.

La CPP studia le proprietà motivazionali di una droga attraverso un condizionamento di tipo pavloviano, permettendo di testare in modo diretto i possibili effetti di rinforzo della droga sull'animale. La droga viene somministrata in un determinato ambiente e dopo numerosi abbinamenti, l'ambiente (stimolo condizionato) viene associato agli effetti della droga (stimolo non condizionato). L'ambiente contiene stimoli che possono determinare la preferenza (CPP) o l'avversione (*Conditioned Place Aversion*, CPA), in dipendenza dalle proprietà gratificanti o avversive della droga associata all'ambiente nella fase di condizionamento. Per eseminare le proprietà gratificanti, l'animale riceve ripetutamente la droga nell'ambiente meno preferito; per esaminare le proprietà avversive, l'animale viene trattato nell'ambiente preferito. In generale, questi studi dimostrano che basse dosi di nicotina producono CPP, alte dosi producono CPA e dosi intermedie non hanno alcun effetto. Bolin e collaboratori nel 2012 per la prima volta hanno dimostrato, utilizzando il paradigma del *place conditioning*, che la nicotina può avere effetti rinforzanti anche nella quaglia giapponese. Lo studio suggerisce che i meccanismi neurofarmacologici che mediano lo sviluppo della CPP sono conservati sia nei mammiferi che negli uccelli.

L'ICSS è una metodica che permette la diretta stimolazione e attivazione del sistema di *reward*. Viene impiantato un elettrodo nel cervello del roditore che permette una diretta stimolazione elettrica a livello di diverse strutture del sistema dopaminergico mesolimbico. Gli animali sono liberi di autosomministrarsi piccole quantità di corrente elettrica e gli sperimentatori, variando l'intensità della stimolazione elettrica, trovano il livello soglia ICSS, al quale è mantenuto un normale comportamento. Successivamente, le proprietà rinforzanti delle droghe d'abuso sono valutate esaminando se la somministrazione della droga sia in grado di abbassare la soglia ICSS. Un abbassamento della soglia ICSS si pensa rifletta un incremento della funzionalità del *reward system*. Diversi studi sperimentali riportano che la somministrazione di nicotina abbassa la soglia d'intensità della corrente (Kenny *et al.*, 2001).

Un altro modello di studio è l'autosomministrazione orale di nicotina. Questa procedura presenta alcuni aspetti nella modalità di consumo che sono simili a quello del tabacco nell'uomo: gli animali non sono deprivati del cibo, hanno libero accesso alla nicotina per tutto il giorno e per periodi estesi. Questo modello è stato utilizzato per più di 50 anni e per lo studio dell'*alcohol addiction* nei roditori (Collins *et al.*, 2012). Tuttavia questa via di somministrazione della nicotina non rispecchia quella usata dall'uomo. Locklear e collaboratori nel 2012 hanno apportato delle modifiche al paradigma di auto somministrazione orale. Si tratta di un test che consiste nel lasciare all'animale la libertà di scegliere di bere tra due bottigliette, una delle quali

contenente disciolta la nicotina. Nel test classico i topi hanno difficoltà nell'apprendere l'associazione tra l'odore e il sapore della soluzione contenente nicotina e gli effetti rinforzanti che ne derivano (Craft *et al.*, 1988; Koob *et al.*, 2006); rimane non chiaro il motivo per cui i topi preferiscano bere acqua anziché la soluzione di nicotina (Robinson *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 2004). Locklear e collaboratori pensano che il variare frequentemente le concentrazioni di nicotina, l'aggiungere dolcificanti o altri gusti a entrambe le bottigliette e la breve durata del tempo di esposizione, siano fattori che non permettano all'animale di apprendere l'associazione. Nello studio condotto hanno evitato queste circostanze e hanno ottenuto che topi C57BL/6J femmine incrementano gradualmente ma significativamente il consumo di nicotina, mostrando una netta preferenza per la soluzione contenente nicotina e segni somatici di dipendenza. Esistono pochi modelli di esposizione alla nicotina che non siano invasivi e attualmente non sono conosciuti modelli animali di fumo passivo. I metodi più comunemente utilizzati per esaminare gli effetti dell'esposizione cronica sono invasivi (come per esempio le minipompe osmotiche, ripetute iniezioni sottocutanee e la somministrazione per via intravenosa) e non mimano l'esposizione intermittente o a bassi livelli di nicotina nell'aria come esposizione passiva (Koob *et al.*, 2006).

Nel 2006, Nowakowska e collaboratori hanno condotto uno studio per investigare le interazioni tra un farmaco antidepressivo, la venlafaxina, e la nicotina, in ratti esposti e non esposti al fumo di sigarette tradizionali. Per far questo hanno utilizzato un apparecchio appositamente progettato per esporre gli animali alla nicotina in modo non invasivo. E' stata utilizzata una macchina al cui interno viene pompata aria, miscelata al fumo di una sigaretta accesa ed immessa in una camera di esposizione contenente gli animali. Successivamente, nel 2008, Czubak, in collaborazione con Nowakowska, ha valutato l'effetto della Gabapentina (GBP) sui processi cognitivi e il suo effetto antiepilettico in ratti esposti o meno al fumo di sigaretta durante la loro vita fetale. E' stato anche indagato se GBP avesse un effetto anticonvulsivante in concomitanza con l'esposizione alla nicotina e sono stati osservati gli effetti sulla coordinazione motoria negli animali se somministrato ad una determinata dose. Questi autori hanno dimostrato l'efficacia anticonvulsivante della GBP, la sua capacità di migliorare i processi cognitivi negli animali sottoposti a trattamento ed anche una capacità antidepressiva in ratti esposti al fumo di tabacco. George e collaboratori nel 2010 hanno dimostrato che l'esposizione cronica alla nicotina vaporizzata è in grado di produrre nel sangue dei roditori livelli di questo alcaloide clinicamente rilevanti e paragonabili a quelli osservati nei fumatori; hanno anche dimostrato che gli animali, esposti ai vapori di nicotina, sviluppano dipendenza. Hanno ideato un sistema che vaporizza la nicotina nell'aria in maniera stabile e affidabile: l'esposizione intermittente a nicotina

vaporizzata ( $0.2 \text{ mg/m}^3$ ) per 8-14 ore al giorno, per 7 giorni consecutivi, produce una concentrazione di nicotina nel sangue pari a 22 ng/ml. E' da notare che in questo modello vengono esaminati gli effetti della nicotina indipendentemente dagli altri costituenti del fumo di sigaretta. Inoltre questo modello induce dipendenza fisica come dimostrato dalla comparsa di segni somatici astinenziali sia a 16 sia a 30 ore dalla fine dell'esposizione.

Nonostante i roditori abbiano fornito delle evidenze fondamentali per la conoscenza dei meccanismi che sottendono ai comportamenti *drug-related*, questi non rappresentano i modelli comportamentali ideali. Infatti presentano alcuni svantaggi e problemi di *bias* che li caratterizzano: i tempi lunghi e le spese richieste per il loro ed allevamento. Per questo motivo, la *Drosophila Melanogaster* sta diventando un modello pratico per lo studio degli effetti stimolatori e sedativi delle droghe e anche delle loro proprietà gratificanti. Mentre nel passato questo modello animale era utilizzato solo per identificare i meccanismi molecolari e neuronali, recentemente lo sviluppo di saggi che misurano l'autosomministrazione e il *reward* ha permesso l'analisi di comportamenti più complessi. In *D. Melanogaster* sono stati ampiamente studiati gli effetti dell'abuso di etanolo che può essere somministrato a questi animali in forma liquida o volatile, cosa non sempre fattibile per altre droghe (McClung *et al.*, 1998; Baiton *et al.*, 2000). Quando esposta a basse dosi di nicotina volatile, la *D. Melonogaster* esibisce iperattività locomotoria, movimenti spasmodici; ad alte dosi di alcaloide manifesta invece ipocinesia e acinesia (Baiton *et al.*, 2000). Come nei mammiferi, gli effetti locomotori della nicotina nella *D. Melonogaster* sono dopamina dipendenti, infatti una deplezione farmacologica della dopamina riduce la sensibilità alla nicotina. Comunque sia, poco si sa dei meccanismi molecolari che mediano la sensibilità alla nicotina nella *D. Melonogaster*.

## *L'astinenza da nicotina*

In Italia circa il 40% dei fumatori attivi vorrebbero smettere di fumare ma non ci riesce, proprio a causa di una forte dipendenza prodotta dall'utilizzo di fumo di tabacco. Solo il 5-6% di coloro che hanno smesso di fumare senza aiuto riesce a rimanere astinente per 1 anno. Il 55-60% ricade nel vizio del fumo entro 3 mesi e il 75% in sei mesi. La fase iniziale del consumo di tabacco è sostenuta da un rinforzo positivo, determinato dall'azione della nicotina sui centri di gratificazione; in seguito, viene instaurato un rinforzo negativo, che trasforma questo piacere nella ricerca di sollievo dai sintomi di astinenza. Infatti, la riduzione o la sospensione di assunzione di nicotina porta ad una vera e propria sindrome di astinenza caratterizzata da effetti avversi centrali e periferici che potrebbero essere spiegati dall'eccessiva stimolazione

colinergica dei recettori nicotinici (Hughes, 2007). L'aumentata attività di aree cerebrali a trasmissione colinergica e le anomalie della secrezione di neuromediatrici, dopamina e noradrenalina, genera uno stato di malessere generalizzato (Dani *et al.*, 1996). Come accennato in precedenza, durante l'assunzione cronica di nicotina si verifica un neuroadattamento che, quando vengono tolte le condizioni che ne avevano indotto l'espressione, si manifesta in modo patologico. Lo smettere di fumare smaschera i processi neuroadattativi messi in atto dopo anni di fumo. I fenomeni osservabili sono diversi, ma tra questi il più studiato è quello della tolleranza. Come accennato prima, diversi sono i meccanismi attraverso i quali si instaura la tolleranza alla nicotina, in particolare quella che deriva dalla desensitizzazione rapida dei recettori nicotinici subito dopo il legame della nicotina al recettore stesso. Si ipotizza che l'*up-regulation* dei recettori nicotinici sia alla base delle azioni negative descritte dalla cessazione del fumo ad opera dell'eccessiva attività del neurotrasmettitore endogeno, l'acetilcolina, su questi recettori in sovrannumero. Infatti sempre ipoteticamente, le ricerche effettuate suggeriscono che il fumatore assuma nicotina per desensitizzare i propri recettori nicotinici in sovrannumero e ridurre così gli effetti negativi dell'aumentata attività colinergica (Watkins *et al.*, 2000). Infatti, come già detto, è noto che la sigaretta più desiderata della giornata sia la prima del mattino, al risveglio, quando l'effetto dell'*up-regulation* dei recettori nicotinici è maggiore a causa dell'astinenza notturna. Clinicamente l'astinenza da nicotina appare meno grave rispetto dell'astinenza da alcool e oppioidi (Martin, 1977). Inoltre l'astinenza da nicotina non determina un tasso di morbosità medico o psichiatrico particolarmente significativo. Bisogna tener conto comunque che c'è un'enorme variabilità interindividuale in tutte le sindromi astinenziali: alcuni fumatori possono sperimentare sintomi di entità maggiore rispetto a sintomi che deriverebbero dall'abuso di sedativi o di oppioidi. La sospensione dell'uso di nicotina è seguita da una sindrome di astinenza che può durare un mese o più ed include sintomi che rapidamente conducono le persone a rinnovare l'uso del tabacco, contribuendo all'insuccesso dello smettere di fumare. I sintomi di astinenza della nicotina possono cominciare poche ore dopo l'ultima sigaretta ed includono una sensazione di vuoto, alterazioni dell'umore, irritabilità, irrequietezza, ansia, agitazione, frustrazione, disagio, mal di testa, *deficit* cognitivi e di attenzione, disturbi del sonno, aumento dell'appetito con conseguente aumento del peso corporeo, costipazione, bradicardia e *craving* (West *et al.*, 1989; Kenny *et al.*, 2001; Berrettini *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2008). La sindrome di astinenza è in relazione con gli effetti farmacologici della nicotina, tuttavia anche molti fattori comportamentali possono incidere sulla gravità della sindrome. E' evidente che la dipendenza da nicotina si caratterizza come un disturbo del comportamento visto che, durante l'astinenza, si instaurano degli stati patologici di alterazione dell'umore e di ansia. I sintomi arrivano al loro

punto massimo nei primi giorni (tra le 48 e le 72 ore), dopo qualche settimana di astinenza diminuiscono il nervosismo e l'ansia, si recupera autostima e autocontrollo, migliora il rendimento anche lavorativo. Tuttavia, in genere, l'organismo impiega 3 settimane per disintossicarsi completamente dalla nicotina. Tuttavia, per alcune persone i sintomi possono durare addirittura mesi (Gross *et al.*, 1989; Hughes *et al.*, 1991; Benowitz, 2008; Markou, 2008). Una sindrome astinenziale che si protrae nel tempo è osservata per l'alcool, per gli oppioidi e per gli stimolanti (Satel *et al.*, 1993); per l'astinenza da nicotina invece non ci sono evidenze, fatta eccezione per il *craving* e per l'appetito/aumento del peso corporeo: i livelli alti di *craving* per il tabacco, l'appetito e l'aumento di peso possono durare anche 6 mesi o più (Hughes, 2007). Per alcune persone il fatto di sentire, annusare o guardare una sigaretta, come il rito di tenerla, manipolarla, accenderla e fumarla, è associato con gli effetti piacevoli del fumare e può far sì che l'astinenza o il *craving* peggiorino.

Nei roditori i sintomi somatici astinenziali osservati sono: sollevamento delle zampe posteriori, salti, continua masticazione, tremori facciali, iperplasia e alterazione dell'attività locomotoria. Segni affettivi sono invece comportamenti ansiosi, innalzamento della soglia di *reward* e *contextual fear conditioning* indotta dall'astinenza (Malin *et al.*, 1992; Hughes *et al.*, 1994).

Dipendenza dalla nicotina - fasi	
Uomo	Animale
Sviluppo della dipendenza - effetti gratificanti (sensazione di soddisfazione) - effetti soggettivi (esperienze piacevoli)	Sviluppo della dipendenza - effetti gratificanti - effetti soggettivi
Sintomi di astinenza - somatici bradicardia, disturbi gastrointestinali, costipazione, incremento dell'appetito, aumento del peso corporeo, nausea, mal di testa, stanchezza, dolori muscolari - affettivi desiderio di nicotina, umore depresso, ansia, irritabilità, aggressività, deficit nella concentrazione, insonnia	Sintomi di astinenza - somatici tremore di tutto il corpo/delle zampe anteriori, scuotimento della testa, rantoli, sbadigli, tentativi di fuga, sbattimento dei denti, pilo erezione, spasmi muscolari, rilassamento muscolare - affettivi anedonia, comportamento simil-depresso, desiderio di nicotina, ansia
Ricadute indotte da - nicotina - stress o stimoli ambientali	Ricadute indotte da - nicotina - stress o stimoli ambientali

**Tab. C:** Fasi nella dipendenza da nicotina nell'uomo e nell'animale (Zaniewska, 2009)



Uno dei sintomi affettivi dell'astinenza da nicotina è l'anedonia, definita come l'incapacità di provare piacere anche in circostanze normalmente piacevoli. La somministrazione di nicotina abbassa la soglia di *reward*, mentre durante l'astinenza si osserva un incremento della soglia dell'*Itracranial Self-stimulation* (ICSS) che rappresenta una misura dell'anedonia (Epping-Jordan *et al.*, 1998; Hughes, 2007).

Un altro sintomo affettivo della sindrome astinenziale nell'uomo è l'incremento dell'ansia. Nei topi l'analisi di comportamenti ansiosi avviene comunemente mediante il *light-dark test*, che si basa sul conflitto tra l'innata avversione dell'animale ad esplorare aree ben illuminate e il suo comportamento spontaneo ad esplorare nuovi ambienti (Stoker *et al.*, 2008). Constall e collaboratori, nel 1989, hanno osservato in topi BKW un incremento dell'ansia nel test durante il periodo di astinenza spontanea, dopo 14 giorni di iniezioni di nicotina. Un altro studio riporta un incremento del comportamento ansioso nell'*Elevated Plus Maze* dopo 24 ore dal termine dell'esposizione alla nicotina (Damaj *et al.*, 2003).

Quando l'uomo è in uno stato ansioso, la *startle response* (la reattività a nuovi stimoli ambientali) aumenta (Grillon, 2002; Bast *et al.*, 2003). L'aumentata reattività di risposta può essere una misura indiretta dello stato d'ansia associato all'astinenza. Tuttavia nei topi C57BL/6N non sono stati osservati effetti sulla *startle response* né dopo esposizione acuta e cronica né dopo il periodo astinenziale (Semenova *et al.*, 2003; Gould *et al.*, 2005; Jonkman *et al.*, 2005).

L'astinenza da nicotina può indurre nei fumatori una maggiore sensibilità allo stress. Mannucci e collaboratori nel 2006 hanno studiato gli effetti a lungo termine di un'esposizione ripetuta di nicotina ad alte dosi sull'umore. Servendosi del *Forced Swimming Test*, hanno dimostrato che dopo esposizione cronica a nicotina (mediante iniezioni giornaliere sottocute), nel periodo astinenziale, gli animali sono più depressi, come indica l'incremento del tempo di *immobility*. L'*immobility* in animali sottoposti al *Forced Swimming Test* è l'espressione di un umore depresso, causato dalla consapevolezza di una fuga impossibile. Questo modello suggerisce che i fumatori accaniti quando smettono di fumare, possono nel loro futuro sviluppare disordini dell'umore. Anche Ribeiro-Carvalho e collaboratori nel 2011, hanno studiato le ripercussioni dell'astinenza da nicotina sull'umore in topi C57BL/6J adolescenti; servendosi dei tests di *Forced Swimming Test* e *Sucrose Preference test* hanno dimostrato che l'astinenza da nicotina si manifesta con un incremento del tempo di *immobility* e una riduzione del consumo di soluzione zuccherina, indici di uno stato depresso e anedonico.

E' noto che la somministrazione di nicotina altera la memoria e l'apprendimento sia nell'uomo sia nei roditori (Levin *et al.*, 2006; Kenny *et al.*, 2008; Heishman *et al.*, 2010). Kenney e

collaboratori nel 2011 hanno studiato gli effetti dell'esposizione acuta (tramite iniezioni intraperitoneali) e cronica (mediante minipompe osmotiche) e dell'astinenza da nicotina sulla *novel* e sulla *spatial object recognition* (rispettivamente NOR e SOR) in topi maschi C57BL/6J. Il test dell'*object recognition* sfrutta la naturale propensione dei roditori ad esplorare nuovi oggetti o configurazioni spaziali intorno ad oggetti familiari o già sperimentati in precedenza (Ennaceur *et al.*, 1988; Bevins *et al.*, 2006; Dere *et al.*, 2007; Ennaceur, 2010). Questo tipo di test permette di valutare l'*incidental learning*: un tipo di apprendimento che determina la formazione di memorie che si verificano in seguito all'interazione con stimoli ambientali, in assenza di intenzione o di motivazione (Wang *et al.*, 2010). Questo tipo di *learning* permette all'uomo di capire cosa e dove sono gli oggetti nell'ambiente che lo circonda oltre che permettergli di portare a termine con successo le sue attività quotidiane (Postma *et al.*, 2008). La somministrazione cronica di nicotina non ha alcun effetto sulla NOR, mentre invece determina un *deficit* nella SOR. NOR e SOR sono state anche esaminate a 24 e 48 ore di astinenza da nicotina. A 24 ore non si verifica alcun effetto su NOR e SOR; a 48 ore invece si osserva un *deficit* nella SOR e nessun effetto nella NOR. Le differenze nelle risposte in acuto, in cronico e in astinenza nella SOR e nella NOR possono essere dovute al coinvolgimento di diverse regioni cerebrali (l'ippocampo per la SOR, la corteccia peririnale per la NOR) (Kenney *et al.*, 2011).

I meccanismi nAChR-mediati alla base dell'astinenza da nicotina possono essere studiati in modelli animali, inducendo i sintomi somatici astinenziali con l'utilizzo di antagonisti dei recettori nicotinici, oppure utilizzando topi KO per specifiche subunità dei recettori nicotinici (Salas *et al.*, 2004; Besson, 2006; Jackson *et al.*, 2008). Evidenze sperimentali dimostrano che le subunità  $\alpha_2$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_7$  e  $\beta_4$  regolano l'espressione dei sintomi somatici d'astinenza, mentre le subunità  $\beta_2$  e  $\alpha_6$  contribuiscono alla componente affettiva della sindrome astinenziale (Changeux, 2010).

Si è visto che l'area cerebrale particolarmente attivata è il *locus coeruleus*. Infatti le cellule del *locus coeruleus* che sintetizzano noradrenalina, e su cui sono espressi i recettori nicotinici, presenterebbero un'attività aumentata e anormale durante l'astinenza, inducendo un'alterata attivazione cerebrale, con una serie di sintomi che abbiamo visto caratterizzare la sindrome d'astinenza dal fumo di sigaretta.

L'esposizione cronica alla sigaretta porta anche a modifiche della funzionalità dopaminergica e serotoninergica (Altman *et al.*, 1996). Queste alterazioni neurochimiche si suppone siano alla base di alcuni sintomi dell'astinenza come la disforia, l'anedonia ed i disturbi dell'appetito (anche se per questi ultimi è complessa l'interazione tra effetti cerebrali e periferici). L'astinenza da nicotina induce una riduzione generalizzata della trasmissione dopaminergica tale da essere

chiamata “deplezione dopaminergica”: si riduce il rilascio di dopamina ed il suo processo di sintesi, l’attività metabolica dei neuroni bersaglio della dopamina si riduce, i recettori dopaminergici cambiano di numero oppure si modifica l’attività dei meccanismi di trasduzione (Altman *et al.*, 1996).

*Terapie per la disintossicazione  
da fumo di sigaretta*

Le alte proprietà additive della nicotina sono esemplificate dalla grande difficoltà dei fumatori nell'abbandono della pratica; nonostante la maggior parte dei tentativi di smettere di fumare fallisca, rimane sempre alto l'interesse nel riprovarci, spesso entro 30 giorni dall'ultimo tentativo fallito (Fu *et al.*, 2006). I tentativi di smettere senza successo riguardano circa il 30% dei fumatori, dei quali il 75% tenta senza alcun aiuto e i restanti utilizzano farmaci per la dissuefazione. Si smette di fumare mediamente a 43.2 anni ma le donne lo fanno prima (42) rispetto agli uomini (43.7 anni). Le ex-fumatrici hanno smesso prevalentemente in un'età compresa tra i 36 e i 45 anni mentre gli ex-fumatori hanno smesso in un'età compresa tra i 46 e i 55 anni. Le esperienze di dissuefazione indicano che le donne incontrano più difficoltà a smettere di fumare e, se lo fanno, è più probabile che riprendano. Fattori che potrebbero contribuire alla difficoltà che hanno le donne nel lasciare l'abitudine sono la maggiore sensibilità alla sindrome d'astinenza e la maggiore preoccupazione, rispetto agli uomini, per il possibile aumento di peso.

Negli anni 80', nell'ambito del trattamento delle tossicodipendenze fu coniata l'espressione *harm reduction* (riduzione del danno) (Drummond *et al.*, 1987; *Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians*, 2007). Con questo termine si vollero identificare quegli interventi il cui fine primario era di minimizzare il danno di salute oppure la sostituzione del comportamento dannoso con uno meno deleterio. Nell'ambito delle misure di controllo del fumo di sigaretta la coniazione del termine risulta più recente, in quanto emerso alla prima conferenza europea della SRNT (Società di Ricerca sulla Nicotina e sul Tabacco) a Copenhagen nel 1998. La discussione centrò sulla possibilità di utilizzare terapie sostitutive per ridurre il consumo di sigarette. Tuttavia, il termine "riduzione del danno" ha sollevato parecchie discussioni (Warner, 2002) per la mancata veridicità empirica relativamente a questa riduzione teorica possibile, in quanto per osservare la riduzione del danno di salute, non basta la sostituzione del prodotto ma bisogna che sia realmente di minore entità il danno e che la sostituzione raggiunga un alto numero di soggetti. Un esempio per comprendere quanto sia complesso il problema riporta alla memoria l'introduzione in commercio delle sigarette *light*, ideate per ridurre il problema dell'esposizione ai componenti cancerogeni della combustione. La reale conseguenza fu solo una compensazione farmacocinetica, dovuta al fatto che un fumatore con una forte dipendenza da nicotina non farà altro che inalare più profondamente il genere *light* rispetto alla classe normale di sigarette, con un inalterato rischio di cancro al polmone (Franceschi *et al.*, 1999). Per questi motivi sono necessarie terapie efficaci e definitive con le quali i fumatori riescano definitivamente ad abbandonare il vizio del fumo.

Hilario e collaboratori nel 2012 hanno mimato il ciclo di *smoking relapse* utilizzando cicli

multipli di esposizione e di astinenza alla nicotina, per testare l'effetto sul sistema di *reward*. Attraverso due modelli complementari, l'ICSS e la CPP, hanno mostrato che l'alternanza di cicli di esposizione e di astinenza, induce un aumento della sensibilità del sistema di *reward*, associato ad un'*up-regulation* dei recettori nicotinici nello striato e nell'ippocampo; in particolar modo dopo un'esposizione cronica risulta maggiormente up-regolato il sottotipo recettoriale  $\alpha_4\beta_2$  (Gaimarri *et al.*, 2007). I risultati dello studio suggeriscono quindi che periodi continui di astinenza aumentano la sensibilità del sistema di *reward*, potenziando gli effetti edonici della nicotina. Capire i meccanismi associati a cicli continui di esposizione e astinenza della nicotina, è il primo passo per la promozione di nuove terapie contro la dipendenza da tabacco. Al giorno d'oggi i metodi che forniscono supporto per smettere di fumare sono numerosi. Ogni metodo di dissuefazione presenta le proprie caratteristiche e può essere più o meno indicato anche in base alle particolarità del fumatore (Fiore, 2000; Garrett *et al.*, 2001; Lerman *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2010; Caponnetto *et al.*, 2013). Le tipologie di fumatore sono assai diverse, sia per quanto concerne la reale determinazione a smettere, sia per la personalità, i livelli di ansia o depressione o l'eventuale presenza di altri disturbi della sfera personale o interpersonale. I singoli soggetti possono presentare bisogni differenziati e, quindi, è opportuno poter offrire loro trattamenti diversificati tra i quali poter scegliere quelli più adatti a raggiungere l'obiettivo. Attualmente nessuna tecnica è in grado da sola di far smettere di fumare, soprattutto se il fumatore non è sostenuto dalla reale volontà di riuscirvi.

## TERAPIE NICOTINICHE

I fumatori non sono tutti uguali, soprattutto quando si tratta di smettere di fumare. Per chi non è sufficientemente motivato da provare, e riuscire, ad abbandonare il vizio da un giorno all'altro, può essere d'aiuto un trattamento di sostituzione della nicotina (NRT, *Nicotine Replacement Treatment*) che appunto prevede la somministrazione della nicotina non associata al fumo di sigaretta. Con questa terapia sostitutiva, attuata attraverso le gomme da masticare, le compresse sub-linguali e le pastiglie, i cerotti trans dermici, gli spray nasali e gli inalatori di nicotina, il soggetto, pur smettendo di fumare, non è costretto a fare a meno della nicotina, ed è in grado di dosarne l'assunzione in modo da non avvertire i sintomi astinenziali. Ciò gli permette di abbandonare la sigaretta, con tutto il corredo di gestualità, riti e abitudini che la accompagnano, senza soffrire fisicamente, ma dovendo ugualmente fare i conti con la dipendenza psicologica e con la necessità di dover comunque scalare prima o poi la nicotina contenuta nei presidi sostitutivi. La nicotina, infatti, è stata il primo agente farmacologico approvato dall'ente regolatorio americano (FDA) per uso nella terapia di cessazione del fumo. I trattamenti

sostitutivi della nicotina negli USA sono tutti approvati e vengono venduti moltissimo; al contrario l'Italia è agli ultimi posti in Europa nella vendita dei farmaci utilizzati nella terapia di dissuefazione dal fumo. Un altro vantaggio aggiuntivo è che queste forme di nicotina hanno uno scarso potenziale di abuso poiché consentono di assumere una quantità di nicotina controllata non producendo così gli effetti piacevoli dei prodotti del tabacco; inoltre, il lento assorbimento tramite gli NRT non permette la contingenza tra gli effetti della nicotina e la sua assunzione. Gli NRT non contengono i carcinogeni e i gas associati con l'uso del tabacco. Tuttavia, alle donne in gravidanza, agli adolescenti e ai fumatori "leggeri" la NRT è sconsigliata. L'efficacia di questo trattamento è stata ampiamente dimostrata in diversi lavori di ricerca e offre le maggiori probabilità di successo (da 1.5 a 2 volte) rispetto a qualsiasi altra terapia. Secondo una revisione che ha esaminato più di 130 studi clinici per un totale di 40.000 fumatori, il ricorso alla terapia di sostituzione accresce le probabilità di smettere di fumare con successo (ovvero per almeno 6 mesi ininterrotti) del 50-70% rispetto a quanto avviene facendo appello esclusivamente alla propria forza di volontà. Secondo le ricerche scientifiche, la percentuale di fumatori che riesce a disintossicarsi dal tabacco usando proprio la NRT è pari al 22% a distanza di 6 mesi, e al 28.5% se si aggiunge un qualche supporto psicologico (*counseling* e incontri con lo psicologo individuali o di gruppo). I prodotti sostitutivi della nicotina sono facilmente accessibili e non necessitano di prescrizione medica; infatti si tratta di medicinali OTC (*over the counter*), da automedicazione, ma per questo motivo sono spesso sotto-dosati e mal utilizzati. Tuttavia, affinché svolgano la propria azione, è necessario che il trattamento sia eseguito con costanza per il periodo prescritto, generalmente da 8 settimane a 3 mesi. In particolare ne va stabilito il metodo di somministrazione e la dose in base al numero di sigarette fumate, al punteggio della scala Fagerström ed al CO esalato. L'efficacia di tali rimedi è stata comparata in alcuni studi di letteratura, ma la superiorità di un metodo rispetto agli altri non è stata dimostrata. Inoltre, per determinare il successo di un tentativo di cessazione da parte del fumatore concorrono diversi fattori, legati spesso ad aspetti soggettivi (livello di motivazione, esistenza o meno di problemi fisici, ambiente facilitante, etc.). Infine un metodo può essere molto efficace nell'aiutare a smettere nell'immediato, ma non essere in grado di incidere sul mantenimento dell'astinenza nel lungo periodo, aspetto anch'esso molto legato a variabili individuali. Si tratta, dunque, di scegliere di volta in volta il metodo che meglio si addice alla tipologia del fumatore.

## GOMMA DA MASTICARE

L'approvazione dell'FDA della gomma di nicotina nel 1984 segnò la disponibilità della prima terapia sostitutiva nicotinic sul mercato USA. Nel 1996, l'FDA approvò la gomma (*Nicorette*) per la vendita da banco (senza ricetta).

Le gomme da masticare liberano una quantità controllata di nicotina che rispetto alla sigaretta viene assorbita molto più lentamente, circa nel doppio del tempo. Mentre la gomma di nicotina fornisce ad alcuni fumatori il controllo desiderato e la capacità di alleviare la compulsione, altri sono incapaci di tollerare le richieste in termini di sapore e masticazione. Si adattano soprattutto a fumatori irregolari e sono sconsigliate a chi soffre di ulcera o bruciori di stomaco.

I risultati del *Lung Health Study*, pubblicati nel 2005 (Anthonisen *et al.*, 2005), dimostrano inequivocabilmente come un intervento di dissuefazione con gomma alla nicotina e consigli medici, possa avere un effetto sostanziale sulla mortalità per patologie fumo-correlate.

## COMPRESSE SUB-LINGUALI E PASTIGLIE

Le compresse sub-linguali e le pastiglie possono essere impiegate in alternativa alle gomme in quanto sono più discrete.

## CEROTTI TRANSDERMICI

Nel 1991-1992, l'FDA approvò quattro cerotti transdermici di nicotina, due dei quali divennero prodotti da banco nel 1996, rispondendo alla necessità di molti utilizzatori di tabacco. I cerotti, da sostituire ogni 24 ore, assicurano un rilascio di nicotina graduale e costante, adattandosi meglio ai fumatori regolari. Sono più efficaci nella protezione dei sintomi d'astinenza che si presentano al mattino; sono associabili a gomme o pastiglie per combattere i momenti di maggiore difficoltà (tipicamente dopo i pasti).

## SPRAY NASALE E INALATORE DI NICOTINA

Nel 1996 uno spray nasale di nicotina e nel 1999 un inalatore di nicotina, consigliato ai forti fumatori, divennero disponibili per prescrizione. Questi sistemi hanno un forte impatto e sono quindi consigliati per quegli individui che, a prescindere dal numero di sigarette fumate, presentano una marcata dipendenza gestuale (Bolliger *et al.*, 2000; Hon, 2005).



## VACCINI ANTI-NICOTINA

I vaccini contro la nicotina stimolano la risposta immunitaria anticorpale nei confronti di questa sostanza. Legando la molecola in periferia, gli anticorpi ne dovrebbero limitare la quantità in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e i conseguenti effetti psicotropi. Teoricamente, il fumatore dovrebbe avvertire in modo ridotto la gratificazione indotta dall'inalazione del fumo di sigaretta. La nicotina non induce risposte anticorpali di per sé, ma funziona da aptene se viene coniugata ad una proteina più voluminosa di origine batterica o virale.

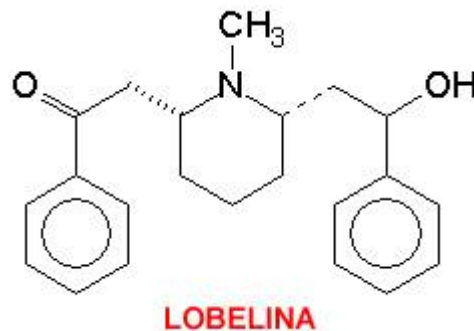
Il primo vaccino ad essere testato il *NicVAX* (*NABI Biopharmaceuticals*), ha completato uno studio di fase III. I risultati sono stati molto inferiori alle attese: la cessazione del fumo di sigaretta non è stata differente rispetto al placebo (*Nabi Biopharmaceuticals*, 2011). Analogamente, un altro studio di fase II riguardante un altro vaccino non ha riscontrato tassi di ricaduta nel fumo di sigarette differenti dal placebo (Tonstad *et al.*, 2013).

Non è chiara la causa del fallimento dei vaccini anti-nicotina nell'uomo, che si sono dimostrati efficaci nei modelli animali di dipendenza da nicotina e sono stati in grado di ridurre significativamente il *binding* di nicotina nel SNC (Pentel *et al.*, 2000). Una causa della mancata efficacia potrebbe essere una non adeguata risposta anticorpale, non sufficiente a legare una quota significativa di molecole di nicotina. Effettivamente, i migliori *responders* al vaccino anti-nicotina, cioè i soggetti con tassi di astinenza maggiori, erano coloro che avevano titolazioni anticorpali più alte (Cornuz *et al.*, 2008; Hatsukami *et al.*, 2011). Per ovviare a questo problema si stanno approntando preparazioni immunogene, contenenti adiuvanti in grado di potenziare la risposta anticorpale (McCluskie *et al.*, 2013). I vaccini anti-nicotina, tuttavia, secondo diversi ricercatori, soffrono di un limite intrinseco che ne riduce l'efficacia potenziale ed è comune a quei farmaci antagonisti (es. naltrexone) e/o dissuasivi (es. disulfiram) che impediscono all'utilizzatore di percepire gli effetti delle sostanze d'abuso o li rendono sgradevoli: non sostituiscono la molecola a cui si è diventati dipendenti e non riducono efficacemente il *craving*. La *compliance* del paziente diventa il problema principale, dato che chi non è sufficientemente motivato o non riesce a superare il *craving* utilizza dosi maggiori delle sostanze d'abuso oppure semplicemente interrompe l'assunzione della terapia.

La strada dei vaccini anti-nicotina sembra avere degli ostacoli non facilmente superabili. Oggi si sta esplorando la possibilità che i vaccini migliorino l'efficacia di altre terapie farmacologiche; infatti uno studio clinico è attualmente in corso per testare i risultati dell'associazione vaccino-vareniclina su una popolazione di fumatori (NCT00995033).

## LOBELINA

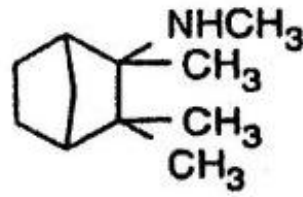
La lobelina, alcaloide estratto dalla *Lobelia inflata*, è un antagonista del recettore nicotinico che in passato è stato impiegato come analettico respiratorio ed il cui impiego è stato proposto per la dissuefazione dal fumo. La lobelina possiede, come la nicotina, effetti farmacologici in alcuni tessuti periferici, ma ha scarsi effetti a livello comportamentale. Inoltre questo composto sembra ridurre l'assunzione di alcool sia nei ratti sia nei topi (Bell *et al.*, 2009; Sajja *et al.*, 2010).



**Fig. H:** Struttura chimica della lobelina

## MECAMILAMINA

E' un antagonista non selettivo dei nAChR (Bacher *et al.*, 2009). E' ben assorbita a livello gastrointestinale e attraversa velocemente la barriera ematoencefalica. Questo composto è stato utilizzato da diversi gruppi di ricerca negli ultimi due decenni, per studiare il ruolo centrale dei nAChR nell'eziologia e nel trattamento di diversi disturbi neuropsichiatrici, tra cui i disturbi da dipendenza, la sindrome di *Tourette*, la schizofrenia e i vari disordini cognitivi e dell'umore. Inoltre è stato utilizzato come bloccante gangliare per la cura dell'ipertensione e soprattutto come bloccante dei recettori nicotinici cerebrali di tipo  $\alpha_3\beta_4$  per il trattamento della dipendenza da fumo (Shytle *et al.*, 2002). Questo farmaco è in grado di ridurre le sensazioni psico-fisiche derivate dall'assunzione di nicotina ma alla lunga produce effetti incostistenti portando, in determinati casi, ad un aumento del numero di sigarette fumate (Benowitz *et al.*, 2000). L'approccio che ha avuto maggior successo, aprendo così la strada agli agonisti parziali, è stata la co-somministrazione di nicotina e mecamilamina. L'ideale è che un giusto rapporto agonista-antagonista possa attenuare i sintomi della crisi di astinenza e allo stesso tempo attenuare gli effetti rinforzanti della nicotina. La nicotina e la mecamilamina hanno diversa farmacocinetica e diverso profilo metabolico, pertanto mantenere un rapporto antagonista-antagonista costante nel tempo conferisce un problema pratico non indifferente.



**Fig. I:** Struttura chimica della mecamilamina

## AGONISTI PARZIALI: LA VARENICLINA

La vareniclina ( $C_{13}H_{13}N_3$ ), ottenuta con tecniche di chimica combinatoriale a partire dalla citisina e dalla morfina, è stato il primo agonista parziale nicotinic approvato per la terapia contro il fumo di sigaretta (Coe *et al.*, 2005; Rollema *et al.*, 2007; Hays *et al.*, 2008; Hajek *et al.*, 2009; Jiménez-Ruiz *et al.*, 2009; Faessel *et al.*, 2010; George *et al.*, 2011; Hawk *et al.*, 2012; Mello *et al.*, 2014). Questo composto si lega con un'efficacia intrinseca inferiore a quella della nicotina ma con un'elevata affinità e selettività ai recettori nicotinici neuronali dell'acetilcolina  $\alpha_4\beta_2$ , mentre è un agonista completa del recettore omomeroico  $\alpha_7$  (Mihalak *et al.*, 2006; Obach *et al.*, 2006; Ebbert *et al.*, 2014). La vareniclina può bloccare in modo efficace la capacità della nicotina di attivare i recettori  $\alpha_4\beta_2$  ed il sistema dopaminergico mesolimbico. Il legame vareniclina-recettore produce due risultati:

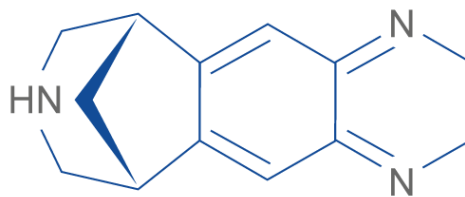
- provoca il rilascio di dopamina con un effetto di rinforzo simile ma non uguale a quello della nicotina e comunque sufficiente ad alleviare i sintomi del desiderio compulsivo e dell'astinenza (attività agonista). Poiché la vareniclina è in grado di ridurre significativamente il *craving* e i sintomi della crisi d'astinenza, è un farmaco indicato per i pazienti che hanno appena smesso di fumare;
- agendo come antagonista impedisce il legame nicotina-recettori  $\alpha_4\beta_2$  e determina contemporaneamente una riduzione degli effetti della gratificazione e del rinforzo dell'abitudine al fumo (Gonzales *et al.*, 2006; Jorenby *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2009; Ebbert *et al.*, 2014).

La vareniclina si somministra per via orale, è ampiamente distribuita nell'organismo, oltrepassa la barriera ematoencefalica ed è escreta immodificata per il 92% nelle urine.

Dato il ruolo importante del sottotipo recettoriale nicotinic  $\alpha_4\beta_2$  per l'acquisizione e il mantenimento della dipendenza da nicotina, dal punto di vista sperimentale sono stati effettuati studi su modelli animali per valutare l'efficacia della vareniclina e della mecamilamina, utilizzando il test del CPP. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la nicotina, come è noto,

induce una *Place Preference* per il comparto inizialmente meno preferito, mentre il pretrattamento con vareniclina e mecamilamina è risultato in grado di bloccare tale preferenza (Biala *et al.*, 2010).

Dati di letteratura indicano che la vareniclina è stata utilizzata anche nel trattamento contro la dipendenza da alcool. Risultati presenti in letteratura dimostrano infatti che la vareniclina riduce il consumo e la ricerca di etanolo. Il suo profilo sicuro e i suoi lievi effetti collaterali, ne suggeriscono quindi il suo impiego terapeutico nella dipendenza da alcool (Steensland *et al.*, 2007; Wounda *et al.*, 2011).



**Fig. L:** Struttura chimica della vareniclina

#### AGONISTI PARZIALI: LA CITISINA E I SUOI DERIVATI

La citisina è un alcaloide derivante dalla pianta *Laburnum anagyroides* Med (*Cytisus maggiociondolo* L., *Fabaceae*), ampiamente distribuita in Europa centrale e orientale. Tutte le parti della pianta contengono l'alcaloide, ma la più grande quantità (fino al 3%) si trova nei semi. La citisina è stata trovata in altre varietà di piante della famiglia *Cytisus*, come la *Genista*, la *Sophora* e le famiglie della *Baptisia* e si presenta come una sostanza bianca cristallina, dal sapore amaro e con proprietà di avvelenamento. La somministrazione orale di semi macinati finemente negli animali (ovini) provoca tremore, difficoltà nel camminare ed uno stato semicosciente. La citisina infatti contribuisce maggiormente alla tossicità dei semi di *Laburnum* e la tossicità varia a seconda della parte di pianta ingerita e dall'età della pianta. Il segno comune dell'intossicazione è l'irritazione gastrointestinale. L'esordio dei sintomi è rapido, con vomito a partire dai 45 minuti dall'ingestione. Effetti sul sistema nervoso centrale comprendono midriasi, sonnolenza, debolezza, perdita di coordinazione, convulsioni e coma; si possono manifestare anche alcuni effetti colinergici, come la ritenzione urinaria.

La medicina tradizionale raccomanda l'uso di una piccola quantità di citisina in caso di irritazione delle mucose, in caso di vomito durante la gravidanza e negli attacchi di diarrea e stipsi. La citisina è inoltre usata per alleviare la tosse bronchiale e attenuare la gravità di pertosse

e asma. Gli estratti sono utilizzati in omeopatia contro l'emicrania e l'insonnia. In passato la principale applicazione terapeutica della citisina nei paesi occidentali è stata come diuretico e recentemente le sono state attribuite alcune proprietà antiinfiammatorie e ipoglicemizzanti. Altri scopi terapeutici della citisina sono proposti in diverse malattie neurodegenerative, come il Parkinson e l'Alzheimer. La citisina infatti agisce come potenziale ferro-chelante e quindi attenua la formazione di radicali liberi; pertanto, risulta essere utile per il trattamento del Parkinson, in cui la chelazione degli ioni ferro potrebbe impedire la morte delle cellule neuronali.

Farmacologicamente, la citisina agisce soprattutto a livello gangliare, esibendo effetti di blocco; inoltre, ha una potente attività antinocicettiva e, a dosi elevate, modula l'attività locomotoria.

Durante la seconda guerra mondiale, le foglie di *Cytisus maggiociondolo* venivano utilizzate dai fumatori come sostituto del tabacco. Infatti la citisina ha un peso molecolare e una struttura simile a quella della nicotina. Studi condotti su questo composto hanno evidenziato che si comporta da agonista parziale sui nAChRs e mostra un'elevata affinità per il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$ . Nel 1978, l'industria del tabacco ha identificato la citisina come la sostanza con l'azione farmacologica più vicina a quella della nicotina (Etter, 2006). La farmacocinetica della citisina è stata studiata nei topi, dopo somministrazione endovenosa o somministrazione orale della dose di 2 mg/kg. Le più alte concentrazioni plasmatiche vengono raggiunte a 2 ore dalla somministrazione. Il tasso di assorbimento è stimato intorno al 42% e l'emivita plasmatica dopo somministrazione per via endovenosa è di 200 minuti. La citisina è assorbita attraverso le mucose della bocca e si distribuisce in diversi organi e tessuti. Nel ratto, dopo somministrazione orale o endovenosa, le concentrazioni più elevate di citisina sono state riscontrate nella bile, nel fegato, nelle ghiandole surrenali e nei reni; la concentrazione dell'alcaloide nel cervello viene misurata secondo la tecnica HPLC e viene rapidamente eliminata al 32% come farmaco immodificato dal rene ed escreto nelle urine entro 24 ore.

Fin dall'inizio del secolo scorso, sui testi medico-botanici viene riportata la teoria secondo la quale il fumo del *Cytisus maggiociondolo* potrebbe sostituire il fumo da tabacco, perché la sostanza non induce dipendenza. Durante gli studi preclinici sui gatti, è stato osservato che la citisina ha una tossicità inferiore rispetto alla nicotina e meno effetti periferici sul sistema cardiovascolare, per questo motivo ne è stato proposto l'uso come alternativa alla nicotina. Il trattamento mira ad ottenere gli stessi effetti della nicotina contenuta nel fumo di sigaretta, ma a ridurre i sintomi di astinenza quando si smette di fumare (Mineur *et al.*, 2009; West *et al.*, 2011). Molti studi preclinici sono stati eseguiti per descrivere il meccanismo d'azione, la farmacocinetica e la tossicità della citisina.

Il primo studio clinico su questo alcaloide utilizzato contro il tabagismo è stato condotto nel 1965 in Bulgaria, in un gruppo relativamente piccolo di fumatori con evidente dipendenza da nicotina e i risultati sono stati promettenti: la maggior parte dei pazienti aveva smesso di fumare prima della fine del trattamento. Tuttavia, alcuni pazienti hanno dovuto interrompere la terapia a causa degli effetti collaterali, quali disturbi gastrici e nausea, mentre non è stata osservata nessuna significativa differenza di peso corporeo.

L'efficacia funzionale della citisina dipende dall'identità della subunità  $\beta$  presente nei recettori nicotinici. Questo fatto sottolinea l'importanza della suddetta nella determinazione delle interazioni con possibili agonisti dei nAChR neurali e tra queste subunità la  $\beta_2$ , a livello mesolimbico, è stata individuata come una componente critica nella dipendenza da nicotina. Infatti, come accennato prima, studi su topi a cui manca questa subunità, dimostrano che questi animali non riescono ad autosomministrarsi nicotina, in quanto non sono in grado di percepire le sue proprietà rinforzanti; infatti un'esposizione prolungata dell'agonista produce un'*up-regulation*, con un aumento della densità dei siti di legame della nicotina nel tessuto cerebrale.

Recenti studi sul sistema nervoso del ratto hanno dimostrato che, rispetto alla nicotina, la citisina ha un'affinità sette volte superiore per il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$  e per l' $\alpha_7$ . L'affinità della citisina per i recettori  $\alpha_4\beta_2$  è superiore a quella per il recettore  $\alpha_3\beta_2$ , stabilendo il seguente grado di affinità per i tre nAChR:  $\alpha_4\beta_2 > \alpha_3\beta_2 > \alpha_7$ .

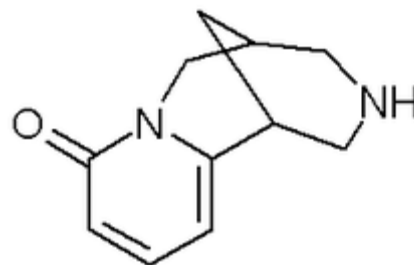
Inoltre Cunningham e McMahon nel 2011 hanno condotto uno studio sui topi C57BL/6J utilizzando farmaci per la terapia da dipendenza da tabacco come la nicotina, la citisina e la vareniclina. Citisina e vareniclina hanno un'efficacia più bassa nel legare i recettori  $\alpha_4\beta_2$  rispetto alla nicotina *in vivo*. È stato osservato un decremento nelle risposte indotte dalla nicotina che potrebbe essere dovuto ad una diminuzione dell'attività motoria. Il recettore nicotinico  $\alpha_4\beta_2$  contribuisce parzialmente a diminuire gli effetti indotti dalla nicotina ma non a ridurre gli effetti indotti dalla vareniclina e dalla citisina. I risultati ottenuti hanno suggerito che i trattamenti contro il tabagismo variano nella loro capacità di stimolare i recettori nicotinici  $\alpha_4\beta_2$  *in vivo*.

In letteratura è stato riportato anche uno studio che ha esaminato l'efficacia della citisina e della lobelina, sul consumo di alcool in ratti del ceppo *High-alcohol-consuming rats* (HAD-2). È stato così dimostrato che la somministrazione dei ligandi dei recettori nicotinici riduce l'assunzione di etanolo nei ratti (Bell *et al.*, 2009). Anche nel topo C57BL/6N la citisina e la lobelina riducono l'assunzione di alcool (Sajja *et al.*, 2010). Questi risultati evidenziano che i nAChRs influenzano l'assunzione di etanolo e sono un *target* promettente per la farmacoterapia nel trattamento della dipendenza e della ricaduta da alcool (Bell *et al.*, 2009; Sajja *et al.*, 2010).

Dal punto di vista chimico, è possibile progettare e sintetizzare una serie di derivati e di analoghi

della citisina quali potenziali agonisti selettivi per i sottotipi dei recettori nicotinici. Le modificazioni strutturali che possono essere effettuate sulla molecola della citisina riguardano, singolarmente o in successione, il gruppo amminico secondario, il sistema di doppi legami coniugati e il gruppo carbonile; tuttavia, perché si conservi l'attività nicotinic centrale, occorre mantenere il carattere basico e la tipica distanza tra la testa cationica e il dipolo carbonilico. Con modifiche di questo tipo sono stati già ottenuti numerosi derivati in alcuni dei quali l'affinità per i sottotipi contenenti unità  $\alpha_4\beta_2$  rispetto a quelli contenenti le  $\alpha_3$  è aumentata di 4-5 volte. Un gruppo di derivati di particolare interesse è costituito da composti contenenti due unità citisiniche connesse tramite una catena polimetilenica di lunghezza crescente. Una catena sufficientemente lunga potrebbe portare a composti che discriminano tra recettori nicotinici gangliari e muscolari, come è ben noto per i composti bis-ammonici-quaternari (esametonio e decametonio). D'altra parte una catena breve (2-4 metilene) potrebbe essere adatta al simultaneo coinvolgimento di due siti di legame nella stessa molecola recettoriale. Come è noto, la simultanea occupazione dei due siti di legame consente la concertata modificazione conformazionale delle unità  $\alpha$  che porta infine all'apertura del canale ionico (Boido *et al.*, 2005).

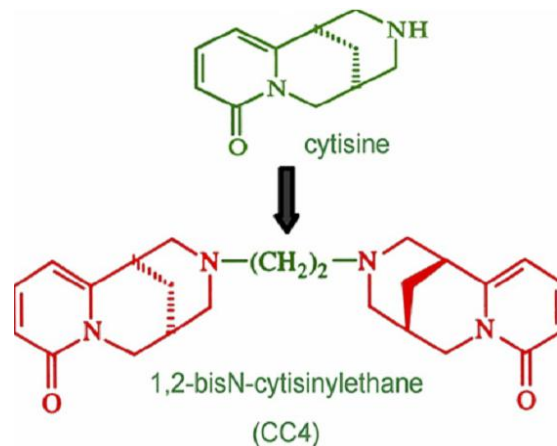
La citisina, come spiegato in precedenza, è selettiva per i sottotipi  $\alpha_4\beta_2$ , rispetto ad altri sottotipi nAChR importanti come  $\alpha_3\beta_4$  e  $\alpha_7$ . La manipolazione della struttura dell'alcaloide, mostra efficacia su vari nAChR neuronali. Ad esempio, la bromurazione o la iodurazione in posizione 3 dell'anello piridinico della citisina conserva piena efficacia al recettore  $\alpha_7$  e aumenta l'efficacia a livello dei recettori  $\alpha_4\beta_2$ , mentre l'aggiunta di gruppi laterali azotati di citisina può ridurre o eliminare l'affinità verso diversi sottotipi recettoriali.



**Fig. M:** Struttura chimica della citisina

## AGONISTI PARZIALI: IL CC4

Negli ultimi hanno particolare attenzione è stata posta allo studio di un nuovo composto, il *1,2-bisN-cytisinylethane* (CC4), che è costituito da due molecole di citisina, unite da una catena polimetilenica.



**Figura N :** Struttura del *1,2-bisN-cytisinylethane* (CC4)

Sono state impiegate cellule di neuroblastoma SH-SY5Y come modello, dal momento che esprimono in maniera nativa i recettori nicotinici  $\alpha_3$  e  $\alpha_7$  ed assomigliano perciò ai neuroni del sistema nervoso simpatico. Su questo modello è stata studiata l'espressione differenziale dei suddetti recettori sulla membrana plasmatica e all'interno del citoplasma prima e dopo l'esposizione al CC4. Esperimenti preliminari hanno dimostrato che il massimo livello di *up-regulation* è stato ottenuto utilizzando concentrazioni di CC4 a 2.5 mM; in parallelo, a concentrazioni di CC4 fino a 1 mM non vi era alcun effetto dannoso; tuttavia, concentrazioni più elevate di CC4 risultavano tossiche.

Il trattamento farmacologico con nicotina può influenzare l'espressione dei nAChRs sia *in vivo* che *in vitro* attraverso meccanismi che non sono stati ancora completamente compresi.

E' stato osservato che il CC4 ha un'alta affinità per il sottotipo recettoriale nicotinico  $\alpha_4\beta_2$ , ma a differenza della citisina, non possiede una piena capacità agonista sui recettori nicotinici  $\alpha_3\beta_4$  e  $\alpha_7$ . Inoltre, ha la capacità di aumentare l'espressione dei recettori nicotinici sensibili alla [<sup>3</sup>H]-Epibatidina ([<sup>3</sup>H]-Epi, 3-4 volte) e alla [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -bungarotossina ([<sup>125</sup>I]- $\alpha$ Bgtx, 1.2 volte) sulla membrana cellulare e nel *pool* intracellulare (Carbonelle *et al.*, 2003; Riganti *et al.*, 2005). Studi di immunoprecipitazione e immunopurificazione hanno confermato che l'aumento dei recettori <sup>3</sup>H-Epi è dovuto all'espressione dei sottotipi  $\alpha_3\beta_2$  e  $\alpha_3\beta_2\beta_4$  senza cambiamenti nella subunità



trascrizionale dell'mRNA. La tecnica del *patch-clamp* sulle cellule trattate con CC4 ha dimostrato la presenza di grandi correnti di nicotina verso l'interno. Il trattamento cronico con CC4 quindi aumenta il numero dei nAChRs contenenti le subunità  $\beta_2$  e  $\alpha_7$  sulla membrana plasmatica, dove sono funzionalmente attivi. Nel caso dei recettori contenenti la subunità  $\beta_2$ , il CC4 si lega ai recettori intracellulari, innescando una riorganizzazione conformazionale della stessa subunità (Riganti *et al.*, 2005).

E' stato dimostrato che i recettori nicotinici per l'acetilcolina sono coinvolti negli effetti rinforzanti di molte sostanze d'abuso: per esempio giocano un ruolo fondamentale sia nella dipendenza da alcool che da nicotina (Bell *et al.*, 2009). Si è proposto quindi di utilizzare agonisti pieni e parziali e antagonisti colinergici nella terapia *anti-addiction*.

## TERAPIE NON NICOTINICHE

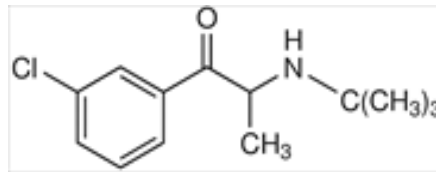
Benchè il nucleo principale dei trattamenti farmacologici della assuefazione da nicotina sia stata la sostituzione con nicotina, sono stati sviluppati altri trattamenti per alleviare i sintomi da astinenza di nicotina.

### BUPROPIONE

Il primo farmaco non nicotinic da prescrizione, il bupropione, nome commerciale *Zyban*, un antidepressivo, è stato approvato come trattamento farmacologico nella assuefazione da nicotina nel Dicembre 1996 (Slemmer *et al.*, 2000). Esso rappresenta il primo farmaco che non contiene nicotina. Questo antidepressivo agisce in qualità di inibitore dell'*up-take* della dopamina (Balfour, 2001; Jorenby *et al.*, 2006), normalizzando così la trasmissione dopaminergica (Balfour, 2001; Ebbert *et al.*, 2009; Ebbert *et al.*, 2014). Il bupropione, agendo sul trasportatore della dopamina, permetterebbe di ridurre la ricaptazione all'interno delle cellule e ne innalzerebbe i livelli extracellulari (Rauhut *et al.*, 2003). Si ipotizza che il bupropione abbia effetto analogo anche sul trasportatore della noradrenalina, riducendo con meccanismo di inibizione retroattiva l'iperattività delle cellule noradrenergiche del *locus coeruleus*. Con questo farmaco sono stati rilevati tassi di cessazione pari al 44.2% al termine del trattamento e del 23.1% dopo un anno. Associando al bupropione la terapia sostitutiva nicotinic, la percentuale di successo ad un anno arriverebbe al 35.5%. L'efficacia clinica del bupropione apre delle nuove prospettive al trattamento farmacologico della dissuefazione dal fumo mediante l'uso di antidepressivi.

Tuttavia esistono controindicazioni all'uso di questo farmaco quali ipersensibilità al bupropione,

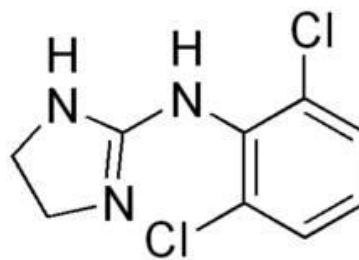
patologie convulsive, bulimia o anoressia nervosa disordini bipolari ed effetti collaterali quali insonnia, bocca secca e nausea.



**Figura O** : Struttura del bupropione

## CLONIDINA

Si tratta di un antiipertensivo che pur essendo efficace, presenta delle notevoli limitazioni nella somministrazione a causa di importanti effetti collaterali che devono essere ogni volta attentamente valutati dal medico (Gourlay *et al.*, 2004).



**Figura P** : Struttura della clonidina

## USDHHS E NORTRIPTILINA

Sono farmaci antidepressivi che agiscono sul trasportatore della noradrenalina (USDHHS, 2000). Nonostante siano necessari ancora studi e ricerche in merito per meglio conoscere le potenzialità e la tollerabilità degli antidepressivi nei fumatori, i risultati delle ricerche di base indicano delle interessanti prospettive nel futuro impiego di questi farmaci.

## RIMONABANT E MODULAZIONE DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

I cannabinoidi endogeni sono primariamente responsabili delle forme di plasticità sinaptica a breve e a lungo termine indotte dalle sostanze d'abuso nei neuroni del sistema limbico (Kauer *et al.*, 2007; Melis *et al.*, 2012). Coerentemente l'antagonista del recettore CB1, il rimonabant, ha suscitato molto interesse per la sua efficacia nei modelli animali di *addiction*, in particolare per la dipendenza da nicotina (Le Foll *et al.*, 2008) ma anche per quella del cibo (quest'ultima

accompagnata da obesità e sindrome metabolica) (Meye *et al.*, 2013). Tuttavia, il rimonabant si è rilevato fallimentare nell'uomo, dato che i *trials* clinici hanno rilevato un'incidenza, considerata inaccettabile, di disturbi neuropsichiatrici gravi, tra cui depressione e suicidio (Christensen *et al.*, 2007). Tuttavia era chiaro che il sistema cannabinoide endogeno fosse intimamente coinvolto nei meccanismi del *reward* naturale (Mahler *et al.*, 2007; Fattore *et al.*, 2010). Infatti, studi di risonanza magnetica funzionale nell'uomo hanno dimostrato che il rimonabant riduce la risposta a stimoli piacevoli, agendo a livello dello striato ventrale e della corteccia orbitofrontale, aree intimamente coinvolte nei circuiti neuronali della gratificazione. Allo stesso tempo, viene invece potenziata la risposta a stimoli sgradevoli nella corteccia orbitofrontale laterale (Horder *et al.*, 2010). Quindi l'antagonismo del recettore CB1 induce condizioni di anedonia e disagio che possono diminuire la motivazione a ricercare fonti di piacere naturale e condurre al suicidio i soggetti più vulnerabili (Horder *et al.*, 2010).

Tuttavia, la via del sistema cannabinoide non è affatto chiusa. Consapevoli degli errori del passato oggi si persegue la via della modulazione di questo sistema. Recenti studi, svolti dal *National Institute on Drug Abuse* (NIDA, USA), rivelano risultati molto promettenti circa lo sviluppo di alcuni inibitori dell'idrolisi degli endocannabinoidi o di molecole analoghe all'anandamide (uno dei principali endocannabinoidi), prive di attività cannabinoide ma che agiscono sul recettore PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptors type  $\alpha$* ) (Melis *et al.*, 2008; Mascia *et al.*, 2011; Panlilio *et al.*, 2012).

## ANTAGONISTI OPPIOIDI

Il sistema oppioide endogeno, come quello cannabinoide, gioca un ruolo importante nei meccanismi neurobiologici delle dipendenze e regola il rilascio di dopamina indotto dalla nicotina nelle aree cerebrali della gratificazione (Trigo *et al.*, 2010). Il naltrexone, un antagonista del recettore oppioide  $\mu$  approvato per il trattamento della dipendenza da alcool e oppioidi, si sarebbe dimostrato utile anche nel trattamento della dipendenza da tabacco, soprattutto se associato ai cerotti alla nicotina (King *et al.*, 2013). Il naltrexone e la nicotina agirebbero con meccanismi complementari, il primo ridurrebbe la gratificazione e il rinforzo positivo prodotto dalle sigarette, mentre la seconda attenuerebbe i sintomi dell'astinenza. Non tutti gli studi clinici finora effettuati confermano l'efficacia del naltrexone sia da solo sia in associazione con la terapia sostitutiva; in particolare, uno studio di meta-analisi non ha riscontrato un'efficacia superiore in modo significativo rispetto al placebo (David *et al.*, 2013). Il naltrexone avrebbe però un effetto utile negli ex-fumatori: ridurrebbe l'aumento di peso, un fattore che sicuramente interferisce con la motivazione a proseguire con l'astinenza, soprattutto nel sesso femminile. Il

sistema oppioide endogeno è implicato nella gratificazione indotta dal cibo e gli antagonisti oppioidi ne riducono il potere gratificante e modificano diversi aspetti edonici legati al comportamento alimentare. Sotto questo aspetto, il naltrexone potrebbe essere efficace nel ridurre l'aumento di peso associato all'astinenza (Yeomans *et al.*, 2002). Diversi studi clinici hanno infatti evidenziato che l'uso del naltrexone limita l'aumento di peso soprattutto nelle donne (King *et al.*, 2012), e quindi questo farmaco potrebbe essere utile, in associazione con altri più efficaci, per attenuare l'impatto dell'aumento di peso sulla volontà di proseguire l'astinenza da sigaretta.

### ANTAGONISTI PER IL RECETTORE DOPAMINERGICO D3

I recettori dopaminergici D3 sono coinvolti negli aspetti motivazionali della dipendenza (Heidbreder *et al.*, 2005; Le Foll *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2005; Heidbreder *et al.*, 2010; Newman *et al.*, 2012). Dati preclinici indicano che gli antagonisti D3 selettivi regolano la motivazione nell'autosomministrazione di sostanze d'abuso e riducono il *craving* evocato da stimoli. I recettori D3 hanno una distribuzione più ristretta dei recettori D2 e sono particolarmente abbondanti nelle zone di proiezione del sistema dopaminergico mesolimbico (striato ventrale, corteccia prefrontale e amigdala), primariamente implicato nei meccanismi centrali della gratificazione, nonché nel controllo degli aspetti cognitivi ed emotivi legati all'*addiction* (Heidbreder *et al.*, 2010). L'antagonismo di questi recettori potrebbe essere un approccio terapeutico innovativo nella terapia delle dipendenze, compresa quella da sigarette (Andreoli *et al.*, 2003; Pak *et al.*, 2006; Le Foll *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2007; Khaled *et al.*, 2010).

La *GlaxoSmithKline* ha sviluppato un antagonista selettivo, il GSK598809, che è attualmente alla fase II della sperimentazione clinica (NCT01188967).

### INIBITORI DELLE MAMOAMMINO-OSSIDASI B (I-MAO-B)

La selegilina e l'EVT302, inibitori reversibili dell'enzima catabolico della dopamina MAO-B, sono stati testati clinicamente come ausilio per smettere di fumare. I primi risultati, ottenuti da un numero limitato di fumatori, suggerivano la loro efficacia nel ridurre i sintomi d'astinenza da sigarette e le ricadute. L'inibizione del catabolismo della dopamina dovrebbe, in teoria, attenuare lo stato ipodopaminergico caratteristico dell'astinenza da nicotina e di conseguenza il *craving*. Nonostante gli studi di fase I abbiamo mostrato una buona tollerabilità all'EVT302, esso non si è dimostrato più efficace del placebo (Berlin *et al.*, 2012).

Il *National Institute on Drug Abuse* (NIDA) ha portato avanti diversi studi clinici con la

selegilina, nonostante questa non abbia dimostrato significativi miglioramenti nei tassi d'astinenza (Weinberger *et al.*, 2010).

### AGONISTI PPAR $\alpha$

Studi condotti dal NIDA hanno evidenziato che gli agonisti endogeni del recettore PPAR $\alpha$ , lipidi analoghi all'anandamide, riducono gli effetti biochimici, elettrofisiologici e comportamentali della nicotina (Melis *et al.*, 2008; Melis *et al.*, 2010). Il meccanismo responsabile di questo effetto sarebbe la riduzione della funzionalità dei recettori nicotinici ad alta affinità  $\alpha_4\beta_2$ , attraverso la fosforilazione mediata dai PPAR $\alpha$ . Questo effetto potrebbe essere utile per ripristinare una normale funzionalità recettoriale colinergica, che viene alterata dall'assunzione cronica di nicotina attraverso fenomeni come l'*up-regulation* recettoriale (Govind *et al.*, 2012).

I fibrati (fenofibrato, gemfibrozil, clofibrato) sono farmaci agonisti PPAR $\alpha$  già approvati per uso umano nel trattamento delle iperlipidemie. Analogamente agli agonisti endogeni, anche i fibrati sono efficaci in modelli animali di dipendenza da nicotina (Mascia *et al.*, 2011; Panlilio *et al.*, 2012; Melis *et al.*, 2013). Sulla base delle evidenze precliniche è stato approvato un protocollo sperimentale, attualmente in fase II, per verificare l'efficacia del gemfibrozil nella dipendenza da nicotina (NCT01876810).

### TRATTAMENTI COMPORTAMENTALI

L'abitudine al fumo, oltre ad essere considerata una e vera e propria tossicodipendenza, è anche un comportamento, uno stile di vita. Come avviene in tutti coloro che hanno problemi di dipendenza, anche per chi fuma è necessaria una maggiore responsabilizzazione e un coinvolgimento attivo nel processo di cambiamento comportamentale perché questo sia duraturo e definitivo. Nei trattamenti basati su interventi "esterni" (farmaci, etc.) il soggetto assume un ruolo passivo e il cambiamento sembra avvenire in maniera quasi "miracolosa". Questi metodi "esterni" favoriscono atteggiamenti di completa delega ad altri e la convinzione che la possibilità di smettere di fumare dipenda più dall'efficacia del metodo piuttosto che dall'impegno personale. Per questa ragione è importante ricorrere ad approcci che agiscono maggiormente sulla motivazione personale, che coinvolgano il fumatore in una riflessione critica rispetto al significato che questi attribuisce al fumare, ad un'analisi dettagliata degli stimoli e dei meccanismi che lo spingono verso la sigaretta. L'obiettivo è stimolare il fumatore ad attivare le risorse personali, cercando di promuovere un cambiamento del comportamento ed uno stile di vita più attento alla difesa della propria salute. Nell'ultima decade, questo approccio si è diffuso da programmi di natura primariamente clinica, di formale cessazione del fumo, all'applicazione

in numerose comunità e ambienti pubblici di cura. In genere, i metodi comportamentali vengono impiegati per scoprire situazioni ad alto rischio di ricaduta, creare avversione al fumo, sviluppare un auto-monitoraggio del comportamento di chi fuma e stabilire risposte adattative competitive. Altri fattori chiave in un trattamento di successo includono l'evitamento dei fumatori e dell'ambiente di fumo e il sostegno della famiglia e degli amici. Il più importante fattore singolo, tuttavia, è l'apprendimento e l'uso di capacità di adattamento per la prevenzione a breve e a lungo termine della ricaduta: i fumatori non solo devono apprendere modalità comportamentali e cognitive per la prevenzione della ricaduta ma devono essere anche pronti ad applicare queste capacità in una crisi.

Benchè i trattamenti farmacologici e comportamentali possono avere grande successo quando applicati da soli, la Ricerca ci insegna che l'integrazione di entrambi i tipi di trattamento rappresenta l'approccio più efficace. Più del 90% dei soggetti che tentano di interrompere il fumo hanno una ricaduta o ritornano a fumare entro un anno. Vi è però un 2.5-5% che ha successo. E' stato dimostrato che i trattamenti farmacologici possono raddoppiare le eventualità del loro successo. Tuttavia, una combinazione di trattamenti farmacologici e comportamentali aumenta ulteriormente queste possibilità. Per esempio, quando l'uso del cerotto alla nicotina è combinato con un approccio comportamentale, così come la terapia di gruppo o reti di sostegno sociale, l'efficacia del trattamento è significativamente aumentata. Inoltre, smettere di fumare può avere un impatto positivo immediato nella salute della persona: ad esempio, un uomo di 35 anni che smette di fumare aumenta la sua aspettativa di vita in media di 5.1 anni.

## *La sigaretta elettronica*

La sigaretta elettronica, conosciuta anche con il nome di *e-cigarette* o *personal vaporizer* o ENDS (*Electronic Nicotine Delivery Systems*, definita così nel 2010 dall'OMS), è stata vista da molti tabagisti come uno strumento alternativo alla sigaretta tradizionale, da poter utilizzare nei luoghi dove vige il divieto antifumo, per continuare ad assumere nicotina. Altri fumatori utilizzano invece la sigaretta elettronica come un mezzo utile per smettere di fumare (questo grazie anche al fatto che è possibile controllare la dose di nicotina somministrata e scalarla nel tempo, analogamente a come si fa con i cerotti transdermici o con altri presidi progettati *ad hoc* dall'industria farmaceutica) (Cahn *et al.*, 2011; Caponnetto *et al.*, 2011; Caponnetto *et al.*, 2013). Sin dalla prima denuncia pubblica dei reali gravi rischi connessi al fumo della sigaretta convenzionale nel 1952, quando il *Reader's Digest* pubblicò un articolo intitolato *Cancer by the*

*Carton*, diversi studiosi ricercarono pratiche alternative al fumo che fossero meno dannose. Un'iniziale alternativa arrivò dallo scienziato americano Herbert A. Gilbert che nel 1963 brevettò una "sigaretta senza fumo e senza tabacco", attraverso cui inalare aria calda aromatizzata al tabacco, dispositivo che non ebbe successo commerciale a causa della mancanza di nicotina e dell'ancora scarso consenso circa la nocività del tabacco (Modi *et al.*, 2012). Con il crescere del riconoscimento sociale della nocività del tabagismo, le *major* del tabacco non tardarono ad investire nella ricerca di sigarette che producessero fumo in minor quantità e di minor tossicità (Bertholon *et al.*, 2013) arrivando a lanciare sul mercato:

- *Premier* (1988), capsule di alluminio contenenti tabacco di *R.J. Reynolds*, ritirate già nel 1989;
- *Eclipse* (1994), nuovo tentativo di *R.J. Reynolds* costituito da una punta di carbone, del glicerolo e del tabacco (Fagerstrom *et al.*, 2000);
- *Accord* (1998), sistema ideato da Philip Morris costituito da una sigaretta e da un surriscaldatore in cui inserirla.

Sebbene tutti questi dispositivi permettessero di non bruciare direttamente tabacco, non consentirono di eliminare del tutto le tossine tipiche del fumo e non incontrarono i favori dei consumatori per le loro difficoltà di utilizzo e i gusti poco convincenti (Dautzenberg *et al.*, 2013).

La moderna sigaretta elettronica venne ideata dal farmacista cinese Hon Lik che nel 2003 fondò la *Ruyan* (letteralmente "simile al fumo") con l'intento di realizzare la prima sigaretta che contenesse nicotina ma non catrame (Lee *et al.*, 2011), "una terapia miracolosa per i fumatori che non vogliono o non riescono a smettere". Fisicamente assomigliava a un ibrido tra una normale sigaretta e una penna a biro. In quell'anno è stato brevettato in Cina un dispositivo ad ultrasuoni che nebulizzava la nicotina disciolta in una soluzione di glicole propilenico che l'anno seguente venne introdotto nel mercato interno cinese (Dautzenberg *et al.*, 2013). Vennero presentati i primi di una lunga serie di brevetti internazionali e nel 2006 cominciò l'esportazione, prima nel Regno Unito e, in un secondo tempo, negli USA e nel resto del mondo (Matrix, 2013). L'uso della sigaretta elettronica è cresciuto in modo tumultuoso in molti paesi: negli Stati Uniti e in Inghilterra il 6% dei fumatori si è convertito all'uso di questo dispositivo. In Italia sono nati migliaia di negozi che vendono la sigaretta elettronica; secondo l'ANAFE (Associazione Nazionale Fumo Elettronico) il 20% di 10 milioni di fumatori usa o intende utilizzare le sigarette elettroniche (Cobb *et al.*, 2010; Farsalinos *et al.*, 2013; Goniewicz *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). I venditori assicurano che la sigaretta elettronica offre tutte le sensazioni del fumo di tabacco, meno le 4000 sostanze tossiche in esso contenute. Inoltre, non produce fumo

passivo, non provoca incendi e costa meno delle sigarette tradizionali. Infatti, questo dispositivo elettronico è stato inventato con lo scopo di imitare il sistema di inalazione della nicotina della sigaretta convenzionale, senza avere gli effetti dannosi derivanti dalla combustione del tabacco (Kralikova *et al.*, 2013).

Tuttavia, dopo la grande popolarità che la sigaretta elettronica ha conosciuto negli ultimi anni, oggi il suo utilizzo si è più che dimezzato: gli utilizzatori sono passati dal 4.2% del 2013 al 1.6% del 2014. Coloro che la usavano abitualmente nel 2013 erano circa 510 mila persone (1% della popolazione), nel 2014 sono passati a 255 mila (lo 0.5%). Anche i consumatori occasionali che erano 1.6 milioni nel 2013 (il 3.2%), sono passati a circa 550 mila (1.1%) nel 2014. Tuttavia, tra gli utilizzatori della sigaretta elettronica nel 2014 è aumentata la percentuale di chi ha dichiarato di aver smesso di fumare le sigarette tradizionali (18.8% nel 2014, 10.6% nel 2013); diminuisce invece la percentuale di chi dichiara di aver ridotto leggermente o drasticamente il numero di sigarette fumate (41.8% nel 2014 rispetto al 67.3% nel 2013). Infine compare quest'anno anche tra gli utilizzatori della sigaretta elettronica chi ha dichiarato di aver aumentato il numero di sigarette tradizionali (1.7%) e di chi ha iniziato a fumare sigarette tradizionali sebbene prima non avesse questa abitudine (12.1%).

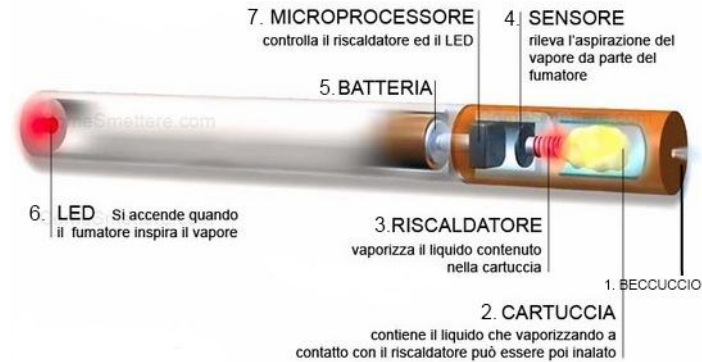
Dalla sua invenzione, la sigaretta elettronica si è diffusa in tutto il mondo, specialmente attraverso *Internet*. Le sigarette elettroniche possono essere acquistate in rete o nei punti vendita al dettaglio. Sono disponibili in commercio anche sigari e pipe elettroniche.

Colui che fa uso della sigaretta elettronica è chiamato svapatore o *vaper* (Etter, 2010).

## COMPONENTI DEL DISPOSITIVO E MODALITA' DI FUNZIONAMENTO

La sigaretta elettronica si compone di varie parti. Un beccuccio, che consente al soggetto di inspirare aria; una camera al cui interno viene messo un liquido contenente diverse sostanze, tra cui la nicotina (chiamato *e-liquid*); una camera di atomizzazione o meglio di vaporizzazione (nota semplicemente con il nome di atomizzatore o vaporizzatore), una batteria ricaricabile e una luce a LED (Cantrell, 2013).





**Fig. Q :** Componenti della sigaretta elettronica

In particolare:

- la cartuccia, o con maggiore precisione il dispositivo di stoccaggio dell'*e-liquid*, che può prendere la forma di un filtro, assolvendo alla funzione di bocchino o di serbatoio. Ne esistono di ricaricabili e di monouso;
- l'atomizzatore, costituito da una resistenza elettrica con la funzione di scaldare il liquido e trasformarlo in vapore. Con l'utilizzo perde di efficienza a causa dell'accumulo di residui e richiede di essere sostituito;
- la batteria, generalmente a ioni di litio, si avvita all'atomizzatore a cui fornisce energia e termina con un LED. Può essere attivata automaticamente da un sensore di pressione o di flusso o manualmente mediante un pulsante. Viene commercializzata in varie grandezze e capacità.

Nei modelli più recenti è in uso la pratica di integrare atomizzatore e cartuccia in un unico componente, il cartomizzatore, a beneficio della resa aromatica (il liquido viene scaldato dall'interno per mezzo di una lanetta) e della semplicità di utilizzo (Modi *et al.*, 2012; Facchino, 2013). Vi sono due tipi di sigaretta elettronica: manuale e automatica.

Il modello manuale, oltre alle componenti sopra descritte, possiede un piccolo pulsante. Quando lo si preme, il liquido contenente le varie sostanze chimiche e la nicotina presenti nell'apposita camera, vengono scaldati e l'atomizzatore le trasforma in vapore che può essere aspirato o inalato. Essendo un modello manuale, si crea vapore solo quando viene premuto il pulsante e si inala.

Le sigarette automatiche richiedono solo di inalare o "prendere una boccata" per attivare il vaporizzatore (Weinberg *et al.*, 2011).

In commercio esistono modelli monouso o dispositivi riutilizzabili corredati di caricatori, cartucce o liquidi di ricarica e batterie aggiuntive. Questi ultimi vengono proposti in un'ampia gamma di configurazioni.

Il principio importante della sigaretta elettronica è che l'evaporizzazione della nicotina è comandata dall'utente mediante l'aspirazione. Questa produce l'accensione di una resistenza

elettrica che vaporizza la soluzione e rilascia la nicotina, alle stesse concentrazioni del fumo della sigaretta, ed eventualmente gli aromi della sigaretta. L'attuale offerta si polarizza attorno a due punti di forza:

- estetica: sono sigarette elettroniche tradizionali nella forma e nella modalità di utilizzo (senza pulsante). L'esperienza d'uso è resa naturale dalle varianti *plug & play* (che tradotto letteralmente significa "collega e usa") a filtri usa e getta e dal pacchetto, che nella versione PCC4, permette di superare il punto debole dell'autonomia a batterie di modeste dimensioni, responsabili dell'*hit* (la percezione di vapore che passa nella laringe durante l'inspirazione) poco intenso e della diversa aspirazione;

- percezione: sono sigarette elettroniche appaganti nell'aspirazione e nell'*hit* che si distinguono nettamente sia nell'estetica, con forme nuove e colori metallizzati o sgargianti, che nella modalità di utilizzo, con ricariche a liquido e batterie manuali e con intensità di vaporizzazione variabile, a discapito delle dimensioni che hanno portato a definire questa tipologia *big battery*. Introducono nell'esperienza del fumatore, o meglio dello svapatore, una nuova dimensione di personalizzazione di batterie, clearomizzatori e aromi.

Le sigarette elettroniche in commercio sono articolo di varia tipologia, con cartucce che possono contenere nicotina a differenti concentrazioni oppure esserene prive (Goniewicz *et al.*, 2012). Per fumare una *e-cigarette*, si possono scegliere cartucce e liquidi per la ricarica a base di nicotina, senza nessun aroma o dai più svariati aromi (mentolo, incenso, vaniglia, liquirizia, caramello, caffè, cioccolato, coca cola, fragola e mela sono solo alcuni esempi). Vengono offerte "assaggiature" gratis, perché il cliente scelga la concentrazione di nicotina e l'aroma più gradito. E' stato osservato però che, il numero di svapatori di *e-cigarette* senza nicotina, è inferiore a quello dei fumatori di sigarette elettroniche con nicotina (Etter *et al.*, 2011). Che sia parte di un filtro confezionato o provenga da un flacone per la ricarica del serbatoio, per la creazione del "fumo elettronico" è necessario un liquido con una specifica composizione (Dautzenberg *et al.*, 2013; Facchino, 2013).

Il "fumo elettrico" non è un fumo vero e proprio, data l'assenza di combustione, ma è improprio definirlo anche un vapore. Si tratta di un aerosol, una dispersione di particelle di liquido (nicotina, glicole propilenico e glicerolo) in sospensione in un mezzo gassoso, il vapore acqueo.

## COMPOSIZIONE CHIMICA ED EMISSIONI

Per il funzionamento del dispositivo, di fondamentale importanza è il liquido contenuto in una specifica camera. Dall'*e-liquid* della sigaretta elettronica contenente nicotina sono state isolate 1,2-propadiolo (propilene glicole), 1,2,3-propantriolo (glicerina), l'enantiomero S(-) della

nicotina e diversi agenti aromatizzanti. Propilene glicole e glicerina costituiscono circa il 90% del liquido.

Nel liquido senza nicotina sono state rilevate le medesime sostanze, nelle stesse quantità o in quantità lievemente diverse, ad eccezione dell'enantiomero S(-) della nicotina che è presente in quantità inferiore allo 0.001%, rispetto al liquido contenente nicotina, dove il quantitativo è invece dello 0.25% (Pellegrino *et al.*, 2012). Anche nel vapore emesso dal dispositivo è presente soprattutto 1,2-propandiolo e glicerina. Il propilene glicole è un liquido trasparente, incolore, inodore e insapore a temperatura ambiente. Può esistere anche sotto forma di vapore. Ha una vastissima gamma di applicazioni: può essere utilizzato come base per i liquidi decongelanti, come solvente nelle industrie plastiche, come sostanza chimica in grado di generare fumo artificiale, come additivo per diversi farmaci (solvente in molti preparati farmaceutici, in formulazioni per uso orale, iniettabili e ad uso topico), umettante in medicinali, cosmetici, prodotti alimentari e a base di tabacco. Nei liquidi delle sigarette elettroniche è utilizzato per simulare l'aspetto di una sigaretta tradizionale. La FDA ha classificato questa molecola come “*generally recognized as safe*”. Il suo uso è consentito negli aromi, nei farmaci, nei prodotti alimentari e cosmetici.

Tuttavia, all'interno del liquido sono presenti agenti aromatizzanti che possono comportare alcuni rischi per la salute, ma la loro concentrazione è inferiore allo 0.1%, limite massimo consentito dalla legge.

Con l'accensione della sigaretta elettronica si ha l'emissione di vapore e di particolato sottile (PM). Tuttavia, comparando i livelli di PM prodotti dalla *e-cigarette* e da una sigaretta tradizionale sono state rilevate significative differenze: le emissioni fini ed ultrafini di PM sono risultate notevolmente più alte per la normale sigaretta rispetto a quella elettronica (Pellegrino *et al.*, 2012).

## EFFETTI DEGLI ENDS

Le problematiche degli effetti sulla salute della sigaretta elettronica sono state sollevate relativamente a certi parametri clinici che devono essere valutati rispetto a quelli dei fumatori convenzionali. Tali parametri includono i livelli di nicotina nel plasma, la risposta cardiovascolare (frequenza cardiaca), il coinvolgimento in patologie infiammatorie che colpiscono il tessuto di sostegno del dente (superficiale e profondo) e l'incidenza di cancro orale. Una prima e fondamentale area di indagine connessa alla tossicità dei costituenti dell'*e-liquid* è l'impatto sulla salute del fumatore attivo e degli altri soggetti “passivi”, che è stato studiato solamente negli effetti acuti di breve termine e dovrà essere integrato con gli effetti cronici a

lungo termine di cui tutt'oggi non siamo ancora a conoscenza (Vansickel *et al.*, 2010; Vardavas *et al.*, 2012; Dawkins *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2014).

Infatti è noto che le sigarette tradizionali causino o aumentino l'incidenza di cancro orale, alla testa e alla gola e di patologie infiammatorie che interessano i denti. Rispetto alle normali sigarette, quelle elettroniche non sono risultate essere un fattore di rischio per lo sviluppo di cancro al polmone e ictus (Trtchounian *et al.*, 2010). Gli effetti avversi più comuni riportati sono irritazioni alla bocca e alla gola, mal di gola, tosse secca, afte della bocca, nausea, vertigini, mal di testa e aumento della sudorazione (Weinberg *et al.*, 2011; Caponnetto *et al.*, 2012).

Recentemente è stato osservato che la sigaretta elettronica può avere effetti sul sistema respiratorio. Alcuni minuti dopo aver inalato da una *e-cigarette* sono stati rilevati cambiamenti nella funzionalità respiratoria, costrizione o infiammazione delle vie aeree.

I costituenti stessi dichiarati dai produttori che recano i primi rischi sono la nicotina e il glicole propilenico. La prima, come già spiegato nei capitoli precedenti, è di tossicità accertata e determina un sovraccarico di lavoro del cuore fino a giungere ad essere letale per l'uomo (Gilardi, 2013). Il secondo, che ricordiamo essere un additivo alimentare, ha mostrato degli effetti negli esperimenti di esposizione per via inalatoria effettuati in passato sui lavoratori dei comparti dell'aviazione e dello spettacolo: irritazione acuta degli occhi e delle vie aeree superiori e tosse ed oppressione cronica al torace (Gilardi, 2013). In relazione alla sigaretta elettronica il glicole propilenico, con il suo effetto irritativo, è ritenuto responsabile di un aumento della resistenza delle vie respiratorie simile a quella causata dalle sigarette tradizionali: 5 minuti di "svapo" sono sufficienti a restringere i bronchi nell'immediato e ad aumentare la loro resistenza al passaggio dell'aria (Gratziou, 2012; Vardavas *et al.*, 2012). Va segnalato che questo risultato è stato distorto dai media, arrivati ad affermare che gli studi sperimentali hanno dimostrato che la sigaretta elettronica danneggia i polmoni. Tuttavia, un aumento della resistenza aerea, determinabile anche dall'inspirazione di aria calda e umida, non si traduce necessariamente in un danno, nonostante rimangano da appuntare gli effetti a lungo termine; inoltre, non ci sono rischi di accumulo nei polmoni, in quanto si tratta di un olio essenzialmente solubile (Dautzenberg *et al.*, 2013).

Ulteriori rischi sono sollevati dai componenti presenti ma non dichiarati, in particolare dalle nitrosammine specifiche del tabacco, i primi cancerogeni delle sigarette, derivanti dai residui del tabacco, contenuti nella nicotina addizionata. La FDA ne rileva tracce, nei liquidi esaminati, dallo 0.07% allo 0.2%, ossia in una concentrazione inferiore a quella contenuta nel fumo tradizionale (Westenberger, 2009). Nello stesso studio viene evidenziata la presenza di impurità tipiche del tabacco, ossia di sostanze vicine alla nicotina ma con differente emivita e di prodotti

di scarsa qualità, come il nocivo glicole di etilenico; inoltre, si riscontrano livelli di nicotina diversi da quelli dichiarati.

Recenti studi hanno ampliato l'indagine della composizione chimica dell'aerosol generato, studiandone il particolato, composto da polveri fini e ultrafini respirabili, e la fase gassosa, costituita da composti organici volatili (COV). Con attenzione al profilo della tossicità, Goniewicz e collaboratori, nel 2012, oltre alle nitrosammine già evidenziate, rilevano metalli in forma di nanoparticelle, che destano preoccupazione per la loro capacità di penetrare a fondo nei polmoni, e COV cancerogeni o dannosi per l'uomo, quali la formaldeide e l'acetaldeide. Tuttavia, i livelli di sostanze tossiche contenute nell'aerosol sono dalle 9 alle 450 volte inferiori rispetto a quelle contenute nel fumo di sigaretta e la maggior parte delle volte presenti sono in tracce.

Principali sostanze tossiche			
	<i>E-cigarette</i>	Sigaretta	Ordine inferiorità
COV			
Formaldeide	0.2-5.61	1.6-52	9
Acetaldeide	0.11-1.36	52-140	450
Acroleina	0.07-4.19	2.4-62	15
Toluene	0.02-0.63	8.3-70	120
Metalli			
Cadmio	0.01-0.22		
Nichel	0.11-0.29		tracce
Piombo	0.03-0.57		

**Tab. D:** Principali sostanze tossiche contenute nelle sigarette elettroniche e in quelle tradizionali (Goniewicz *et al.*, 2012)

Discordanti le ipotesi circa l'origine dei metalli: secondo Dautzenberg e collaboratori (2013) derivano dal processo di fabbricazione degli *e-liquids* mentre secondo Gilardi (2013) sono originati dai filamenti metallici del cartomizzatore. Poiché le industrie che producono sigarette elettroniche sono migliaia, i controlli di qualità sono difficili, ma necessari. L'OMS ha proposto che le sigarette elettroniche siano regolamentate come i prodotti farmaceutici, non come i prodotti del tabacco. Tuttavia, la preoccupazione delle autorità sanitarie rimane che la sigaretta elettronica produca una "nuova dipendenza".

In riferimento alla quantità delle particelle e dei COV emessi e all'inquinamento degli ambienti interni, Schripp e collaboratori nel 2013 hanno evidenziato che, sebbene l'aerosol della sigaretta elettronica non sia rilasciato in modo continuo ma unicamente durante le esalazioni, dall'utilizzo del dispositivo deriva un aumento delle emissioni, in particolare di glicole propilenico; dunque, deve essere atteso un "*passive vaping*".

Infine è necessario evidenziare che l'aerosol inalato subisce dei cambiamenti nei polmoni che allo stato attuale non sono stati ancora definiti e su cui dovranno vertere gli studi futuri (Blasi, 2013).

## EFFICACIA DEGLI ENDS

Chris Dawkins e collaboratori, nel 2012, hanno dimostrato che la sigaretta elettronica contenete nicotina e quella priva di nicotina hanno la stessa efficacia nel sopprimere il *craving* e gli altri sintomi dell'astinenza. Il loro effetto non è superiore a quello dell'inalatore. E' verosimile che la riduzione dei sintomi acuti dell'astinenza sia un effetto placebo, piuttosto che delle peculiari qualità della sigaretta elettronica. E' noto infatti che quei sintomi possono essere soppressi dalla sigaretta di tabacco senza nicotina.

Sulla capacità di dissuefazione dal fumo, Bullen e collaboratori, nel 2013, hanno pubblicato su *Lancet* i risultati di uno studio su 675 fumatori intenzionati a smettere di fumare. I soggetti coinvolti sono stati reclutati dalla comunità centrale di New Jersey attraverso volantini, e-mail e passaparola, presentavano un'età maggiore di 18 anni ed erano fumatori in una media di 41 sigarette al giorno, senza alcuna storia pregressa di utilizzo di sigarette elettroniche o altri tipi di NRT. Tra i criteri di esclusione sono stati considerati un recente infarto del miocardio o angina, asma o malattia polmonare cronica ostruttiva non ben controllati, abuso di sostanze, gravidanza o utilizzo corrente di altri dispositivi per la cessazione dell'abitudine al fumo. La sigaretta elettronica contenente 16 mg di nicotina, con aroma normale, utilizzata *ad libitum*, è stata confrontata col cerotto contenente 21 mg di nicotina (uno al dì). Dopo sei mesi, il 7.3% del gruppo dei soggetti che utilizzavano la sigaretta elettronica contro il 5.8% del gruppo trattato con il cerotto era completamente astinente. Inoltre il 57% dei partecipanti nel gruppo della sigaretta elettronica e il 41% nel gruppo del cerotto avevano ridotto di almeno la metà il consumo delle sigarette di tabacco. Secondo questo studio anche nella dissuefazione dal fumo, la sigaretta elettronica è di poco più efficace del cerotto. Tuttavia, ciò che rende differente la nicotina delle sigarette elettroniche rispetto a quella dei sostituti (ceroti transdermici, etc.) è che in questi l'erogazione non è comandata dal fumatore e il rilascio di nicotina avviene in modo continuativo, anche per molte ore: un modo efficace per mantenere i recettori nicotinici in una condizione di

permanente desensitizzazione, nella quale la nicotina erogata non produce l'effetto gratificante, ma al contrario previene quello prodotto dalla nicotina inalata col fumo. La strategia dei sostituti nicotinici è infatti quella di togliere i sintomi dell'astinenza e di far dimenticare il piacere della sigaretta; tuttavia, il fumatore ha anche una dipendenza gestuale che viene mantenuta dall'uso della sigaretta elettronica.

I risultati di Caponnetto, Polosa e collaboratori, dell'Università di Catania, sono più incoraggianti. Infatti Caponnetto e collaboratori nel 2013 hanno dimostrato che la sigaretta elettronica (contenente 7.4 mg di nicotina) ha ridotto fortemente il numero delle sigarette convenzionali fumate in 7 su 14 schizofrenici, e ha prodotto la completa astinenza in 2 di questi soggetti. La sigaretta elettronica, inoltre, non ha modificato la sintomatologia psichiatrica.

Su 40 fumatori, intenzionati a smettere di fumare, Polosa e collaboratori, nel 2011, hanno dimostrato che la sigaretta elettronica (contenente 7.4 mg di nicotina), a 6 mesi dall'inizio del trattamento, ha prodotto la completa astinenza in 9 soggetti e la riduzione del 50% del numero delle sigarette fumate in 13 su 40 soggetti studiati. Successivamente, nel 2013, Caponnetto e collaboratori su 300 fumatori, non intenzionati a smettere di fumare, hanno dimostrato che l'uso per 6 mesi della sigaretta elettronica (contenente 7.2 mg di nicotina) ha ridotto di almeno il 50% il consumo di sigarette nel 20.5% dei soggetti, ed ha prodotto la totale astinenza per un anno nell'8.7% dei soggetti. Tuttavia, questi risultati non sembrano attribuibili alla nicotina poiché uguali successi sono stati ottenuti con la sigaretta elettronica senza nicotina.

Le interviste, attraverso la rete Internet o per e-mail, su una popolazione molto più ampia di utilizzatori di sigarette elettroniche hanno fornito importanti informazioni sulle ragioni del loro utilizzo, gli indici di gradimento delle varie marche, gli effetti percepiti e soprattutto la loro efficacia nel ridurre il numero delle sigarette convenzionali ed i sintomi dell'astinenza.

Etter e Bullen, nel 2011, hanno intervistato 3.587 utilizzatori di sigarette elettroniche da almeno 3 mesi, di cui il 70% era costituito da ex-fumatori, il 61% maschi di età media di 41 anni. Nella stragrande maggioranza degli intervistati le risposte alla domanda "Perché usi la sigaretta elettronica?" sono state: "è meno tossica del tabacco", "toglie la voglia della sigaretta", "toglie i sintomi dell'astinenza", "evita le ricadute", "permette di fumare dove è proibito". Molti degli intervistati hanno riferito che temono di ricadere nel fumo se interrompono l'uso della sigaretta elettronica. Quasi tutti dichiarano di star meglio fisicamente dopo aver sostituito la sigaretta di tabacco con quella elettronica.

Siegel e collaboratori, nel 2011, hanno intervistato via e-mail 222 soggetti che avevano acquistato 6 mesi prima una determinata marca di sigaretta elettronica. A 6 mesi dall'acquisto, il 30% ha dichiarato di essere astinente, il 66% di aver ridotto più della metà il numero di sigarette:

il 70% di coloro che usavano la sigaretta per più di 20 volte al giorno ha dichiarato di essere diventato astinente dalle sigarette convenzionali.

E' probabile che le differenze nei risultati degli studi controllati e le risposte nelle interviste dipendano dalla differente finalità dell'uso della sigaretta elettronica da parte dei clinici e dei fumatori intervistati. I primi vogliono "curare" il fumatore, il loro scopo è lo *smoking cessation*, mentre gli intervistati vogliono sostituire la sigaretta di tabacco con quella elettronica, con uno scopo di *harm reduction*. Inoltre, alcune manchevolezze negli studi clinici limitano fortemente la validità dei risultati ottenuti: in esse è stata utilizzata una determinata marca di sigaretta elettronica, contenente una quantità fissa di nicotina, arbitrariamente scelta dai medici; inoltre, non è stata misurata la concentrazione di nicotina nel vapore inalato, per cui non è possibile valutare l'equivalenza della nicotina erogata con quella del fumo di sigaretta di tabacco; ancora, non stati misurati i livelli di nicotina nel sangue dei soggetti, né è stata controllata la loro aderenza al trattamento, una precauzione necessaria nello studio di una nuova farmacoterapia. A differenza dei soggetti reclutati, i soggetti intervistati via internet o per e-mail appartengono ad una nuova comunità, quella dei *vapers*, motivati a sostituire in tutto o in parte la sigaretta di tabacco con quella elettronica. Si tratta di utilizzatori entusiasti che si scambiano pareri, consigli, commenti via internet: descrivono la forza, la gradevolezza, l'aroma delle *e-cigarettes*, stabiliscono graduatorie, etc. Ad aiutarli nelle loro scelte, è nata sulla rete una nuova categoria di informatori, che si dichiarano indipendenti, che li informa sui nuovi arrivi sul mercato. La feroce concorrenza costringe i produttori a costruire sigarette sempre più simili alle sigarette di tabacco, sia fisicamente che negli effetti gratificanti.

Lo scenario futuro, come scrive Peter Hajek su *Lancet*, non è quello di aiutare una minoranza di fumatori a smettere di fumare (la sigaretta elettronica non è nata per lo *smoking cessation*) ma quella di offrire ai fumatori in generale un mezzo più sicuro della sigaretta da tabacco. Il suo uso dovrebbe portare alla scomparsa del fumo di tabacco e delle malattie e morti da esso provocate.

#### DIPENDENZA DALLA SIGARETTA ELETTRONICA

La nicotina, contenuta nella maggior parte delle cartucce, è una sostanza che crea dipendenza ed è quindi un rischio connesso alla sigaretta elettronica. Tuttavia, vista la novità del dispositivo, pochi consumatori hanno mostrato palesemente il desiderio di liberarsene e la letteratura scientifica fornisce ancora poche informazioni su un utilizzo superiore ai 6 mesi (Dautzenberg *et al.*, 2013). Il primo rischio è l'instaurarsi di una dipendenza nicotinic, per la quale gioca un ruolo determinante la rapidità di arrivo al cervello della nicotina e l'effetto *shoot* che ne scaturisce; dovrà essere quindi indagata la cinetica plasmatica della nicotina inalata attraverso



l'*e-cigarette* e comparata alle attuali terapie sostitutive, dai cerotti a lento rilascio agli inalatori (Dautzenberg *et al.*, 2013).

Tale dipendenza, assieme ad altre variabili ambientali, è collegata ai rischi per i non fumatori di iniziazione alla nicotina, in un primo momento, e al tabacco, in un secondo tempo. Tale possibile configurazione della sigaretta elettronica come *gateway to smoking* assume una rilevanza particolare in relazione al rischio dell'iniziazione giovanile al fumo. Infatti i giovani mancano della capacità di fare decisioni informate e stanno mostrando un certo interesse per il “fumo digitale”: un recente sondaggio presso 20.000 studenti polacchi ha mostrato come 1/5 di loro abbia provato la sigaretta elettronica (Erbach, 2013), mentre i sondaggi dell'associazione *Paris Sans Tabac* hanno dimostrato come il tasso di sperimentazione massima si situi intorno ai 17 anni e sia passato dall'8.1% del 2012 al 18.3% del 2013, contribuendo a tale innalzamento il generale abbassamento dei prezzi e l'aumento della notorietà del dispositivo (Dautzenberg *et al.*, 2013).

Il secondo rischio è l'instaurarsi di una dipendenza dalla sigaretta elettronica stessa per la quale, così come per la sigaretta, svolge un ruolo fondamentale la componente gestuale, la posizione del prodotto nella società e il modo di consumazione. Tuttavia, allo stato attuale non si dispone di studi soddisfacenti sul grado associato alla *Cigarette Dependence Scale* (Dautzenberg *et al.*, 2013). A tale profilo risultano collegati i rischi di abuso e di intossicazione da nicotina, pur rivestendo un ruolo marginale. Inoltre, la grande diffusione delle sigarette elettroniche pone delle grosse preoccupazioni alle autorità sanitarie e ai mercanti del tabacco.

*Lo Zebrafish:  
un nuovo modello di studio*

## CARATTERISTICHE ANATOMICHE - FUNZIONALI

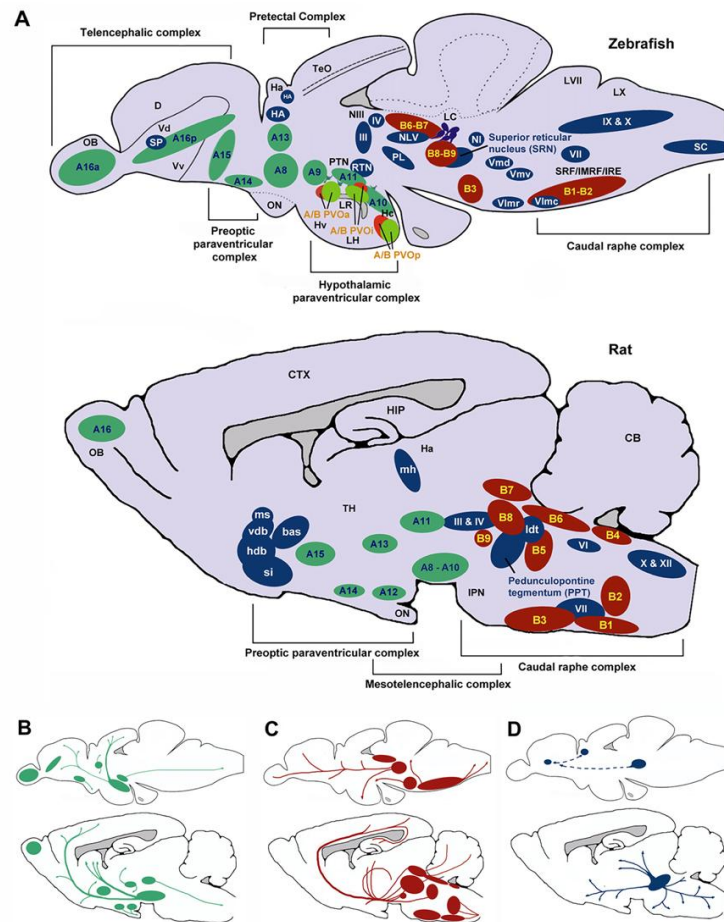
Anche gli *Zebrafish* (*Danio Rerio*), piccoli pesci teleostici tropicali d'acqua dolce originari del sud-est asiatico, sono un ottimo modello animale per studiare gli effetti molecolari e fisiologici dell'esposizione alla nicotina. Lo *Zebrafish* fu utilizzato per la prima volta nel campo della ricerca scientifica da George Streisinger al fine di investigare, mediante studi di genetica molecolare, lo sviluppo dei vertebrati. Da allora lo *Zebrafish* è considerato un importante organismo in biologia dello sviluppo, in genetica e in neurobiologia (Grunwald *et al.*, 2002). In seguito, è stato indagato l'aspetto comportamentale dello *Zebrafish* per lo studio delle funzioni cerebrali dei vertebrati.

Il suo largo impiego è riscontrabile nel fatto che lo *Zebrafish* è un vertebrato che presenta piccole dimensioni (3-5 cm) che rendono facile e poco costoso il mantenimento di un gran numero di animali in uno spazio relativamente piccolo, requisito fondamentale per studi su larga scala (Nusslein-Volhard *et al.*, 2002; Bowman *et al.*, 2010). Queste caratteristiche si riscontrano anche in modelli invertebrati, quali *Caenorhabditis elegans* e *D. Melanogaster*, ma mancano totalmente in modelli vertebrati, come i roditori. Inoltre lo *Zebrafish* ha un'alta fecondità: si riproduce in breve tempo, dando luogo ad una progenie assai numerosa (200 soggetti). Allo stato embrionale (0-5 giorni) e a quello larvale (5 giorni – 2 settimane) è trasparente e permette così la visualizzazione, diretta o tramite proteine fluorescenti, dei vari destini cellulari e quindi di eseguire l'analisi genetica, permettendo di individuare circa 4000 mutazioni letali dell'embrione e più di 500 fenotipi mutanti nei vari aspetti dei primi stadi di sviluppo (Driever *et al.*, 1996; Haffter *et al.*, 1996) che sono risultati molto utili per l'avanzamento dell'*Human Genome Project*. Determinate specie, definite *naked*, sono trasparenti, pertanto consentono di seguire tutte le tappe dello sviluppo, inoltre, gli organi interni sono visibili esternamente. Il genoma, di ridotte dimensioni, si presta a studi di mutagenesi su larga scala, di mappaggio genico, di *screening* (Sager *et al.*, 2010). Infatti, cambiamenti comportamentali possono essere correlati a mutazioni casuali del DNA (*forward genetic screen*), mutazioni sito specifiche o *knock-down* (*reverse genetic screen*) (Veldman *et al.*, 2008). Gli *Zebrafish* possono essere utilizzati come modello animale per lo *screening* di composti chimici aventi potenziale azione terapeutica per una determinata patologia (Kokel *et al.*, 2008; Pardo-Martin *et al.*, 2010; Zon *et al.*, 2010). Molti dei fenotipi mutanti identificati nello *Zebrafish*, infatti, richiamano patologie umane (disordini ematopoietici, cardiovascolari, renali, cancerogenesi) mettendo in luce un alto grado di similitudine genetica e fisiologica tra le due specie (Dooley *et al.*, 2000). Oltre all'omologia genetica, è stata riscontrata un'omologia anatomica anche delle strutture cerebrali tra lo

*Zebrafish* e gli altri vertebrati, tra cui l'uomo (Tropepe *et al.*, 2003). Si è quindi ipotizzato di impiegare questa specie per studiare i meccanismi delle complesse proprietà funzionali cerebrali dei mammiferi (Gerlai, 2003).

Nel sistema nervoso dei vertebrati i neuroni dopaminergici sono localizzati nel prosencefalo basale (principalmente nell'ipotalamo), nel mesencefalo, nel bulbo olfattivo e nella retina. I neuroni noradrenergici sono per lo più presenti nel *locus coeruleus*, centro noradrenergico cerebrale. I neuroni serotoninergici sono stati trovati nell'ipotalamo e nei nuclei del Rafe. Questi neuroni giocano un ruolo modulatorio fondamentale (Goldstein *et al.*, 1998). Disfunzioni del sistema delle monoamine, nell'uomo, producono disordini del movimento, dipendenza da alcool e droghe, ansia, depressione e schizofrenia.

Nello *Zebrafish* è stato caratterizzato lo sviluppo dei neuroni dopaminergici, di quelli noradrenergici e di quelli serotoninergici (Guo *et al.*, 1999; Shakarchi *et al.*, 2013). La maggior parte dei neuroni dopaminergici in questo pesce sono stati trovati nel prosencefalo basale, mentre sono risultati assenti nel mesencefalo. Questi neuroni dopaminergici proiettano al telencefalo, in particolare allo striato (Rink *et al.*, 2001). Questo dimostra che nello *Zebrafish* i neuroni dopaminergici possono svolgere funzioni simili a quelle dei neuroni dopaminergici del mesencefalo nei mammiferi (Breitaud *et al.*, 2007). In particolare, come spiegato nei capitoli precedenti, nei mammiferi il sistema dopaminergico mesolimbico è composto da neuroni dopaminergici che hanno i corpi cellulari nella VTA a livello del mesencefalo. Da questa zona partono proiezioni dirette alla zona ventrale striatale (*nucleus accumbens*), alla corteccia prefrontale e all'amigdala. Negli anamnioti, *Zebrafish* compreso, nel mesencefalo non sono presenti neuroni dopaminergici. Tuttavia è stata identificata una via ascendente dopaminergica essenziale per le risposte di *reward*. In particolare i neuroni dopaminergici del tubercolo posteriore dell'ipotalamo dorsale proiettano alle zone dorsali e ventrali dello striato. Queste proiezioni rappresenterebbero il corrispettivo delle vie mesostriatali e mesolimbiche (Rink *et al.*, 2001), mentre la regione dorso-mediale del telencefalo corrisponderebbe all'amigdala (Portavella *et al.*, 2002; Peitsaro *et al.*, 2003). Inoltre neuroni dopaminergici sono stati trovati nel bulbo olfattivo e nella retina, mentre i neuroni noradrenergici sono presenti in piccolissimo numero (circa 3-10 nello *Zebrafish* adulto) nel *locus ceruleus*. I neuroni serotoninergici sono stati evidenziati nell'epifisi, nel diencefalo basale e nel romboencefalo. Anatomicamente l'abenula, che riveste un ruolo chiave nel mediare i processi di *addiction*, è ben identificata e conservata tra *Zebrafish* e uomo (Agetsuma *et al.*, 2010).



**Fig. G:** Visione sagittale del cervello di *Zebrafish* (A) e di ratto (B). In verde è rappresentato il sistema dopaminergico, in rosso quello serotonergico e in blu quello colinergico (Parker *et al.*, 2013)

**ZEBRAFISH: MODELLO DI STUDIO DEI DISORDINI DEL S.N.C.**

I modelli animali sono molto utili per capire l’eziologia e la patofisiologia di molte malattie neuropsichiatriche come l’ansia, la schizofrenia, l’autismo e la *drug addiction*. Gli *Zebrafish* presentano comportamenti sociali, risposte condizionate e capacità di memorizzazione semplici ma comunque rapportabili all’uomo (Lieschke *et al.*, 2007; Brennan, 2011).

Lo *Zebrafish* è stato anche utilizzato come modello per la valutazione della tossicità e degli effetti farmacologici di numerose sostanze (Zon *et al.*, 2005), in quanto molte di queste sono solubili in acqua e vengono così direttamente assorbite dal pesce tramite le branchie, la pelle e la bocca.

Sono stati anche valutati l’apprendimento e la memoria attraverso diversi test, tra cui il *T-maze*. Si tratta di un labirinto a T che presenta alla fine di uno dei due bracci un piccolo ambiente più

profondo con alghe artificiali, che rappresenta per lo *Zebrafish* un *habitat* favorevole che in alcuni esperimenti può essere reso ancora più appetibile dall'aggiunta di cibo; in seguito ad una prima esplorazione il pesce impara a raggiungere più velocemente questo ambiente. Il tempo per raggiungere la fine del braccio diminuisce in diversi tipi di mutanti in seguito al trattamento con cocaina (Darland *et al.*, 2001) e con psicostimolanti come la D-amfetamina (Ninkovic *et al.*, 2006).

Studi effettuati in embrioni e larve di *Zebrafish* hanno dimostrato gli effetti indotti da diverse sostanze, tra le quali l'etanolo, la 6-idrossidopamina, il taxolo, l'acrilamide, il TCDD (tetracloro-dibenzodiossina), la neomicina e l'acido retinoico, sullo sviluppo dei neuroni motori, del nervo ottico, dei neuroni dopaminergici e del rivestimento mielinico (Parng *et al.*, 2007).

Ugualmente lo *Zebrafish* allo stato larvale è stato utilizzato per studiare farmaci antipsicotici, impiegati nel trattamento di patologie psichiatriche, che generano effetti collaterali extrapiramidali con conseguente disordine del movimento nell'uomo (Giacomini *et al.*, 2006). Questo permette di ipotizzare che l'azione farmacologica di molte sostanze possa essere ben conservata nei vertebrati: lo studio sulla larva dello *Zebrafish* può così fornire dati basilari sull'effetto di diverse sostanze sul controllo cerebrale dell'attività motoria.

E' stato dimostrato che lo *Zebrafish*, già allo stato embrionale possiede semplici capacità sensoriali e locomotorie. La larva invece possiede aspetti fondamentali per il comportamento, ovvero è in grado di nuotare, nutrirsi autonomamente e possiede il riflesso di fuga dal predatore. L'embrione di *Zebrafish* presenta una prima popolazione di neuroni, chiamati neuroni primari, che costituisce un sistema nervoso piuttosto semplice che si differenzia per coordinare i movimenti larvali. La distribuzione e le proiezioni dei neuroni primari sono ben note (Eisen, 1991) e lo sviluppo del comportamento natatorio dello *Zebrafish* avviene in una sequenza definita (Drapeau *et al.*, 2002).

Nonostante queste rilevanti caratteristiche dell'embrione di *Zebrafish*, numerosi studi comportamentali necessitano dello *Zebrafish* adulto (Guo, 2004). L'utilizzo del pesce adulto è più laborioso sia per gli spazi sia per i costi di mantenimento, ma soprattutto perché è più sensibile allo stress causato dal maneggiamento, perciò richiede una maggiore cura durante gli studi comportamentali. E' però necessario utilizzare l'animale adulto quando il comportamento d'interesse richiede la piena funzionalità di un sistema nervoso del tutto sviluppato.

## ZEBRAFISH: MODELLO DI STUDIO DI SOSTANZE D'ABUSO

Negli ultimi anni lo *Zebrafish* è risultato un modello animale interessante per lo studio di sostanze d'abuso, in particolare dell'impatto che queste hanno sul sistema nervoso, e della *drug addiction* (Lockwood *et al.*, 2004; Ninkovic *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2011; Kedikian *et al.*, 2013; Neelkantan *et al.*, 2013), intesa come un disordine psichiatrico che comporta alterazioni nei processi di memorizzazione e apprendimento in seguito ad una eccessiva stimolazione delle vie di *reward* dopaminergiche. I circuiti neuronali che mediano il *reward*, la memoria e l'apprendimento sono evolutivamente conservati (Kily *et al.*, 2008). Ciò rende gli *Zebrafish* un buon modello per lo studio delle risposte di *reward* alle comuni droghe d'abuso come dimostrato dalla variazione nell'espressione di specifici geni in seguito all'esposizione cronica a determinate sostanze d'abuso (Kily *et al.*, 2008; Ninkovic *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2012; Kedikian *et al.*, 2013). Inoltre diversi studi hanno dimostrato la possibilità di generare modelli di *Zebrafish* sensibili alla *drug addiction*. Queste linee sensibili sono state ottenute esponendo gli spermatogoni di pesci "fondatori" a mutageni chimici in grado di generare mutazioni nucleotidiche (Muto *et al.*, 2005). Associando analisi genetiche e comportamentali è possibile individuare i geni coinvolti nel fenomeno della *drug addiction*.

Inoltre, molti lavori sono stati indirizzati allo sviluppo di metodiche valide, rapide e riproducibili per lo studio del comportamento nello *Zebrafish* adulto, che potessero essere utilizzate nello *screening* su ampia scala (Kokel *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda lo studio dell'*addiction*, come detto in precedenza, la CPP è un modello comportamentale utilizzato per studiare le proprietà gratificanti e di rinforzo dei farmaci o delle sostanze d'abuso. In questo studio una vaschetta viene divisa in due compartimenti diversificati tramite diversi segnali visivi. Successivamente viene determinata la posizione preferita per i singoli pesci in condizioni basali. In seguito, ogni animale viene confinato prima nel lato preferito e gli viene somministrato veicolo e poi nel lato non preferito ed esposto alla droga. Il giorno successivo viene eseguito il test di preferenza (Mathur *et al.*, 2011). Inoltre, semplici test permettono la valutazione degli effetti delle droghe anche sull'attività natatoria, come la conta del numero di linee attraversate in un determinato tempo (Gerlai *et al.*, 2000), la misurazione dei centimetri percorsi e della velocità media del nuoto (Anichtchik *et al.*, 2004).

Sono stati valutati gli effetti di numerosi composti psicoattivi sullo *Zebrafish* (Neelkantan *et al.*, 2013). Ad esempio cocaina, amfetamina, morfina e nicotina producono effetti collegati all'ansia e alla ricompensa (Levin *et al.*, 2006). Inoltre, Brennan ha dimostrato che gli *Zebrafish* mostrano variazioni adattative nell'espressione genica in seguito all'esposizione cronica a sostanze

d'abuso. Questi pesci sono un ottimo modello di studio della *drug addiction*: presentano evidenti comportamenti di dipendenza, come la ricerca della sostanza anche in presenza di stimoli avversivi oppure in seguito ad un prolungato periodo di astinenza. Dopo aver individuato i circuiti cerebrali che mediano questo fenomeno (Kelley *et al.*, 2004), il mondo scientifico ha spostato l'attenzione sui fattori genetici che contribuiscono alla predisposizione dell'*addiction*. Negli ultimi anni ha acquisito sempre più importanza l'idea di associare studi genetici e comportamentali sugli *Zebrafish*. Studi di mutagenesi su tutto il genoma consentono l'individuazione di loci genici interessanti che potrebbero mediare il fenome dell'*addiction*. Tali studi di associazione *genome-wide* sull'uomo hanno dimostrato un significativo contributo genetico alla propensione di sviluppare *addiction* in seguito al consumo prolungato di determinate droghe. Recenti studi hanno dimostrato la possibilità di utilizzare *screening* di questo tipo per identificare fattori genetici coinvolti nelle risposte di *reward*. La comprensione dei meccanismi genetici potrebbe portare allo sviluppo di nuove terapie per arginare la vulnerabilità individuale alla dipendenza da droghe.

Ad esempio, sullo *Zebrafish* possono essere indagati gli effetti collaterali di agenti farmacologici, come l'MK-801, antagonista dei recettori NMDA, che ha mostrato effetti negativi sull'attività natatoria e sulla *Place Preference* nello *Zebrafish* (Swain *et al.*, 2004).

Inoltre, attraverso il test della CPP è stato dimostrato che la cocaina, l'amfetamina e gli oppiacei inducono un effetto rinforzante nello *Zebrafish* adulto (Darland *et al.*, 2001; Ninkovic *et al.*, 2006; Bretaud *et al.*, 2007; Cadet, 2009; Webb *et al.*, 2009) paragonabile a quello riscontrato nel topo (Sora *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda la cocaina, lo *Zebrafish* si è dimostrato un ottimo modello per lo studio di fattori genetici ed endocrini sesso-specifici coinvolti nel determinare i sintomi della crisi di astinenza da cocaina (Mathur *et al.*, 2010). Le crisi di astinenza successive ad una prima manifestazione d'euforia sono tipiche dell'effetto della cocaina. Negli *Zebrafish*, queste crisi di astinenza causano uno stato d'ansia che si presenta prima nelle femmine rispetto ai maschi, ma, in questi ultimi, è molto più forte e persistente nel tempo ed è accompagnata dalla diminuzione del numero dei trasportatori dopaminergici con conseguente diminuzione dei livelli di dopamina (Lopez Patino *et al.*, 2008).

Per quanto concerne il *reward* indotto dall'amfetamina, questo può essere ridotto diminuendo l'attività dell'acetilcolina, indicando la piena partecipazione del sistema colinergico nel mediare l'*addiction*. Questi dati sono stati confermati da esperimenti condotti su *Zebrafish* portatori di una mutazione *loss of function* per il gene dell'acetilcolina. I pesci omozigoti per la mutazione avevano scarse probabilità di sopravvivenza, mentre gli eterozigoti presentavano aspetti



fenotipici comparabili con i *wild-type* ma un'acetilcolina meno funzionale. Gli eterozigoti hanno mostrato ridotte risposte di *reward* all'amfetamina senza mostrare *deficit* motori o cognitivi (Ninkovic *et al.*, 2006). Questo risultato indica che l'acetilcolina è un importante *target* per individuare trattamenti contro l'*addiction*, confermando gli *Zebrafish* come un valido modello di studio per la dipendenza da droghe sia da un punto di vista genetico che comportamentale (Ninkovic *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2012). Ninkovic e collaboratori nel 2006 hanno condotto esperimenti di CPP su 1128 linee di *Zebrafish*, ognuna caratterizzata da una determinata mutazione. I risultati hanno identificato 26 mutazioni potenzialmente coinvolte nel determinare le risposte di *reward* all'amfetamina.

Nello *Zebrafish* è stata anche indagata l'attività rinforzante della Salvinorina A, principio attivo isolato dalle foglie della *Salvia Divinorum* e agonista del recettore k-oppiode, mediante il test della CPP. La Salvinorina A (0.2 e 0.5 µg/kg) ha indotto un chiaro effetto rinforzante in termini di incremento del tempo di permanenza nell'ambiente associato alla droga. La dose 0.1 µg/kg non ha prodotto effetti, mentre la dose 80 µg/kg ha indotto avversione. Questo studio ha dimostrato ancora una volta la validità dello *Zebrafish* come modello di studio degli effetti allucinogeni e rinforzanti della Salvinorina A, a basse dosi, in accordo con l'uso ricreazionale della *Salvia Divinorum* nell'uomo (Braida *et al.*, 2007).

Inoltre, lo *Zebrafish* è stato utilizzato anche nello studio dell'*addiction* da morfina (Lau *et al.*, 2006; Cachat *et al.*, 2010). È stato dimostrato che la somministrazione di morfina nello *Zebrafish* durante lo sviluppo, cambia il livello di espressione e la localizzazione dei recettori nocicettivi, indicando che il sistema nocicettivo gioca un ruolo nello sviluppo dell'*addiction* da sostanze d'abuso (Macho Sanchez-Simon *et al.*, 2009).

Utilizzando lo *Zebrafish* per studiare gli effetti dell'etanolo (Lockwood *et al.*, 2004; Gerlai *et al.*, 2009) e della nicotina con il test della CPP, sono stati osservati cambiamenti nell'espressione genica comune ad entrambe le molecole (Kily *et al.*, 2008). I risultati ottenuti con la CPP hanno dimostrato che mentre la preferenza indotta dall'esposizione ad etanolo è stata ridotta dagli stimoli negativi, non si è osservato alcun calo della CPP da nicotina anche dopo l'esposizione a stimoli avversi, quali l'allontanamento dall'acqua per 3 secondi. L'analisi di espressione differenziale ha identificato 128 geni con variazioni simili nell'attività trascrizionale in seguito agli esperimenti di CPP con nicotina o etanolo: questi includevano i geni associati a nove *Gene Ontology* per diversi processi biologici, compresi modificazioni proteiche, ubiquitinazione, trascrizione, traduzione, neurotrasmissione, plasticità sinaptica, trasduzione del segnale, apoptosi cellulare, metabolismo degli steroidi. Molti di questi processi, tra cui la plasticità sinaptica e la neurotrasmissione, sembrano essere coinvolti nelle modifiche a lungo termine associate

all'esposizione a sostanze d'abuso (Nestler, 2001). Queste osservazioni dimostrano la capacità dello *Zebrafish* adulto di produrre alterazioni molecolari mediate dalla nicotina e di esibire comportamenti rappresentanti della tossicodipendenza.

Inoltre, è stato dimostrato che ad elevate concentrazioni l'etanolo influisce sull'attività natatoria (Gerlai *et al.*, 2006). Cachat e collaboratori nel 2010 hanno descritto la sindrome di astinenza da alcool nello *Zebrafish* adulto attraverso il *Novel Tank Diving Test*. Tali studi sulla alcool *addiction* nello *Zebrafish* hanno mostrato forti correlazioni con i risultati dell'abuso di etanolo sull'uomo. In particolare, l'esposizione acuta all'alcool determina significative variazioni nelle concentrazioni di dopamina, serotonina e relativi metaboliti nel cervello dello *Zebrafish* adulto (Chatterjee *et al.*, 2009). Le crisi d'astinenza, dovute alla sospensione della somministrazione di alcool in pesci dipendenti, sono state valutate come numero di eventi di *freezing* e movimenti erratici e correlate alle variazioni della concentrazione di cortisolo (Cachat *et al.*, 2010). La risposta di *camouflage* all'etanolo, regolata fisiologicamente da una grande varietà di neuro peptidi e neurotrasmettitori, è stata usata come parametro per capire gli effetti biologici di questa sostanza d'abuso. E' stato osservato che gli *Zebrafish* con ridotto *camouflage* in risposta all'etanolo presentavano mutazioni nel gene dell'adenilato ciclasi 5 (AC5). Inoltre, la ridotta sensibilità dei mutanti all'etanolo, può essere mimata nello *Zebrafish wild-type* con l'inibizione parziale della fosforilazione dell'*Extracellular Regulated Kinase* (ERK). Questi studi dimostrano un ruolo critico dei geni AC5 e ERK nel regolare la sensibilità all'etanolo. Attualmente la ricerca sta indagando sulla possibilità che mutazioni nei rispettivi geni umani possano favorire la predisposizione individuale all'alcolismo (Mathur *et al.*, 2010).

Recentemente questo animale è stato utilizzato anche per studiare le componenti molecolari e genetiche della dipendenza da nicotina (Kily *et al.*, 2008; Petzold *et al.*, 2009; Klee *et al.*, 2012). Studi recenti su larve di *Zebrafish* hanno focalizzato l'attenzione sull'importanza della componente genetica nel determinare la dipendenza da nicotina. Larve di *Zebrafish* dell'età di quattro giorni mostrano un'incrementata attività motoria in seguito a trattamento con nicotina (2.5-50  $\mu$ M), presentano sensitizzazione in seguito a precedenti esposizioni a quest'alcaloide e questa risposta viene bloccata da antagonisti recettoriali nicotinici (Petzold *et al.*, 2009). Questi studi comportamentali sono stati associati con *screening* genetici condotti tramite la tecnica del *gene-breaking transposon mutagenesis*. Sono emersi due geni interessanti, quello della *Chaperonin Containing Protein 8* (CCT8) e quello della subunità 1 del recettore GABA-B. Questi geni sono al centro di studi traslazionali sull'uomo per identificare le cause genetiche della predisposizione alla dipendenza da nicotina (Mathur *et al.*, 2010).

Diversi gruppi di ricerca si sono occupati anche delle conseguenze dell'esposizione a nicotina

sullo sviluppo embrionale, sull'*addiction*, sull'ansia e sulla memoria (Kedikian *et al.*, 2013). Questi metodi comprendevano l'utilizzo della *green fluorescent protein* per marcare proteine d'interesse e seguirne il destino cellulare in seguito all'esposizione a nicotina. Inoltre sempre su questo modello analisi con *microarray* sono state associate con studi della CPP e di attività natatoria in seguito al trattamento con nicotina, per capire se la prolungata esposizione potesse determinare variazioni nell'espressione genetica (Kily *et al.*, 2008). Queste ricerche sulla dipendenza da tabacco hanno portato all'identificazione di varianti genetiche associate all'*addiction* da nicotina (Li, 2008) e di geni codificanti per proteine molto importanti per i processi neuroadattativi, come il recettore glutamatergico, i recettori per le benzodiazepine e le molecole associate alla plasticità sinaptica (Kily *et al.*, 2009). Inoltre, sono stati identificati tre agenti farmacologici (nicotina, bupropione e vareniclina) che hanno favorito l'astinenza da tabacco in pazienti dipendenti (Burke *et al.*, 2008; Jimenez-Ruiz *et al.*, 2009; Ebbert *et al.*, 2010).

Studi orientati ad ottenere una prolungata astinenza dal consumo di tabacco e studi volti allo sviluppo di nuove terapie contro il tabagismo possono essere condotti utilizzando come modello animale lo *Zebrafish* (Klee *et al.*, 2011; Cousin *et al.*, 2014). Gli *Zebrafish* sono stati anche utilizzati per estendere le conoscenze sui recettori nicotinici e sull'effetto comportamentale della nicotina (Klee *et al.*, 2011).

#### **ZEBRAFISH: EFFETTI ANSIOLITI DELLA NICOTINA**

La nicotina è nota per gli effetti ansiolitici sull'uomo (Spinella, 2005). Alti livelli di stress potrebbero indurre un aumento nel consumo di tabacco (Heishman, 1999). E' stato suggerito che gli effetti ansiolitici della nicotina potrebbero favorire il consumo di tabacco negli adolescenti e rinforzare la dipendenza negli adulti (Byrne, 1995). Gli *Zebrafish* sono in grado di presentare comportamenti ansiosi quando vengono spostati in un nuovo acquario o comunque si instaurano nuove condizioni ambientali (Blaser *et al.*, 2010). Inoltre hanno una risposta cortisolo-mediata allo stress. Questa capacità di manifestare ansia da parte degli *Zebrafish* ha portato alla messa a punto di test comportamentali per valutare la presenza/assenza di ansia, per esempio in seguito alla somministrazione di un farmaco ansiolitico (Levin *et al.*, 2007) e a caratterizzare molecularmente la risposta (Egan *et al.*, 2009).

E' stato dimostrato che l'esposizione alla nicotina riduce i comportamenti ansiosi negli *Zebrafish*. Tali stati d'ansia, per esempio indotti dall'introduzione di una novità nell'ambiente al quale erano abituati i pesci, possono essere riconosciuti tramite alterazioni del comportamento natatorio, come l'aumento del tempo trascorso lungo i margini e minor preferenza per il centro

dell'acquario (Peitsaro *et al.*, 2003). Quando i pesci si abituano al nuovo ambiente, tornano a nuotare regolarmente coprendo l'intero volume a loro disposizione. Queste osservazioni sono servite per ideare il test comportamentale *Novel Tank dive-response* (Levin *et al.*, 2007). Pesci controllo introdotti nel nuovo ambiente (un nuovo acquario test) mostrano una propensione ad occupare unicamente il fondo dell'acquario. L'esposizione acuta a nicotina (100 mg/l per 3 minuti), cinque minuti prima del test, riduce significativamente il tempo trascorso sul fondo del nuovo ambiente al momento dell'immissione (Levin *et al.*, 2007). La cosomministrazione di mecamilamina (antagonista nAChRs), di metillicaconitina (MLA) (antagonista del recettore  $\alpha_7$ ) e di diidroβeritroidina (DHβE) (antagonista del recettore  $\alpha_4\beta_2$ ) determina il blocco dell'effetto ansiolitico. Tali risultati indicano che l'effetto ansiolitico della nicotina è direttamente collegato al *binding* della nicotina ai recettori  $\alpha_7$  e  $\alpha_4\beta_2$  (Levin *et al.*, 2007; Bencan *et al.*, 2008).

### ZEBRAFISH: EFFETTO MNEMONICO DELLA NICOTINA

Diversi studi con modelli animali roditori hanno dimostrato che l'esposizione acuta alla nicotina ha effetti pro-mnemonici che si manifestano con scelte più accurate e minore percentuali di errori in determinati test (Swan *et al.*, 2007). Nei soggetti in crisi d'astinenza da tabacco si sono osservati *deficit* cognitivi seguiti da improvvisi miglioramenti in seguito alla ripresa del consumo (Bell *et al.*, 1999). La capacità della nicotina di migliorare la memoria potrebbe essere una causa del fallimento delle terapie di disintossicazione da tabacco (Klee *et al.*, 2011). L'effetto mnesico della nicotina è bloccato dalla mecamilamina somministrata immediatamente prima (Levin *et al.*, 2006).

Il miglioramento delle capacità cognitive in seguito alla somministrazione di nicotina è dimostrato con l'aumentata concentrazione dell'acido diidrossifenilacetico (DOPAC) nei pesci esposti alla nicotina. Il DOPAC è un metabolita che si forma durante il *reuptake* presinaptico della dopamina. La concentrazione di DOPAC è indice del livello dopaminergico e suggerisce che l'aumento della concentrazione di dopamina, in seguito all'esposizione di nicotina, sia la causa principale dei miglioramenti cognitivi (Eddins *et al.*, 2009).

La nicotina e i suoi agonisti hanno dato prova di migliorare l'attenzione, la memoria e l'apprendimento (Buccafusco *et al.*, 2005). Come per altre sostanze che migliorano le funzioni cognitive, la curva dose-effetto per la nicotina ha un andamento parabolico. Ciò indica che dosi troppo basse o troppe elevate di nicotina determinano una diminuzione della *performance* in specifici test comportamentali (Dunnett *et al.*, 1990). Diversi gruppi di ricerca si sono concentrati sullo studio di agonisti nicotinici per individuare potenziali terapie per malattie cognitive come l'Alzheimer, i *deficit* d'attenzione, l'iperattività e la schizofrenia (Newhouse *et*

*al.*, 2000; Levin *et al.*, 2002). Nel processo di sviluppo di nuovi farmaci, servirsi di un modello alternativo ai mammiferi, per una rapida valutazione del potenziale cognitivo di nuove molecole, è di fondamentale importanza. Lo *Zebrafish* per le sue caratteristiche, è il modello ideale (Levin *et al.*, 2004). Questi pesci infatti sono in grado di apprendere risposte di fuga, mostrano capacità di discriminazione spaziale e cromatica e sono in grado di apprendere e memorizzare numerosi *task* (Blank *et al.*, 2009; Sison *et al.*, 2011; Morin *et al.*, 2013; Braida *et al.*, 2014).

Levin e collaboratori nel 2005 hanno studiato il *timing* d'azione della nicotina sull'apprendimento nello *Zebrafish*. Questi ricercatori hanno dimostrato, mediante il test della *Delayed Spatial Alternation*, che la nicotina induce miglioramenti significativi della memoria del tutto analoghi a quelli osservati nei ratti e nelle scimmie, suggerendo così che gli agonisti nicotinici potessero essere sviluppati come possibile trattamento per l'Alzheimer ed altre malattie cognitive. Dal momento che per valutare il potenziale terapeutico di nuove molecole agoniste del recettore nicotinico, è opportuno avere un riscontro relativamente rapido del miglioramento cognitivo, gli *Zebrafish* si propongono come un ottimo modello animale per questo scopo (Levin *et al.*, 2006). A questo proposito Levin e collaboratori hanno messo a punto un metodo per la valutazione rapida dell'apprendimento nello *Zebrafish* costituito da una sessione di sette *trials*, con la finalità di valutare le capacità di scelta e di discriminazione spaziale. Questo metodo è stato utilizzato per valutare gli effetti cognitivi della nicotina. La nicotina determina un significativo miglioramento delle scelte corrette nel *Rapid Spatial Discrimination Task*. Questo test di discriminazione spaziale valuta le capacità di scelta dello *Zebrafish*, utilizzando un acquario dotato di tre stanze. Alle scelte non corrette segue una punizione, mentre alle scelte corrette un premio. In particolare, l'effetto rinforzante della nicotina si presenta tra i venti e i quaranta minuti dopo la somministrazione, ma non prima, e declina dopo gli ottanta e i centosessanta minuti dal trattamento. L'effetto positivo della nicotina, cioè il miglioramento nell'accuratezza delle scelte, è annullato dall'antagonista nicotinico mecamilamina, unicamente se somministrata cinque minuti prima del test. La somministrazione di mecamilamina contemporaneamente alla nicotina non esercita alcun effetto. Ciò suggerisce che l'attivazione dei nAChR ad alta affinità, bloccati dalla mecamilamina, sia necessaria per consentire l'effetto rinforzante della nicotina. L'azione antagonista della mecamilamina al momento della co-somministrazione potrebbe essere pareggiata dall'attivazione di recettori nicotinici a bassa affinità. La nicotina, somministrata quaranta minuti prima del test, porterebbe alla desensitizzazione dei recettori nicotinici immediatamente dopo la somministrazione. Nell'intervallo di quaranta minuti, cioè tra la somministrazione e l'inizio del test, si assisterebbe alla risensitizzazione, che potrebbe rendere i recettori nicotinici più sensibili alla stimolazione

dei ligandi endogeni, portando al miglioramento delle funzioni cognitive. Pertanto, la mecamilamina, somministrata cinque minuti prima del test, bloccherebbe l'attività dei nAChR risensitizzati, annullando l'effetto rinforzante della nicotina. Con questo studio Levin e collaboratori hanno dimostrato l'effetto rinforzante della nicotina in termini di miglioramento della memorizzazione nello *Zebrafish*, suggerendo l'utilizzo di questo test di memoria per valutare l'effetto di nuovi composti nicotinici volti al trattamento di *deficit* cognitivi, in tempi brevi e nelle prime fasi di più ampi studi sperimentali. Inoltre questi studi propongono un alto grado di similitudine tra i recettori nicotinici dello *Zebrafish* e quelli dei mammiferi (Zirger *et al.*, 2003).

Ciò ci permette di affermare che lo *Zebrafish* risulta un modello valido ed efficiente per lo studio di sostanze d'abuso (Mathur *et al.*, 2010) e per l'identificazione di nuovi *target* in ambito farmacologico e tossicologico.

## RECETTORI NICOTINICI NELLO ZEBRAFISH

Gli *Zebrafish* sono stati utilizzati anche per estendere le conoscenze sui recettori nicotinici (Papke *et al.*, 2012). Numerosi studi sono stati condotti sui nAChRs e sull'effetto comportamentale della nicotina, come riassunto in Tab 2 (Klee *et al.*, 2011). In particolare, lo *Zebrafish* è risultato un valido modello animale per studiare il ruolo preciso di specifici sottotipi neurali dei recettori nicotinici per l'acetilcolina a livello molecolare e genetico, durante il normale processo di sviluppo, e gli effetti della nicotina sullo sviluppo del sistema nervoso dei vertebrati. La nicotina infatti distrugge la differenziazione dei neuroni spinali e altera lo sviluppo degli assoni nell'embrione di *Zebrafish*: i recettori nicotinici mediano questi cambiamenti. Questo ha permesso di caratterizzare l'espressione delle subunità  $\alpha_2$ ,  $\alpha_7$  e  $\beta_3$  dei nAChR nello *Zebrafish* (Zirger *et al.*, 2003) e di clonare e caratterizzare il *pattern* di espressione delle subunità  $\alpha_6$  (*chrna6*) e  $\alpha_4$  (*chrna4*) dei nAChR nello *Zebrafish* (Ackerman *et al.*, 2009). È stato poi osservato che *chrna6* è espresso in particolari neuroni catecolaminergici del mesencefalo, ma è anche presente in cellule non catecolaminergiche del mesencefalo e romboencefalo. L'espressione dell'RNA di *chrna6* in cellule catecolaminergiche, supporta l'uso dello *Zebrafish* come valido modello per capire le basi molecolari della regolazione colinergica del segnale dopaminergico e il ruolo di  $\alpha_6$  nel morbo di Parkinson. Il *chrna4*, invece, si trova espresso soprattutto a livello delle creste neuronali e dei neuroni reticolo spinali del romboencefalo.

È stato dimostrato che i recettori nicotinici  $\alpha_7$  e  $\alpha_4\beta_2$  giocano un importante ruolo nelle funzioni cognitive; entrambi i recettori nicotinici sono coinvolti nell'induzione degli effetti ansiolitici e stimolanti della nicotina nello *Zebrafish* (Bencan *et al.*, 2008). Gli effetti rinforzanti della

nicotina, dovuti all'azione agonista sui nAChRs, determinano variazioni nell'espressione genica a livello neuronale e ciò è alla base della dipendenza da tabacco (Wonnacott *et al.*, 2005).

Argomento	Articoli	Autore	Anno
<i>Addiction</i>	<i>Conditioned Place Preference</i>	Kily <i>et al.</i>	2008
	Test natatori, <i>screening</i> di mutazioni	Petzold <i>et al.</i>	2009
Effetti ansiolitici	Percorso natatorio, localizzazione nell'acquario	Levin <i>et al.</i>	2007
	Risposta all'immersione	Bencan <i>et al.</i>	2008
Funzioni cognitive	Test di discriminazione spaziale	Levin <i>et al.</i>	2004
	Test di scelta a tre camere	Levin <i>et al.</i>	2006
	Test di scelta a tre camere	Eddins <i>et al.</i>	2009
	Test di ansia	CastRo <i>et al.</i>	2009

**Tab B.** Studi che correlano il recettore nicotinico nello *Zebrafish* con differenti test comportamentali

*Scopo della Ricerca*



I numerosi effetti della nicotina e del fumo hanno incoraggiato la ricerca di nuove terapie farmacologiche in grado di ridurre il desiderio di fumare e di aumentare il tasso di successo sul lungo termine.

Tra i vari composti utilizzati per la dipendenza da nicotina, la citisina, agonista dei recettori nicotinici con un'elevata affinità per il sottotipo recettoriale nicotinico  $\alpha_4\beta_2$ , è stata proposta per ridurre i sintomi di astinenza quando si smette di fumare. Nonostante i risultati promettenti negli studi preclinici, alcuni pazienti hanno dovuto interrompere la terapia a causa degli effetti negativi. Attualmente sono stati sintetizzati una serie di derivati e analoghi della citisina, quali potenziali agonisti selettivi per i sottotipi recettoriali nicotinici, di cui però non si conosce ancora l'efficacia. Quindi, il primo scopo del mio dottorato è stato quello di testare alcuni derivati e analoghi della citisina, che in futuro potessero essere impiegati nella terapia per lo *smoking cessation*. Tra questi composti particolare interesse è costituito dal *1,2-bis(citisi-12-yl)ethane* (CC4) e dall'*1,4-bis(citisi-12-yl)-butyne* (CC26), molecole costituite da 2 unità citisiniche connesse tramite una catena polimetilenica di diversa lunghezza. Ci si è proposto innanzitutto di studiare l'effetto della nicotina, della citisina e dei suoi agonisti parziali (citisina e vareniclina) nell'indurre un effetto di *reward*, utilizzando il test della *Conditioned Place Preference* (CPP), che consiste nell'associare differenti dosi della sostanza in esame o il rispettivo veicolo a due ambienti diversi per caratteristiche visive. Il tempo speso dall'animale in ciascun ambiente, riflette l'avvenuto condizionamento o avversione.

Il modello animale utilizzato è stato quello dello *Zebrafish*, piccolo pesce teleosteo adatto per lo *screening* veloce di nuovi composti, che negli ultimi anni è stato adottato per lo studio delle alterazioni indotte dalle sostanze d'abuso. Per verificare su quali sottotipi recettoriali agisse la nicotina nell'indurre gli effetti di *reward* nello *Zebrafish*, sono stati utilizzati differenti antagonisti nicotinici,  *$\alpha$ -conotoxin MII* (MII), *methyllycaconitine* (MLA) e *dihydro- $\beta$ -erythroidine* (Dh $\beta$ E) selettivi rispettivamente per i sottotipi  $\alpha_6\beta_2$ ,  $\alpha_7$  e  $\beta_2$ . Identificati i sottotipi recettoriali nicotinici coinvolti nei processi di *addiction* dello *Zebrafish*, è stata testata l'efficacia dei nuovi derivati della citisina (CC4 e CC26), in comparazione agli agonisti parziali (citisina e vareniclina) e ad un antagonista nicotinico non selettivo (mecamilamina), nel ridurre gli effetti rinforzanti della nicotina utilizzando sempre il test della CPP.

Infine, per escludere che le sostanze utilizzate influissero sull'attività motoria, è stata monitorata la capacità natatoria spontanea degli animali nell'arco di 30 minuti, mediante la conta delle linee attraversate in una vaschetta di *Plexiglas*, in seguito alla somministrazione delle sostanze in esame. Successivamente, in collaborazione con il laboratorio della Dott.ssa Gotti, si è stabilito di

caratterizzare farmacologicamente i sottotipi recettoriali nicotinici presenti nel cervello dello *Zebrafish* e di quantificare la concentrazione di nicotina presente sia a livello cerebrale che periferico in seguito a somministrazione di dosi crescenti di quest'alcaloide. In particolare per la caratterizzazione recettoriale si sono utilizzati ligandi selettivi per i diversi sottotipi recettoriali ( $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$ ) per i quali si è valutata la costante di inibizione. Si sono così utilizzati differenti composti: agonisti pieni (nicotina), parziali (citisina, CC4 e CC26) o antagonisti di diversi sottotipi recettoriali per calcolarne l'affinità.

Il secondo obiettivo è stato quello di testare il CC4 anche nel ratto, per verificare se anche in questo modello animale fosse efficace nel contrastare il *reward* da nicotina. A tale scopo, l'effetto rinforzante della nicotina, della citisina e del CC4 è stato testato utilizzando due metodiche: il test della CPP e quello dell'*Intracerebroventricular Self Administration* (ICSA). La CPP nel ratto si basa sullo stesso principio di quella effettuata nello *Zebrafish*; l'ICSA consente invece all'animale di scegliere se somministrarsi la sostanza in esame o il veicolo mediante pressione di 2 leve. Dopo aver verificato le proprietà rinforzanti della nicotina ed indagato se i derivati della citisina avessero anche loro proprietà di *reward*, utilizzando queste due metodiche, si è voluto verificare se anche nel ratto il pretrattamento con CC4 fosse in grado di diminuire il tempo speso nel compartimento della CPP associato alla nicotina e di ridurre il numero di battute della leva associate all'alcaloide.

Infine per verificare che le sostanze utilizzate, anche nel ratto, non influissero sull'attività motoria, si è stabilito di monitorare la capacità motoria spontanea nell'arco di 30 minuti, rilevando il numero di movimenti orizzontali e verticali eseguiti in un'*activity cage* automatizzata.

Tuttavia, la nicotina è stata somministrata mediante una via che non mimava l'assunzione dell'uomo dove, oltretutto, la dipendenza non è data solo dalla nicotina ma dall'insieme di quasi 4.000 sostanze che costituiscono il fumo di sigaretta.

Recentemente è stato introdotto sul mercato un nuovo dispositivo elettronico con lo scopo di imitare il sistema di inalazione della nicotina con la sigaretta tradizionale, evitando gli effetti dannosi derivanti dalla combustione del tabacco: la sigaretta elettronica. Al giorno d'oggi mancano tuttavia studi a lungo termine circa gli effetti del suo utilizzo e risulta di primaria importanza effettuare una caratterizzazione degli effetti che questi dispositivi possono portare. Inoltre, le metodiche presenti oggi in letteratura non mimano la via di assunzione usata dall'uomo, risultano invasive, rendono i risultati ottenuti poco sovrapponibili a quelli umani e non consentono di studiare le differenze date dall'assunzione del fumo delle sigarette tradizionali

rispetto al vapore delle sigarette elettroniche.

Per questo motivo, terzo obiettivo è stato quello di validare un nuovo modello murino che prevedesse l'assunzione di nicotina attraverso il fumo di sigaretta tradizionale o il vapore della sigaretta elettronica, mimando il più possibile l'assunzione umana. Ci si è proposti anche di caratterizzare tale modello sia da un punto di vista comportamentale che biochimico, studiando gli effetti a breve e a lungo termine dell'esposizione. A questo scopo si è stabilito di sottoporre topi maschi del ceppo Balb/c a 7 settimane di esposizione al fumo di 7 sigarette o al vapore della sigaretta elettronica, contenente lo stesso quantitativo di nicotina delle sigarette tradizionali (5.6 mg), per 3 volte al dì, per 5 giorni a settimana, mediante un ventilatore meccanico in grado di saturare l'ambiente in cui venivano posti i topi; parallelamente, altri animali sono stati esposti ad aria semplice mediante lo stesso tipo di apparecchiatura (gruppo controllo). Settimanalmente, durante il periodo di esposizione, è stato inoltre monitorato il peso corporeo e il consumo di cibo. Al fine di verificare e monitorare la quantità di nicotina aspirata e metabolizzata, in collaborazione con l'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, dopo 1, 4 e 7 settimane di esposizione si è stabilito di registrare i livelli di cotinina, principale metabolita della nicotina, presenti nelle urine degli animali. Per quanto riguarda gli studi biochimici, alla fine delle 7 settimane di esposizione, in collaborazione con il laboratorio della Dott.ssa Gotti, sono stati misurati i livelli di nicotina e di cotinina presenti nel cervello degli animali esposti al fumo della sigaretta tradizionale, al vapore della sigaretta elettronica o ad aria.

Immediatamente al termine del periodo di esposizione, un primo gruppo di animali è stato osservato per la comparsa di sintomi/segni astinenziali precipitati da mecamilamina (1 mg/kg s.c.), mentre in un secondo, sempre in seguito alla somministrazione dell'antagonista nicotinico, è stata monitorata l'attività motoria in un'*activity cage* automatizzata. Dal momento che studi in letteratura ci indicano che le proprietà rinforzanti della nicotina sono primariamente dovute ad un'aumentata neurotrasmissione via nAChRs nel *pathway* dopaminergico mesolimbico, ci si è proposti di eseguire studi di *binding* e di immunoprecipitazione. In particolar modo si è voluto verificare se ci fosse o meno un'alterazione del numero dei recettori nicotinici, soprattutto di quello del sottotipo recettoriale  $\alpha_4\beta_2$  maggiormente coinvolto nel processo di *addiction*.

Successivamente, da 24 ore a 90 giorni di astinenza dopo la sospensione dell'esposizione a fumo di sigaretta tradizionale o vapore della sigaretta elettronica, i topi, suddivisi in differenti gruppi sono stati monitorati per differenti test comportamentali: l'attività motoria spontanea mediante un'*activity cage* automatizzata; la memoria spaziale mediante lo *spatial object recognition test*;

la comparsa di uno stato ansioso mediante l'*elevated plus maze test* e il *marble burying test* e lo sviluppo di uno stato depressivo tramite il *tail suspension test* e il *sucrose preference test*.

# *Materiali e Metodi*

# Animali

## Zebrafish



Sono stati utilizzati Zebrafish (*Danio Rerio*) adulti *wild type* (WT), sia maschi che femmine (50-50%), di circa 6-12 mesi di età, del peso medio di 0.4-1 g. Gli Zebrafish, acquistati presso l'Acquarium Center di Milano, avevano un *background* genetico eterogeneo. Il sesso di ciascun pesce è stato identificato secondo la metodica descritta da Streisinger del 2000).

Gli animali sono stati mantenuti in un acquario (42x26x30 cm) nel quale la temperatura dell'acqua è stata mantenuta a circa 28.5 °C con un ciclo di 14 ore di luce e 10 ore di buio, con una costante areazione e filtrazione. Ogni acquario ospitava gruppi di circa 20 animali. L'acqua utilizzata per gli acquari è una miscela di acqua deionizzata e sale di mare (*Instant Ocean, Aquarium System, Sarrebourg, Francia*) nel rapporto 0.6 g ogni 10 litri di acqua.

I pesci sono stati nutriti giornalmente (1 volta al dì) con cibo per pesci in scaglie (*Tropical fish food, Consorzio G5, Italia*).

I test comportamentali hanno avuto luogo durante la fase di luce tra le 9:00 del mattino e le 14:00. I pesci *drug naive*, una volta trattati, non sono stati riutilizzati. Sono stati utilizzati 10 pesci per ciascun gruppo sperimentale.

## Ratti

Sono stati utilizzati ratti maschi *Wistar* (*Charles River, Calco, Italia*), del peso medio di 200-250 g. Al loro arrivo, gli animali sono stati divisi in gruppi e stabulati in condizioni ambientali e dietetiche *standard* (temperatura 22°C ± 2°C; umidità 50% ± 5%; illuminazione artificiale 12 ore di luce/ 12 ore di buio; acqua e cibo *ad libitum*).

Tutti gli esperimenti comportamentali sono stati condotti tra le 8:00 e le 16:00.

Sono stati utilizzati 10 ratti per ciascun gruppo.



## Topi

Sono stati utilizzati topi maschi del ceppo Balb/c (*Charles River, Calco, Italia*) di 9 settimane di età. Al loro arrivo, gli animali sono stati divisi in gruppi e stabulati in



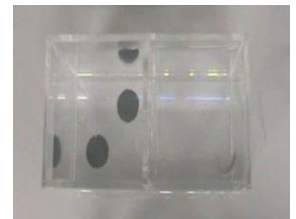
condizioni ambientali e dietetiche *standard* (temperatura  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; umidità  $50\% \pm 5\%$ ; illuminazione artificiale 12 ore di luce/ 12 ore di buio; acqua e cibo *ad libitum*).

## **Studi condotti nello Zebrafish**

### **Conditioned Place Preference (CPP)**

#### APPARECCHIATURA

Per il test della CPP è stata utilizzata una vaschetta in *plexiglas* delle dimensioni di 20x10x15 cm contenente 3 litri di acqua deionizzata e sali marini, come mostrato nella figura accanto, dotata di due diversi separatori in *plexiglas*: uno perforato, in modo da consentire il libero passaggio dell'animale, ed uno nero che non offre la possibilità di passaggio da un ambiente all'altro, allo scopo di isolare l'animale nel compartimento desiderato. I separatori suddividono la vaschetta in due compartimenti che hanno dimensione uguale (10x10x15 cm), ma contengono differenti stimoli visivi (due *pois* neri – diametro: 2.8 cm – applicati sul fondo del compartimento di sinistra (Braida *et al.*, 2007), come mostrato nella figura accanto.



#### PROCEDURA

La durata complessiva dell'esperimento è di 2 giorni ed ogni giorno il *test* è stato svolto alla stessa ora. L'esperimento viene condotto in tre fasi successive.

#### FASE DI PRE-CONDIZIONAMENTO

Nella prima fase (pre-condizionamento) è consentito a ciascun pesce, dopo essere stato pesato, di esplorare liberamente entrambi i compartimenti (il 50% degli animali è stato posto nel compartimento di destra e il rimanente 50% nel compartimento di sinistra), resi accessibili dalla presenza della parete divisoria dotata di aperture.

Il tempo trascorso in ciascun ambiente viene registrato per 15 minuti (PRE); è stata così valutata la percentuale di tempo trascorso dall'animale nei due compartimenti per determinare un'eventuale preferenza incondizionata. I pesci che hanno mostrato un comportamento anomalo, come ad esempio un eccessivo o uno scarso movimento, oppure una preferenza per uno dei due

compartimenti superiore al 70%, sono stati scartati dall'esperimento.

Ogni pesce è stato poi alloggiato singolarmente in vaschette numerate (8x9x10 cm) poste all'interno dell'acquario.

## FASE DI CONDIZIONAMENTO

Nella seconda fase (condizionamento) l'animale viene trattato per via i.m. con il veicolo e posto nel compartimento preferito senza libertà di passaggio per 30 minuti. Il giorno successivo, allo scopo di verificare eventuali proprietà di rinforzo della sostanza in esame, il pesce viene trattato per via i.m. con la sostanza e viene posto nel compartimento meno preferito senza libertà di passaggio per 30 minuti. Il gruppo di animali controllo ricevono sempre il veicolo per via i.m. in entrambe le somministrazioni.

## FASE DI POST CONDIZIONAMENTO

Nella terza fase è stato permesso all'animale, senza alcun trattamento, libero accesso ad entrambi i compartimenti per 15 minuti ed è stato cronometrato il tempo speso dal pesce in ogni compartimento (POST). La differenza di tempo, ottenuta sottraendo il tempo trascorso nel compartimento meno preferito durante la fase di pre-condizionamento dal tempo passato nello stesso compartimento durante la fase di post-condizionamento ( $\Delta$ ), riflette la proprietà rinforzante ( $\Delta$  positivo) o avversiva ( $\Delta$  negativo) della sostanza in esame.

# Comportamento natatorio

## APPARECCHIATURA

Per la valutazione del comportamento natatorio è stata utilizzata una vaschetta in *plexiglas* delle dimensioni di 20x10x15 cm contenente 3 litri di acqua deionizzata e sali marini. Il fondo della vaschetta è stato suddiviso in 10 rettangoli uguali di 2x10 cm tramite l'utilizzo di un foglio stampato posto sotto la vaschetta (Swain *et al.*, 2004), come mostrato nella figura accanto.





## PROCEDURA

Immediatamente dopo il trattamento ogni soggetto è stato singolarmente alloggiato nella vaschetta in *plexiglas*. L'attività natatoria è stata monitorata contando il numero di linee attraversate dall'animale in un intervallo di 30 secondi; tale procedura è stata ripetuta ogni 5 minuti, per un totale di 6 osservazioni nell'arco di 30 minuti (Swain *et al.*, 2004).

## Trattamento

Il trattamento è stato eseguito eseguito per via intramuscolare (i.m.). A tal fine è stato innanzitutto misurato il peso dei pesci secondo Novak (2005). L'animale è stato rimosso dall'acquario utilizzando un retino, quindi momentaneamente tenuto a secco in una garza e poi messo in un *becker*, contenente una quantità nota d'acqua dell'acquario e posizionato su una bilancia digitale. Il peso del pesce è stato calcolato sottraendo dal peso del *becker* + pesce il peso del solo *becker* contenente acqua.

I pesci sono stati trattati mediante iniezione per via i.m. nel muscolo caudale con un volume pari a 2  $\mu\text{l/g}$  di animale, mediante una siringa *Hamilton* da 10  $\mu\text{l}$  (*Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Svizzera*), tenendo l'ago con una angolazione di 45°.

Gli animali sono stati suddivisi per i vari trattamenti a *random* in gruppi sperimentali di 10 pesci ciascuno.

## Studi di *binding* e di farmacologia sul cervello di *Zebrafish*

### ESTRAZIONE DEL CERVELLO DA ZEBRAFISH

L'estrazione del cervello da *zebrafish* è stata eseguita in accordo con la metodica proposta da Gupta e collaboratori (2010). Ogni animale è stato previamente anestetizzato con tricaina 0.2% (*Sigma Aldrich, St Louis, USA*) (2  $\mu\text{l/g/i.m.}$ ) e sacrificato mediante incubazione in ghiaccio per 15 minuti. Successivamente il pesce è stato appoggiato su carta assorbente e disposto sul supporto di dissezione. È stata isolata la regione cefalica dell'animale incidendo, mediante bisturi, a livello dell'attaccatura delle pinne anteriori. Mediante due pinzette chirurgiche sono stati rimossi tutti i tessuti molli a partire dalla superficie ventrale del cranio. Sono stati rimossi gli occhi mediante forbicine chirurgiche. In seguito è stato aperto il cranio ed è stato rimosso l'osso dalla parte ventrale del cervello. La porzione cefalica è stata trasferita in una capsula *petri*

contenente PBS 10% (*Sigma Aldrich, St Louis, USA*) e sono state rimosse le ossa del cranio dalla parte dorsale del cervello.

## PREPARAZIONE DELLE MEMBRANE DA TESSUTI NEURONALI

I cervelli sono stati prelevati da *Zebrafish* adulti, immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Non si sono riscontrate differenze in termini di legame dei ligandi radioattivi tra il tessuto fresco e congelato.

I cervelli sono stati prima omogeneizzati in un tampone contenente 50 mM NaP, 120 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7, con omogeneizzatore manuale, centrifugati per 60 minuti a 15.000 rpm e quindi risospesi nello stesso tampone in presenza di inibitori delle proteasi (bestatina, pepstatina, leupeptina e aprotinina) alla concentrazione di 10  $\mu\text{g/ml}$ .

## CURVE DI SATURAZIONE

### a) [ $^3\text{H}$ ]-EPIBATIDINA (Epi)

Per determinare la costante di dissociazione ( $K_d$ ) del legame dei ligandi radioattivi alle membrane ottenute dallo *Zebrafish* sono stati compiuti esperimenti di *binding* alle membrane. Aliquote da 100  $\mu\text{l}$  di membrane, diluite in tampone citisina, sono state incubate con concentrazioni comprese tra 25 pM e 10 nM di [ $^3\text{H}$ ]-Epibatidina a  $4^{\circ}\text{C}$  per tutta la notte (O/N). Studi precedenti compiuti nel laboratorio della Dott.ssa Gotti avevano determinato che la [ $^3\text{H}$ ]-Epibatidina, oltre a legare con alta affinità i recettori eteromericici, lega anche i recettori omomericici contenenti la subunità  $\alpha_7$ . Per impedire che i sottotipi contenenti la subunità  $\alpha_7$  contribuissero al *binding* della [ $^3\text{H}$ ]-Epibatidina, tutti gli esperimenti di *binding* sono stati condotti su campioni di membrane preincubati per 3 ore con  $\alpha$ -bungarotossina  $1\mu\text{M}$ . Accanto al *binding* totale, ottenuto mediante incubazione di un volume costante di membrane con concentrazioni crescenti di [ $^3\text{H}$ ]-Epibatidina, è stato determinato il *binding* aspecifico incubando, nelle stesse condizioni, le membrane con Epibatidina non radioattiva alla concentrazione di 100 nM. Le membrane sono state poi separate su filtri GFC (*Whatman*), lavate con il tampone *wash buffer* (50 mM Na~P, pH 7.4) e la radioattività contata al  $\beta$ -contatore con 5 ml di liquido di scintillazione *Filter-count* (*Packard*).

Il legame specifico è stato determinato per sottrazione del legame aspecifico dal legame totale.

b) [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ BUNGAROTOSSINA ([<sup>125</sup>I]- $\alpha$ BgTx)

Per determinare la costante di dissociazione (Kd) del legame della [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ bungarotossina alle membrane ottenute dallo *Zebrafish*, gli esperimenti di *binding* alle membrane sono stati compiuti su aliquote da 85  $\mu$ l di membrane, diluite in tampone citisina e incubate per tutta la notte (O/N) a 4°C con concentrazioni comprese tra 100 pM e 10 nM di [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ bungarotossina. Parallelamente è stato determinato il *binding* aspecifico incubando, nelle stesse condizioni, le membrane con  $\alpha$ -bungarotossina non radioattiva alla concentrazione di 1  $\mu$ M, in presenza della stessa concentrazione di [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ bungarotossina. Le membrane sono state poi separate con la metodica di filtrazione su filtri GFC, lavate con il tampone *wash buffer* e la radioattività contata al  $\gamma$ -contatore con 5 ml di liquido di scintillazione *Filter-count*.

Anche in questo caso il legame specifico è stato determinato per sottrazione del legame aspecifico dal legame totale.

## CURVE DI COMPETIZIONE

Per determinare la costante di affinità dei diversi farmaci nicotinici alle due classi di recettori presenti nelle membrane di *Zebrafish*, sono stati eseguiti esperimenti di *binding* alle membrane utilizzando una concentrazione fissa di 0.25 nM [<sup>3</sup>H]-Epibatidina (nel caso dei recettori eteromerici) e di 1 nM [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ bungarotossina (nel caso dei recettori contenenti la subunità  $\alpha_7$ ) e concentrazioni crescenti di farmaci in studio in un *range* compreso tra 0.01 nM e 10 mM. Le membrane sono state poi separate con la metodica di filtrazione su filtri GFC e la radioattività contata al  $\beta$ -contatore con 5 ml di liquido di scintillazione per il legame della [<sup>3</sup>H]-Epibatidina o direttamente nel  $\gamma$ -contatore nel caso della [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ bungarotossina.

I dati sperimentali ottenuti dagli esperimenti di legame (sia curve da saturazione che da curve di competizione) sono stati analizzati per mezzo di un programma *LIGAND* come descritto da Munson e Rodbard nel 1980.

I parametri di legame sono ottenuti dal *fitting* di tre esperimenti indipendenti (sei curve, tre omologhe e tre eterologhe). Il valore di legame è espresso come parte del recettore legato sul totale del ligando (B/T) contro il logaritmo della concentrazione totale. La concentrazione totale è data dalla somma del ligando “freddo” e quello radioattivo.

## VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI NICOTINA NEL CERVELLO E NEI TESSUTI PERIFERICI DELLO *ZEBRAFISH*

20 minuti dopo l'iniezione i.m. di nicotina 0.001, 0.01 o 0.1 mg/kg, gli *Zebrafish* sono stati sacrificati ed è stato prelevato il cervello e i reni e il fegato. Tali tessuti sono stati omogeneizzati in acqua deionizzata (2 ml/g) e trattati secondo il protocollo standard per l'immunoprecipitazione. Brevemente, l'omogenato è stato diluito 1:4 in acetonitrile e centrifugato a 10.000 rpm per 10 min a 4°C. Il surnatante è stato fatto evaporare, ricostituito in 10 mM di acetato di ammonio e analizzato utilizzando la cromatografia liquida – spettrometria di massa *tandem*.

I livelli di nicotina sono stati determinati mediante cromatografia liquida – spettrometria di massa *tandem* (LC-MS/MS) (Vieira-Brock *et al.*, 2011). La cromatografia liquida è stata effettuata utilizzando un sistema HP 1200 costituito da una pompa binaria, un campionatore automatico e una colonna (Agilent Technologies, Germany) dotato di una colonna *Discovery HS - F5* (150 mm × 2,1 millimetri, 3 micron) (Supelco, Milano, Italia). La temperatura della colonna è stata mantenuta a 25°C. La fase mobile è costituita da 10 mM di acetato di ammonio e acetonitrile. Le diluizioni sono state le seguenti: da 5% a 95% di acetonitrile (0-10 min), 95% di acetonitrile (10-13 min), da 95% a 5% di acetonitrile (13-13.1 min) con una portata di 0.3 ml/min. I parametri di base dello spettrometria di massa sono stati i seguenti: temperatura del gas: 350°C, flusso: 12 l/min, pressione del gas nebulizzato: 35 psi e tensione capillare: 3,500 V. Il tempo di ritenzione della nicotina è stato di 5.8 min.

### *Studi condotti nel ratto*

#### *Conditioned Place Preference (CPP)*

##### APPARECCHIATURA

E' stata utilizzata una *shuttle-box* modificata, costituita da una scatola in *plexiglas* delle dimensioni di 80x25x36 cm suddivisa in due compartimenti di identiche dimensioni separati da una porta a ghigliottina in grado di isolare, se chiusa, l'animale nel compartimento desiderato, non offrendo possibilità di passaggio da un ambiente all'altro, come mostrato nella



figura accanto. Nelle fasi di pre-condizionamento e di post-condizionamento la porta rimane aperta per consentire all'animale la libertà di esplorazione di entrambi gli ambienti.

I due compartimenti differiscono sia per quanto riguarda gli stimoli visivi che quelli tattili. Un compartimento presenta pareti a righe orizzontali marroni e bianche e pavimento liscio, l'altro pareti marroni con *pois* bianchi e pavimento ruvido; ogni lato della parete divisoria presenta lo stesso tema del compartimento verso cui è rivolto.

L'intera apparecchiatura è alloggiata in una piccola stanza la cui porta rimane chiusa in modo che l'animale non venga disturbato da rumori o luci provenienti dall'esterno.

## PROCEDURA

L'esperimento viene condotto in tre fasi successive.

### FASE DI PRE-CONDIZIONAMENTO

In questa prima fase ciascun animale è stato posto all'interno della *shuttle-box* (il 50% degli animali è stato posto nel compartimento di destra ed il rimanente 50% nel compartimento di sinistra) con libero accesso ad entrambi i compartimenti per 15 minuti. E' stato cronometrato il tempo speso dall'animale in ogni compartimento.

Generalmente l'animale, in questa fase, non sembra mostrare una significativa preferenza per nessuno dei due ambienti. Gli animali che mostrano una preferenza superiore al 70% per uno dei due compartimenti vengono scartati dall'esperimento.

### FASE DI CONDIZIONAMENTO

La fase di condizionamento comprende una sessione al giorno da 30 minuti, per 8 giorni. Un gruppo di animali ha ricevuto, a giorni alterni, la sostanza in esame oppure il veicolo ed è stato confinato per 30 minuti in uno dei due compartimenti. Per convenzione il compartimento associato alla droga è quello che l'animale ha dimostrato sfavorire, in modo non significativo, durante la fase di pre-condizionamento.

Un altro gruppo di animali ha invece ricevuto il veicolo per tutti gli 8 giorni del test. Per gli studi di antagonismo ulteriori gruppi di animali hanno ricevuto un'ulteriore iniezione prima del trattamento con la sostanza in esame o il veicolo.

## FASE DI POST-CONDIZIONAMENTO

24 ore dopo la fase di condizionamento è stato eseguito il test di preferenza, dove l'animale non ha ricevuto alcun trattamento. Ogni animale è stato posto nella *shuttle-box* con libertà di passaggio da un compartimento all'altro, esattamente come è avvenuto nella fase di pre-condizionamento, per un tempo di 15 minuti. Si è registrato quindi il tempo speso dall'animale in ogni compartimento.

I risultati sono espressi come differenza ( $\Delta$ ) del tempo trascorso nell'ambiente associato alla droga durante il test e quello durante la fase di pre-condizionamento.

## *Intracerebroventricular Self Administration* (ICSA)

### APPARECCHIATURA: GABBIA DI SKINNER

Gli esperimenti sono stati condotti in una gabbia di *Skinner*, come mostrato nella figura accanto, nella quale viene posto l'animale per il condizionamento all'attività operante. Tale gabbia è strutturata in modo da permettere una facile osservazione del comportamento, rendere agevoli le operazioni di immissione o prelievo dell'animale, consentire una normale areazione e permettere all'animale di muoversi liberamente al suo interno sia orizzontalmente che verticalmente.



La gabbia di *Skinner* è cubica, con lato di 31 cm; è dotata di due pareti frontali trasparenti in plexiglas, due pareti laterali ed un soffitto in metallo, un pavimento ad asticchie metalliche ed una lampada che illumina indirettamente la gabbia. All'interno della gabbia sono posizionati inoltre:

- due abbeveratoi dotati di illuminazione propria
- due leve metalliche.

Le leve rappresentano l'interruttore del sistema. Infatti una lieve pressione da parte dell'animale (attività operante) causa l'accensione della luce propria dell'abbeveratoio e l'azionamento del dispositivo automatico di abbeveraggio che rende disponibile 0.1 ml di liquido all'animale in un tempo di 8 secondi. Ogni leva è in grado di azionare il dispositivo di abbeverazione solo dal suo corrispettivo abbeveratoio.

Per evitare qualsiasi disturbo esterno (luce, rumori), la gabbia è inoltre alloggiata in un *box* di isolamento acustico (58x40x38 cm) fornito di spioncino per permettere allo sperimentatore di osservare l'attività dell'animale all'interno della stessa.

Un microprocessore capace di acquisire i dati da sei canali indipendenti (*Basilink Data Acquisition System*, Basile, Italia), munito di stampante a carta termica, registra l'attività dell'animale (n° battute totali, n° battute su singola leva/tempo).

Tutta l'apparecchiatura è dotata di un pannello di controllo (*Colbourn Instrument*, Basile, Italia), componibile con diversi tipi di accessori (*timer*, contatori, etc), che permette la regolazione di tutti i circuiti del sistema ed in particolare l'impostazione del periodo di inattività della leva tra una battuta e l'altra (8 secondi), l'attivazione o disattivazione del rinforzo liquido, l'accensione o lo spegnimento di uno stimolo luminoso.

## PROCEDURA

### MODELLAMENTO

Gli animali, precedentemente posti a digiuno di acqua, sono stati sottoposti ad alcune sedute di modellamento in gabbia di *Skinner* ai fini di acquisire la capacità di premere le leve e di associare la pressione della leva all'erogazione di acqua dal corrispettivo abbeveratoio. Il numero di sedute di modellamento necessarie varia intorno ad una media di 3 sedute alla frequenza di 1 seduta da 30 minuti al giorno fino al raggiungimento dell'obiettivo.

Il ratto è stato introdotto nella gabbia senza che venga chiuso il portellone insonorizzante in modo che esso sia completamente visibile allo sperimentatore. Il modellamento, che si compie al buio mentre nella gabbia rimane accesa la luce ambientale, consiste nel far apprendere all'animale che esiste la possibilità di bere premendo le leve presenti all'interno; per fare questo è indispensabile privare di acqua l'animale per un certo periodo di tempo (23 ore) in modo da spingerlo a compiere il lavoro richiesto.

Lo sperimentatore partecipa attivamente al processo di modellamento essendo in grado di azionare esternamente i dispositivi automatici di abbeverazione e di spingere l'animale nella giusta direzione per il raggiungimento dello scopo. Sono necessari vari passaggi fino alla totale acquisizione delle capacità. Innanzitutto vengono rinforzate le risposte che si avvicinano alla richiesta, ma vengono fatte estinguere quelle non compatibili con essa. Le risposte che devono essere rinforzate sono in progressione: l'osservazione della leva, l'annusamento, la progressiva pressione con la zampa.

Il modellamento deve essere:

- progressivo: ogni risposta successivamente rinforzata deve avvicinarsi sempre più a quella definitiva

- irreversibile: non si deve gratificare una risposta poco simile a quella richiesta dopo che l'animale ne ha già emessa un'altra più simile.

E' inoltre importante:

- rinforzare immediatamente il comportamento ad ogni fase del modellamento in quanto il ritardare la presentazione del rinforzo può aumentare i dubbi dell'animale allontanandolo dalla risposta voluta;

- non concedere né troppi né troppo pochi rinforzi ad una risposta approssimativa rispetto a quella finale desiderata;

- rinforzare solo le risposte che si avvicinano in modo specifico a quella finale voluta.

## ALLENAMENTO

Gli animali sono stati allenati in sessioni quotidiane della durata di 1 ora ciascuna con un programma di rinforzo continuo (CRF), per mezzo del quale ad ogni battuta corrispondeva un rinforzo (acqua).

Nella fase di allenamento l'animale è stato posto nella gabbia con il portellone insonorizzato chiuso e lo sperimentatore diviene parte passiva.

Al termine del test, il ratto, viene riportato nel suo alloggio in stabulario e gli viene lasciato libero accesso ad un dispensatore di acqua per 30 minuti.

I risultati ottenuti durante l'allenamento giornaliero sono stati registrati e quando gli animali hanno raggiunto una stabilità di battute, gli è stato impiantato, sotto anestesia, il connettore a due cannule per la somministrazione icv.

## OPERAZIONE CHIRURGICA

L'animale viene anestetizzato con Cloralio Idrato (*Sigma Aldrich, St Louis, USA*), iniettato per via intraperitoneale (i.p.) alla dose 450 mg/kg in un volume finale di 9 ml/kg.

A questo punto, dopo aver accuratamente depilato la zona, si incide con il bisturi la cute del cranio dell'animale sulla linea mediana per circa 1 cm, in modo da scoprire l'area intorno al bregma; si raschia il periostio sottostante e si asciuga l'osso con del cotone. Quindi si procede alla perforazione del cranio con un trapano elettrico in due punti ubicati 1.8 mm posteriormente e 1.5 mm lateralmente a sinistra e a destra rispetto al punto di incontro tra la sutura coronale e quella sagittale in accordo con le coordinate indicate nell'atlante stereotassico di Paxinos e



Watson (1998). I fori così realizzati si trovano in corrispondenza dei ventricoli laterali. Vengono eseguiti altri 3 fori, due anteriormente e uno posteriormente, che vengono immediatamente richiusi con delle piccole viti lasciate in parte sporgenti al di sopra della teca. Una volta inserito l'impianto icv, facendo coincidere ai due fori le due cannule, si versa una resina autopolimerizzante che solidificandosi si fissa al cranio attraverso le viti e a sua volta fissa il castelletto. La ferita viene quindi ricucita utilizzando del filo da sutura.

Si iniettano poi in ciascuna cannula, con una siringa da 10  $\mu$ l (tipo *Hamilton*), 5  $\mu$ l di liquido cefalorachidiano per verificare la pervietà e per riparare alla perdita del liquido cerebrale. Successivamente all'operazione, l'animale trascorre sette giorni di convalescenza, dove oltre alla medicazione della zona gli vengono somministrati quotidianamente 50 mg/kg di *Ceftriaxone* (*Sigma Aldrich, St Louis, USA*), sciolto in soluzione fisiologica 0.9% per via intraperitoneale (i.p.) nel volume di 5 ml/kg.

Per controllare l'esatto posizionamento delle cannule, il giorno precedente l'esperimento, vengono iniettati attraverso le cannule stesse 3  $\mu$ l di una soluzione di angiotensina II (1  $\mu$ g/ratto), noto dipsogeno in grado di provocare se iniettato direttamente in ventricolo una immediata assunzione di acqua da parte dell'animale. Per lo stesso motivo, al termine dell'esperimento, vengono iniettati attraverso le cannule 10  $\mu$ l di *Evans blue* (*Merck*) e l'animale viene immediatamente sacrificato; in seguito al prelievo dell'encefalo, un'analisi macroscopica permette di valutare l'esatto posizionamento delle cannule grazie alla sola colorazione dell'area dei ventricoli laterali e conferma la veridicità dei risultati ottenuti.

## AUTOSOMMINISTRAZIONE

Successivamente al periodo di convalescenza si è proceduto all'autosomministrazione icv dei composti da testare. Questa è stata resa possibile grazie al collegamento di ogni leva alla corrispettiva pompa di infusione (Basile, Comerio, Italia) e della pompa di infusione all'impianto dell'animale.

Le due pompe, una per leva, poste esternamente alla gabbia sono in grado di erogare, se azionate, 2  $\mu$ l di liquido nell'arco di 8 secondi. Ogni pompa è collegata ad un connettore rotante posto sul soffitto della gabbia tramite un tubo di *Sylastic* (diametro interno 0.01 mm, diametro esterno 0.03 mm) a sua volta collegato ad un secondo connettore dotato di cannule che inserendosi nell'impianto dell'animale permette il passaggio del liquido dalla pompa al ventricolo.

Ad ogni battuta dell'animale corrisponde quindi non solo l'erogazione di acqua, ma anche la somministrazione icv della sostanza associata alla pompa collegata alla leva premuta.

Inizialmente, dopo l'operazione, gli animali a dieta d'acqua, sono stati posti nella gabbia di *Skinner*, 1 ora al giorno per circa una settimana, connessi alle pompe di infusione contenenti solo il veicolo del farmaco da testare. E' stato utilizzato lo stesso programma CRF precedentemente descritto.

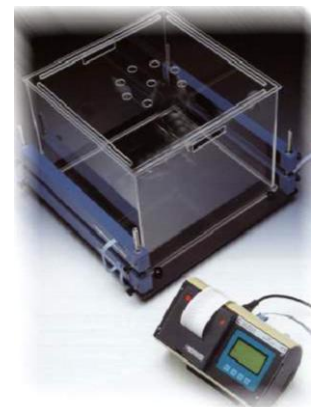
Una volta che gli animali hanno raggiunto una stabilità di battute si è proceduto all'autosomministrazione quotidiana in sessioni di un'ora del composto in esame. Le sedute giornaliere sono state programmate sulla base dell'individuale preferenza di ogni animale per una delle due leve. La leva preferita è stata associata all'infusione di veicolo, mentre la leva meno preferita all'infusione della sostanza.

Successivamente è stata effettuata la stampa relativa al numero di battute per ogni leva e al numero di battute totali ogni 5 minuti. Attraverso queste informazioni si è anche risaliti alla quantità totale di sostanza assunta per sessione giornaliera da ciascun animale.

## Attività motoria spontanea

### APPARECCHIATURA

Per la valutazione dell'attività motoria spontanea dei ratti è stata utilizzata un'*activity cage* delle dimensioni di 41x41x32 cm, interamente costruita in *plaxiglas* (Ugo Basise, *Biological Research Instruments*, Comerio, Varese, Italia), come mostrato nella figura accanto. La gabbia è fornita di due serie di raggi infrarossi paralleli orizzontali, posti rispettivamente a 2.5 e a 12.5 cm dal pavimento, per la registrazione dei movimenti orizzontali e verticali.



L'interruzione dei raggi risulta in un conteggio progressivo di passaggi registrati da un microprocessore e da una stampante (Ugo Basise, *Biological Research Instruments*, Comerio, Varese, Italia). L'intera apparecchiatura è posta in un locale insonorizzato in modo che l'animale non venga disturbato da rumori provenienti dall'esterno.

### PROCEDURA

In seguito al trattamento farmacologico, ciascun animale è stato posto nell'*activity cage* e la sua attività motoria è stata registrata per 30 minuti ed espressa come numero totale dei movimenti orizzontali e verticali.

# Studi condotti nel topo

## Procedura di esposizione

### APPARECCHIATURA

E' stata utilizzata una camera di esposizione (dimensioni 22x40x20 cm) con un flusso di 200 ml/minuto (frequenza: 25 *puff*/minuto, volume: 8 ml/*puff*), generato da un ventilatore meccanico, come mostrato nella figura accanto (*7025 Rodent Ventilator, Ugo Basile, Biological Research Instruments, Comerio, Varese, Italia*).

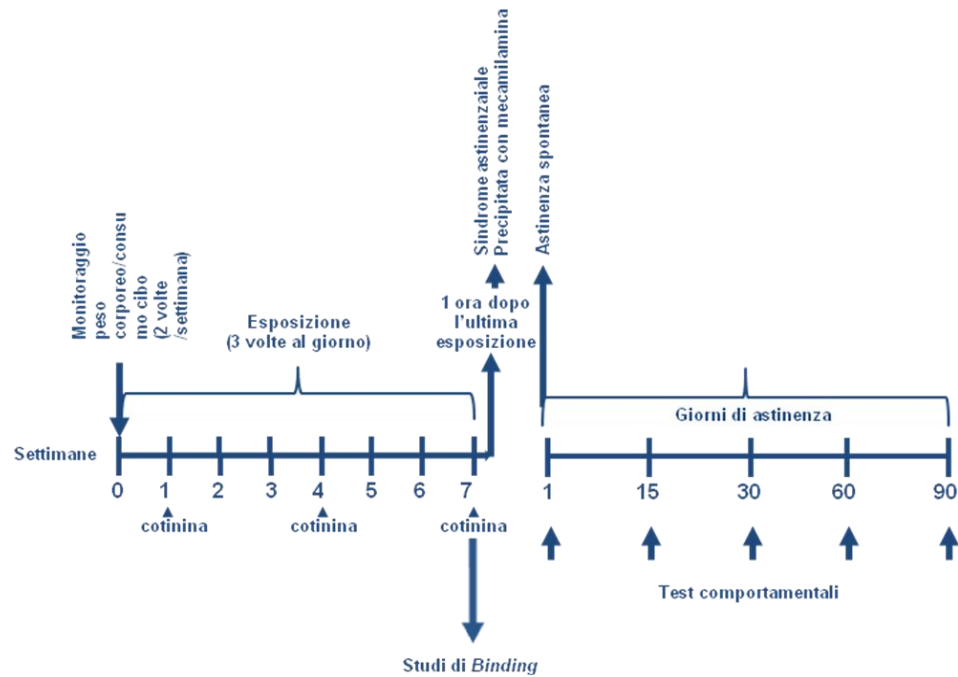


### PROCEDURA DI ESPOSIZIONE

Una settimana dopo il loro arrivo gli animali sono stati collocati, in gruppi di 30, nelle camere di esposizione, 3 volte al giorno (ore 9:30, 12:30, 14:30), 5 giorni a settimana, per 7 settimane. Il primo gruppo (CIG) è stato esposto al fumo generato dalla combustione di 7 sigarette tradizionali (una sigaretta contiene: nicotina 0.8 mg, catrame 10 mg, monossido di carbonio 10 mg, per un totale di 16.8 mg/dì di nicotina). Il secondo gruppo (E-CIG) è stato esposto al vapore prodotto dalla nebulizzazione del liquido di una sigaretta elettronica commerciale contenente 5.6 mg/sessione di nicotina, per un totale di 16.8 mg/dì. Il gruppo controllo (CTR) è stato invece esposto solo ad aria nelle medesime condizioni dei gruppi precedenti.

Tra un'esposizione e l'altra gli animali sono stati riposti nelle loro rispettive gabbie. Al termine delle 7 settimane di esposizione un gruppo di animali (CTR, CIG e E-CIG) è stato destinato a studi di biochimica; in un altro gruppo è stata precipitata una sindrome astinenziale con mecamilamina ed è stato monitorata o l'attività motoria o il comportamento.

Un ulteriore gruppo di animali, a 24 ore, 15, 30, 60 e 90 giorni dalla sospensione dell'esposizione è stato sottoposto a test comportamentali per la valutazione della sindrome astinenziale spontanea, come mostrato nello schema sottostante:



## Studi comportamentali

### Accrescimento corporeo e valutazione del consumo di cibo

Per tutto il periodo sperimentale, durante l'esposizione e l'astinenza, gli animali sono stati pesati settimanalmente per monitorare eventuali variazioni del loro peso corporeo.

Due volte a settimana è stato registrato anche il consumo di cibo (espresso in grammi)

### Sindrome astinenziale precipitata

#### APPARECCHIATURA

Per l'osservazione degli animali, durante la sindrome astinenziale precipitata da mecamilamina, sono stati utilizzati dei cilindri in *plexiglas* trasparenti del diametro di 20 cm e altezza di 25 cm.

## PROCEDURA

Immediatamente dopo l'ultima esposizione, gli animali sono stati trattati con mecamilamina (1 mg/kg) o soluzione fisiologica (0.9 %) per via sottocutanea.

Nei 30 minuti successivi è stato osservato il comportamento per evidenziare la presenza di una sindrome astinenziale, in accordo con Castañé e collaboratori (2002).

Sono stati considerati dei sintomi (*body tremor*, *ptosis*, *teeth chattering*, *genital licks*, *piloerection* e *sniffing*) valutati con uno *score* che può essere 1 (presenza) o 0 (assenza) e dei segni contabili (*wet dog shakes*, *front paw tremor* e *scratching*) a cui viene attribuito uno *score* di 0.5.

Le osservazioni sono state effettuate ogni 5 minuti, per 1 minuto, per 1 totale di sei osservazioni in 30 minuti.

Alla fine dell'esperimento sono stati sommati i punteggi ed espressi come *global score*.

## **Attività motoria spontanea**

### APPARECCHIATURA

Per la valutazione dell'attività motoria spontanea di ciascun animale è stata utilizzata un'*activity cage* automatizzata, come descritto in precedenza. I raggi infrarossi paralleli erano però posizionati a 2.5 e a 5 cm dal pavimento per la conta dei movimenti orizzontali e verticali.

### PROCEDURA

Immediatamente dopo l'ultima esposizione, un gruppo di animali è stato trattato per via sottocutanea con mecamilamina (1 mg/kg) ed è stata valutata per 15 minuti l'attività motoria. Per la sindrome astinenziale spontanea, un altro gruppo di animali è stato valutato 24 ore, 15, 30, 60 e 90 giorni dopo l'ultima esposizione.

## **Sindrome astinenziale spontanea**

24 ore, 15, 30, 60 e 90 giorni dopo l'ultima esposizione, un gruppo di 150 animali (50 CTR, 50 CIG e 50 E-CIG), sono stati sottoposti ad una batteria di test comportamentali per monitorare lo sviluppo di alterazioni cognitive (*Spatial Object Recognition test*) ed emozionali (*Elevated Plus Maze*, *Marble Burying Test*, *Tail Suspension test*, *Sucrose Preference test*).

## *Spatial Object recognition test*

### APPARECCHIATURA

E' stato utilizzato un *box* di plastica bianca delle dimensioni di 58x50x43 cm, allestito con un foglio a righe bianche e nere e un foglio a scacchi bianco e nero posti su due diverse pareti interne del *box* (Kenney *et al.*, 2011). Gli oggetti utilizzati sono diversi ma della medesima altezza (ad esempio una colonna lego, una *falcon* o una *flask* riempita di segatura e una bottiglietta).

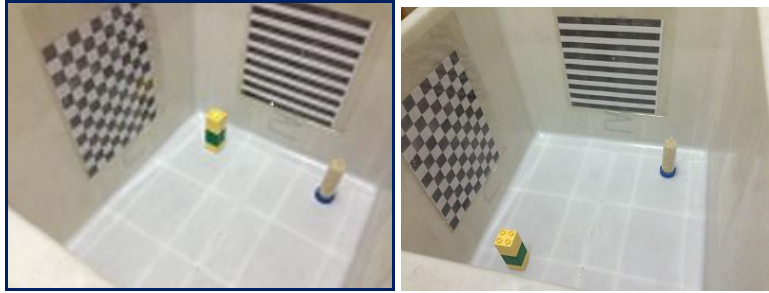
### PROCEDURA

Il giorno precedente il test, ciascun animale è stato singolarmente ambientato nel *box* per 10 minuti con due riferimenti spaziali, senza introdurre alcun oggetto. Dopo 24 ore due oggetti diversi vengono posti a ridosso della parete frontale negli angoli di destra e sinistra, come mostrato nella figura sottostante.

Ogni animale è stato posto all'interno dell'arena e lasciato libero di esplorare gli oggetti (fase T<sub>1</sub>). Si cronometra il tempo durante il quale gli animali esplorano ogni oggetto. La somma dei tempi di esplorazione deve essere pari a 30 secondi. Viene stabilito un *cut off* di tempo di 20 minuti oltre il quale, se l'animale non compie un sufficiente periodo di esplorazione, viene eliminato dall'esperimento.

Tra un animale e l'altro, gli oggetti sono stati accuratamente puliti con acido acetico 0.1 % e le loro posizione è stata invertita.

Dopo 48 ore viene spostato in avanti l'oggetto maggiormente esplorato dall'animale (fase T<sub>2</sub>) e nuovamente si cronometrano i tempi di esplorazione di entrambi gli oggetti, per un totale di 30 secondi. Anche in questa fase viene stabilito un *cut off* di 20 minuti. Viene considerato come esplorazione il tempo speso dall'animale nell'interazione diretta e volontaria con l'oggetto. I risultati sono stati espressi come indice di discriminazione (I), che rappresenta la differenza di tempo di esplorazione tra l'oggetto spostato in avanti (N) e quello familiare (F) sul tempo di esplorazione di entrambi gli oggetti durante la fase di test T<sub>2</sub>:  $I=(N-F)/(N+F)$ . Un indice di riconoscimento positivo rileva che l'animale ha speso un tempo maggiore ad esplorare l'oggetto spostato rispetto a quello familiare.

Fase T<sub>1</sub>Fase T<sub>2</sub>

## *Elevated Plus Maze*

### APPARECCHIATURA

L'*elevated Plus Maze* consiste in uno strumento di legno bianco costruito secondo una versione modificata di Lister (1987). L'apparecchio, sollevato 60 cm dal pavimento, è costituito da una piattaforma centrale quadrata di 9 cm per lato dalla quale si dipartono quattro bracci (30x9 cm) disposti a croce: due bracci opposti aperti e gli altri due, delle stesse misure, chiusi sul perimetro tramite dei muri di legno bianco (h=14 cm), come mostrato nella figura accanto.



Il contorno della piattaforma è contrassegnato da linee che indicano il passaggio della stessa verso i bracci.

L'*elevated Plus Maze* è posto in una stanza isolata da qualsiasi disturbo e nella quale non sono presenti riferimenti visivi che possano influenzare il comportamento dell'animale. Condizioni di luce e temperature vengono mantenuti costanti.

### PROCEDURA

Ogni animale viene portato nella stanza dell'*Elevated Plus Maze* per favorirne l'ambientamento e per mantenerlo in un luogo privo di stimoli, così da valutarne il comportamento in assenza di alterazioni esterne precedenti alla prova. Ciscun topo viene posto sulla piattaforma centrale, con il muso rivolto verso uno dei due bracci aperti e lasciato libero di esplorare. Il comportamento dell'animale viene registrato per un periodo di 5 minuti da uno sperimentatore munito di cronometro, che si collocherà in un punto da cui poter osservare l'animale senza però essere visto a sua volta dal topo, per non influenzare la sua spontanea attività. I parametri (espressi in percentuale) da rilevare sono: il numero di entrate nei bracci aperti, il numero di entrate nei

bracci chiusi, il numero totale di entrate sia nei bracci aperti sia in quelli chiusi, il tempo trascorso nei bracci e il tempo trascorso nei bracci chiusi. La percentuale delle entrate nei bracci aperti è calcolata come rapporto tra il numero di entrate nei bracci aperti sul totale delle entrate; allo stesso modo è calcolata la percentuale delle entrate nei bracci chiusi. La percentuale di tempo speso nei bracci aperti è calcolata come rapporto tra il tempo speso nei bracci aperti e il tempo totale di durata del test; allo stesso modo è calcolata la percentuale del tempo speso nei bracci chiusi. Per convenzione si intende “entrata nel braccio” l’attraversamento della linea che indica il passaggio dalla piattaforma al braccio, con tutte e quattro le zampe dell’animale; mentre, per “uscita dal braccio” s’intende l’attraversamento della linea, dal braccio verso la piattaforma, con due sole zampe.

Prima di testare ciascun animale lo strumento è stato pulito con acido acetico 0.1%.

## ***Marble Burying Test***

### **APPARECCHIATURA**

In accordo con Njung’e ed Handley (1991) è stata utilizzata una gabbia (42x26x18 cm), riempita con 5 cm di segatura pulita. Vengono utilizzate 20 biglie di vetro blu identiche tra loro (diametro=25 mm).

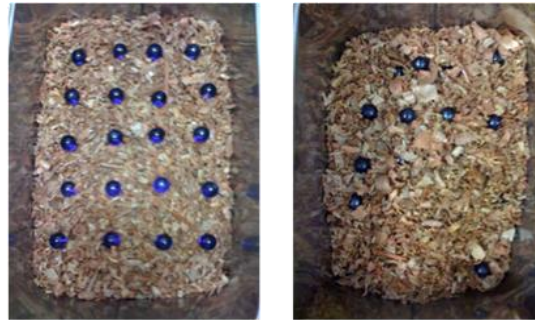
### **PROCEDURA**

Il topo viene lasciato nella stanza all’interno della propria gabbia per 30 minuti affinché possa abituarsi all’ambiente. Successivamente l’animale viene posto nell’arena, riempita di segatura e coperta da una grata, per altri 30 minuti di ambientamento. Terminata tale fase, l’animale viene rimesso nella sua gabbia per il tempo necessario al posizionamento di 20 biglie (5x4) in modo che siano equidistanti tra loro, come mostrato nella figura sottostante.

Successivamente il topo viene posto in un angolo dell’arena e lasciato libero di esplorare per 15 minuti durante i quali viene registrata la latenza al primo seppellimento, cioè l’atto di ricoprire almeno 2/3 della biglia di segatura, e alla fine dei 15 minuti, si esegue il conteggio del numero di biglie seppellite.

Dal momento che il numero di biglie seppellite è direttamente proporzionale al comportamento ansioso del topo, più è alto il numero di biglie che vengono seppellite nei 15 minuti, maggiore è lo stato ansioso dell’animale testato.





Prima

Dopo

## ***Tail Suspension Test***

### **APPARECCHIATURA**

Come indicato nella metodica di Steru e collaboratori del 1985, la struttura utilizzata per questo test consiste in un sostegno metallico alto 35 cm cui viene inserito un gancio al fine di mantenere il topo sospeso per la coda.

### **PROCEDURA**

Gli animali vengono portati nella stanza dove si svolgerà il test 1 ora prima dell'inizio in modo che si possano adattare all'ambiente.

Per il test la coda del topo viene fissata al gancio utilizzando del nastro adesivo. Il gancio cui è fissata la coda deve essere a circa 1 cm dalla base della stessa. Una volta inserito il gancio nel supporto viene avviato un *timer* e viene registrato, mediante un cronometro, con un *cut off* di 6 minuti, il tempo di *immobilità*, ossia il tempo in cui l'animale resta totalmente immobile.

## ***Sucrose Preference Test***

Il test di preferenza al saccarosio consente di valutare l'anedonia, ovvero una ridotta risposta agli stimoli di piacere nei roditori. Viene testata la preferenza dei topi a bere una soluzione zuccherina gratificante rispetto alla comune acqua, utilizzando una procedura che prevede la possibilità di scelta tra le due alternative (Willner *et al.*, 1987).

### **PROCEDURA**

Il giorno precedente il test per ogni singolo animale sono state preparate due bottigliette: una contenente 100 ml di una soluzione al 3% di saccarosio ed una contenente 100 ml di *acqua*

*fontis*. Nella fase di test, per due giorni consecutivi, i topi vengono posti in gabbie singole nelle quali hanno la possibilità di accedere liberamente alle due bottigliette. Dopo 24 e 48 ore le bottigliette vengono rimosse e registrate le quantità di acqua e di soluzione zuccherina consumate dagli animali. Per evitare eventuali preferenze di posizione, nei due giorni di test si scambia la posizione delle bottigliette di acqua e di soluzione zuccherina. I risultati sono stati espressi come percento di animali anedonici, ossia che bevono meno del 50 % di soluzione zuccherina rispetto al totale.

## Studi di biochimica

### Valutazione cotinina presente a livello urinario

Questi studi sono stati condotti in collaborazione con l'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia.

Per la valutazione dei livelli di cotinina nelle urine, dopo 1, 4 e 7 settimane di esposizione, alla fine dell'ultima esposizione della giornata, gli animali sono stati posti, in gruppi di 5, nelle gabbie metaboliche per circa 3 ore, per la raccolta delle urine. Per ogni gruppo sono stati raccolti circa 5 ml di urina che sono stati subito congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

I campioni di urina sono stati poi centrifugati in tubi contenente eparina (*Inmulite 2000: Nicotine Metabolite*), e congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . I livelli di cotinina sono stati misurati usando tecniche di chemiluminescenza; tutti i campioni testati sono stati duplicati e il valore medio ottenuto è stato impiegato per l'analisi statistica.

Il limite inferiore di sensibilità è di 10 ng/ml e i coefficienti di intra e interdosaggio di variazione sono stati rispettivamente 7.42% e 9.37%.

### Valutazione nicotina/cotinina presente a livello cerebrale

Per quanto riguarda i livelli di nicotina e di cotinina registrati nel cervello, gli animali sono stati sacrificati dopo 1 ora dalla fine delle 7 settimane di esposizione e i loro cervelli congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  *in toto*. La valutazione della concentrazione di nicotina e cotinina è stata determinata utilizzando la tecnica della cromatografia liquida-spettrometria di massa *tandem* (LC-MS/MS), come descritto in precedenza per la valutazione dei livelli di nicotina nel cervello dello *Zebrafish*.

## Studi di *binding* recettoriale

Tutti gli studi di *binding* recettoriale sono stati eseguiti in collaborazione con la Dott.ssa Cecilia Gotti del CNR di Milano.

### ESTRAZIONE DELLA CORTECCIA CEREBRALE, *NUCLEUS ACCUMBENS* E IPPOCAMPO

Gli animali sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale; in seguito è stata isolata la regione cefalica mediante decapitazione con una forbice chirurgica; si è proceduto incidendo la cute fino al setto nasale per scoprire il cranio. Con l'utilizzo della forbice chirurgica si è tagliato il midollo allungato in direzione obliqua fino a raggiungere l'attaccatura inferiore del padiglione auricolare. Con l'utilizzo di pinze chirurgiche dalla punta arrotondata si sono rimossi i tessuti molli e l'osso poco per volta, facendo attenzione a non alterare l'integrità del cervello, fino a che questo non fosse completamente scoperto. A questo punto con l'ausilio di una paletta chirurgica, si è adagiato gentilmente il cervello su una piastra *Petri*, per procedere al prelievo della corteccia cerebrale, del *nucleus accumbens* e dell'ippocampo. Con un bisturi si è proceduto alla dissezione delle varie aree del cervello che sono state immediatamente congelate a -80°C.

### PRODUZIONE DI ANTICORPI E CARATTERIZZAZIONE

Gli anticorpi policlonali (Ab) subunità-specifici utilizzati per l'immunoprecipitazione sono stati prodotti nel laboratorio della Dott.ssa Gotti in conigli, contro peptidi derivanti dal terminale carbossilico (COOH) e/o dal *loop* citoplasmatico (CYT) delle sequenze di subunità di ratto, uomo o topo.

### PREPARAZIONE DELLE MEMBRANE DA TESSUTI NEURONALI ED ESTRAZIONE CON DETERGENTE *TRITON X-100* 2%

Le aree prelevate vengono prima omogeneizzate in 10 ml di 50 mM di sodio fosfato, pH 7.4, 1 M NaCl, 2 mM EGTA e 2 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) utilizzando un omogeneizzatore; l'omogenato è poi diluito e centrifugato per 90 minuti a 60.000 g. Le procedure di omogeneizzazione, diluizione e centrifugazione sono ripetute più volte, dopodiché i *pellets* sono raccolti e rapidamente risciacquati con 50 mM Tris HCl, pH 7, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> e 2 mM PMSF e poi risospesi nello stesso tampone contenente 10 µg/ml

di una miscela di inibitori delle proteasi: pepstatina A, leupeptina e aprotinina. *Triton X-100* alla concentrazione finale del 2 % viene aggiunto alle membrane lavate, che sono estratte per 2 ore a 4°C. Gli estratti sono centrifugati per 90 minuti a 60.000 g e una piccola aliquota dei surnatanti viene raccolta per il dosaggio delle proteine utilizzando il saggio BCA (*Pierce Chemical, Rockford, IL*) con albumina di siero bovino come *standard*.

## STUDIO DI BINDING

[<sup>3</sup>H]-EPIBATIDINA (Epi): Per escludere che i sottotipi recettoriali contenenti le subunità  $\alpha_7$  potessero contribuire al *binding* di [<sup>3</sup>H]-Epibatidina (Marks *et al.*, 2006), sia le membrane sia i recettori solubilizzati (presenti negli estratti e negli esperimenti di immunoprecipitazione) sono stati pre-incubati per 3 ore con 2  $\mu$ M  $\alpha$ Bgtx, che lega specificatamente i recettori nicotinici  $\alpha_7$  (prevenendo così che [<sup>3</sup>H]-Epi si leghi a questi siti). Il *binding* degli omogenati viene condotto tutta la notte incubando aliquote di membrane con 1 nM [<sup>3</sup>H]-Epi a 4°C. Il legame aspecifico (in media il 5-10% del legame totale) viene determinato in campioni paralleli contenenti 100 nM di epibatidina fredda. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati filtrati su filtri GFC bagnati in 0.5 % polietilenimina, lavati con 15 ml di *buffer* (fosfato di sodio 10 mM, pH 7.4, 50 mM NaCl); la radioattività è stata poi contata al  $\beta$ -contatore. Gli estratti con *Triton X-100* sono stati incubati con 2 nM [<sup>3</sup>H]-Epi. Il *binding* è stato ottenuto usando DE52 resina a scambio ionico (*Whatman, Maidstone, Kent, UK*).

## IMMUNOPRECIPITAZIONE DEI COMPLESSI RECETTORI/[<sup>3</sup>H]-EPIBATIDINA CON ANTICORPI SUBUNITA' SPECIFICI

Gli estratti tissutali sono stati preincubati con 2  $\mu$ M  $\alpha$ Bgtx, marcati con [<sup>3</sup>H]-Epi e incubati tutta la notte con concentrazioni saturanti di anticorpi, prodotti nel coniglio, specifici diretti contro le diverse subunità dei recettori (20-30  $\mu$ g). L'immunoprecipitazione è ottenuta mediante incubazione dei campioni con microsfeere a cui sono state legate IgG di capra rivolte contro quelle di coniglio. Il livello di immunoprecipitazione viene espresso come femtomoli di recettore [<sup>3</sup>H]-Epibatidina marcato immunoprecipitato per milligrammo di proteina (fmoli/mg).

## Farmaci

NICOTINA: (*Sigma Aldrich Chemical Co., St, Lous, Mo, USA*) opportunamente sciolta in soluzione fisiologica 0.9 % (NaCl) nello *Zebrafish* viene somministrata, per via i.m., in un *range* di dosi compreso tra 0.0001 e 0.1 mg/kg e per via intraperitoneale (i.p.) nel ratto in un *range* compreso tra 0.01 e 0.2 mg/kg. Nell'*Intracerebroventricular Self Administration*, la concentrazione di nicotina usata è stata 0.1 µg/2 µl. Nel topo la nicotina è stata somministrata sotto forma di sigaretta di tipi standard (0.8 mg a sigaretta) o contenuta nel liquido della sigaretta elettronica di tipo commerciale (19 mg/ml).

CC4: *1,2-bis(cytisi-12-yl)ethane* (gentilmente offerto dalla Dott.ssa Gotti, CNR, Milano) opportunamente sciolto in soluzione fisiologica 0.9 % (NaCl) viene somministrato, per via i.m., nello *Zebrafish* in un *range* compreso tra 0.001 e 10 mg/kg. E' stato invece somministrato per via sottocutanea (s.c.) nel ratto in un *range* compreso tra 0.05 e 10 mg/kg. E' stato somministrato da solo o con la dose massimamente rinforzante di nicotina.

CC26: *1,2-bis(cytisi-12-yl)-2-butyne* (gentilmente offerto dalla Dott.ssa Gotti, CNR, Milano) opportunamente sciolto in soluzione fisiologica 0.9 % (NaCl) viene somministrato, per via i.m., nello *Zebrafish* in un *range* compreso tra 0.001 e 1 mg/kg. E' stato somministrato da solo o con la dose massimamente rinforzante di nicotina.

CITISINA: (*Sigma Aldrich Chemical Co., St, Lous, Mo, USA*) opportunamente sciolta in soluzione salina 0.9 % (NaCl), è stata somministrata, per via i.m., nello *Zebrafish* in un *range* di dosi tra 0.1 e 2.5 mg/kg. Nel ratto è stata invece somministrata per via i.p., sempre nello stesso *range* di dosi. E' stato somministrato da solo o con la dose massimamente rinforzante di nicotina.

VARENICLINA: (*Sigma Aldrich Chemical Co., St, Lous, Mo, USA*) opportunamente sciolta in soluzione salina 0.9 % (NaCl), è stata somministrata, per via i.m., nello *Zebrafish* in un *range* di dosi tra 1 e 10 mg/kg. E' stato somministrato da solo o con la dose massimamente rinforzante di nicotina.

MECAMILAMINA CLORIDRATO: (*Sigma Aldrich Chemical Co., St, Lous, Mo, USA*) opportunamente sciolta in soluzione salina 0.9 % (NaCl). Nello *Zebrafish* è stata somministrata, per via i.m., alla dose di 0.1 mg/kg.

Nel ratto è stata invece somministrata alla dose di 10 mg/kg per via s.c. Nel topo, la mecamilamina cloridrato è stata somministrata alla dose di 1 mg/kg per via s.c. E' stato somministrato da solo o con la dose massimamente rinforzante di nicotina.

MLA: *methyllycaconitine* (Sigma Aldrich Chemical Co., St, Lous, Mo, USA) opportunamente sciolta in soluzione salina 0.9 % (NaCl). Nello *Zebrafish* è stata somministrata, per via i.m., alla dose di tra 0.01 e 1 mg/kg. E' stato somministrato da solo o con la dose massimamente rinforzante di nicotina.

MII:  *$\alpha$ -conotoxin MII* (Sigma Aldrich Chemical Co., St, Lous, Mo, USA) opportunamente sciolta in soluzione salina 0.9 % (NaCl). Nello *Zebrafish* è stata somministrata, per via i.m., in un *range* di dosi tra 0.01 e 1 mg/kg. E' stato somministrato da solo o con la dose massimamente rinforzante di nicotina.

Dh $\beta$ E: *dihydro- $\beta$ -erythroidine* (Sigma Aldrich Chemical Co., St, Lous, Mo, USA) opportunamente sciolta in soluzione salina 0.9 % (NaCl). Nello *Zebrafish* è stata somministrata, per via i.m., in un range di dosi tra 0.001 e 0.1 mg/kg. E' stato somministrato da solo o con la dose massimamente rinforzante di nicotina.

TRICAINA: (Sigma Aldrich Chemical Co., St, Lous, Mo, USA) è stata somministrata alla concentrazione 0.2 % nello *Zebrafish*, per via i.m. con un volume di 2  $\mu$ l/g.

[<sup>3</sup>H]-EPIBATIDINA: (*Epi*; GE Healthcare, Chalfont St, Giles, Buckinghamshire, UK) in un *range* tra 0.25 e 100 nM per il cervello dello *Zebrafish* e tra 1 e 100 nM per le aree cerebrali del topo.

## **Tecniche statistiche**

I risultati ottenuti sono stati espressi come media  $\pm$  e.s. ed elaborati utilizzando un'analisi di varianza a una o due vie (ANOVA), seguita dal test di *Tukey* o di *Bonferroni*. I dati non parametrici sono stati analizzati mediante il test di *Kruskal-Wallis* seguiti dal test di *Dun*.

Negli studi di *binding* sono state generate curve di saturazione.

L'elaborazione è stata condotta mediante *softwar Prism 6.0. GraphPad U.S.A.*

Il livello di significanza è stato  $p < 0.05$ .

*Risultati*

## **Studi condotti nello Zebrafish**

### ***Conditioned Place Preference (CPP)***

In *figura 1 A* sono riportati i valori della differenza tra il tempo speso dall'animale nel compartimento associato alla nicotina, somministrata a dosi crescenti, durante la fase di post- e pre-condizionamento ( $\Delta$ ). L'ANOVA ha evidenziato una differenza significativa tra i gruppi ( $F_{(4,45)}=4.55$   $P<0.005$ ). Il test di Tukey ha rilevato che lo stimolante alla dose di 0.001 mg/kg ha indotto un significativo incremento del  $\Delta$  rispetto al gruppo veicolo, indicando un pieno effetto rinforzante. La somministrazione della massima dose utilizzata (0.1 mg/kg) è risultata invece inefficace, in quanto induce un decremento statisticamente significativo rispetto alla dose massimamente rinforzante (0.001 mg/kg). La curva dose-risposta ha un andamento a U rovesciata.

In *figura 1 B e C* è invece riportato il valore del  $\Delta$  ottenuto dopo la somministrazione di dosi crescenti di citisina (*1 B*) e vareniclina (*1 C*). L'ANOVA ha rilevato una significativa differenza tra i gruppi (citisina:  $F_{(3,36)}=4.95$ ,  $P<0.005$ ) e (vareniclina:  $F_{(5,54)}=14.77$ ,  $P<0.0001$ ). L'analisi *post hoc* ha mostrato che entrambi i composti mostrano una curva dose-risposta a U rovesciata: la massima dose rinforzante della citisina è risultata la 1 mg/kg mentre quella della vareniclina è la 2.5 mg/kg. Inoltre la dose 10 mg/kg di vareniclina è risultata inefficace, in quanto induce una riduzione del  $\Delta$  statisticamente significativo rispetto alla dose massimamente rinforzante (2.5 mg/kg).

La risposta dello *Zebrafish* al trattamento con dosi crescenti di CC4 e CC26 è mostrata in *figura 2 A e B*, dove sono riportati i valori del  $\Delta$ . L'ANOVA ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i gruppi sia per quanto riguarda il CC4 ( $F_{(5,54)}=5.12$ ,  $P<0.0002$ ) che per quanto riguarda il CC26 ( $F_{(4,45)}=3.44$ ,  $P<0.02$ ). Il test di Tukey ha messo in luce che le dosi 0.01, 0.1 e 1 mg/kg di CC4 e la dose 0.01 mg/kg di CC26 hanno prodotto un significativo aumento del  $\Delta$  rispetto al gruppo controllo. Inoltre, anche questi agonisti parziali hanno mostrato una curva dose-risposta a U rovesciata.

Da questi risultati è evidente che l'agonista parziale più efficace a indurre CCP risulta essere il CC26 (0.01 mg/kg), seguito dal CC4 (0.01-1 mg/kg), dalla citisina (1 mg/kg) e dalla vareniclina (2.5 mg/kg).

In *tabella 1* è mostrato l'effetto della somministrazione di tre antagonisti nicotinici, selettivi per i sottotipi recettoriali nicotinici  $\alpha_7$ ,  $\alpha_6\beta_2$  e  $\beta_2$ , di per sé e in associazione con la dose massimamente rinforzante di nicotina (0.001 mg/kg). Quando gli antagonisti sono somministrati da soli,



l'ANOVA mostra un effetto sul trattamento (MLA:  $F_{(7,72)}=13.93$ ,  $P<0.0001$ ), (MII:  $F_{(7,72)}=5.86$ ,  $P<0.0001$ ), (DH $\beta$ E:  $F_{(7,72)}=8.08$ ,  $P<0.0001$ ). L'analisi *post hoc* evidenzia che l'MLA (0.01 mg/kg), l'MII (1 mg/kg) e il DH $\beta$ E (0.01 mg/kg) hanno di per sè un leggero ma significativo effetto rinforzante; quanto somministrati insieme alla dose massimamente rinforzante di nicotina (0.001 mg/kg), l'MLA (1 mg/kg) e il DH $\beta$ E (0.01 e 0.1 mg/kg) antagonizzano il suo effetto rinforzante, mentre l'MII risulta inefficace.

Gli studi di antagonismo sono riportati in *figura 3*, dove è mostrato che il trattamento con citisina (2.5 mg/kg), vareniclina (7.5 mg/kg), CC4 (5 mg/kg), CC26 (1 mg/kg) e mecamilamina (0.1 mg/kg), somministrate da sole, non è risultato efficace, in quanto il  $\Delta$  è sovrapponibile al gruppo del veicolo. Il pretrattamento con questi composti, associati alla dose maggiormente rinforzante di nicotina (0.001 mg/kg), ha indotto dei significativi cambiamenti ( $F_{(11,108)}=2.55$ ,  $P<0.004$ , ANOVA). L'analisi *post hoc* ha messo in luce un significativo incremento del  $\Delta$  nel gruppo a cui è stata somministrata nicotina + veicolo, rispetto al gruppo controllo (veicolo + veicolo). Il trattamento con i diversi agonisti parziali nicotinici o con la mecamilamina prima della dose massimamente rinforzante di nicotina, ha indotto un significativo e completo decremento del  $\Delta$  rispetto al gruppo trattato con la nicotina + veicolo.

## ***Attività natatoria***

In *figura 4* sono riportati i valori delle linee attraversate dallo *Zebrafish*, nel test dell'*Attività natatoria*, dopo somministrazione della dose massimamente rinforzante di nicotina (0.001 mg/kg) e dei vari agonisti parziali o antagonisti, somministrati alla dose massimamente rinforzante o alla più alta dose usata per l'antagonismo: citisina (1-2.5 mg/kg), vareniclina (2.5-7.5 mg/kg), CC4 (1-5 mg/kg), CC26 (0.1-1 mg/kg), mecamilamina (0.1 mg/kg), MLA (1 mg/kg), MII (1 mg/kg) e DH $\beta$ E (0.1 mg/kg). L'analisi statistica effettuata non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi ( $F_{(13,126)}=P=0.97$ , ns).

## ***Caratterizzazione biochimica e farmacologica***

### ***Recettori della [<sup>3</sup>H]-Epibatidina***

Mediante studi di *binding* con ligandi radioattivi e competizione con i composti nicotinici, sono stati caratterizzati farmacologicamente i recettori presenti nelle membrane, come descritto nei Materiali e Metodi. La *figura 5A* mostra la curva di saturazione della [<sup>3</sup>H]-Epibatidina ad omogenati, in presenza di 1  $\mu$ M di  $\alpha$ -bungarotossina. L'interazione della [<sup>3</sup>H]-Epibatidina con i

recettori presenti nell'omogenato controllo è consistente con la presenza di una singola classe di siti ad alta affinità (Kd) di 0.026 nM (*figura 5C*). Il profilo farmacologico dei recettori presenti nelle membrane è stato ulteriormente caratterizzato mediante determinazione della potenza dei composti citisina, CC4, CC26, nicotina, vareniclina, DH $\beta$ E,  $\alpha$ -bungarotossina, MII, MLA e mecamilamina nel competere, all'equilibrio, il legame di 250 pM [ $^3$ H]-Epibatidina. La *figura 5C* mostra i valori di Ki determinati per i vari composti sui recettori eteromerici presenti nelle membrane di *Zebrafish*. Si può osservare che la nicotina (Ki 11.8 nM), la citisina (Ki 1.47 nM), il CC4 (Ki 11.9 nM), il CC26 (Ki 5.38 nM) e l'MII (Ki 1.9 nM) mostrano un'alta affinità verso i recettori eteromerici, mentre gli altri antagonisti esibiscono un'affinità molto inferiore nel range  $\mu$ M.

### *Recettori della [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -bungarotossina*

La curva di *binding* con concentrazioni crescenti di [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -bungarotossina (*figura 5B*) mostrano che questa tossina ha un singolo sito di legame con un'affinità di 0.42 nM (*figura 5C*).

I recettori che legano la [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -bungarotossina, presenti nelle membrane, esibiscono un'affinità inferiore (valori di Ki più alti) dei diversi composti agonisti e antagonisti rispetto a quella misurata verso i recettori della [ $^3$ H]-Epibatidina (*figura 5C*). Gli unici composti che mostrano un'affinità nanomolare sono l'  $\alpha$ -bungarotossina (Ki 0.4 nM) e l'MLA (Ki 0.59 nM) indicando che, dal punto di vista farmacologico, questa classe di recettori ha lo stesso profilo dei recettori dell' $\alpha$ -bungarotossina presenti nei mammiferi.

Dai risultati mostrati in *figura 5C* emerge che la vareniclina è in grado di legare sia i recettori sensibili all' [ $^3$ H]-Epibatidina che quelli sensibili all' $\alpha$ -bungarotossina, come dimostrato dalle rispettive costanti di affinità dei ligandi colinergici: rispettivamente Ki 1.1 nM e 1.29 nM. Anche la citisina, lega entrambi i tipi di recettori ma con un'affinità maggiore per quelli eteromerici (Ki 1.47 nM per i recettori eteromerici e 37.4 nM per quelli sensibili all' $\alpha$ -bungarotossina). Il CC4 e il CC26, come la citisina, mostrano un'alta affinità per il sottotipo eteromerico mentre, a differenza della citisina, esibiscono un'affinità molto più bassa (circa 100 volte) verso i recettori dell' $\alpha$ -bungarotossina, come dimostrato dalle rispettive Ki (CC4: Ki 11.9 nM per i recettori eteromerici e 234 nM per i recettori sensibili all' $\alpha$ -bungarotossina; CC26: Ki 5.38 nM per i recettori eteromerici e 126 nM per quelli sensibili all' $\alpha$ -bungarotossina).

## *Valutazione dei livelli di nicotina*

In *figura 5D* sono riportati i livelli di nicotina registrati nel cervello e nei tessuti periferici (fegato e reni) dello *Zebrafish*, 20 minuti dopo la somministrazione i.m. di dosi crescenti (0.001, 0.01 e 0.1 mg/kg) di nicotina. Dai risultati emerge un aumento dose-dipendente dei livelli di nicotina a livello cerebrale; tale incremento dose-dipendente risulta maggiore a livello dei tessuti periferici.

## **Studi condotti nel Ratto**

### ***Conditioned Place Preference (CPP)***

In *figura 6* sono riportati I valori del  $\Delta$  di dosi crescenti di nicotina (A), citisina (B) e CC4 (C). L'ANOVA ha evidenziato una differenza significativa tra i gruppi ( $F_{(3,36)}=4.11$ ,  $P<0.001$  per la nicotina;  $F_{(4,45)}=8.65$ ,  $P<0.0001$  per la citisina;  $F_{(5,54)}=4.51$ ,  $P<0.001$  per il CC4). Il test di Tukey ha messo in luce come la nicotina e il CC4 aumentano il tempo speso nel compartimento associato alla droga nella fase di post-condizionamento alla dose di 0.1 mg/kg mentre la citisina agisce alle dosi di 0.1 e 0.5 mg/kg. Le dosi più alte di questi tre composti (0.2 mg/kg per la nicotina; 2.5 mg/kg per la citisina e 10 mg/kg per il CC4) sono risultate inefficaci.

Per quanto riguarda gli studi di antagonismo, in *figura 7*, sono riportati i valori del  $\Delta$  di gruppi di animali trattati con veicolo, mecamilamina (10 mg/kg), CC4 (5-10 mg/kg) e citisina (2.5 mg/kg) da soli o in associazione alla dose di nicotina (0.1 mg/kg) risultata massimamente rinforzante nel test della CPP. L'ANOVA ha evidenziato una significativa differenza tra i gruppi ( $F_{(9,90)}=9.53$ ,  $P<0.0001$ ). Il test di Tukey ha rilevato che quando somministrati da soli questi composti risultano inefficaci, mentre, quando somministrati insieme alla dose massimamente rinforzante di nicotina (0.1 mg/kg), la mecamilamina, il CC4 e la citisina riducono in modo significativo il tempo speso nel compartimento associato alla droga durante la fase di post-condizionamento rispetto alla nicotina da sola.

### ***Intracerebroventricular Self-administration***

Durante la fase di modellamento il 90% degli animali impara in circa tre sessioni quotidiane che esiste la possibilità di ottenere un rinforzo liquido previa pressione delle leve presenti nella gabbia (dati non mostrati). Durante il periodo di allenamento solo il 38% degli animali preme

indifferentemente entrambe le leve, mentre la maggior parte tende a preferirne una e la preferenza così instaurata si mantiene per tutto il periodo considerato.

La *figura 8* mostra l'andamento della pressione delle leve in tre animali rappresentativi, in seguito ad allenamento, a cui sono state offerte concentrazioni crescenti di nicotina (A), citisina (B) e CC4 (C). In *figura 8A* è mostrato come, durante l'autosomministrazione di nicotina alla concentrazione di 0.003  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione, si osserva la medesima preferenza delle leve, come nel periodo di allenamento. Alla concentrazione di 0.03  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione, l'animale riduce notevolmente il numero di battute della leva associata al veicolo. Alla concentrazione di 0.1  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione si osserva un notevole aumento del numero di battute della leva associata alla nicotina ed un contemporaneo recupero di preferenza per la leva associata al veicolo. Alla concentrazione di 0.3  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione l'animale ritorna alle condizioni preferenziali della leva associata al veicolo rispetto alla leva associata alla nicotina. Le *figure 8B* e *C* mostrano l'andamento in seguito a infusioni icv di dosi crescenti di citisina (*8B*) e CC4 (*8C*): partendo dall'infusione di 0.0001  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  di citisina e di 0.003  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  di CC4, si assiste ad un leggero e progressivo incremento del numero di pressioni della leva meno preferita. Tuttavia, nel caso della citisina, le pressioni di tale leva rimangono sempre nettamente inferiori rispetto a quelle associate al veicolo. Al contrario, la concentrazione più alta di CC4 (0.3  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) diminuisce in modo significativo il numero di pressioni della leva associate al veicolo e aumenta il numero di pressioni di quella associate alla droga.

In *figura 9* è riportata la media delle battute sulla leva associata al veicolo e a dosi crescenti di nicotina (A), citisina (B) e CC4 (C) in differenti gruppi di ratti. L'ANOVA ha messo in luce una significativa differenza tra i gruppi sia per quanto riguarda la nicotina ( $F_{(9,40)}=16.75$ ,  $P<0.0001$ ), sia per la citisina ( $F_{(13,126)}=22.98$ ,  $P<0.0001$ ) che per il CC4 ( $F_{(7,72)}=11.23$ ,  $P<0.0001$ ). Il test di Tukey ha evidenziato che l'autosomministrazione di nicotina alla concentrazione di 0.1  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione provoca un significativo aumento del numero di battute della leva associata alla droga rispetto a quella associata al veicolo; una significativa riduzione del numero di tali battute è stata osservata alla dose di 0.3  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione di nicotina (*figura 9A*). Per quanto riguarda la citisina, l'analisi *post hoc* ha mostrato che, ad eccezione della dose di 0.001  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione, il numero di battute della leva associata alla droga risulta sempre statisticamente inferiore rispetto a quella associata al veicolo (*figura 9B*). Per quanto concerne il CC4, l'analisi *post hoc* ha indicato che l'autosomministrazione della dose 0.3  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione aumenta in modo significativo il numero delle battute della leva associata alla droga rispetto al corrispettivo veicolo.

La *figura 10* riporta l'andamento dell'assunzione giornaliera dei  $\mu\text{g}$  di nicotina (A), di citisina (B) e di CC4 (C) negli ultimi 5 giorni di battute stabili. L'ANOVA ha rilevato una significativa

differenza tra i differenti gruppi (nicotina:  $F_{(3,36)}=18.34$ ,  $P<0.0001$ ), (citisina:  $F_{(5,54)}=7.41$ ,  $P<0.0001$ ), (CC4:  $F_{(2,27)}=234$ ,  $P<0.0001$ ). Per quanto riguarda la nicotina, l'analisi *post hoc* ha rilevato che l'assunzione giornaliera aumenta progressivamente da 0.003 a 0.1  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione; l'autosomministrazione della massima dose di nicotina (0.3  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione) porta ad una riduzione del 50 % dell'assunzione giornaliera rispetto alla 0.1  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione ( $10.12 \pm 1.40$  vs  $5.55 \pm 1$ ) (*figura 10A*). In modo simile alla nicotina, nella *figura 10B*, l'analisi *post hoc* ha indicato che l'assunzione giornaliera di citisina aumenta gradualmente da 0.0001 a 0.5  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione e la più alta dose (0.5  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione) incrementa in modo significativo l'autosomministrazione della droga. Infine, per quanto concerne il CC4, l'assunzione giornaliera aumenta progressivamente da 0.003 a 0.3  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione; il test di Tukey ha evidenziato un incremento significativo dell'assunzione della dose di 0.3  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione rispetto alla dose 0.003 e 0.008  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione.

In *figura 11A* è riportata la media delle battute della leva associata al veicolo o alla nicotina (0.1  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ ) in seguito al pretrattamento con veicolo, mecamilamina (10 mg/kg) e CC4 (5 mg/kg). L'ANOVA ha messo in luce una significativa differenza tra i gruppi ( $F_{(11,108)}=5.15$ ,  $P<0.0001$ ). L'analisi *post hoc* ha evidenziato che il pretrattamento con mecamilamina o CC4 di per sé non influisce sul numero di pressioni della leva. Tuttavia, quando somministrati insieme alla nicotina (0.1  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ /infusione), questi due composti riducono in modo significativo il numero delle pressioni della leva associate alla droga, rispetto alla nicotina da sola. Allo stesso modo, l'ANOVA ha evidenziato un effetto del pretrattamento di veicolo, mecamilamina (10 mg/kg) e CC4 (5 mg/kg) sull'assunzione media giornaliera di nicotina ( $F_{(2,27)}=26.41$ ,  $P<0.0001$ ) (*figura 11B*). L'analisi *post hoc* ha mostrato un significativo decremento dell'assunzione media giornaliera dell'alcaloide nei gruppi pretrattati con mecamilamina o CC4 (*figura 11B*).

## ***Attività motoria***

In *figura 12* sono riportati i risultati del test *dell'Attività Motoria*, valutata in termini di movimenti orizzontali (A) e verticali (B) monitorati nell'arco di 30 minuti. La nicotina, somministrata 20 minuti prima del test alla massima dose rinforzante (0.1 mg/kg), non ha mostrato variazioni di tali parametri. Parallelamente la somministrazione di CC4, 30 minuti prima del test, alle dosi di 0.1-5 e 10 mg/kg, non hanno alterato la motilità degli animali.

## **Studi condotti nel Topo**

### ***Andamento del peso corporeo e consumo di cibo***

In *figura 13 A* è riportato l'andamento del peso corporeo dei topi durante le 7 settimane di esposizione al fumo della sigaretta tradizionale o al vapore prodotto dalla sigaretta elettronica o ad aria. L'analisi di varianza a due vie, ha evidenziato una significativa differenza tra i tre gruppi in esame per quanto riguarda il trattamento ( $F_{(2,216)}=14.85$ ,  $P<0.0001$ ), il tempo ( $F_{(7,216)}=10.90$ ,  $P<0.0001$ ) ma non l'interazione tra i due parametri ( $F_{(14,216)}=1.2$ ,  $P=0.2$ ). Il test di Bonferroni ha rilevato un significativo decremento nel peso corporeo dei topi esposti al fumo della sigaretta tradizionale rispetto a quello degli altri gruppi a partire dal 14° giorno di esposizione. Inoltre, è stata osservata una differenza con il gruppo degli animali esposti al vapore della sigaretta elettronica l'ultimo giorno di esposizione (49° giorno). L'analisi *post hoc* ha rilevato un incremento del peso corporeo in tutti e tre i gruppi analizzati; tuttavia, il gruppo di topi esposti al fumo di sigaretta tradizionale mostra un incremento più rallentato. Risultati preliminari (non mostrati) indicano, inoltre, che nel successivo periodo di astinenza questo parametro tende ad aumentare e così i topi esposti al fumo delle sigarette convenzionali acquisiscono un peso sovrapponibile a quello degli animali appartenenti agli altri due gruppi.

In *figura 13 B* viene indicato il consumo di cibo durante il periodo di esposizione. L'analisi statistica ha evidenziato una significativa differenza tra i gruppi per quanto riguarda il trattamento ( $F_{(2,216)}=29.09$ ,  $P<0.0001$ ), il tempo ( $F_{(7,216)}=112.8$ ,  $P<0.0001$ ) e l'interazione tra i due parametri ( $F_{(14,216)}=1.92$ ,  $P=0.05$ ). L'analisi *post hoc* ha rilevato un significativo decremento del consumo di cibo da parte degli animali esposti al fumo di sigaretta tradizionale a partire dal 14° giorno di esposizione fino al 35°.

### ***Valutazione della cotinina presente a livello urinario***

La *figura 14* mostra l'andamento dei livelli di cotinina urinaria dopo 1, 4 e 7 settimane di esposizione. L'ANOVA a due vie evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i vari gruppi per quanto riguarda il trattamento ( $F_{(2,81)}=6.16$ ,  $P=0.003$ ), ma non il tempo ( $F_{(2,81)}=2.5$ ,  $P=0.07$ ) e l'interazione tra i due parametri ( $F_{(4,81)}=0.68$ ,  $P=0.56$ ). L'analisi *post hoc* ha rilevato che, dopo 1, 4 e 7 settimane di esposizione, i livelli di cotinina risultano statisticamente più alti nei gruppi di animali esposti al fumo della sigaretta tradizionale e al vapore della sigaretta elettronica, rispetto a quello esposto ad aria.

## ***Valutazione della nicotina/cotina presente a livello cerebrale***

Le concentrazioni (pg/mg) cerebrali di nicotina e cotina (*figura 15 A e B*), valutate alla fine delle 7 settimane di esposizione, risultano statisticamente differenti tra di i vari gruppi (nicotina:  $F_{(2,15)}=27.00$ ,  $P=0.01$ ; cotina:  $F_{(2,15)}=21.48$ ,  $P=0.01$ ; ANOVA). L'analisi *post hoc* mostra come il gruppo esposto al vapore della sigaretta elettronica esibisce un aumento statisticamente significativo dei livelli di nicotina rispetto agli altri due gruppi di esposizione ( $P<0.05$ , *figura 15 A*); al contrario il gruppo esposto al fumo di sigaretta tradizionale mostra un aumento significativo dei livelli cerebrali di cotina ( $P<0.0001$ ) (*figura 15 B*).

## ***Sindrome astinenziale precipitata con mecamilamina***

In *figura 16* sono riportati i dati ottenuti dall'osservazione comportamentale in seguito alla somministrazione di mecamilamina (1 mg/kg, s.c.) in termini di sintomi e segni (*A*) e di *global score* ottenuto dalla somma totale dei punteggi attribuiti (*B*). L'analisi statistica ha evidenziato un'effetto significativo per quanto riguarda lo sviluppo dei segni ( $F_{(2,27)}=8.15$ ,  $P=0.001$ , ANOVA) e dei sintomi ( $\chi^2=8.45$ ,  $P=0.01$ , Kruskal-Wallis test) (*figura 16 A*). L'analisi *post hoc* ha evidenziato la presenza di più segni nel gruppo esposto al fumo della sigaretta tradizionale rispetto al gruppo esposto al vapore della sigaretta elettronica e al gruppo controllo e ha rilevato un incremento nel numero dei sintomi nel gruppo esposto al vapore della sigaretta elettronica ed ancor più nel gruppo esposto al fumo della sigaretta convenzionale nei confronti del gruppo esposto ad aria. E' stata riscontrata una differente "severità" nella sindrome astinenziale precipitata tra i differenti gruppi ( $F_{(2,27)}=5.89$ ,  $P=0.01$ ; *figura 16 B*); il *global score* è risultato statisticamente più alto nel gruppo di animali esposti al fumo della sigaretta convenzionale, rispetto a quelli esposti al vapore della sigaretta elettronica e ad aria ( $\chi^2=10.15$ ,  $P=0.006$ , Kruskal-Wallis test).

## ***Attività motoria con mecamilamina***

In *figura 17* sono riportati i dati ottenuti dal monitoraggio dell'attività motoria degli animali, dopo trattamento con mecamilamina (1 mg/kg, s.c.), al termine delle 7 settimane di esposizione, ed espressi come movimenti orizzontali (*A*) e verticali (*B*), compiuti nell'arco di 15 minuti. L'ANOVA mostra differenze significative tra i vari gruppi sia per quanto riguarda i movimenti orizzontali ( $F_{(2,27)}=14.82$ ,  $P<0.001$ ) (*A*) che per quelli verticali ( $F_{(2,27)}=10.49$ ,  $P=0.0004$ ). Il test di

Tukey ha evidenziato una significativa riduzione dei movimenti orizzontali e verticali da parte degli animali che per 7 settimane sono stati esposti al fumo di sigaretta convenzionale, rispetto agli altri due gruppi.

## ***Studi biochimici e farmacologici***

### ***Studi di binding***

La *figura 18* riporta i risultati dello studio di *binding* recettoriale, eseguito dopo 7 settimane di esposizione al fumo, al vapore o ad aria. Vengono indicati i recettori legati all' $[^3\text{H}]$ -Epibatidina e le diverse subunità, quantificate ed espresse come fmol/mg di proteina a livello della corteccia cerebrale (A), del *nucleus accumbens* (B), dell'ippocampo (C), del *caudato putamen* (D), dell'abenula (E) e del nucleo interpeduncolare (F). Per quanto riguarda la corteccia cerebrale, l'ANOVA evidenzia una significativa differenza nel *binding* dell' $[^3\text{H}]$ -Epibatidina ai recettori eteromerici tra il gruppo controllo e quelli esposti al fumo della sigaretta tradizionale o al vapore del dispositivo elettronico ( $F_{(2, 27)}=9.63$ ,  $P=0.0009$ ). L'analisi *post hoc* mostra che l'effetto del dispositivo elettronico risulta maggiore rispetto a quello prodotto dall'esposizione alla sigaretta convenzionale. Gli esperimenti di immunoprecipitazione evidenziano un'*upregulation* dei recettori contenenti il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$  soprattutto negli animali esposti alla sigaretta elettronica ( $\alpha_4$ :  $F_{(2,27)}=10.78$ ,  $P=0.0002$ ;  $\beta_2$ :  $F_{(2,27)}=8.93$   $P=0.0008$ , ANOVA); nessun effetto è stato riscontrato per quanto riguarda il sottotipo recettoriale contenente la subunità  $\alpha_5$ . Gli studi biochimici e farmacologici effettuati a livello del *nucleus accumbens* hanno mostrato un significativo incremento, nei due gruppi esposti ai due tipi di sigarette rispetto al gruppo controllo, nel *binding* recettoriale dell' $[^3\text{H}]$ -Epibatidina ( $F_{(2,27)}=21.65$ ,  $P=0.0018$ ). Anche in questo caso si evidenzia un'*upregolazione* dei recettori contenenti le subunità  $\alpha_4$  e  $\beta_2$ , soprattutto nel gruppo esposto alla sigaretta tradizionale ( $\alpha_4$ :  $F_{(2,27)}=7.5$ ,  $P=0.0068$ ;  $\beta_2$ :  $F_{(2,27)}=15.8$   $P=0.0002$ , ANOVA). Gli esperimenti di immunoprecipitazione hanno evidenziato un significativo incremento del numero dei recettori contenenti il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$ , mentre risultano inalterati quelli contenenti le subunità  $\alpha_5$  e  $\alpha_6$ .

Anche a livello dell'ippocampo, l'analisi statistica ha mostrato un significativo aumento del *binding* recettoriale dell' $[^3\text{H}]$ -Epibatidina nel gruppo di topi esposti alla sigaretta convenzionale o elettronica rispetto a quelli precedentemente esposti ad aria ( $F_{(2,27)}=27.27$ ,  $P=0.0032$ ). Anche in questa area cerebrale si evidenzia un significativo incremento della subunità  $\alpha_4\beta_2$  ( $\alpha_4$ :  $F_{(2,27)}=7.25$ ,  $P=0.0069$ ;  $\beta_2$ :  $F_{(2,27)}=8.16$   $P=0.0045$ , ANOVA); al contrario, non si evidenziano variazioni a



livello della subunità  $\alpha_5$ .

A livello del *caudato putamen* si evidenzia un incremento del *binding* recettoriale dell' $^3\text{H}$ -Epibatidina nei due gruppi esposti ai due tipi di sigaretta, che tuttavia non risulta statisticamente significativo. L'ANOVA mostra un aumento significativo per quanto riguarda i recettori contenenti la subunità  $\beta_2$ , soprattutto negli animali esposti alla sigaretta convenzionale. Non sono state riscontrate differenze per quanto riguarda i recettori contenenti la subunità  $\alpha_5$  e  $\alpha_6$ .

Infine gli studi biochimici e farmacologici condotti a livello dell'abenula e del nucleo interpeduncolare non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi per quanto riguarda l'espressione dei recettori contenenti le subunità  $\alpha_3\beta_4$  e  $\beta_2$ .

## ***Sindrome astinenziale spontanea***

### ***Attività motoria spontanea***

In *figura 19* è riportato l'effetto dell'esposizione al fumo della sigaretta tradizionale o al vapore della sigaretta elettronica o ad aria, sull'attività motoria spontanea dei topi, espressa come numero dei movimenti orizzontali, registrati nell'arco di 15 minuti in un'*activity cage* automatizzata. L'ANOVA a due vie non ha evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa né per quanto riguarda il trattamento ( $F_{(2,135)}=0.456$ ,  $P=0.74$ , ns), né per quanto riguarda il tempo ( $F_{(4,135)}=1.953$ ,  $P=0.632$ ), né per l'interazione tra i due parametri ( $F_{(8,135)}=1.203$ ,  $P=0.99$ , ns).

### ***Spatial Object Recognition***

In *figura 20* sono riportati i dati relativi al test dello *Spatial Object Recognition*, per la valutazione della memoria spaziale. L'ANOVA a due vie ha evidenziato una significativa differenza tra i diversi gruppi per quanto riguarda il trattamento ( $F_{(2,135)}=63.36$ ,  $P<0.0001$ ), ma non per quanto riguarda il tempo ( $F_{(4,135)}=0.217$ ,  $P=0.94$ , ns) e l'interazione tra i due parametri ( $F_{(8,135)}=3.681$ ,  $P=0.12$ , ns). L'analisi *post hoc* ha mostrato un significativo decremento dell'indice di discriminazione nei gruppi esposti ai due tipi di sigaretta rispetto al gruppo controllo per tutto il periodo considerato; dopo 24 ore dalla fine dell'esposizione, gli animali esposti al fumo di sigaretta tradizionale esibiscono un *deficit* significativo nella loro *performance* anche rispetto ai topi esposti al vapore della sigaretta elettronica, mostrando un indice di discriminazione statisticamente minore ( $P<0.05$ ).

### ***Elevated Plus Maze***

In *figura 21* sono rappresentati i risultati dell'*Elevated Plus Maze*, espressi come percentuale di entrate (A) e tempo (B) speso nei bracci aperti a 24 ore, 15, 30, 60 e 90 giorni di astinenza. Per quanto riguarda le entrate nei bracci aperti (A), l'analisi di varianza a due vie ha rilevato una differenza significativa sia per quanto riguarda il tempo ( $F_{(4,135)}=8.969$ ,  $P<0.0001$ ) che per quanto riguarda il trattamento ( $F_{(2,135)}=62.16$ ,  $P<0.0001$ ) e l'interazione tra i due parametri ( $F_{(8,135)}=6.358$ ,  $P<0.0001$ ). L'analisi *post hoc* ha evidenziato un significativo decremento del parametro nei gruppi esposti al fumo o al vapore nei confronti dei controlli per tutti gli intervalli di tempo considerati. Inoltre, da 24 ore a 30 giorni di astinenza, il numero di entrate nei bracci aperti degli animali esposti al fumo di sigaretta convenzionale risulta sempre inferiore rispetto al gruppo esposto al vapore della sigaretta elettronica, suggerendo un profilo più ansioso da parte di questi animali, soprattutto nei primi periodi di astinenza. Parallelamente, l'analisi statistica ha riscontrato differenze significative nella percentuale di tempo speso nei bracci aperti (B), per quanto concerne il tempo ( $F_{(4,135)}=22.11$ ,  $P<0.0001$ ), il trattamento ( $F_{(2,135)}=37.28$ ,  $P<0.0001$ ) ma non l'interazione tra i due parametri ( $F_{(8,135)}=2.901$ ,  $P=0.203$ , ns). Il test di Bonferroni ha rilevato un significativo decremento del tempo speso nei bracci aperti da parte degli animali esposti al fumo della sigaretta convenzionale rispetto agli altri due gruppi a 24 ore. Dopo 15, 30, 60 e 90 giorni di astinenza invece, il tempo speso nei bracci aperti sia degli animali esposti al fumo che di quelli esposti al vapore risulta significativamente decrementato rispetto a quello del gruppo controllo.

### ***Marble burying test***

In *figura 22* sono riportati i dati relativi al *Marble burying test*, volti a valutare alterazioni a livello emozionale, sulla base del numero di biglie sotterrate (A) e della latenza al primo sotterramento (B). Per quanto riguarda il numero di biglie sotterrate, l'analisi di varianza a due vie ha evidenziato una significativa differenza tra i gruppi per quanto concerne il trattamento ( $F_{(2,135)}=29.38$ ,  $P<0.0001$ ), il tempo ( $F_{(4,135)}=11.06$ ,  $P<0.001$ ) e l'interazione tra i due parametri ( $F_{(8,135)}=8.785$ ,  $P=0.0049$ ). Il test di Bonferroni ha evidenziato un significativo e progressivo incremento di tale parametro da parte degli animali esposti al fumo della sigaretta convenzionale e al vapore della sigaretta elettronica a partire da 24 ore fino a 90 giorni di astinenza. In particolare a 30 giorni si assiste ad un incremento significativo del numero di biglie sotterrate da parte degli animali esposti al vapore della sigaretta elettronica nei confronti di quelli esposti al

fumo della sigaretta convenzionale.

Per quanto riguarda la latenza impiegata dall'animale a sotterrare la prima biglia, l'ANOVA a due vie ha evidenziato significative differenze per quanto riguarda il tempo ( $F_{(4,135)}=8.279$ ,  $P<0.0001$ ), il trattamento ( $F_{(2,135)}=71.98$ ,  $P<0.0001$ ) e l'interazione tra i due parametri ( $F_{(8,135)}=6.689$ ,  $P<0.0001$ ). L'analisi *post hoc* ha rilevato differenze significative nelle latenze dei gruppi di topi esposti al fumo della sigaretta convenzionale e al vapore della sigaretta elettronica, rispetto al gruppo controllo, da 24 ore a 90 giorni di astinenza. Inoltre, a 30 e soprattutto a 60 giorni di astinenza, gli animali esposti al vapore della sigaretta elettronica mostrano un'ulteriore diminuzione della latenza al primo sotterramento che diventa statisticamente significativa anche nei confronti del gruppo esposto al fumo.

### ***Tail suspension test***

In *figura 23* sono raffigurati i risultati ottenuti nel *Tail Suspension test*, eseguito 15, 30, 60 e 90 giorni dall'ultima esposizione. L'analisi di varianza a due vie ha mostrato una significatività tra i gruppi per quanto riguarda il tempo ( $F_{(3,108)}=19.45$ ,  $P<0.0001$ ), il trattamento ( $F_{(2,108)}=13.75$ ,  $P<0.0001$ ) e l'interazione tra i due parametri ( $F_{(6,108)}=25.95$ ,  $P<0.0001$ ). Il test di Bonferroni ha rilevato un significativo decremento del tempo di *immobility* tra gli animali esposti al fumo di sigaretta convenzionale rispetto agli altri due gruppi a 15 e 30 giorni di astinenza. A partire da 60 giorni, per il gruppo degli animali esposti al vapore della sigaretta elettronica, e da 90 giorni, per quelli esposti al fumo della sigaretta convenzionale, si assiste ad un incremento statisticamente significativo del tempo di *immobility* rispetto ai topi controllo.

### ***Sucrose preference test***

In *figura 24* sono riportati i dati relativi al *Sucrose preference test*, volto a misurare l'anedonia, valutata come percentuale di animali anedonici durante due giorni di esposizione. Il test di Fischer mostra che, a partire dai 30 giorni di astinenza, si assiste ad un progressivo incremento della percentuale degli animali esposti ai due tipi di sigarette che risultano anedonici, ossia consumano meno del 50% di saccarosio rispetto al totale bevuto. In particolare, tale percentuale di animali diventa statisticamente significativa a 60 giorni per quanto riguarda il gruppo esposto al vapore del dispositivo elettronico e a 90 giorni per quello esposto al fumo, rispetto al gruppo controllo; infine, sempre a 90 giorni, la percentuale di topi anedonici esposti alla sigaretta elettronica risulta statisticamente maggiore anche di quella degli animali esposti al fumo.

# *Discussione*

Dai nostri risultati è emerso che lo *Zebrafish* si presenta come un valido modello per lo *screening* delle sostanze d'abuso ed in particolare per lo studio dell'*addiction*. Infatti recentemente, questo animale è stato impiegato in moltissimi studi, in alternativa ai roditori, in quanto possiede numerosi vantaggi: è un animale economico, maneggevole, di piccole dimensioni, facilmente reperibile e può essere testato in tempi piuttosto brevi. Inoltre da un punto di vista evolutivo, presenta numerose analogie con i vertebrati, quali i roditori (Langheinrich, 2003; Delvecchio *et al.*, 2011).

Mentre il test della CPP è ampiamente utilizzato sui roditori, solo negli ultimi anni questa metodica è stata utilizzata sullo *Zebrafish* per dimostrare gli effetti rinforzanti di alcune sostanze, come la cocaina (Darland *et al.*, 2001), l'amfetamina (Ninkovic *et al.*, 2006), la Salvinorina A (Braidia *et al.*, 2007) e la morfina (Bretaud *et al.*, 2007).

I nostri risultati hanno dimostrato, mediante il test della CPP, che la nicotina ha un chiaro effetto rinforzante nello *Zebrafish*. Infatti si è registrato un significativo aumento del tempo speso nel compartimento associato alla droga alla dose di 0.001 mg/kg (i.m.). Inoltre, la valutazione dei livelli di nicotina a livello cerebrale e periferico mostra come lo *Zebrafish* sia un modello animale molto sensibile alle basse concentrazioni di nicotina, come riportato anche da Kedikian (2013). L'incremento dose dipendente dei livelli di nicotina cerebrale risulta paragonabile con quello riscontrato nei cervelli dei fumatori (Matta *et al.*, 2007). Parallelamente i nostri risultati hanno riscontrato un incremento dose-dipendente maggiore a livello dei tessuti periferici, dovuto probabilmente alle diverse proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche della nicotina nei diversi tessuti. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Kily e collaboratori, nel 2008, e da Kedikian e collaboratori nel 2013. E' interessante notare che i nostri risultati sono in accordo con quelli ottenuti da questi autori che hanno utilizzato una diversa via di somministrazione, che prevede di sciogliere la nicotina in un volume fisso di acqua dell'*acquario test*. Nel nostro studio le somministrazioni sono state eseguite per via i.m. e ciò consente un migliore controllo sulla dose effettivamente iniettata all'animale.

Gli effetti rinforzanti provocati dalla nicotina sono potenzialmente dovuti all'interazione con i diversi sottotipi recettoriali nicotinici, implicati negli effetti di rinforzo di molte sostanze d'abuso (Bell *et al.*, 2009). Tra questi, il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$  lega ad alta affinità la nicotina ed è ampiamente distribuito nel sistema nervoso centrale, in particolare nelle aree dopaminergiche, principali responsabili degli effetti di *reward* (Corrigall *et al.*, 1992; Wonnacott *et al.*, 2005). Il sistema dopaminergico mesolimbico dei mammiferi è costituito da neuroni dopaminergici i cui corpi cellulari sono localizzati a livello della VTA e le cui proiezioni raggiungono lo striato ventrale, la corteccia prefrontale e l'amigdala. Lo *Zebrafish* non ha neuroni dopaminergici a livello del

mesencefalo, ma studi presenti in letteratura hanno identificato un sistema dopaminergico essenziale per le risposte di *reward* nei quali i neuroni dopaminergici dell'ipotalamo dorsale proiettano allo striato ventrale e dorsale. E' stato suggerito che queste proiezioni rappresentano il sistema meso-striatale e il sistema meso-limbico (Rink *et al.*, 2002). Tuttavia, l'organizzazione neuroanatomica dei neuroni dopaminergici nello *Zebrafish* e nei mammiferi risulta essere simile (Panula *et al.*, 2010; Klee *et al.*, 2011) e l'aumento dei livelli di DOPAC (un metabolita della dopamina) durante l'apprendimento indotto dalla nicotina, suggerisce che la nicotina, anche nello *Zebrafish*, aumenta l'attività dopaminergica (Eddins *et al.*, 2009).

Per capire, nello *Zebrafish*, su quali sottotipi recettoriali nicotinici agisse la nicotina per indurre gli effetti di *reward*, sono stati utilizzati differenti antagonisti selettivi,  *$\alpha$ -conotoxin MII* (MII), *methyllycaconitine* (MLA) e *dihydro- $\beta$ -erythroidine* (Dh $\beta$ E) specifici rispettivamente per i sottotipi  $\alpha_6\beta_2$ ,  $\alpha_7$  e  $\beta_2$ . I nostri risultati hanno dimostrato che la mecamilamina, antagonista non selettivo, il Dh $\beta$ E (in maniera molto efficiente) e l'MLA bloccano completamente l'effetto rinforzante della nicotina; al contrario l'MII, antagonista del sottotipo  $\alpha_6\beta_2$  (Pucci *et al.*, 2011), non altera la CPP indotta da nicotina.

Dal momento che, studi di letteratura hanno dimostrato che la citisina, nonostante i primi risultati promettenti, può provocare seri effetti collaterali che ne impediscono l'impiego nella terapia per lo *smoking cessation*, la ricerca ultimamente si sta focalizzando sulla ricerca di nuovi composti derivati o analoghi della citisina. Dimostrata la validità dello *Zebrafish* come modello animale per lo studio delle proprietà di *reward* della nicotina, derivati della citisina sono stati testati utilizzando il modello della CPP. In particolare il CC4 è stato scelto perché questo composto risulta altamente selettivo per il sottotipo recettoriale nicotinico  $\alpha_4\beta_2$  e la sua lipofilità è soltanto 5 volte minore rispetto alla nicotina ma 17 volte più della citisina. Dal momento che la lipofilità è un fattore importante per l'assorbimento e il passaggio della barriera ematoencefalica, questo indica che il CC4 potrebbe essere un buon candidato per lo *smoking cessation*.

I nostri risultati hanno dimostrato che il CC4, il CC26, la citisina e la vareniclina sono in grado di indurre CPP in maniera assolutamente paragonabile alla nicotina, inducendo un significativo aumento del tempo speso nel compartimento associato alla droga. In particolare, il massimo effetto rinforzante del CC26 e del CC4 viene raggiunto a dosi che sono rispettivamente 10 volte (0.01 mg/kg) e 100 volte (0.1 mg/kg) più alte della nicotina (0.001 mg/kg); per quanto riguarda la vareniclina e la citisina, queste raggiungono il loro massimo effetto rinforzante a concentrazioni che risultano rispettivamente 1000 e 2500 volte più alte della nicotina. Dal nostro studio emerge anche che quando questi composti vengono somministrati insieme

all'alcaloide del tabacco, possiedono proprietà di antagonisti sul rinforzo da nicotina, annullandone completamente l'effetto rinforzante.

Studi di letteratura hanno precedentemente caratterizzato il CC4 per i suoi effetti sui recettori di mammifero. Il CC4 e il CC26 sono composti costituiti da due residui di citisina uniti da una catena polimetilenica di diversa lunghezza (tale catena risulta più lunga nel CC26). La differente grandezza di queste molecole rispetto alla citisina li rende capaci di discriminare i sottotipi recettoriali in modo diverso rispetto alla citisina. Infatti la citisina è un agonista potente e completo per il sottotipo  $\alpha_7$ , un buon agonista per i sottotipi contenenti la subunità  $\beta_4$ , ma solo un agonista parziale per i sottotipi  $\alpha_4\beta_2$ . Il CC4 nel mammifero mantiene le caratteristiche farmacologiche di un agonista parziale verso i recettori  $\beta_2$  ma è diventato un antagonista con bassa affinità verso i sottotipi  $\alpha_7$  e  $\alpha_3\beta_4$ . Anche il CC26, che recentemente nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato migliorare la memoria spaziale (Braidà *et al.*, 2013), sembra mantenere tutte le caratteristiche farmacologiche di un agonista parziale verso i recettori nicotinici  $\beta_2$ . Analogamente a quanto trovato nel mammifero, anche nello *Zebrafish* la citisina mantiene verso i recettori che legano l' $\alpha$ -bungarotossina un'alta affinità, mentre il CC4 e il CC26 risultano avere, rispetto alla citisina, un'affinità molto ridotta verso questa classe di recettori. Inoltre, comportandosi come agonisti parziali, questi composti agiscono da agonista se somministrati da soli e da antagonisti se somministrati insieme alla nicotina (in quanto competono con tale sostanza per il legame ai recettori nicotinici). In accordo con questo comportamento di agonista/antagonista, anche nel nostro modello sperimentale, il trattamento con CC4 e CC26 da solo determina CPP, mentre la loro somministrazione, alla dose di 5 e 1 mg/kg, 10 minuti prima della nicotina, induce un significativo decremento degli effetti rinforzanti della nicotina utilizzata alla dose risultata massimamente rinforzante (0.001 mg/kg). Inoltre, in cellule in coltura, il trattamento cronico con CC4 aumenta il numero di recettori nicotinici contenenti le subunità  $\beta_2$  e  $\alpha_7$  in *pools* intracellulari e in membrana, dove sono funzionalmente attivi; nel caso dei recettori contenenti la subunità  $\beta_2$ , i risultati ottenuti hanno portato a ipotizzare che il CC4, legandosi ai recettori intracellulari, compori una riorganizzazione conformazionale delle subunità intracellulari, che favorirebbe l'assemblaggio e il traffico dei recettori nella membrana plasmatica (Riganti *et al.*, 2005).

Ad oggi, in letteratura, sono stati riportati pochi studi che hanno utilizzato agonisti e antagonisti colinergici nella terapia *anti-addiction*. I nostri risultati, tuttavia, dimostrano che il blocco degli effetti rinforzanti della nicotina, si ottiene, oltre che con il CC4 e il CC26, anche pretrattando con citisina 2.5 mg/kg, vareniclina 7.5 mg/kg o mecamilamina 0.1 mg/kg.

Studi analoghi condotti da Biala e collaboratori nel 2010, utilizzando come modello animale il

ratto, dimostrato che il pretrattamento con vareniclina, agonista parziale della subunità  $\alpha_4\beta_2$  e agonista pieno  $\alpha_7$  e  $\alpha_3\beta_4$  (Coe *et al.*, 2005; Foulds, 2006; Mihalak *et al.*, 2006), o con mecamilamina riduce l'acquisizione della CPP da nicotina. La vareniclina, agonista parziale dei recettori nicotinici, somministrata da sola, determina un'attivazione del sistema dopaminergico, a livello del *nucleus accumbens*, inferiore del 40-60% rispetto all'attivazione provocata dalla nicotina. Quindi anche questo composto è in grado di indurre CPP e provocare effetti di *reward*, agendo a livello del sistema dopaminergico mesolimbico (Rollema *et al.*, 2011). Spiller e collaboratori, nel 2009, hanno dimostrato come, nei ratti, la somministrazione sistemica di vareniclina ha un effetto di *reward*, bifasico e dose-dipendente, provocato dalla stimolazione elettrica. Tuttavia, il pretrattamento con vareniclina riduce il rilascio di dopamina, nicotina-dipendente, al livello del *nucleus accumbens*, bloccando gli effetti dell'alcaloide del tabacco a livello del SNC e quindi inibendo l'autosomministrazione di nicotina (Rollema *et al.*, 2007; O'Connor *et al.*, 2010). Quindi, la vareniclina, di fatto, agisce come la mecamilamina, noto antagonista nicotinico (Coe *et al.*, 2005; Rollema *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007). Inoltre, la vareniclina è in grado di diminuire in modo dose-dipendente l'autosomministrazione di nicotina sia in ratti a cui era permesso un accesso limitato (1 ora al giorno) sia in ratti a cui era permesso libero accesso (23 ore al giorno) all'alcaloide del tabacco (George *et al.*, 2011). Studi clinici hanno dimostrato che la vareniclina è superiore al bupropione nel promuovere la cessazione dal fumo e la somministrazione prolungata di vareniclina ha dimostrato ridurre le ricadute nei fumatori che erano in astinenza, almeno nei primi 12 settimane dopo la terapia iniziale (Gonzales *et al.*, 2006; Tonstad, 2006; Benowitz, 2009).

Parallelamente, per verificare che gli effetti rinforzanti riscontrati non fossero dovuti a problemi motori, abbiamo testato le capacità natatorie dello *Zebrafish*, in seguito al trattamento con questi composti. I dati ricavati dal test volto a valutare l'attività natatoria non hanno evidenziato alcuna differenza significativa tra i vari gruppi di trattamento, in quanto non vi erano grandi differenze in termini di linee attraversate, dimostrando che la capacità natatoria risultava invariata. Dal momento che in letteratura mancano studi sui differenti sottotipi recettoriali nel SNC dello *Zebrafish*, è stata effettuata una caratterizzazione farmacologica volta a confermare i dati comportamentali. I nostri studi, condotti in collaborazione con la Dott.ssa Gotti, hanno dimostrato la presenza di almeno due classi di recettori nicotinici: i recettori che legano ad alta affinità la [ $^3\text{H}$ ]-Epibatidina ( $K_d= 0.026$  nM) e i recettori che legano ad alta affinità la [ $^{125}\text{I}$ ]- $\alpha$ bungarotossina ( $K_d=0.42$  nM). I dati di *binding*, insieme con i dati di caratterizzazione farmacologica indicano fortemente che i recettori che legano la [ $^{125}\text{I}$ ]- $\alpha$ bungarotossina sono quelli contenenti la subunità  $\alpha_7$ , ma la dimostrazione conclusiva si avrà solo o con l'espressione



in sistemi eterologhi del cDNA di  $\alpha_7$  di *Zebrafish* e/o mediante immunoprecipitazione dei recettori della  $\alpha$ bungarotossina da parte di anticorpi diretti contro la subunità  $\alpha_7$  di *Zebrafish*.

La classe dei recettori che lega la [ $^3\text{H}$ ]-Epibatidina con alta affinità è chiaramente distinta e diversa farmacologicamente da quella che lega la [ $^{125}\text{I}$ ]- $\alpha$ bungarotossina. Finora sono state clonate diverse subunità, tra cui  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_4$  (Zirger *et al.*, 2003; Ackerman *et al.*, 2009) che codificano per le subunità presenti nei recettori eteromerici di *Zebrafish*. Inoltre, negli embrioni di *Zebrafish* la presenza di subunità  $\alpha_2$ ,  $\alpha_7$  e  $\beta_3$  è stata dimostrata mediante RT-PCR tra 2 e 8 ore dopo la fecondazione (Zirger *et al.*, 2003).

Nello *Zebrafish* adulto la presenza di nAChRs è stata dimostrata in maniera indiretta mediante l'utilizzo di antagonisti noti dei nAChRs volti a revertire gli effetti della nicotina, non solo dai nostri esperimenti, ma anche da altri autori (Svoboda *et al.*, 2002; Bencan *et al.*, 2008; Eddins *et al.*, 2009; Levin *et al.*, 2009). Anche nei nostri studi l'utilizzo dell'MLA, dell'MII e dell'DH $\beta$ E si è dimostrato capace di bloccare l'azione della nicotina in modo selettivo solo su particolari sottotipi recettoriali nicotinici, confermando che anche nello *Zebrafish* esistono differenti sottotipi nAChR che partecipano nel modulare i diversi effetti indotti dall'alcaloide del tabacco.

Tuttavia, al momento, non possiamo definire con esattezza la composizione in subunità dei recettori eteromerici presenti nel SNC di *Zebrafish*. Sia i nostri studi di caratterizzazione farmacologica dei recettori eteromerici presenti nello *Zebrafish*, che i dati presenti in letteratura, indicano che i sottotipi  $\alpha_4\beta_2$  e  $\alpha_6\beta_2$  possano essere i responsabili degli effetti additivi della nicotina. I nostri dati di competizione con agonisti nicotinici mostrano che l'epibatidina, la nicotina, la citisina, il CC26 e il CC4 mostrano un'alta affinità per i recettori eteromerici, mentre mostrano un'affinità molto più bassa per i recettori sensibili alla [ $^{125}\text{I}$ ]- $\alpha$ bungarotossina. Inoltre, proprio i recettori eteromerici che legano [ $^3\text{H}$ ]-Epibatidina con alta affinità, presumibilmente che contengono il sottotipo  $\alpha_4\beta_2$ , e che sono bloccati dal DH $\beta$ E, dal CC4, dal CC26 e dalla mecamilamina, sono implicati nel mediare la CPP nello *Zebrafish*. Per quanto concerne il blocco della CPP indotto dall'MLA, anche se gli studi di *binding* hanno mostrato che questo antagonista ha un'affinità 2000 volte maggiore per i recettori contenenti la subunità  $\alpha_7$ , questo può essere spiegato dal fatto che i ligandi selettivi per i recettori  $\alpha_7$  dei mammiferi, hanno un *range* di attività superiore nello *Zebrafish* rispetto ai mammiferi (Papke *et al.*, 2012). I nostri risultati, ottenuti sia dagli esperimenti comportamentali, sia dalla caratterizzazione biochimica, dimostrano quindi che il sottotipo recettoriale nicotinico  $\alpha_4\beta_2$  è implicato nell'induzione della CPP nello *Zebrafish*. I nostri dati sono in linea con uno studio in cui il pretrattamento di topi C57BL/6 con l'antagonista mecamilamina e con il DH $\beta$ E (2 mg/kg, s.c.) blocca la CPP indotta dalla nicotina; inoltre, studi presenti in letteratura dimostrano che nei topi *knock-out* per il

recettore  $\beta_2$  la nicotina non è in grado di indurre *reward*, mentre topi *knock-out* per il recettore  $\alpha_7$  mostrano chiaramente tutti gli effetti rinforzanti dati dall'alcaloide del tabacco (Grabus *et al.*, 2006; Walters *et al.*, 2006).

Studi di comparazione computazionale tra sequenze geniche codificanti i nAChRs tra uomo e *Zebrafish* hanno evidenziato che 11 geni sono ortologhi tra le due specie, dimostrando quindi un alto grado di conservazione genica per le sequenze codificanti i nAChRs (Sprague *et al.*, 2006). Tuttavia, ad oggi, nessun gruppo di ricerca ha ancora identificato in modo conclusivo tutte le sottoclassi recettoriali nicotiniche presenti nel cervello dello *Zebrafish* e i nostri risultati di caratterizzazione farmacologica sono molto promettenti ma non definitivi nel definire le sottoclassi di recettori presenti.

Nonostante l'incoraggiante risultato ottenuto con questi agonisti parziali, l'utilizzo dello *Zebrafish* come modello animale in studi preclinici sull'*addiction* da nicotina presenta alcune limitazioni. Essendo un vertebrato non appartenente ai mammiferi, lo *Zebrafish* è evolutivamente più distante dall'uomo rispetto ad altre specie animali come i roditori. Inoltre il genoma di questo pesce ha subito un evento duplicativo addizionale nel corso dell'evoluzione: quindi, alcuni geni possono essere in duplice copia e non trovare perfetta corrispondenza con il genoma umano. Molti protocolli sperimentali sono stati traslati e adattati dal roditore allo *Zebrafish*, non sempre però con risultati ottimali. Manca inoltre il supporto della letteratura e di articoli scientifici a riguardo. Le conoscenze sui meccanismi di assorbimento e metabolizzazione delle sostanze nello *Zebrafish* sono scarse e richiedono studi ulteriori. Morfologicamente, l'anatomia dei centri nervosi superiori è stata descritta a livello generale, ma mancano informazioni e conoscenze dettagliate (Klee *et al.*, 2011).

Per questi motivi, ulteriore scopo di questo lavoro è stato quello di verificare i risultati ottenuti anche in un modello animale mammifero, il ratto, utilizzando non solo il test della *Conditioned Place Preference* ma anche quello dell'*Intracerebroventricular Self Administration*, allo scopo di indagare ancora più a fondo l'effetto dei composti nicotinici sui diversi modelli di *nicotine addiction*.

Per prima cosa è stato confermato l'effetto di *reward* della nicotina. I risultati ottenuti, utilizzando il classico test della CPP, dimostrano che nei ratti l'esposizione alla nicotina induce chiari effetti rinforzanti, ad una dose pari a 0.1 mg/kg. I nostri dati sono confermati da numerosi studi presenti in letteratura, in cui si dimostra come la nicotina sia in grado di indurre CPP, anche a dosi superiori rispetto a quelle utilizzate per il nostro esperimento (Kota *et al.*, 2007). Parimenti, nel test dell'autosomministrazione icv, la concentrazione 0.1  $\mu$ g/infusione, incrementa significativamente il numero di battute sulla leva associata alla nicotina, suggerendo effetti

rinforzanti dell'alcaloide del tabacco anche in questo test.

Sempre mediante autosomministrazione, è stata riportata una chiara dimostrazione degli effetti rinforzanti della nicotina nei primati non umani (Le Foll *et al.*, 2007). Questo studio è stato eseguito con scimmie scoiattolo *naive*, che non avevano subito alcuna precedente esposizione ad altre sostanze d'abuso. Durante il corso di sedute ripetute, le scimmie hanno sviluppato una forte preferenza per la leva associata alla nicotina, in un *range* di dosi tra lo 0.003 e 0.06 mg/kg/infusione, con un picco alle dosi di 0.01 e 0.03mg/kg/infusione.

Come nello *Zebrafish*, i nostri studi hanno dimostrato, utilizzando il classico test della CPP, che anche nel ratto, l'esposizione alla citisina e al CC4 ha prodotto chiari effetti rinforzanti rispettivamente alle dosi di 0.1-0.5 e 0.1 mg/kg, come indicato da un aumento del tempo speso nel compartimento associato alla droga nel giorno di post-condizionamento. Dosi più basse o più alte non hanno prodotto alcun effetto statisticamente significativo. Nel test dell'autosomministrazione icv, il CC4, a partire dalla concentrazione di 0.003 µg/infusione fino a quella di 0.3 µg/infusione, determina un incremento del numero di battute rispetto a veicolo, suggerendo un chiaro effetto rinforzante. Per quanto riguarda la citisina, nell'autosomministrazione icv, il numero di battute della leva associata alla droga rimane invece sempre nettamente inferiore rispetto a quella associata al veicolo. Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti precedentemente con la citisina in un test di autosomministrazione endovenosa nei topi (Rasmussen *et al.*, 1998). In questi studi la citisina viene autosomministrata alle stesse dosi della nicotina e la curva dose-risposta sembra essere piuttosto simile per entrambi i composti (Rasmussen *et al.*, 1998). Inoltre, ratti che ricevono iniezioni di citisina nella VTA spendono significativamente più tempo nel compartimento associato alla droga rispetto a quello associato al veicolo (Museo *et al.*, 1994). Questi risultati dimostrano la capacità della citisina di essere un agonista dei recettori nicotinici per l'acetilcolina; a confermarlo ci sarebbe anche la sua struttura molecolare molto simile a quella della nicotina; inoltre, gli studi di *binding* hanno dimostrato che la citisina presenta affinità e distribuzione verso siti specifici nel cervello comparabili a quelli della nicotina (Pabreza *et al.*, 1991). La citisina agisce soprattutto a livello gangliare, ma sono stati dimostrati anche effetti centrali collegati alla stimolazione colinergica.

In aggiunta a tutte le attività farmacologiche classiche degli agonisti della nicotina, Rao e collaboratori, nel 1996, hanno esaminato l'effetto di nicotina, citisina ed epibatidina sul rilascio di [<sup>3</sup>H]-norepinefrina, [<sup>3</sup>H]-dopamina e [<sup>3</sup>H]-serotonina a livello della corteccia prefrontale di ratto. Dai risultati emerge che tutti gli agonisti provocano un simile aumento del rilascio di [<sup>3</sup>H]-norepinefrina e [<sup>3</sup>H]-dopamina, ma con ordine diverso di potenza; l'epibatidina risulta l'agonista più potente e la citisina si dimostra essere più efficace della nicotina sull'aumento del

rilascio di [<sup>3</sup>H]-norepinefrina mentre manifesta un effetto simile alla nicotina sul rilascio della [<sup>3</sup>H]-dopamina. Tutti i composti non hanno alcun effetto significativo sul rilascio di [<sup>3</sup>H]-serotonina (Rao *et al.*, 1996).

Allo scopo di mettere in luce l'attività antagonista del CC4, in comparazione con la mecamilamina, abbiamo sottoposto ulteriori gruppi di animali al pretrattamento con il composto, prima del test della CPP. I risultati del nostro studio dimostrano che nel ratto il pretrattamento con mecamilamina (10 mg/kg) o CC4 (5 e 10 mg/kg), somministrati prima della nicotina e del rispettivo veicolo, induce un significativo decremento degli effetti rinforzanti della nicotina utilizzata alla dose risultata massimamente rinforzante (0.1 mg/kg). Parimenti, nel test dell'autosomministrazione icv, il pre-trattamento quotidiano con CC4 (5 mg/kg) riduce significativamente il numero di battute della leva associata alla nicotina in maniera del tutto simile a quello osservato con la mecamilamina (Bacher *et al.*, 2009).

Per escludere che gli effetti osservati nella CPP e nell'autosomministrazione fossero dovuti ad effetti sulla motilità, è stata valutata anche l'attività motoria, monitorando il numero di movimenti orizzontali e verticali compiuti nell'arco di 30 minuti, in seguito a somministrazione di nicotina o CC4. La somministrazione di nicotina alla massima dose rinforzante (0.1 mg/kg) non ha mostrato variazioni di tali parametri; parallelamente, le somministrazioni di CC4, alle dosi di 0.1-5-10 mg/kg, non hanno alterato la motilità degli animali.

Interessante è notare che l'effetto rinforzante del CC4 è ottenuto nello stesso *range* di dosi sia nello *Zebrafish* che nel ratto, suggerendo quindi l'omologia di risposta tra roditori e *Zebrafish*. Si può affermare quindi che lo *Zebrafish* risulta un valido modello per mettere in luce gli effetti rinforzanti di sostanze d'abuso e per lo studio degli antagonisti.

Inoltre, i dati da noi ottenuti hanno dimostrato che il CC4 si comporta come un agonista parziale, in quanto se viene somministrato di per sé a basse dosi, produce effetti rinforzanti, sia in ratti Wistar (0.1 mg/kg) che nello *Zebrafish* (0.01-1 mg/kg), mentre le dosi 5 mg/kg per lo *Zebrafish* e 5 e 10 mg/kg per il ratto ne antagonizzano gli effetti rinforzanti della nicotina. Il CC4 si identifica quindi come farmaco chiave nella terapia *anti-addiction* da nicotina. Il suo effetto esclusivamente rivolto ai recettori eteromerici lo rende ideale per contrastare l'insorgenza dell'*addiction* da nicotina mediata proprio da tali recettori (Picciotto *et al.*, 1998; Mansvelder *et al.*, 2002; Marubino *et al.*, 2003; Laviolette *et al.*, 2004; Hogg *et al.*, 2005). Allo stesso tempo, il basso agonismo sui recettori omomerici  $\alpha_7$ , potrebbe contribuire ad alleviare effetti collaterali come la perdita della memoria ai quali un paziente in cura con antagonisti nicotinici va inevitabilmente incontro (Bell *et al.*, 1999).

I dati ottenuti con questi esperimenti risultano essere molto promettenti; tuttavia, la nicotina è

stata somministrata mediante una via che non mimava l'assunzione dell'uomo dove, oltretutto, la dipendenza non è dovuta solo alla presenza di nicotina ma all'insieme di quasi 4.000 sostanze che costituiscono il fumo di sigaretta. Per questo motivo, ulteriore scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto un nuovo modello murino che permettesse di studiare gli effetti del fumo della sigaretta tradizionale, rispetto a quelli della sigaretta elettronica, dispositivo che sta diventando sempre più popolare, e che mimasse il più possibile la via di somministrazione usata dall'uomo (Gentry-Nielsen *et al.*, 2004). È stata quindi utilizzata la via inalatoria per la somministrazione di nicotina a topi Balb/C, contenuta sia all'interno del tabacco delle sigarette tradizionali sia nel liquido della sigaretta elettronica, dal momento che il vapore di nicotina nell'aria risulta essere stabile e facilmente controllabile (Beckett *et al.*, 2013).

Dal nostro studio è emerso che l'esposizione cronica al fumo di sigaretta o al vapore della sigaretta elettronica per 7 settimane ha indotto nei topi uno stato di dipendenza da nicotina, come dimostrato dalla comparsa dei sintomi tipici della sindrome astinenziale sia precipitata che spontanea, già a partire dalle 24 ore successive all'interruzione del trattamento. Per questo esperimento è stato scelto di esporre gli animali al vapore di una sigaretta elettronica, commercializzata in Italia, il cui liquido possiede un quantitativo di nicotina pari a 19 mg/ml (medio-alto). In particolare sono stati forniti 5.6 mg/sessione di nicotina (3 sessioni giornaliere), 16.8 mg/dì (5 giorni di esposizione alla settimana, per 7 settimane complessive). Parallelamente un altro gruppo di animali è stato esposto al fumo di sigarette, comunemente diffuse tra i fumatori e con lo stesso contenuto di nicotina del liquido della sigaretta elettronica (16.8 mg/dì, 0.8 mg a sigaretta).

Il primo parametro preso in considerazione è stato l'andamento del peso corporeo, parallelamente all'analisi del consumo di cibo, nel periodo di esposizione al fumo, al vapore o ad aria (gruppo controllo). Da tali osservazioni emerge come il fumo della sigaretta tradizionale incide, rallentando, l'accrescimento del peso corporeo già a partire dalla seconda settimana di esposizione e contemporaneamente influisce sul consumo di cibo. Al contrario, l'esposizione al vapore del dispositivo elettronico non rallenta l'accrescimento corporeo degli animali e non influisce neppure sul consumo di cibo durante le 7 settimane di esposizione. Risultati preliminari indicano, inoltre, che nel successivo periodo di astinenza questi due parametri tendono ad aumentare e così i topi esposti al fumo delle sigarette convenzionali acquisiscono un peso sovrapponibile a quello degli animali appartenenti agli altri due gruppi. I dati da noi ottenuti durante il periodo di esposizione al fumo di sigaretta tradizionale, risultano in accordo con quelli ottenuti da Chen e collaboratori nel 2005, dove viene riportata una riduzione del peso corporeo parallelamente al decremento del consumo di cibo durante il periodo di esposizione al fumo in

topi Balb/c. I risultati da noi raccolti, per quanto riguarda la sigaretta convenzionale, sono concordi anche con l'effetto che essa ha sull'uomo (Albanes *et al.*, 1987): la capacità della nicotina di regolare l'appetito e il peso corporeo che, oltretutto, è uno dei fattori che i fumatori ritengono essere la principale motivazione che li induce a non smettere di fumare, ed è anche quella che spinge la maggior parte degli adolescenti ad iniziare la pratica. Oltretutto, è noto che durante l'astinenza da nicotina, si ha un ripresa del peso corporeo (Pistelli *et al.*, 2009), e questo scoraggia ancora di più i fumatori a smettere di fumare. Studi di letteratura hanno dimostrato che la nicotina influisce sul peso corporeo e sul consumo di cibo, agendo a livello del sistema ipotalamico della melanocortina (Mineur *et al.*, 2011). Inoltre, è stata recentemente riportata la presenza di siti di *binding* per la nicotina nelle regioni dell'ipotalamo del topo, responsabili della regolazione dell'appetito. Ciò suggerisce che a livello del SNC la nicotina possa contribuire alla riduzione dell'appetito e alla conseguente perdita di peso, diminuendo l'espressione del neuropeptide Y (NPY), un potente stimolatore dell'appetito abbondante nel cervello dei mammiferi e altamente concentrato nell'ipotalamo. E' stato infatti dimostrato che ratti iniettati con nicotina sia in acuto che in cronico (2 settimane) presentano ridotti livelli di NPY e del suo mRNA (Frankish *et al.*, 1995). Inoltre, i risultati da noi ottenuti sono in linea con quelli ottenuti da Hussmann e collaboratori nel 2014, che però utilizzano ratti impiantati con minipompe osmotiche sottocutanee che rilasciano un quantitativo di nicotina di 6 mg/kg/giorno. Tuttavia, vista la novità del dispositivo elettronico, non sono presenti in letteratura informazioni sull'andamento del peso corporeo o sul consumo di cibo dei fruitori di sigaretta elettronica. Pochi consumatori, poi, hanno mostrato palesemente il desiderio di smettere di utilizzare tale dispositivo elettronico. Inoltre, dato che la sigaretta elettronica, al contrario del fumo di sigaretta convenzionale, non ha avuto alcun effetto sul peso corporeo e sull'assunzione di cibo, si può ipotizzare che non sia solo la nicotina l'unico elemento a incidere sull'appetito e quindi sul peso corporeo nei soggetti: alcune delle sostanze isolate da una sigaretta tradizionale potrebbero potenziarne l'effetto. Nel vapore prodotto dalla sigaretta elettronica, invece, sono presenti sostanze diverse, che probabilmente non potenziano questi effetti della nicotina.

Al fine di verificare e monitorare la quantità di nicotina assunta e metabolizzata, in collaborazione con l'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, dopo 1, 4 e 7 settimane di esposizione, sono state condotte delle analisi sull'urina di questi animali per dosare il principale metabolita della nicotina, la cotinina, la cui concentrazione nei liquidi biologici dei fumatori fornisce una misura quantitativa della nicotina assunta e metabolizzata (Watts *et al.*, 1990). Tali dati, indicano un quantitativo di cotinina di circa 700 ng/ml in topi esposti a vapore o fumo. Questi livelli sono in linea con i valori di cotinina dosati con gas-cromatografia-

spettrometria di massa nell'urina dei fumatori di sigaretta tradizionale, dove raggiungono 800-1000 ng/ml (Man *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2012). Valori simili sono stati ottenuti anche in persone che hanno fumato circa 20 sigarette standard al giorno per almeno 20 anni (Bozikas *et al.*, 2005). Inoltre, dati di letteratura indicano che i consumatori di sigaretta elettronica (che inalano 18 mg di nicotina) riportano livelli di cotinina pari a 332 ng/ml nella saliva, e 60.6 ng/ml nel siero (Etter *et al.*, 2011; Flouris *et al.*, 2013). Questi livelli di cotinina risultano assolutamente paragonabili a quelli osservati nei fumatori di sigarette convenzionali. Inoltre, i nostri risultati sono in accordo con quelli ottenuti in topi che fumano 10-12 sigarette al giorno per 12 settimane (Catanzaro *et al.*, 2007). I dati da noi ottenuti sono in linea anche con quelli ottenuti da Stanley e collaboratori nel 1992 da 40 campioni di urine di topi che “fumavano” nicotina, nelle quali i valori di cotinina registrata erano compresi in un *range* da 240 ng/ml a 890 ng/ml.

Al termine delle 7 settimane di esposizione, in collaborazione con il laboratorio della Dott.ssa Gotti, sono stati misurati i livelli di nicotina e di cotinina a livello cerebrale. I risultati da noi ottenuti hanno dimostrato che i topi esposti al fumo di sigaretta convenzionale manifestano un aumento statisticamente significativo (6 volte più alto) dei livelli di cotinina; al contrario, il gruppo esposto al vapore della sigaretta elettronica ha mostrato un innalzamento significativo dei valori di nicotina cerebrale. Purtroppo in letteratura sono assenti esperimenti di questo tipo, che spieghino quanto da noi osservato. Tuttavia, una possibile spiegazione potrebbe essere quella che nel tabacco delle sigarette tradizionali si trovino già alti livelli di cotinina o che alcuni ingredienti che lo compongono potrebbero favorire il metabolismo della nicotina a cotinina, determinando così un aumento della concentrazione di questo metabolita. Tali composti risulterebbero invece assenti nel liquido della sigaretta elettronica che, secondo risultati preliminari, ottenuti in collaborazione con l'Agenzia delle Dogane e dei Monopoli di Milano, sembra essere composta, oltre che da nicotina, dal 55% di propilene glicol, dal 35% da glicerina e il restante da fragranze ([4,7,9-Megastigmatrien-3-one (0.1 mg/ml), 3-ethyl-2-hydroxycyclopent-2-en-1-one (0.7 mg/ml) Ethyl Maltol (0.67 mg/ml), vanilline (0.15 mg/ml), neryl acetate (<0.1 mg/ml)].

Nei fumatori, l'astinenza da fumo di tabacco provoca precisi segni e sintomi d'astinenza, come irritabilità, ansia, mal di testa, stanchezza e insonnia (Le Foll *et al.*, 2009). Per indagare gli effetti di una sindrome astinenziale acuta, al termine del periodo di esposizione, è stata somministrata mecamilamina 1 mg/kg. Il quadro che emerge dai nostri studi mostra una generale diminuzione dell'attività motoria solo per quanto concerne il gruppo esposto al fumo della sigaretta tradizionale. Nessuna alterazione nei movimenti orizzontali e verticali è stata osservata negli animali precedentemente esposti al vapore della sigaretta elettronica. La riduzione

dell'attività motoria di topi esposti al fumo della sigaretta tradizionale, in cui è stata precipitata una sindrome astinenziale, è in accordo con quanto osservato da Castañé e collaboratori nel 2002. Per quanto concerne la sigaretta elettronica, invece, i nostri risultati sono in linea con quelli di George e collaboratori che in uno studio del 2010 hanno dimostrato che ratti esposti al vapore di nicotina per 8 ore al giorno, per 7 giorni, mostrano segni somatici di astinenza dopo 30 minuti dall'iniezione di mecamilamina. La sindrome è stata evidenziata attraverso la comparsa di sintomi e segni astinenziali. Sono stati osservati più segni (*wet-dog shakes*, *front paw tremor* e *scratching*) negli animali esposti al fumo della sigaretta tradizionale rispetto agli altri due gruppi. Per quanto riguarda i sintomi (*body tremor*, *ptosis*, *teeth-chattering*, *genital licks*, *piloerection* e *sniffing*), essi sono presenti sia nel gruppo esposto al fumo della sigaretta tradizionale che nel gruppo esposto al vapore del dispositivo elettronico. Infine, il *global score*, ottenuto dalla somma dei punteggi, risulta più alto nel gruppo di topi esposti al fumo della sigaretta convenzionale. I risultati del gruppo esposto al fumo della sigaretta convenzionale sono in accordo con quelli di Castañé e collaboratori (2002) e di Varani e collaboratori (2012) dai quali è emersa la comparsa di segni relativi ad una sindrome astinenziale dopo la somministrazione di 1 mg/kg di mecamilamina in topi CD o Balb/C precedentemente resi dipendenti da nicotina mediante l'utilizzo di minipompe osmotiche che rilasciavano 10-25 mg/kg al giorno; i nostri risultati sono in accordo anche con quelli ottenuti da Damaj e collaboratori nel 2003 che ha iniettato invece 2 mg/kg di mecamilamina sottocute. In generale, i segni somatici da noi osservati sono stati riscontrati anche negli studi sopra citati; tuttavia, in quest'ultimo lavoro di Damaj del 2003 non è stata osservata la presenza di alcun segno che invece sono stati da noi identificati. La differente modalità di somministrazione della nicotina e la diversa dose somministrata, potrebbero essere alla base delle discordanze tra gli studi.

E' noto che l'esposizione a lungo termine alla nicotina è in grado di alterare l'espressione dei sottotipi recettoriali nel cervello dei fumatori e nei modelli animali (Moretti *et al.*, 2010). Infatti è stato dimostrato che un'esposizione prolungata alla nicotina comporta un incremento dell'espressione dei recettori nAChRs, fenomeno noto come *up-regulation*. Studi *in vivo* condotti su cervelli di fumatori (Perry *et al.*, 1999) o su animali sottoposti a trattamenti a lungo termine con nicotina (Marks *et al.*, 1992) hanno dimostrato che questa stimolazione provoca un *up-regulation* senza modificare i livelli di mRNA delle subunità  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  o  $\beta_2$  dei recettori nicotinici, indicando che responsabili del fenomeno sono i meccanismi post-trascrizionali. Pertanto, in collaborazione con il laboratorio della Dott.ssa Gotti, abbiamo verificato se nel nostro modello, l'esposizione a 7 settimane al fumo di sigaretta tradizionale o al vapore della sigaretta elettronica fosse in grado di indurre cambiamenti nell'espressione dei nAChRs.



Dall'analisi della corteccia cerebrale, del *nucleus accumbens*, dell'ippocampo e del *caudato putamen* (aree cerebrali coinvolte in numerosi effetti comportamentali della nicotina) si evince che il gruppo di animali esposti al fumo della sigaretta tradizionale o al vapore della sigaretta elettronica mostra un'*up-regulation* della subunità  $\beta_2$  (subunità molto importante nel processo di *addiction*). A livello della corteccia cerebrale, del *nucleus accumbens* e dell'ippocampo si evidenzia anche un significativo incremento dei recettori contenenti la subunità  $\alpha_4$ . Tale *upregulation* è risultata assolutamente paragonabile nei due gruppi di animali esposti ai due tipi di sigaretta, nonostante le concentrazioni di nicotina presenti a livello cerebrale fossero molto più alte nei topi precedentemente esposti al dispositivo elettronico. Al giorno d'oggi i meccanismi alla base dell'*upregulation* non sono ancora pienamente chiariti: alcuni studi hanno ipotizzato che la nicotina agisca come proteina *chaperone* sul sottotipo  $\alpha_4\beta_2$ , determinando così un aumento della maturazione e dell'assemblaggio delle subunità nel reticolo endoplasmatico (Sallette *et al.*, 2004, 2005; Kuryatov *et al.*, 2005); altri studiosi ipotizzano invece che il *turnover* recettoriale potrebbe giocare un ruolo chiave (Kuryatov *et al.*, 2005; Rezvani *et al.*, 2007).

Inoltre, i nostri risultati non hanno riscontrato nessun effetto sui recettori contenenti la subunità  $\alpha_5$  a livello della corteccia cerebrale, del *nucleus accumbens*, dell'ippocampo e del *caudato putamen*.

Recenti studi hanno dimostrato che i nAChRs del *pathway* abenula mediale-nucleo interpeduncolare potrebbero avere un importante ruolo funzionale nel mediare i processi di *addiction*, e che le manifestazioni somatiche di astinenza da nicotina potrebbero essere dovute ai nAChRs contenenti le subunità  $\beta_4$  o  $\alpha_5$  o  $\alpha_2$ . L'abenula è una struttura diencefalica che riceve numerosi *inputs* da diverse aree del sistema limbico e comunica con il nucleo interpeduncolare mediante il fascicolo retroflesso. Sia l'abenula sia il nucleo interpeduncolare esprimono livelli variabili di mRNA che codifica per diversi recettori nicotinici eteromerici, soprattutto quelli contenenti il sottotipo  $\alpha_3\beta_4$  (Grady *et al.*, 2009). Tuttavia, la nostra analisi biochimica e farmacologica effettuata a livello di queste aree cerebrali non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi. I nostri dati sono in accordo con altri studi effettuati su modelli animali esposti a nicotina cronica (Davila-Garcia *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2003) in cui, come nei nostri esperimenti, non si riscontra nessun alterazione dell'espressione del sottotipo  $\alpha_3\beta_4$  a livello del *pathway* abenula mediale-nucleo interpeduncolare; questo potrebbe essere dovuto alla bassa affinità che la nicotina ha per questo sottotipo recettoriale (Benowitz, 2009).

I nostri risultati sono stati confrontati anche con quelli ottenuti con altri modelli animali comunemente utilizzati per descrivere gli effetti della nicotina: l'*operant intravenous self-*

*administration* (SA) e la somministrazione passiva sottocutanea di nicotina con minipompe osmotiche (MP). Si osserva che la nicotina somministrata via MP up-regola il *binding* con [<sup>3</sup>H]-Epibatidina in tutte le aree del cervello (*nucleus accumbens*, *caudato putamen* e VTA), mentre la nicotina somministrata con SA induce una ridotta *up-regulation* limitata a poche regioni cerebrali. Le differenze dei livelli di *up-regulation* possono essere spiegate dalle differenti dosi e dai diversi profili farmacocinetici della nicotina nei due modelli, come riportano Ulrich e collaboratori nel 1997 e Rowell e Li, sempre nel 1997. Inoltre l'esposizione giornaliera costante che caratterizza la somministrazione con MP potrebbe spiegare perché l'*up-regulation* del sottotipo  $\alpha_4\beta_2$  sia maggiormente pronunciata rispetto a quella ottenuta mediante SA (Kuryatov *et al.*, 2005; Rezvani *et al.*, 2007).

I nostri risultati sono in accordo con quanto rilevato da Turner e collaboratori nel 2011 che ha individuato un'*up-regulation* dei recettori nAChRs nella corteccia cerebrale dopo somministrazione cronica di nicotina (14 giorni) mediante minipompe osmotiche sottocutanee. Successivamente è stato monitorato lo sviluppo della sindrome astinenziale spontanea dopo 24 ore, 15, 30, 60 e 90 giorni dal termine dell'esposizione.

Nell'uomo è noto che l'astinenza da fumo di sigaretta provoca difficoltà di concentrazione, di attenzione, *deficit* nell'apprendimento e nella memoria e alterata plasticità corticale (Gould *et al.*, 2014). La memoria spaziale può essere alterata nei fumatori in astinenza (Wing *et al.*, 2010; Camfield *et al.*, 2012) anche se risultati contraddittori sono stati ottenuti da Domier e collaboratori nel 2007, che ha dimostrato nei soggetti astinenti dalla nicotina un *deficit* cognitivo ma non di attenzione. Tuttavia, sulla base delle evidenze che la somministrazione di nicotina altera l'apprendimento e la memoria sia nell'uomo che negli animali (Levin *et al.*, 2006; Kenney *et al.*, 2008, 2011; Heishman *et al.*, 2010), abbiamo indagato gli effetti dell'esposizione al fumo e al vapore sulla memoria spaziale mediante il test dello *Spatial Object Recognition*. Da esso emerge come l'astinenza da nicotina cronica peggiori la memoria spaziale in modo significativo sia nel gruppo esposto al fumo della sigaretta tradizionale sia in quello esposto al vapore della sigaretta elettronica a partire da 24 ore fino ad almeno 90 giorni di astinenza. Infatti, nei topi l'astinenza da nicotina distrugge l'apprendimento ippocampo-dipendente ma non quello ippocampo-indipendente; è stato dimostrato che la nicotina agisce sul sottotipo  $\alpha_4\beta_2$  proprio a livello dell'ippocampo dorsale, causando così alterazioni dell'apprendimento durante l'astinenza (Gould *et al.*, 2014). Anche i risultati dei nostri esperimenti hanno dimostrato un'*up-regulation* del sottotipo recettoriale  $\alpha_4\beta_2$  proprio a livello dell'ippocampo e questo potrebbe spiegare il *deficit* riscontrato nella memoria spaziale. I nostri studi sono in linea con quelli ottenuti da Kenney e collaboratori nel 2011 che dimostra come l'astinenza da nicotina cronica (6.3 mg/kg al

giorno mediante minipompe osmotiche sottocutanee) influenza la memoria spaziale dei topi quando viene applicato un *intertrial* di 48 ore tra la fase T<sub>1</sub> e la fase T<sub>2</sub> del test. E' importante sottolineare che l'astinenza da nicotina cronica non influisce sui tempi di esplorazione degli oggetti, pertanto il *deficit* osservato non è imputabile all'ansia o alla riduzione dell'attività locomotoria. Dal momento che in studi precedenti (Kenney *et al.*, 2011) l'astinenza da nicotina non ha prodotto alcun effetto nel *Novel Object Recognition test*, è stato ipotizzato che differenti regioni del cervello siano coinvolte in queste abilità cognitive: l'ippocampo è un'area critica per il processamento dell'informazione spaziale e contestuale nella *performance* della *Spatial Object Recognition* (Eichenbaum, 2004; Smith *et al.*, 2006), mentre la corteccia peririnale è la principale struttura coinvolta nel processamento delle informazioni oggetto-specifiche, importanti nel *Novel Object Recognition test*, ma non nel riconoscimento di discriminazioni configurative. Jacobsen e collaboratori nel 2005 hanno condotto uno studio per investigare gli effetti del fumo sulla *working* e *verbal memory* nei fumatori adolescenti; quello che ne risulta è che, come già osservato nei fumatori adulti (Snyder *et al.*, 1989; West *et al.*, 1991; Roth *et al.*, 1992; Foulds *et al.*, 1996), l'astinenza da nicotina negli adolescenti che fumano giornalmente è associata a peggioramento della memoria, che viene recuperata con la ripresa del fumo. Dallo studio emerge quindi che i fumatori adolescenti mostrano *deficits* della memoria e che questi sono tanto più gravi quanto prima si inizia a fumare, in accordo con evidenze precliniche che dimostrano maggiori effetti neurotossici della nicotina sul cervello nelle fasi precoci del suo sviluppo.

Sono stati anche osservati sintomi affettivi che caratterizzano la sindrome astinenziale spontanea da nicotina cronica: l'ansia e la depressione. E' noto, infatti, che l'astinenza da nicotina porta ad un aumento dello stato ansioso sia negli umani (*American Psychiatric Association*, 2000; Hughes, 2007) che nei topi (Stoker *et al.*, 2008). L'ansia è stata valutata mediante l'*Elevated Plus Maze test* e il *Marble Burying test*. Il primo test è basato sulla paura innata dei topi per gli spazi aperti, non familiari, rialzati e non protetti, quindi sul conflitto provato dall'animale tra la propensione ad esplorare un ambiente nuovo e l'inibizione a farlo a causa delle sue caratteristiche avversive (Wall *et al.*, 2001; Graeff, 2002). La misura dello stato di ansia è rappresentata dalla percentuale di tempo trascorso nei bracci aperti e dal numero di entrate in tali bracci: meno tempo e meno entrate l'animale effettua nei bracci aperti più è ansioso. Dai nostri risultati emerge che i topi precedentemente esposti alla sigaretta tradizionale sono più ansiosi dei topi controllo, infatti entrano meno nei bracci aperti e vi trascorrono meno tempo. Anche i topi precedentemente esposti al vapore della sigaretta elettronica sono più ansiosi dei topi controlli durante tutto il periodo di astinenza, da 24 ore a 90 giorni dopo la fine dell'esposizione. In

particolare a 30 giorni di astinenza gli animali esposti al fumo della sigaretta convenzionale risultano addirittura più ansiosi di quelli esposti al vapore della sigaretta elettronica, infatti effettuano un numero minore di entrate nei bracci aperti. Questi risultati indicano che l'astinenza da nicotina cronica ha sicuramente un effetto ansiogeno. I nostri dati non concordano con lo studio di Grabus e collaboratori del 2004 dal quale emerge che l'astinenza spontanea da nicotina cronica orale incrementa i segni somatici e l'iperalgisia, mentre non ha effetti sul comportamento dell'animale se sottoposto al test dell'*Elevated Plus Maze*. Queste nostre osservazioni non concordano nemmeno con quelle fatte da Alkam e collaboratori nel 2013, che non hanno riscontrato differenze significative nell'entrate all'aperto fra la progenie di topi esposti alla nicotina in gravidanza e i controlli. Ci troviamo, invece, in accordo con lo studio di Damaj e collaboratori nel 2003, che riporta un'incremento dell'ansia misurata con l'*Elevated Plus Maze* e anche con il *Light-dark box test* a 24 ore dall'ultima somministrazione di nicotina. I nostri risultati sono in linea anche con quelli di Stoker e collaboratori che, in un lavoro del 2008, hanno dimostrato che topi impiantati con minipompe osmotiche sottocutanee che rilasciavano 40 mg/kg al giorno di nicotina per 28 giorni mostravano un aumento del comportamento ansioso, misurato con il *light-dark test*, 24 ore dopo l'ultima somministrazione.

Il *Marble Burying test* è basato invece su una reazione istintiva specifica ed incondizionata dei roditori (Njung'e *et al.*, 1991). La misura dello stato d'ansia viene definita contando il numero di biglie seppellite, in un periodo di tempo stabilito: minore è il numero di biglie sepolte, minore è lo stato ansioso dell'animale. Dai risultati ottenuti si evince un significativo e progressivo incremento del numero di biglie sotterrate dagli animali esposti al fumo e al vapore a partire da 24 ore fino 90 giorni dalla fine dell'esposizione. In particolare a 15 e 30 giorni si osserva un incremento del parametro negli animali esposti al vapore del dispositivo elettronico decisamente maggiore rispetto al gruppo esposto al fumo della sigaretta convenzionale. Inoltre la latenza al primo sotterramento è inferiore nei due gruppi, rispetto al gruppo controllo, per tutto il periodo di tempo considerato e decisamente ridotta nel gruppo esposto al vapore della sigaretta elettronica a 30 e 60 giorni dalla fine dell'esposizione. Questo suggerisce lo sviluppo nel tempo di uno stato ansioso negli animali esposti alla nicotina sotto forma di fumo o vapore e sottolinea come questo stato d'ansia risulti maggiore negli animali esposti alla sigaretta elettronica. Bisogna ricordare che l'*Elevated Plus Maze test* e il *Marble Burying test* valutano due tipi di ansia differenti, dimostrando che probabilmente l'esposizione al fumo della sigaretta tradizionale o al vapore della sigaretta elettronica suscita un differente tipo di stato ansioso, probabilmente dato dai diversi componenti del tabacco e del liquido del dispositivo elettronico. Inoltre, data la novità di tale dispositivo, in letteratura non sono presenti dati che confermano le nostre osservazioni.

Alkam e collaboratori nel 2013 hanno però esposto topi C57BL/6J di sesso femminile e gravide a nicotina disciolta all'interno di una soluzione di saccarosio 2%, rilevando poi, mediante il *Marble Burying test* la presenza, nella progenie generata, di un maggiore stato ansioso non presente nei topi controllo. Le aree cerebrali precise dove la nicotina modula il comportamento ansioso e i sottotipi recettoriali responsabili non sono ancora stati dimostrati, tuttavia recentemente è stata evidenziata la presenza di un meccanismo colinergico a livello dell'ippocampo che sembrerebbe regolare nei topi la suscettibilità all'ansia (Mineur *et al.*, 2013). Infatti topi iniettati a livello dell'ippocampo con fisostigmina o con shRNA virali diretti contro l'acetilcolinesterasi mostrano un aumento del comportamento ansioso e del comportamento depressivo, dimostrando così che il *signaling* dei nAChRs a livello dell'ippocampo regola questi tipi di comportamenti.

La presenza o meno di uno stato depressivo in seguito all'astinenza da nicotina è stata valutata negli animali mediante il *Tail Suspension test* e il *Sucrose Preference test*. Il primo test registra il tempo di *immobility* da parte dei topi quando sospesi per la coda, in un tempo stabilito di 6 minuti. Dai risultati si evince che a 60 e 90 giorni di astinenza, il gruppo di animali esposti al vapore della sigaretta elettronica aumenta significativamente il tempo di *immobility*; gli animali esposti al fumo della sigaretta convenzionale aumentano il tempo di *immobility* solo a 90 giorni di astinenza. Per quanto riguarda la sigaretta tradizionale, tali osservazioni concordano con quanto osservato da Ribeiro-Carvalho e collaboratori che in uno studio del 2011 ha rilevato lo sviluppo di uno stato simil-depressivo in seguito alla cessazione dell'esposizione alla nicotina. E' necessario precisare che la modalità di esposizione alla nicotina ed il test comportamentale da noi utilizzato per indagare tale stato emotivo sono differenti.

Dai risultati ottenuti dal *Sucrose Preference test* si evince che a partire da 30 giorni di astinenza, i topi esposti al fumo di sigaretta tradizionale e al vapore della sigaretta elettronica consumano progressivamente una percentuale di soluzione zuccherina inferiore rispetto a quella bevuta dal corrispettivo gruppo controllo. Quindi a partire da 30 giorni di astinenza si assiste ad un incremento progressivo della percentuale degli animali anedonici, ossia di quegli animali che bevono meno del 50% di saccarosio sul totale. Come nel *Tail Suspension test*, la percentuale di animali esposti alla sigaretta elettronica che manifestano anedonia diventa statisticamente significativa, rispetto al gruppo controllo, a 60 e 90 giorni di astinenza. La percentuale del gruppo di topi esposti al fumo della sigaretta convenzionale che mostrano anedonia risulta statisticamente maggiore rispetto a quella dei topi esposti all'aria solo a 90 giorni; tuttavia, sempre a 90 giorni, il numero degli animali esposti al dispositivo elettronico che manifestano uno stato simil-depressivo risulta statisticamente più elevato rispetto anche a quelli esposti al

fumo di tabacco. I nostri risultati sono in linea con altri studi che mostrano come topi esposti a nicotina disciolta in acqua diventano anedonici, diminuendo il consumo di acqua zuccherata dopo un mese di astinenza spontanea (Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2011). Questi risultati indicano che l'astinenza prolungata da nicotina cronica porta a uno stato simil-depressivo, che si manifesta con una diminuzione della sensibilità ad un *reward* naturale: ciò indica che gli animali in astinenza da nicotina non provano alcun piacere anche in una circostanza che normalmente risulta piacevole (in questo caso, bere una soluzione di acqua zuccherata). Questo è in accordo con uno studio recente di Iñiguez e collaboratori del 2009 in cui si dimostra che iniezioni ripetute di nicotina in topi adolescenti generano una riduzione di preferenza all'acqua zuccherata in età adulta. Inoltre, i nostri dati dimostrano che gli animali esposti alla sigaretta elettronica sembrano manifestare maggiormente la comparsa di uno stato simil-depressivo, dimostrando la necessità di studiare in modo più dettagliato gli effetti a lungo termine circa l'utilizzo di questo nuovo dispositivo.

I risultati ottenuti dal nostro studio dimostrano quindi che l'esposizione alla nicotina contenuta nel liquido di una sigaretta elettronica o nel tabacco di una sigaretta tradizionale, inducono dipendenza nei topi con differenze però sia sul piano fisico che comportamentale. Negli animali esposti al vapore della sigaretta elettronica non si hanno alterazioni nell'andamento del peso corporeo e nel consumo di cibo durante il periodo di esposizione; per quanto concerne la sindrome precipitata da mecamilamina, si rilevano segni di astinenza più lievi, rispetto a quelli manifestati in topi esposti al fumo delle sigarette tradizionali; nella sindrome astinenziale spontanea invece, si osserva lo sviluppo nel tempo di un *deficit* cognitivo e di uno stato ansioso paragonabile a quello osservato nei topi esposti al fumo di sigaretta convenzionale e la comparsa di uno stato simil-depressivo che risulta più accentuato e severo rispetto a questi ultimi. Questi diversi effetti osservati potrebbero, in parte, essere spiegati dal fatto che la mecamilamina, che induce una sindrome astinenziale precipitata più severa nei topi precedentemente esposti alla sigaretta convenzionale, "compete" con l'effetto della cotinina, i cui livelli risultano nettamente più elevati nei cervelli degli animali precedentemente esposti al fumo di sigaretta tradizionale piuttosto che al vapore della sigaretta elettronica. La cotinina, rispetto alla nicotina, ha differenti proprietà farmacologiche: ha una velocità di degradazione circa 10 volte più lenta; quando somministrata a fumatori in fase di astinenza diminuisce il desiderio di fumare, l'irritabilità, l'irrequietezza, l'ansia, la tensione e l'insonnia (Benowitz *et al.*, 1993; Keenan *et al.*, 1994). Questi effetti della cotinina possono essere dovuti alla sua azione di agonista debole dei nAChRs; recentemente è stato anche ipotizzato che la cotinina possa agire come modulatore allosterico positivo (PAM) del sottotipo recettoriale  $\alpha_7$  (Moran, 2012). La cotinina, agendo come

agonista del sottotipo  $\alpha_4\beta_2$  e  $\alpha_3\alpha_6\beta_2$  a livello della regione del *caudato putamen*, determina rilascio di dopamina (O'leary *et al.*, 2008). Inoltre, alcuni studi hanno ipotizzato che questo metabolita possa agire, oltre che sui recettori nicotinici, anche su altri potenziali recettori (Goldberg *et al.*, 1989; Riah *et al.*, 1999) attraverso l'attivazione del sistema serotoninergico e dopaminergico (Riah *et al.*, 2000). Questo potrebbe spiegare, almeno in parte, i diversi effetti riscontrati dal nostro studio nei due gruppi di esposizione ai due tipi di sigarette: ad esempio la minore ansia registrata nei topi esposti alla sigaretta convenzionale nel *Marble Burying test* potrebbe essere dovuta proprio agli alti livelli di cotinina rilevati a livello cerebrale. Le osservazioni fatte sono solo l'inizio di ulteriori indagini nello studio della dipendenza da nicotina indotta dall'utilizzo della sigaretta elettronica, il cui uso si sta rapidamente diffondendo a livello mondiale. Nonostante il nostro sia un metodo che richiede tempistiche lunghe, a nostro parere, esso è altamente specializzato e meno stressante per gli animali rispetto ad altri metodi (es. le ripetute iniezioni, le infusioni endovenose o le minipompe osmotiche) e presenta importanti vantaggi: non richiede interventi chirurgici, quindi non è invasivo. Inoltre, cosa più importante, riproduce la modalità di assunzione della nicotina nell'uomo e può essere utilizzato per esporre gli animali sia alla nicotina presente nel tabacco delle sigarette tradizionali che a quella contenuta nel liquido della sigaretta elettronica. E' un modello valido per investigare gli effetti a lungo termine della nicotina cronica presente sotto varie forme, oltre che per lo studio della neurobiologia della dipendenza da questa sostanza.

Studi futuri saranno sicuramente rivolti a testare la capacità dei nuovi agonisti parziali nicotinici, la cui validità ed efficacia è già stata provata nello *Zebrafish* e nel ratto, anche in questo modello di esposizione, per un potenziale futuro impiego terapeutico nello *smoking cessation*. Un altro obiettivo futuro sarà quello di proseguire lo studio degli effetti dell'esposizione al fumo di sigaretta tradizionale e al vapore della sigaretta elettronica per tempi più lunghi (almeno 6 mesi). Infine, è noto che l'abuso di droghe segue una sequenza precisa: si comincia dalle sigarette per poi continuare con la cannabis e le altre droghe, come cocaina ed eroina. Risultati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che i topi precedentemente esposti al fumo di sigaretta tradizionale risultavano più sensibili agli effetti rinforzanti del  $\Delta^9$ -THC, principio attivo della cannabis, suggerendo che basse dosi di cannabinoide associate con la nicotina possano avere una più alta capacità di indurre risposte comportamentali relative al *reward*, rispetto alla somministrazione di  $\Delta^9$ -THC o di nicotina da soli.

Quindi, sarà nostro interesse verificare se anche l'esposizione al vapore della sigaretta elettronica possa aumentare la sensibilità agli effetti rinforzanti della cannabis; successivamente si potranno

testare anche altre droghe (cocaina ed eroina), per studiare le possibili interazioni tra queste e la sigaretta, che sia tradizionale o elettronica.



# *Bibliografia*

- ✚ **Abreu-Villaça y, Queiroz-Gomes Fdo E, Dal Monte AP, Filguerais CC, Manhaes AC;** “Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice” *Behavioral Brain Research* 167(1): 175-182, 2006
- ✚ **Ackerman KM, Nakkula R, Zirger JM, Beattie CE, Boyd RT;** “Cloning and spatiotemporal expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 6 and alpha 4 subunit RNAs” *Developmental Dynamics* 238: 980-992, 2009
- ✚ **Adami E;** *Farmacologia e Farmacoterapia, Istituto editoriale Cisalpino, Milano, 1960*
- ✚ **Agatu IT, King BA, Dube SR;** “Current cigarette smoking among adults” Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2014
- ✚ **Agetsuma M, Aizawa H, Aoki T, Nakayama R, Takahoko M, Goto M, Sassa T, Amo R, Shiraki T, Kawakami K, Hosova T, Higashijima S, Okamoto H;** “The abenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish” *Nature Neuroscience* 13(11): 1354-1356, 2010
- ✚ **Albanes D, Jones DY, Micozzi MS, Mattson ME;** “Associations between smoking and body weight in the US population: analysis of NHANES II” *American Journal of Public Health* 77: 439-444, 1987
- ✚ **Alberger K, Chitavranshi VC, Sapru NH;** “Cardiovascular responses to microinjections of nicotine into the caudal ventrolateral medulla of the rat” *Brain Research* 892: 138-146, 2001
- ✚ **Albuquerque EX, Alkondon M, Pereire EF, Castro NG, Schrattenholz A, Barbosa CT, Bonfante-Cabarcas R, Aracava Y, Eisenberg HM, Maelicke A;** “Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280: 1117-1136, 1997
- ✚ **Alkam T, Kim HC, Hiramatsu M, Mamiya T, Aoyama Y, Nitta A, Yamada K, Nabeshima T;** “Evaluation of emotional behaviors in young offspring of C57BL/6J mice after gestational and/or perinatal exposure to nicotine in six different time-windows” *Behavioural Brain Research* 239: 80-89, 2013

- ✚ **Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX;** “Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283: 1396-1411, 1997
- ✚ **Altman J, Everitt BJ, Glautier S, Markou A, Nutt D, Oretti R, Phillips GD, Robbins TW;** “The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate” *Psychopharmacology* 125: 285-345, 1996
- ✚ **Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, Dong Q, Zhang Q, Gu X, Vijayakrishnan J;** “Genome-wide association scan of the tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1” *Nature Genetics* 40(5): 616-622, 2008
- ✚ **Anblagan D, Jones NW, Costigan C, Parker AJ, Allcock K, Aleong R, Coyne LH, Deshpande R, Raine-Fenning N, Bugg G, Roberts N, Pausova Z, Paus T, Gowland PA;** “Maternal smoking during pregnancy and fetal organ growth: a magnetic resonance imaging study” *PloS One* 8(7): e67223, 2013
- ✚ **Andreas S, Batra A, Behr J, Berck H, Chenot JF, Gillissen A, Hering T, Herth F, Meierjürgen R, Mühlig S, Nowak D, Pfeifer M, Raupach T, Schultz K, Sitter H, Worth H; Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin;** Guidelines for smoking cessation in patients with COPD issued by the Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin”, *Pneumologie*, 62(5): 255-272, 2008
- ✚ **Andreoli M, Tessari M, Pilla M, Valerio E, Hagan JJ, Heidbreder CA;** “Selective antagonism at dopamine D3 receptors prevents nicotine-triggered relapse to nicotine-seeking behavior” *Neuropsychopharmacology* 28: 1272-1280, 2003
- ✚ **Anichtchik OV, Kaslin J, Peitsaro N, Scheinin M, Panula P;** “Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine” *Journal of Neurochemistry* 88: 443-453, 2004
- ✚ **Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, Manfreda J, Kanner RE, Connett JE;** “The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial” *Annals of Internal Medicine: Journal* 142(4): 233-239, 2005

- ✚ **Aquas E**; “Addiction e Learning: due faccie della stessa medaglia?” *Medicina delle tossicodipendenze* 54-55, 2007
- ✚ **Arricci DP**; “Economic costs of substance abuse” *Proceedings of the Association of American Physician*, 111(2): 119-125, 1999
- ✚ **Bacher I, Wu B, Shytle DR, George TP**; “Mecamylamine – a nicotinic acetylcholine receptor antagonist with potential for the treatment of neuropsychiatric disorders” *Expert Opinion of Pharmacotherapy* 10(16): 2709-2721, 2009
- ✚ **Bailey EL, Smith C, Sudlow CL, Wardlaw JM**; “Pathology of lacunar ischemic stroke in humans – a systemic review” *Brain Pathology* 22: 583-591, 2012
- ✚ **Baiton RJ, Tsai LT, Singh CM, Moore MS, Neckameyer WS, Heberlein U**; “Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*” *Current Biology* 10: 187-194, 2000
- ✚ **Bakhru A, Erlinger TP**; “Smoking cessation and cardiovascular disease risk factors: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey” *PloS Med* 2: e160, 2005
- ✚ **Balestra B, Vailati S, Moretti M, Hanke W, Clementi F, Gotti C**; “Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina” *Molecular Pharmacology* 58: 300-311, 2000
- ✚ **Balfour DJ, Fagerstrom KO**; “Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders” *Pharmacology & Therapeutics* 72(1): 51-81, 1996
- ✚ **Balfour Dj, Wright AE, Benwell ME, Birrell CE**; “The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence” *Behavioural Brain Research* 113: 73-83, 2000
- ✚ **Balfour DJ**; “The neurobiology of tobacco dependence: a preclinical perspective on the role of the dopamine projections to the nucleus accumbens” *Nicotine Tobacco Research* 6(6): 899-912, 2004
- ✚ **Balfour DJ**; “The pharmacology underlying pharmacotherapy for tobacco dependence: a focus on bupropion” *International Journal of Clinical Practice* 55(1): 53-57, 2001

- ✚ **Bardo MT, Rowlett JK, Harris MJ;** “Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 19(1): 39-51, 1995
- ✚ **Barik J, Wonnacott S;** “Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS” *Handbook of Experimental Pharmacology* 192: 173-207, 2009
- ✚ **Barrot M, Olivier JDA, Pernotti LI, Impey S, Storm DR, Neve RL, Zachariou V, Nestel EJ;** “CREB activity in the nucleus accumbens shell gates behavioral responses to emotional stimuli” *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 11435-11440, 2002
- ✚ **Bartecchi CE, MacKenzie TD, Schrier RW;** “Human costs of tobacco use” *New England Journal of Medicine*, 330: 907-980, 1994
- ✚ **Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Panerai AE, Sgoifo A, Dantzer R, Parmigiani S;** “Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 67-81, 2005
- ✚ **Bast T, Feldon J;** “Hippocampal modulation of sensorimotor processes” *Progress in Neurobiology* 70: 319-345, 2003
- ✚ **Bastida G, Beltran B;** “Ulcerative colitis in smokers, non smokers and ex-smokers” *World Journal of Gastroenterology* 17: 2740-2747, 2011
- ✚ **Beckett EL, Stevens RL, Jarnicki AG, Kim RY, Hanish I, Hansbro NG, Deane A, Keely S, Horvat JC, Yang M, Oliver BG, van Rooijen N, Inman MD, Adachi R, Soberman RJ, Hamadi S, Wark PA, Foster PS, Hansbro PM;** “A new short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis”. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131: 752-762, 2013
- ✚ **Bell RL, Earlier BJA, Cook, JB, Rahaman S;** “Nicotinic receptor ligands reduce ethanol intake by high alcohol-drinking HAD-2 rats” *Alcohol* 43(8): 581-592, 2009
- ✚ **Bell SL, Taylor RC, Singleton EG, Henningfield JE, Heishman SJ;** “Smoking after nicotine deprivation enhances cognitive performance and decreases tobacco craving in drug abusers” *Nicotine Tobacco Research* 1: 45-52, 1999

- ✚ **Bencan Z, Levin ED;** “The role of alpha 7 and alpha4beta2 nicotinic receptors in the nicotine-induced anxiolytic effect in zebrafish” *Physiology and Behavior* 95(3): 408-412, 2008
- ✚ **Benowitz NL, Porchet H, Sheiner L, Jacob P;** “Comparison with cigarettes and nicotine gum” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 44: 23-28, 1988
- ✚ **Benowitz N, Jacob P;** “Nicotine and cotinine elimination pharmacokinetics in smokers and nonsmokers” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 53(3): 316-323, 1993
- ✚ **Benowitz NL, Dempsey DA, Goldenberg RL, Hughes JR, Dolan-Mullen P, Ogburn PL, Oncken C, Orleans CT, Slotkin TA, Whiteside HP Jr, Yaffe S;** The use of pharmacotherapies for smoking cessation during pregnancy” *Tobacco Control* 9: 91-94, 2000
- ✚ **Benowitz NL, Jacob P;** “Individual differences in nicotine kinetics and metabolism in humans” *NIDA - Research Monographs* 173: 48-64, 1997
- ✚ **Benowitz NL, Perez-Stable EJ, Herrera B, Jacob P;** “Slower metabolism and reduced intake of nicotine from cigarette smoking in Chinese-Americans” *Journal of the National Cancer Institute* 94: 108-114, 2002
- ✚ **Benowitz NL, Porchet H, Jacob P;** “Nicotine dependence and tolerance in man: pharmaco-kinetic and pharmacodynamic investigations” *Progress in Brain Research* 79: 279-287, 1989
- ✚ **Benowitz NL;** “Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 83: 531-541, 2008
- ✚ **Benowitz NL;** “Pharmacokinetic considerations in understanding nicotine dependence” *Ciba Foundation symposium* 152: 186-200, 1990
- ✚ **Benowitz NL;** “Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease and therapeutics” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49: 57-71, 2009
- ✚ **Berlin I, Hunneyball IM, Greiling D, Jones SP, Fuder H, Stahl HD;** “A selective reversible monoamine oxidase B inhibitor in smoking cessation: effects on its own and in association with transdermal nicotine patch” *Psychopharmacology* 223: 89-98, 2012

- ✚ **Bernhard D, Moser C, Backovic A, Wick G;** “Cigarette smoke – an aging accelerator?” *Experimental Gerontology* 42:160-165, 2007
- ✚ **Berrettini WH, Lerman CE;** “Pharmacotherapy and pharmacogenetics of nicotine dependence” *American Journal of Psychiatry* 162: 1441-1451, 2005
- ✚ **Berridge KC;** “From prediction error to incentive salience: mesolimbic computation of reward motivation” *European Journal of Neuroscience* 35: 1124-1143, 2012
- ✚ **Bertholon JF, Becquemin MH, Annesi-Maesano I, Dautzenberg B;** “Electronic cigarettes: a short review” *Respiration* 86(5): 433-438, 2013
- ✚ **Besson M, David V, Baudonnat M, Cazala P, Guilloux JP, Reperant C, Cloez-Tayarani I, Changeux JP, Gardier AM, Granon S;** “Alpha7-nicotinic receptors modulate nicotine-induced reinforcement and extracellular dopamine outflow in the mesolimbic system in mice” *Psychopharmacology* 220: 1-14, 2012
- ✚ **Besson M;** “Genetic dissociation of two behaviors associated with nicotine addiction: beta-2 containing nicotinic receptors are involved in nicotine reinforcement but not in withdrawal syndrome” *Psychopharmacology (Berl)* 187: 189-199, 2006
- ✚ **Bevins RA, Besheer J;** “Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study recognition memory” *Nature Protocols* 1: 1306-1311, 2006
- ✚ **Beyer J, Lovelace C, Yurekli A;** “Poverty and tobacco” *Tobacco Control*, 10: 210-211, 2001
- ✚ **Bhagwat SV, Raza VH, Mullick J, Avadhani NG;** “Preferential effects of nicotine and 4-N-metil-N-nitrosamino-1-3-piridil-1-butanone on mitochondrial glutathione S-transferase A4-4 induction and increased oxidative stress in the rat brain” *Biochemical Pharmacology* 56(7): 831-839, 1998
- ✚ **Bi X, Sheng G, Feng Y, Fu J, Xie J;** “Gas- and particulate-phase specific tracer and toxic organic compounds in environmental tobacco smoke” *Chemosphere* 61(10): 1512-1522, 2005
- ✚ **Biala G, Stanjak N;** “Varenicline and mecamylamine attenuate locomotor sensitization and cross-sensitization induced by nicotine and morphine in mice” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 96(2): 141-147, 2010

- ✚ **Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzza RA, Xuei X, Saccone NL, Saccone SF, Bertelsen S, Fox L;** “Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence” *American Journal of Psychiatry* 165(9): 1163-1171, 2008
- ✚ **Bishop GB, Cullinan WE, Curran E, Gutstein HB;** “Abused drugs modulate RGS4 mRNA levels in rat brain: comparison between acute drug treatment and a drug challenge after chronic treatment” *Neurobiology of Disease* 10: 334-343, 2002
- ✚ **Bjorklund A, Dunnett SB;** “Dopamine neuron systems in the brain: an update” *Trends in Neurosciences* 30: 194-202, 2007
- ✚ **Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR;** “A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory” *Neurobiology of Learning and Memory* 92: 529-534, 2009
- ✚ **Blaser RE, Chadwick L, McGinnis GC;** “Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*)” *Behavioral Brain Research* 208(1): 56-62, 2010
- ✚ **Blasi F;** “Electronic nicotine delivery systems – a known unknown” *In: European Parliament, Workshop on Electronic Cigarettes, Brussels, 2013*
- ✚ **Boido A, Budriesi R, Boido CC, Ioan P, Terranova E, Chiarini A, Sparatore F;** “Alpha1- and alpha2-adrenoreceptor antagonist profiles of 1- and 2- [omega-(4-arylpiperazin-1-yl)alkyl]-1,2,3-benzotriazoles” *Chemistry & Biodiversity* 2(19): 1290-1304, 2005
- ✚ **Bolin BL, Cornett HL, Barnes AF, Gill KE, Akins CK;** “Nicotine induced a conditioned place preference in male Japanese quail (*Coturnix japonica*)” *Physiology and Behavior* 107: 364-367, 2012
- ✚ **Bolliger CT, Zellweger JP, Danielsson T, van Biljon X, Robidou Am, Westin A, Perruchoud AP, Säwe U;** “Smoking reduction with oral nicotine inhalers: double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety” *BMJ* 321(7257): 329-333, 2000
- ✚ **Borgerding MF, Bodnar JA, Chung HL, Mangan PP, Morrison CC, Risner CH, Rogers JC, Simmons DF, Uhrig MS, Wendelboe FN, Wingate DE, Winkler LS;** “Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part I:



- Chemical composition of mainstream smoke” *Food and Chemical Toxicology* 36(7): 169-182, 1998
- ✚ **Bowman TV, Zon LI**; “Swimming into the future of drug discovery: in vivo chimica screens in zebrafish” *ACS Chemical Biology* 5(2): 159-161, 2010
- ✚ **Bozikas VP, Niopas I, Kafantari A, Kanaze FI, Gabrieli C, Melissidis P, Gamvrula K, Fokas K, Karavatos A**; “No increased levels of the nicotine metabolite cotinine in smokers with schizophrenia” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29: 1-6, 2005
- ✚ **Braida D, Limonta V, Pegorini S, Zani A, Guerini-Rocco C, Gori E, Sala M**; “Hallucinatory and rewarding effect of Salvinorin A in zebrafish: jappa-opioid and CB1-cannabinoid receptor involvement” *Psychopharmacology* 190: 441-448, 2007
- ✚ **Braida D, Ponzoni L, Martucci R, Sparatore F, Gotti C, Sala M**; “Role of neural nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) on learning and memory in zebrafish” *Psychopharmacology (Berl)* 9: 1975-1985, 2014
- ✚ **Braida D, Pozzi M, Parolaro D, Sala M**; “Intracerebral self-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the rat: interaction with the opioid system” *European Journal of Pharmacology* 413:227-234, 2001
- ✚ **Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK**; “Crystal structure of an Ach-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors” *Nature* 411(6835): 269-276, 2001
- ✚ **Brennan CH**; “Zebrafish behavioural assays of translational relevance for the study of psychiatric disease” *Reviews in the neurosciences* 22(1): 37-48, 2011
- ✚ **Bretau S, Li Q, Lockwood BL, Kobayashi K, Lin E, Guo S**; “A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish” *Neuroscience* 143(3): 1109-1116, 2007
- ✚ **Broadbent S, Groot-Kormelink PJ, Krashia PA, Harkness PC, Millar NS, Beato M, Silvilotti LG**; “Incorporation of the 3 subunit has a dominant-negative effect on the function of recombinant central-type neuronal nicotinic receptors” *Molecular Pharmacology* 70: 1350-1357, 2006

- ✚ **Broide RS, Leslie FM;** “The  $\alpha_7$  nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity” *Molecular Neurobiology* 20: 1-16, 1999
- ✚ **Brown KC, Lau JK, Dom AM, Witte TR, Luo H, Crabtree CM, Shah YH, Shiflett BS, Marcelo AJ, Proper NA, Hardman WE, Egleton RD, Chen YC, Mangiarua EI, Desupta P;** “MG624, an  $\alpha_7$ -nAChR antagonist, inhibits angiogenesis via Egr-1/FGF2 pathway” *Angiogenesis* 15: 99-114, 2012
- ✚ **Buccafusco JJ, Jackson WJ, Terry AV Jr, Marsh KC, Decker MW, Arneric SP;** “Improvement in performance of a delayed matching to sample task by monkeys following ABT-418: a novel cholinergic channel activator for memory enhancement” *Psychopharmacology* 120(3): 256-266, 1995
- ✚ **Buisson B, Bertrand D;** “Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4(beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function” *The Journal of Neuroscience* 21: 1819-1829, 2001
- ✚ **Buisson B, Bertrand D;** “Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation” *Trends in Pharmacological Sciences* 23(3): 130-136, 2002
- ✚ **Buisson B, Bertrand D;** “Open-channel blockers at the human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor” *Molecular Pharmacology* 53: 555-563, 1998
- ✚ **Bullen C, Howe C, Laugesen M, McRobbie H, Parag V, Williman J, Walker N;** “Electronic cigarettes for smoking cessation: a randomized controlled trial” *The Lancet*, 382(9905): 1629-1637, 2013
- ✚ **Burke MV, Ebbert JO, Hays JT;** “Treatment of tobacco dependence” *Mayo Clinic Proceedings* 83: 479-483, 2008
- ✚ **Butler NR, Goldstein H;** “Smoking in pregnancy and subsequent child development” *British Medical Bulletin* 4:573-575, 1973
- ✚ **Byrne A;** “Signs and symptoms in drug addiction” *Australian Family Physician* 24(3): 420, 1995
- ✚ **Cachat J, Canavello P, Elegante M, Bartels B, Hart P, Bergner C, Egan R, Duncan A, Tien D, Chung A, Wong K, Goodspeed J, Tan J, Grimes C, Elkhayat S, Suci C, Rosenberg M, Chung KM, Kadri F, Roy S, Gaikwad S, Stewart A, Zapolsky I,**

- Gilder T, Mohnot S, Beeson E, Amri H, Zukowska Z, Soignier RD, Kalueff AV;** “Modeling withdrawal syndrome in zebrafish” *Behavioural Brain Research* 208: 371-376, 2010
- ✚ **Cachope R, Cherr JF;** “Local control of striatal dopamine release” *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8: 188, 2014
- ✚ **Cadet JL;** “Amphetamine recapitulates developmental programs in the zebrafish” *Genome Biology* 10: 231, 2009
- ✚ **Cadoni C, Di Chiara G;** “Differential changes in accumbens shell and core dopamine in behavioral sensitization to nicotine” *European Journal of Pharmacology* 387: R23-R25, 2000
- ✚ **Cahan Z, Siegel M;** “Electronic cigarettes as a harm reduction strategy for tobacco control: a step forward or a repeat of past mistakes?” *Journal of Public Health Policy* 32(1): 16-31, 2011
- ✚ **Calabresi P, Pisani A, Centoze D, Bernardi G;** “Synaptic plasticity and physiological interactions between dopamine and glutamate in the striatum” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 21:519-523, 1997
- ✚ **Camfield DA, Scholey AB, Pipingas A, Silberstein RB, Kure C, Zangara A, Kras M, Stough C;** “The neurocognitive effects of *Hypericum perforatum* Special Extract (Ze 117) during smoking cessation” *Phytotherapy Research* 27(11): 1605-1613, 2012
- ✚ **Camì J, Farrè M;** “Drug addiction” *The New England Journal of Medicine* 349: 975-986, 2003
- ✚ **Caminiti MC;** “Il fumo come fattore di rischio nelle patologie cardiovascolari” 2010
- ✚ **Campbell NR, Fernandes CC, Halff AW, Berg DK;** “Endogenous signaling through  $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors promotes maturation and integration of adult-born neurons in hippocampus” *The Journal of Neuroscience* 30(26): 8734-8744, 2010
- ✚ **Cantrell FL;** “adverse effects of e-cigarette exposure” *Journal of Community Health*, 2013

- ✚ **Caponnetto P, Campagna D, Cibella F, Morjaria JB, Caruso M, Russo C, Polosa R;** “Efficiency and safety of an electronic cigarette (ECLAT) as tobacco cigarettes substitute: a prospective 12 month randomized control design study” *PLoS One* 8(6): e66317, 2013
- ✚ **Caponnetto P, Keller E, Bruno CM, Polosa R;** “How to handle relapse in smoking cessation: strategies and recommendations” *Internal and Emergency Medicine* 8(1): 7-12, 2013
- ✚ **Caponnetto P, Auditore R, Russo C, Cappello GC, Polosa R;** “Impact of an electronic cigarette on smoking reduction and cessation in schizophrenic smokers: a prospective 12-month pilot study” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10(2): 446-461, 2013
- ✚ **Caponnetto P, Campagna D, Cibella F, Morjaria JB, Caruso M, Russo C, Polosa R;** “Efficiency and safety of an electronic cigarette (ECLAT) as tobacco cigarettes substitute: a prospective 12-month randomized control design study” *PLOS One* 8(6): e66317, 2013
- ✚ **Caponnetto P, Campagna D, Papale G, Russo C, Polosa R;** “The emerging phenomenon of electronic cigarettes” *Expert Review of Respiratory Medicine* 6(1): 63-74, 2012
- ✚ **Caponnetto P, Polosa R, Russo C, Leotta C, Campagna D;** “Successful smoking cessation with electronic cigarettes in smokers with a documented history of recurring relapse: a case series” *Journal of Medical Case Reports* 5(1): 585, 2011
- ✚ **Carbonelle E, Sparatore F, Canu-Boido C, Salvagno C, Baldani-Guerra B, Terstappen G, Zwart R, Vijverberg H, Clementi F, Gotti C;** “Nitrogen substitution modifies the activity of cytosine on neuronal nicotinic receptor subtypes” *European Journal of Pharmacology* 471: 85-96, 2003
- ✚ **Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ;** “The many faces of CREB” *Trends in Neurosciences* 28: 436-445, 2005
- ✚ **Carlezon WAJ, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ;** “Regulation of cocaine reward by CREB” *Science* 282: 2272-2275, 1998

- ✚ **Carmines EL**; “Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 1: Cigarette design, testing approach and review of results” *Food and Chemical Toxicology* 40: 77-91, 2002
- ✚ **Caruncho HJ, Guidotti A, Lindstrom J, Costa E, Pesold C**; “Subcellular localization of the  $\alpha_7$  nicotinic receptor in rat cerebellar granule cell layer” *NeuroReport* 8: 1431-1433, 1997
- ✚ **Castañé A, Valjent E, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O**; “Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence” *Neuropharmacology* 43(5): 857-867, 2002
- ✚ **Catanzaro DF, Zhou Y, Chen R, Yu F, Catanzaro SE, De Lorenzo MS, Subbaramaiah K, Zhou XK, Pratico D, Dannenberg AJ, Weksler BB**; “Potentially reduced exposure cigarettes accelerate atherosclerosis: evidence for the role of nicotine” *Cardiovascular Toxicology* 7: 192-201, 2007
- ✚ **Cattaneo MG, Codignola A, Vicentini LM, Clementi F, Sher E**; “Nicotine stimulates a serotonergic loop in human small-cell lung carcinoma” *Cancer Research* 52: 5566-5568, 1993
- ✚ **Centoze D, Picconi B, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P**; “Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum” *European Journal of Neuroscience* 13: 1071-1077, 2001
- ✚ **Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, McIntosh JM, Gardier AM, Changeux JP**; “Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice” *The Journal of Neuroscience* 23: 7820-7829, 2003
- ✚ **Champtiaux N, Han ZI, Bassis A, Rossi FM, Zoli M, Marubio L, McIntosh JM, Changeux JP**; “Distribution and pharmacology of  $\alpha_6$  containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice” *The Journal of Neuroscience* 22: 1208-1217, 2002
- ✚ **Chang RC, Ho YS, Wong S, Gentleman SM, Ng HK**; “Neuropathology of cigarette smoking” *Acta Neuropathologica* 127(1): 53-69, 2014

- ✚ **Changeux JP, Bertrand D, Corringier PJ, Dehaene S, Edelstein S, Lena C, Le Novere N, Marubio L, Picciotto M, Zoli M;** “Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement” *Brain Research Reviews* 26: 198-216, 1998
- ✚ **Changeux JP, Edelstein SJ;** “Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors” *Current Opinion in Neurobiology* 11: 369-377, 2001
- ✚ **Changeux JP, Edelstein SJ;** “Allosteric receptors after 30 years” *Neuron* 21(5): 959-980, 1998
- ✚ **Changeux JP, Edelstein SJ;** “Nicotinic acetylcholine receptors: from molecular biology to cognition” *New York: Odile Jacob*, 2005
- ✚ **Changeux JP;** “Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice” *Nature Reviews Neuroscience* 11: 389-401, 2010
- ✚ **Charlet K, Beck A, Heinz A;** “The dopamine system in mediating alcohol effects in humans” *Current topics in behavioral neurosciences* 13: 461-488, 2013
- ✚ **Chatterjee D, Gerlai R;** “High precision liquid chromatography analysis of dopaminergic and serotonergic responses to acute alcohol exposure in zebrafish” *Behavioral Brain Research* 200: 208-213, 2009
- ✚ **Chen H, Vlahos R, Bozinovski S, Jones J, Anderson GP, Morris MJ;** “Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain neuropeptide Y in mice” *Neuropsychopharmacology* 30(4): 713-719, 2005
- ✚ **Chen PX, Moldoveanu SC;** “Mainstream smoke chemical analyses for 2R4F Kentucky reference cigarette” *Beitrag zur Tabakforschung* 20: 448-458, 2003
- ✚ **Cheramy A, Kemel ML, Gauchy C, Desce JMJ, Galli T, Barbeito L et al;** “Role of excitatory amino acids in the direct and indirect presynaptic regulation of dopamine release from nerve terminals of nigrostriatal dopaminergic neurons” *Amino Acids* 1: 351-363, 1991
- ✚ **Chiamulera C, Epping-Jordan MP, Zocchi A, Marcon C, Cottiny C, Tacconi S, Corsi M, Orzi F, Conquet F;** “Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice” *Nature Neuroscience* 4(9): 873-874, 2001

- ✚ **Chiamulera C**; “Cue reactivity in nicotine and tobacco dependence: a dual-action model of nicotine as a primary reinforcement and as an enhancer of the effects of smoking-associated stimuli” *Brain Research Reviews* 48: 74-97, 2005
- ✚ **Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A**; “Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomized trials” *Lancet* 370: 1706-1013, 2007
- ✚ **Clarke PB, Fu DS, Jakubovik A, Fibiger HC**; “Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 246(2): 701-708, 1988
- ✚ **Clementi F, Nistri A, Marchi M, Eusebi F, Zoli M**; “I recettori nicotinici neuronali: dalla struttura alla funzione” *Ministero dell’Istruzione, dell’Università e della ricerca scientifica, Programma di ricerca* 2000
- ✚ **Clunes LA, Bridges A, Alexis N, Tarran R**; “In vivo versus in vitro airway surface liquid nicotine levels following cigarette smoke exposure” *J Anal Toxicol* 32: 201-207, 2008
- ✚ **Cobb NK, Byron MJ, Abrams DB, Shields PG**; “Novel nicotine delivery systems and public health: the rise of the e-cigarette” *American Journal of Public Health* 100: 2340-2342, 2010
- ✚ **Coe JW, Brooks PR, Vetelino MG, Wirtz MC, Arnold EP, Huang J, Sands SB, Davis TI, Lebel LA, Fox CB, Shrikhande A, Heym JH, Schaeffer E, Rollema H, Lu Y, Mansbach RS, Chambers LK, Rovetti CC, Schulz DW, Tingley FD 3<sup>rd</sup>, O’Neill BT**; “Vareniclina: an  $\alpha_4\beta_2$  nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation” *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 3474-3477, 2005
- ✚ **Collins AC, Pogun S, Nesil T, Kanit L**; “Oral nicotine self-administration in rodents” *Journal of Addiction Research and Therapy* S2: 004, 2012
- ✚ **Connors CK, Levin ED, Sparrow E, Hinton SC, Erhardt D, Meck WH, Rose JE, March J**; “Nicotine and attention in adult attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)” *Psychopharmacology Bulletin* 32(1): 67-73, 1996

- ✚ **Constall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM;** “Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 32(3): 777-785, 1989
- ✚ **Cooke JP, Grebemarim YT;** “Endothelial nicotinic acetylcholine receptors and angiogenesis” *Trends in Cardiovascular Medicine* 18: 247-253, 2008
- ✚ **Cooper E, Couturier S, Ballivet M;** “Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptors” *Nature* 350: 235-238, 1991
- ✚ **Corbillé AG, Valjent E, Marsicano G, Ledent C, Lutz B, Hervè D, Girault JA;** “Role of cannabinoids type 1 in locomotor activity and striatal signaling in response to psychostimulants” *Journal of Neuroscience* 27(26): 6937-6947, 2007
- ✚ **Cornuz J, Zwahlen S, Jungi WF, Osterwalder J, Klingler K, van Melle G, Bangala Y, Guessous I, Muller P, Willers J, Maurer P, Bachmann MF, Cerny T;** “A vaccine against nicotine for smoking cessation: a randomized controlled trial” *PLoS One* 3: e2547, 2008
- ✚ **Corrigall WA, Coen KM;** “Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited- access schedule” *Psychopharmacology* 99:473-478, 1989
- ✚ **Corrigall WA, Franklin KB, Coen KM, Adamson KL;** “Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area” *Brain Research* 653(1-2): 278-284, 1994
- ✚ **Corrigall WA, Franklin KB, Coen KM, Clarke PB;** “The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine” *Psychopharmacology (Berl)* 107(2-3): 285-289, 1992
- ✚ **Corrigall WA;** “Nicotine self-administration in animals as a dependence model” *Nicotine Tobacco Research* 1(1): 11-20, 1999
- ✚ **Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP;** “Nicotinic receptors at the amino acid level” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40: 431-458, 2000
- ✚ **Corti A, Pistolesi M, Spatafora M, Fietta AM, Frabbri L, Bonecchi R, Maiorana A;** “Fumo di tabacco, infiammazione e cancro al polmone: aspetti molecolari, biologici,



- clinici e anatomopatologici” *Ministero dell’Istruzione, dell’Università e della Ricerca Scientifica, Progetto di Ricerca, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia*, 2004
- ✚ **Counotte DS, Smit AB, Spijker S**; “The Yin and Yang of nicotine: harmful during development, beneficial in adult patient populations” *Frontiers in Pharmacology* 3: 1-8, 2012
  - ✚ **Cousin MA, Ebbert JO, Wiinamaki AR, Urban MD, Argue DP, Ekker SC, Klee EW**; “Larval zebrafish model for FDA-approved drug repositioning for tobacco dependence treatment” *PLOSOne* 9(3): e90467, 2014
  - ✚ **Craft RM, Howard JL**; “Cue properties of oral and transdermal nicotine in the rat” *Psychopharmacology* 96: 281-284, 1988
  - ✚ **Csiszar A, Podlutzky A, Wolin MS, Losonczy G, Pacher P, Ungvari Z**; “Oxidative stress and accelerated vascular aging: implication for cigarette smoking” *Frontiers in Bioscience* 14: 3128-3144, 2009
  - ✚ **Csordas A, Bernhard D**; “The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke” *Nature Reviews Cardiology* 10: 219-230
  - ✚ **Cunningham CS, McMahon LR**; “The effects of nicotine, varenicline and cytosine on schedule-controlled responding in mice: differences in  $\alpha_4\beta_2$  nicotinic receptor activation” *European Journal of Pharmacology* 654: 47-52, 2011
  - ✚ **Czubak A, Nowakowska E, Kus K, Sadowski C, Matschay A**; “Effect of gabapentin on cognitive processes in rats not exposed and exposed to tobacco smoke during fetal life” *Human & Experimental Toxicology* 27(12): 883-894, 2008
  - ✚ **D’Alessandro A, Boeckelmann I, Hammerwhoner M, Goette A**; “Nicotine, cigarette smoking and cardiac arhythmia: an overview” *European Journal of Preventive Cardiology* 19: 297-305, 2012
  - ✚ **D’ardenne K, McClure SM, Nystrom LE, Cohen JD**; “BOLD response reflecting dopaminergic signals in the human ventral tegmental area” *Science* 319:1264-1267, 2008
  - ✚ **Dajas-Bailador F, Wonnacott S**; “Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of the neuronal signaling” *Trends in Pharmacological Science* 25(6): 317-324, 2004

- ✚ **Damaj MI, Kao W, Martin BR;** “Characterization of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in the mouse” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307: 526-534, 2003
- ✚ **Dani JA, Balfour DJK;** “Historical and current perspective on tobacco use and nicotine addiction” *Trends in Neuroscience*, 34(7): 383-392, 2011
- ✚ **Dani JA, Bertrand D;** “Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47: 699-729, 2007
- ✚ **Dani JA, Biasi M;** “Cellular mechanisms of nicotine addiction” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 70: 439-446, 2001
- ✚ **Dani JA, Heinemann S;** “Molecular and cellular aspects of nicotine abuse” *Neuron* 16: 905-908, 1996
- ✚ **Dani JA, Radcliffe KA, Pidoplichko VI;** “Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas” *European Journal of Pharmacology* 393: 31-38, 2000
- ✚ **Dani JA;** “Overview of nicotinic receptors and their role in the central nervous system” *Biological Psychiatry* 49: 166-174, 2001
- ✚ **Darland T, Dowling JE;** “Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish” *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98(20): 11691-11696, 2001
- ✚ **Das SK;** “Harmful health effects of cigarette smoking” *Molecular and Cellular Biochemistry* 253: 159-165, 2003
- ✚ **Dautzenberg B, Delrieu A, Osman J, Sommero P, Baril S, Deutsch A, Le Maitre B, Mathern G, Radu-Loghin C, Schmitt AA, Thomas D, Underner M;** Rapport at avis d’experts sur l’e-cigarette” [http://www.ofta-asso.fr/docatel/Rapport\\_e-cigarette\\_VF\\_1](http://www.ofta-asso.fr/docatel/Rapport_e-cigarette_VF_1), 2013
- ✚ **David SP, Lancaster T, Stead LF, Evins AE, Prochaska JJ;** “Opioid antagonists for smoking cessation” *The Cochrane database of systematic reviews* 6: CD003086, 2013

- ✚ **Davila-Garcia M, Musachio J, Kellar K;** “Chronic nicotine administration does not increase nicotinic receptors labeled by [<sup>125</sup>I]-Epibatidine in adrenal gland, superior cervical ganglia, pineal or retina” *Journal of Neurochemistry* 85(5): 1237-1246, 2003
- ✚ **Dawkins L, Corcoran O;** “Acute electronic cigarette use: nicotine delivery and subjective effects in regular users” *Psychopharmacology (Berl)* 231: 401-407, 2014
- ✚ **Dawkins L, Turner J, Hasna S, Soar K;** “The electronic-cigarette: effects on desire to smoke, withdrawal symptoms and cognition” *Addictive Behaviors* 37(8): 970-973, 2012
- ✚ **De Biasi M;** “Meccanismi biologici della dipendenza da nicotina” *Tabaccologia* 1S: 19-23, 2006
- ✚ **De Biasi M;** “Nicotinic mechanisms in the autonomic control of organ system” *Journal of Neurobiology* 53(4): 568-579, 2002
- ✚ **De Filippi G, Baldwinson T, Sher E;** “Evidence for nicotinic acetylcholine receptor activation in rat cerebellar slices” *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 70: 447-455, 2001
- ✚ **DeLong MR, Wichmann T;** “Circuits and circuit disorders of the basal ganglia” *Archives of neurology* 64: 20-24, 2007
- ✚ **Delvecchio C, Tiefenbach J, Krause HM;** “The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery” *ASSAY and Drug Development Technologies* 9: 354-361, 2011
- ✚ **Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA;** “The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31: 673-704, 2007
- ✚ **Desce JM, Godeheu G, Galli T, Artaud F, Cheramy A, Glowinski J;** “L-glutamate-evoked release of dopamine from synaptosomes of the rat striatum: involvement of AMPA and N-methyl-D-aspartate receptors” *Neuroscience* 47:333-339, 1992
- ✚ **Dezfouli A, Balleine BW;** “Habits, action sequences and reinforcement learning” *European Journal of Neuroscience* 35: 1036-1051, 2012

- ✚ **Di Carlo A, Ippolito F**; “Early effect of cigarette smoking in hypertensive and normotensive subjects. An ambulatory blood pressure and thermographic study” *Minerva cardioangiologica* 51: 387-393, 2003
- ✚ **Di Carlo A**; “A study of early effect of cigarette smoking by telethermography” *Journal of Plastic Dermatology* 1: 5-12, 2005
- ✚ **Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D**; “Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection” *Neuropharmacology* 47(1): 227-241, 2004
- ✚ **Di Chiara G**; “Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction” *European Journal of Pharmacology* 393: 295-314, 2000
- ✚ **DiFranza JR, Aligne CA, Weitzman M**; “Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children’s health” *Pediatrics* 113(4): 1007-1015, 2004
- ✚ **Diordjevic MV, Doran KA**; “Nicotine content and delivery across tobacco products” *Handbook of Experimental Pharmacology* 192: 61-82, 2009
- ✚ **Domier CP, Monterosso JR, Brody AL, Simon SL, Mendrek A, Olmstead R, Jarvik ME, Cohen MS, London ED**; “Effects of cigarette smoking and abstinence on Stroop task performance” *Psychopharmacology (Berl)* 195: 1-9, 2007
- ✚ **Dooley K, Zon LI**; “Zebrafish: a model system for the study of human disease” *Current Opinion in Genetics & Development* 10: 252-256, 2000
- ✚ **Drapeau P, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Brustein E**; “Development of the locomotor network in zebrafish” *Progress in Neurobiology* 68: 85-111, 2002
- ✚ **Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SCF, Malicki J, Stemple DL, Stainier DYR, Zwartkuis F, Adbelilah S, Rangini Z**; “A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish” *Development* 123: 37-46, 1996
- ✚ **Drummond C, Edwards G, Glanz A, Glass I, Jackson P, Oppenheimer E, Sheehan M, Taylor C, Thom B**; “Rethinking drug policies in the context of the acquired immunodeficiency syndrome” *Bulletin on narcotics* 39(2): 29-35, 1987

- ✚ **Dunnett SB, Martel FL;** “Proactive interference effects on short-term memory in rats: basic parameters and drug effects” *Behavioral Neuroscience* 104(5): 655-665, 1990
- ✚ **Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM;** “Nicotine and brain development” *Birth Defects Research Part C: Embryo Today* 84: 30-44, 2008
- ✚ **Ebbert JO, Croghan IT, Sood A, Schroeder DR, Hays JT, Hurt RD;** “Varenicline and bupropion sustained-release combination therapy for smoking cessation” *Nicotine & Tobacco Research* 11: 234-239, 2009
- ✚ **Ebbert JO, Hatsukami DK, Croghan IT, Schroeder DR, Allen SS, et al;** “Combination varenicline and bupropion SR for tobacco-dependence treatment in cigarette smokers: a randomized trial” *JAMA* 311: 155-163, 2014
- ✚ **Ebbert JO, Wyatt KD, Hays JT, Klee EW, Hurt RD;** “Varenicline for smoking cessation: efficacy, safety and treatment recommendations” *Patient Preference Adherence* 4:355-362, 2010
- ✚ **Eddins D, Petro A, Williams P, Cerutti DT, Levin ED;** “Nicotine effects on learning in zebrafish: the role of dopaminergic systems” *Psychopharmacology* 202: 103-109, 2009
- ✚ **Efroyimson D, Ahmed S, Townsend J, Alam SM, Dey AR, Saha R, Dhar B, Sujon AI, Ahmed KU, Rahman O;** “Hungry for tobacco: an analysis of the economic impact of tobacco consumption on the poor in Bangladesh” *Tobacco Control*, 10: 212-217, 2001
- ✚ **Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, Elkhavat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukowska Z, Kalueff AV;** “Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish” *Behavioral Brain Research* 205(1): 38-44, 2009
- ✚ **Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P;** “Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis” *Trends in Pharmacological Sciences* 29: 151-158, 2008
- ✚ **Eichenbaum H;** “Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory” *Neuron* 44(1): 109-120, 2004
- ✚ **Eisen JS;** “Motoneuronal development in the embryonic zebrafish” *Development, Suppl.* 2: 141-147, 1991

- ✚ **Elgoyen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S;** “Alpha9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells” *Cell* 79: 705-715, 1994
- ✚ **Ennaceur A, Delacour J;** “A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats: behavioral data” *Behavioral Brain Research* 31: 47-59, 1988
- ✚ **Ennaceur A;** “One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues” *Behavioral Brain Research* 215: 244-254, 2010
- ✚ **Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, Markou A;** “Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal” *Nature* 393: 76-79, 1998
- ✚ **Erbach G;** “Electronic cigarettes” *Library of the European Parliament, Bruxelles* <http://www.europarl.europa.eu/eplibrary/Electronic-cigarettes>, 2013
- ✚ **Erhardt L;** “Cigarette smoking: an undertreated risk factor for cardiovascular disease” *Atherosclerosis* 205: 23-32, 2009
- ✚ **Etter JF, Bullen C;** “Electronic cigarette: users profile, utilization, satisfaction and perceived efficacy” *Addiction* 106(11): 2017-2028, 2011
- ✚ **Etter JF;** “Cytisine for smoking cessation: a literature review and a meta-analysis” *Archives of Internal Medicine* 166(15): 1553-1559, 2006
- ✚ **Etter JF;** “Electronic cigarettes: a survey of users” *BMC Public Health* 10: 231, 2010
- ✚ **Evans SE, Hoffman AC;** “Electronic cigarettes: abuse liability, topography and subjective effects” *Tobacco Control* doi: 10.1136/tobaccocontrol-2013-051489, 2014
- ✚ **Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, Arroyo M, Robledo P, Robbins TW;** “Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala- ventral striatal subsystems” *Annals of the New York Academy of Sciences* 877: 412-438, 1999
- ✚ **Exley R, Cragg SJ;** “Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission” *British Journal of Pharmacology* 153 (Suppl 1): S283-S297, 2008
- ✚ **Exley R, Maubourguet N, David V, Eddine R, Evrard A, Pons S, Marti F, Threlfell S, Cazala P, McIntosh JM, Changeux JP, Maskos U, Cragg SJ, Faure P;** “Distinct

- contributions of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha4 and subunit alpha6 to the reinforcing effects of nicotine” *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 7577-7582, 2011
- ✚ **Facchino AR**; “La sigaretta elettronica-Sperling Tips: fumare meno, fumare meglio” *Sperling & Kupfer Editori, Milano*, 2013
- ✚ **Faessel HM, Obach RS, Rollema H, Ravva P, Williams KE, et al**; “A review of the clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of varenicline for smoking cessation” *Clinical pharmacokinetics* 49: 799-816, 2010
- ✚ **Fagerstrom KO, Hughes JR, Rasmussen T, Callas PW**; “Randomised trial investigating effect of anovel nicotine delivery device (Eclipse) and a nicotine oral inhaler on smoking behavior, nicotine and carbon monoxide exposure and motivation to quit” *Tobacco Control* 9(3): 327-333, 2000
- ✚ **Falvella FS, Galvan A, Frutallanti E, Spinola M, Calabrio E, Carbone A, Incarbone M, Santambrogio L, Pastorino U, Dragani TA**; “Trascription deregulation of the 15q25 locus in association with lung adenocarcinoma risk” *Clinical Cancer Research* 15: 1837-1842, 2009
- ✚ **Farsalinos KE, Romagna G, Tsiapras D, Kyrzopoulos S, Voudris V**; “Evaluation of electronic cigarette use (vaping) topography and estimation of liquid consumption: implications for research protocol standards definition and for public health authorities regulation” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10: 2500-2504, 2013
- ✚ **Fattore L, Cossu G, Martellotta CM, Fratta W**; “Intravenous self-administration of the cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 in rats” *Psychopharmacology (Berl)* 156: 410-416, 2001
- ✚ **Fattore L, Melis M, Fadda P, Pistis M, Fratta W**; “The endocannabinoid system and nondrug rewarding behaviours” *Experimental Neurology* 224: 23-36, 2010
- ✚ **Fenster CP, Whitworth TL, Sheffield EB, Quick MW, Lester RA**; “Upregulation of surface alpha4beta2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine” *The Journal of Neuroscience* 19: 4804-4814, 1999

- ✚ **Figà –Talamanca I, Modolo MA;** “Evaluation of an antismoking educational programme among adolescents in Italy” *Hygie* 8: 24-28, 1989
- ✚ **Fiore MC;** “Treating tobacco use and dependence: an introduction to the US Public Health Service Clinical Practice Guideline” *Respiratory Care* 45(10): 1196-1199, 2000
- ✚ **Fiore MC;** “US public health service clinical practice guideline: treating tobacco use and dependence” *Respiratory Care* 45: 1200-1262, 2000
- ✚ **Flouris AD, Chorti MS, Poulianiti KP, Jamurtas AZ, Kostikas K, Tzatzarakis MN, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM, Koutedakis Y;** “Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function.” *Inhalation Toxicology* 25(2): 91-101, 2013
- ✚ **Fogelman K;** “Smoking in pregnancy and subsequent development of the child” *Child: Care, Health and Development* 6: 233-249, 1980
- ✚ **Ford CP;** “The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and trasmission” *Neuroscience* doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.025, 2014
- ✚ **Foulds J, Stapleton J, Swetternham J, Bell N, McSorley K, Russel MA;** “Cognitive performance effects of subcutaneous nicotine in smokers and never-smokers” *Psychopharmacology (Berl)* 127(1): 31-38, 1996
- ✚ **Foulds J;** “The neurobiological basis for partial agonist treatment of nicotine dependence: varenicline” *International Journal of Clinical Practice* 60(5): 571-576, 2006
- ✚ **Franceschi S, Bidoli E;** “The epidemiology of lung cancer” *Annals of Oncology -- Supplements* 5: S3-S6, 1999
- ✚ **Frankish HM, Dryden S, Wang Q, Bing C, MacFarlane IA, Williams G;** “Nicotine administration reduces neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA concentrations in the rat hypothalamus: NPY may mediate nicotine’s effects on energy balance” *Brain Research* 694(1-2): 139-146, 1995
- ✚ **Fratiglioni IL, Wang HX;** “Smoking and Parkinson’s and Alzheimer’s disease: review of the epidemiological studies” *Behavioural Brain Research* 113: 117-120, 2000



- ✚ **Freiman A, Bird G, Metelitsa AI, Barakin B, Lauzon GJ;** “Cutaneous effects of smoking” *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* 8(6): 415-423, 2004
- ✚ **Fresquez MR, Pappas RS, Watson CH;** “Establishment of toxic metal reference range in tobacco from U.S. cigarettes” *Journal of Analytical Toxicology* 37: 298-304, 2013
- ✚ **Fu SS, Partin MR, Snyder A, An LC, Nelson DB, Clothier B, Nugent S, Willenbring ML, Joseph AM;** “Promoting repeat tobacco dependence treatment: are relapsed smokers interested?” *American Journal of Managed Care* 12(4): 235-243, 2006
- ✚ **Fudala PJ, Teoh KW, Iwamoto ET;** “Pharmacologic characterization of nicotine-induced conditioned place preference” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 22(2): 237-241, 1985
- ✚ **Fuxe K, Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Diaz-Cabiale Z, Rivera A, Ferraro L, Tanganelli S, Tarakanov AO, Garriqa P, Narvàez JA, Ciruela F, Guescini M, Agnati LF;** “Extrasynaptic neurotransmission in the modulation of brain function. Focus on the striatal neuronal-glia networks” *Frontiers in Physiology* 3:136, 2012
- ✚ **Gaimarri A, Moretti M, Riganti L, Zanardi A, Clementi F, Gotti C;** “Regulation of neuronal nicotinic receptor traffic and expression” *Brain Research Reviews* 55: 134-143, 2007
- ✚ **Gajalakshmi GK, Jha P, Rason K, Nguyen S;** “Global patterns of smoking and smoking-attributable mortality” *Tobacco Control in Developing Countries – Oxford University Press*, 2000
- ✚ **Gamberana C;** “Le basi neurobiologiche delle tossicodipendenze” *Medicina delle Tossicodipendenze* 54-55, 2007
- ✚ **Garrett BE, Rose CA, Henningfield JE;** “Tobacco addiction and pharmacological interventions” *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2: 1545-1555, 2001
- ✚ **Gentry CL, Lukas RJ;** “Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure” *Current Drug Targets CNS Neurological Disorders* 1(4): 359-385, 2002

- ✚ **Gentry-Nielsen MJ, Top EV, Snitily MU, Casey CA, Preheim LC.**; “A rat model to determine the biomedical consequences of concurrent ethanol ingestion and cigarette smoke exposure” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 28: 1120-1128, 2004
- ✚ **George O, Grieder TE, Cole M, Koob GF.**; “Exposure to chronic intermittent nicotine vapor induces nicotine dependence” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 96(1): 104-107, 2010
- ✚ **George O, Lloyd A, Carroll FI, Damaj MI, Koob GF.**; “Varenicline blocks nicotine intake in rats with extended access to nicotine self-administration” *Psychopharmacology (Berl)* 213: 715-722, 2011
- ✚ **Gerlai R, Chatterjee D, Pereira T, Sawashima T, Krishnannair R.**; “Acute and chronic alcohol dose: population differences in behavior and neurochemistry of zebrafish” *Genes, Brain and Behavior* 8: 586-599, 2009
- ✚ **Gerlai R, Lahaval M, Guo S, Rosenthal A.**; “Drinks like a fish: zebrafish (*Danio Rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 67: 773-782, 2000
- ✚ **Gerlai R, Lee V, Blaser R.**; “Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio Rerio*)” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 85: 752-761, 2006
- ✚ **Gerlai R.**; “Zebrafish: an incharted behavior genetic model” *Behavior Genetics* 33: 461-468, 2003
- ✚ **Giacomini NJ, Rose B, Kobayashi K, Guo S.**; “Antipsychotics produce locomotor impairment in larval zebrafish” *Neurotoxicology and Teratology* 28: 245-250, 2006
- ✚ **Gilardi L.**; “Sigaretta elettronica: aspetti tossicologici” *DoRS – Centro Regionale di Documentazione per la Promozione della Salute, Torino*, 2013
- ✚ **Goldberg S, Risner M, Stoleran I, Reavill C, Garcha H.**; “Nicotine and some related compounds: effects on schedule-controlled behavior and discriminative properties in rats” *Psychopharmacology (Berl)* 97(3): 295-302, 1989
- ✚ **Goldberg SR, Spealman RD, Goldberg DM.**; “Persistent behavior at high rates maintained by intravenous self-administration of nicotine” *Science* 214: 573-575, 1981

- ✚ **Goldstein DS, Eisenhofer G, McCarty R**; “Catecholamines: bridging basic science with clinical medicine” *Academic Press, San Diego, CA* 1998
- ✚ **Goniewicz ML, Kuma T, Gawron M, Knysak J, Kosmider L**; “Nicotine levels in electronic cigarettes” *Nicotine & Tobacco Research* 15(1): 158-166, 2012
- ✚ **Goniewicz ML, Lingas EO, Hajek P**; “Patterns of electronic cigarette use and user beliefs about their safety and benefits: an internet survey” *Drug and Alcohol Review* 32(2): 133-140, 2012
- ✚ **Goniewicz ML, Lingas EO, Hajek P**; “Patterns of electronic cigarette use and user beliefs about their safety and benefits: an Internet survey” *Drug and Alcohol Review* 32: 133-140, 2013
- ✚ **Gonzales D, Rennard SI, Nides M, Oncken C, Azoulay S, Billing CB, Watsky EJ, Gong J, Williams KE, Reeves KR**; “Vareniclina, an  $\alpha_4\beta_2$  nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation” *The journal of the American Association* 296(1): 47-55, 2006
- ✚ **Goriounova NA, Mansvelder HD**; “Nicotine exposure during adolescence alters the rules for prefrontal cortical synaptic plasticity during adulthood” *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 4: 1-9, 2012
- ✚ **Gotti C, Carbonelle E, Moretti M, Zwart R, Clementi F**; “Drug selective for nicotinic receptor subtypes: a real possibility or a dream?” *Behavioural Brain Research* 113: 183-192, 2000
- ✚ **Gotti C, Clementi F, Fornasari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, Moretti M, Pedrazzi P, Pucci L, Zoli M**; “Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors” *Biochemical Pharmacology* 78: 703-711, 2009
- ✚ **Gotti C, Clementi F**; “I recettori canale” *Farmacologia cellulare e molecolare UTET* 245, 2012
- ✚ **Gotti C, Clementi F**; “Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology” *Progress in Neurobiology* 74(6): 363-396, 2004
- ✚ **Gotti C, Fornasari D, Clementi F**; “Human neuronal nicotinic receptors” *Progress in Neurobiology* 53: 199-237, 1997

- ✚ **Gotti C, Guiducci S, Tedesco V, Corbioli S, Zanetti L, Moretti M, Zanardi A, Rimondini R, Mugnaini M, Clementi F, Chiamulera C, Zoli M;** “Nicotinic acetylcholine receptors in the mesolimbic pathway: primary role of ventral segmenta area alpha6beta2 receptors in mediating sistemi nicotine effects on dopamine release, locomotion and reinforcement” *The Journal of Neuroscience* 30: 5311-5325, 2010
- ✚ **Gotti C, Moretti M, Clementi F, Riganti L, McIntosh JM, Collins AC, Marks MJ, Whiteaker P;** “Expression of nigrostriatal alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors is selectively reduced, but not eliminated, by beta 3 subunit gene deletion” *Molecular Pharmacology* 67: 2007-2015, 2005
- ✚ **Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F, Zoli M;** “Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors” *Biochemical Pharmacology* 74(8): 1102-1111, 2007
- ✚ **Gotti C, Ogando AE, Hanke W, Schlue R, Moretti M, Clementi F;** “Purification and characterization o fan alpha-bungarotoxin receptor that forms a functional nicotinic channel” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 3258-3262, 1991
- ✚ **Gotti C, Omini C, Berti F, Clementi F;** “Isolation of a polipeptide from the venom of *Bungarus multicinctus* that binds to ganglia and blocks the ganglionic trasmission in mammals” *Neuroscience* 15: 563-575, 1985
- ✚ **Gotti C, Zoli M, Clementi F;** “Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance” *TIPS* 27: 482-491, 2006
- ✚ **Gould TJ, Leach PT;** “Cellelar, molecular and genetic substrates underlying the impact of nicotine on learning” *Neurobiology of Learning and Memory* 107: 108-132, 2014
- ✚ **Gould TJ, Rukstalis M, Lewis MC;** “Atomoxetine and nicotine enhance prepulse inhibition of acoustic startle in C57BL/6 mice” *Neuroscience Letters* 377: 85-90, 2005
- ✚ **Gourlay SG, Stead LF, Benowitz N;** “Clonidine for smoking cessation” *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3, Art. No: CD000058, pub2, 2004

- ✚ **Govind AP, Walsh H, Green WN;** “Nicotine-induced upregulation of native nicotinic receptors is caused by multiple mechanisms” *The Journal of Neuroscience* 32: 2227-2238, 2012
- ✚ **Grabus SD, Martin BR, Brown SE, Damaj MI;** “Nicotine place preference in the mouse: influences of prior handling, dose and strain and attenuation by nicotinic receptor antagonists” *Psychopharmacology* 184: 456-463, 2006
- ✚ **Grady SR, Moretti M, Zoli M, Marks MJ, Zanardi A, Pucci L, Clementi F, Gotti C;** “Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a large variety of a common nAChR subtypes, but only the  $\alpha 3\beta 4$  and  $\alpha 3\beta 3\beta 4$  subtypes mediate acetylcholine release” *The Journal of Neuroscience* 29(7): 2272-2282, 2009
- ✚ **Graeff FG;** “In serotonin and experimental anxiety” *Psychopharmacology (Berl)* 163(3-4): 467-476, 2002
- ✚ **Grando SA;** “Cholinergic control of epidermal cohesion” *Experimental Dermatology* 15: 265-282, 2006
- ✚ **Gratziou C;** “Acute effect of e-cigarette on pulmonary function in healthy subjects and smokers” *European Respiratory Society*, 2012
- ✚ **Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA;** “Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentration of nicotine” *Nature* 383: 713-716, 1996
- ✚ **Grillon C;** “Startle reactivity and anxiety disorders: aversive conditioning, context and neurobiology” *Biological Psychiatry* 52: 958-975, 2002
- ✚ **Gross J, Stitzer ML;** “Nicotine replacement: ten-week effects on tobacco withdrawal symptoms” *Psychopharmacology* 98: 331-334, 1989
- ✚ **Grunwald JD, Eisen JS;** “Timeline: headwaters of the zebrafish-emergence of a new model vertebrate” *Natural Reviews of Genetics* 3: 717-724, 2002
- ✚ **Guo JZ, Tredway TL, Chiappinelli VA;** “Glutamate and GABA release are enhanced by different subtypes of presynaptic nicotinic receptors in the lateral geniculate nucleus” *The Journal of Neuroscience* 18: 1963-1969, 1998

- ✚ **Guo S, Wilson SW, Cooke S, Chitnis AB, Driever W, Rosenthal A**; “Mutations in the zebrafish unmask shared regulatory pathways controlling the development of catecholaminergic neurons” *Developmental Biology* 208: 473-487, 1999
- ✚ **Guo S**; “Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish?” *Genes, Brain and Behavior* 3: 63-74, 2004
- ✚ **Gupta T, Mullins MC**; “Dissection of organs from the adult zebrafish” *Journal of Visualized Experiment* doi: 10.3791/1717, 2010
- ✚ **Haffter GM, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJM, Jiang Y, Heisensberg C, Kelsh RN**; “The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio Rerio*” *Development* 123: 1-36, 1996
- ✚ **Hajek P, Tonnesen P, Arteaga C, Russ C, Tonstad S**; “Varenicline in prevention of relapse to smoking: effect of quit pattern on response to extended treatment” *Addiction* 104: 1597-1602, 2009
- ✚ **Hajek P**; “Electronic cigarettes for smoking cessation” *The Lancet* 382(9905): 1614-1616, 2013
- ✚ **Hammond D, Wiebel F, Kozlowski IT, Borland R, Cummings KM, O’Connor RJ, McNeill A, Connolly GN, Arnott D, Fong GT**; “Revising the machine smoking regime for cigarette emissions: implications for tobacco control policy” *Tobacco Control* 16: 8-14, 2007
- ✚ **Hansch C, Telzer BR, Zhang L**; “Comparative QSAR in toxicology: examples from teratology and cancer chemotherapy of aniline mustards” *Critical Reviews in Toxicology* 25(1): 67-89, 1995
- ✚ **Harvey DM, Yasar S, Heishman SJ, Panlilio LV, Henningfield JE, Goldberg SR**; “Nicotine serves as an effective reinforcer of intravenous drug-taking in human cigarette smokers” *Psychopharmacology* 175: 134-142, 2004
- ✚ **Hatsukami DK, Jorenby DE, Gonzales D, Rigotti NA, Glover ED, Oncken CA, Tashkin DP, Reus VI, Akhavan RC, Fahim RE, Kessler PD, Niknian M, Kalnik**

- MW, Rennard SI; "Immunogenicity and smoking-cessation outcomes for a novel nicotine immunotherapeutic" *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89: 392-399, 2011
- ✚ Hauptmann N, Shih JC; "2-Naphthylamine, a compound found in cigarette smoke, decreases both monoamine oxidase A and B catalytic activity" *Life Sciences* 68(11): 1231-1241, 2001
- ✚ Hawk LWJ, Ashare RL, Lohnes SF, Schlienz NJ, Rhodes JD, Tiffany ST, Gass JC, Cummings KM, Mahoney MC; "The effects of extended pre-quit varenicline treatment on smoking behavior and short-term abstinence: a randomized clinical trial" *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 91: 172-180, 2012
- ✚ Hays JT, Ebbert JO, Sood A; "Efficacy and safety of varenicline for smoking cessation" *American Journal of Medicine* 121: S32-S42, 2008
- ✚ Hecht SS; "Lung carcinogenesis by tobacco smoke" *International Journal of Cancer* 131(12): 2724-2732, 2012
- ✚ Heidbreder CA, Gardner EL, Xi ZX, Thanos PK, Mugnaini M, Hagan JJ, Ashby CR Jr; "The role of central dopamine D3 receptors in drug addiction: a review of pharmacological evidence" *Brain Research Reviews* 49: 77-105, 2005
- ✚ Heidbreder CA, Newman AH; "Current perspectives on selective dopamine D(3) receptor antagonists as pharmacotherapeutics for addictions and related disorders" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1187: 4-34, 2010
- ✚ Heishman SJ, Kleykamp BA, Singleton EG; "Meta-analyses of the acute effects of nicotine and smoking on human performance" *Psychopharmacology (Berl)* 210: 453-469, 2010
- ✚ Heishman SJ, Taylor RC, Henningfield JE; "Nicotine and smoking: a review of effects on human performance" *Experimental Clinical Psychopharmacology* 2: 345-395, 1994
- ✚ Heishman SJ; "Behavioral and cognitive effects of smoking: relationship to nicotine addiction" *Nicotine Tobacco Research* 1(2): 143-147, 1999
- ✚ Hejmadi MV, Dajas-Bailador F, Barns SM, Jones B, Wonnacott S; "Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of

- multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes” *Molecular and Cellular Neuroscience* 24(3): 779-786, 2003
- ✚ **Hendrickson LM, Guildford MJ, Tapper AR;** “Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence” *Frontiers in Psychiatry* doi: 10.3389/fpsyt.2013.00029, 2013
- ✚ **Hilario MRF, Turner JR, Blendy JA;** “Reward sensitization: effects of repeated nicotine exposure and withdrawal in mice” *Neuropharmacology* 37(12): 2661-2670, 2012
- ✚ **Hisam A, Rahman MU, Kadir E, Azam N, Masood S;** “Proportion of exposure of passive smoking in teenage group and symptoms precipitated after exposure to second hand smoke” *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 24(6):446-448, 2014
- ✚ **Hoffman D, Hoffmann I;** “Smoking and tobacco control monograph No 9” *Chemistry and Toxicology*, 1998
- ✚ **Hogg RC, Bertrand D;** “Nicotinic acetylcholine receptors are drug targets” *Current Drug Targets CNS and Neurological Disorders* 3(2): 123-130, 2004
- ✚ **Hogg RC, Bertrand D;** “Partial agonists as therapeutic agents at neuronal nicotinic acetylcholine receptors” *Biochemical Pharmacology* 73: 459-564, 2005
- ✚ **Hogg RC, Raggensbass M, Bertrand D;** “Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function” *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 147: 1-46, 2003
- ✚ **Hon L;** “A non-smokable electronic spray cigarette (CA 2518174)” *In Edited by Record CPO*, vol 133, 2005
- ✚ **Horder J, Harmer CJ, Cowen PJ, McCabe C;** “Reduced neural response to reward following 7 days treatment with the cannabinoid CB1 antagonist rimonabant in healthy volunteers” *The international journal of neuropsychopharmacology/official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 13: 1103-1113, 2010
- ✚ **Hsieh SJ, Zhuo H, Benowitz NL, Thompson BT, Liu KD, Matthay MA, Calfee CS and the National Heart, Lung and Blood Institute Acute Respiratory Distress**



- Syndrome Network**; “Prevalence and impact of active and passive cigarette smoking in acute respiratory distress syndrome” *Critical Care Medicine* Epub of ahead of print, 2014
- ✚ **Hughes JR, Gust SW, Skoog K, Keenan RM, Fenwick JW**; “Symptoms of tobacco withdrawal. A replication and extension” *Archives of General Psychiatry* 48: 52-59, 1991
- ✚ **Hughes JR, Higgins ST, Bickel WK**; “Behavioral properties of drugs” *Psychopharmacology (Berl)* 96(4):557, 1988
- ✚ **Hughes JR, Stephen TH, Bickel WK**; “Nicotine withdrawal versus other drug withdrawal syndromes: similarities and dissimilarities” *Addiction* 89: 1461-1470, 1994
- ✚ **Hughes JR**; “Effects of abstinence from tobacco: valid symptoms and time course” *Nicotine and Tobacco Research* 9(3): 315-327, 2007
- ✚ **Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL**; “Metabolism and disposition kinetics of nicotine” *Pharmacological Reviews* 57(1): 79-115, 2005
- ✚ **Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P**; “A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25” *Nature* 452(7187): 633-637, 2008
- ✚ **Hurst R, Rollema H, Bertrand D**; “Nicotine acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics” *Pharmacology Therapy* 137: 22-54, 2013
- ✚ **Husmann GP, Dedominicis KE, Turner JR, Yasuda RP, Klehm J, Forcelli PA et al**; “Chronic varenicline-A maintains anxiolytic effects and slower weight gain following chronic nicotine without maintaining increased density of nicotinic receptors in rodent brain” *Journal of Neurochemistry* doi: 10.1111/jnc.12653, 2014
- ✚ **Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ**; “Neuronal mechanism of addiction: the role of reward-related learning and memory” *Annual Review of Neuroscience* 29: 565-598, 2006
- ✚ **Hyman SE**; “Addiction to cocaine and amphetamine” *Neuron* 16: 901-904, 1996
- ✚ **Imperato A, Honoré T, Jensen LH**; “Dopamine release in the nucleus caudatus and in the nucleus accumbens is under glutamatergic control through non-NMDA receptors: a study in freely-moving rats” *Brain Research* 530: 223-228, 1990

- ✚ **Imperato A, Mulas A, Di Chiara G;** “Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats” *European Journal of Pharmacology* 132(2-3): 337-338, 1986
- ✚ **Improgo M, Tapper AR, Gardner PD;** “Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer” *Biochemical Pharmacology* 82: 1015-1021, 2011
- ✚ **Improgo MR, Scofield MD, Tapper AR, Gardner PD;** “The nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster: dual role in nicotine addiction and lung cancer” *Progress in Neurobiology* 92(2): 212-226, 2010
- ✚ **International Organization for Standardization;** “Cigarettes determination of total and nicotine free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine” *ISO 4387*, 1-17, 2000
- ✚ **Jackson KJ, Martin BR, Changeux JP, Damaj MI;** “Differential role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in physical and affective nicotine withdrawal signs” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325(1): 302-312, 2008
- ✚ **Jacobsen LK, Krystal JH, Mencl WE, Westerveld M, Frost SJ, Pugh KR;** “Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco smokers” *Biological Psychiatry* 57(1): 56-66, 2005
- ✚ **Jama A, Cecchi M, Calvo N, Watson SJ, Akil H;** “Inter-individual differences in novelty-seeking behavior in rat predict differential responses to desipramine in the forced swim test” *Psychopharmacology* 98: 333-340, 2008
- ✚ **Jarvik ME, Madsen DC, Olmstead RE, Iwamoto-Schaap PN, Elins JL, Benowitz NL;** “Nicotine blood levels and subjective craving for cigarettes” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 66(3): 553-558, 2000
- ✚ **Jensen AA, Frolund B, Liljefors T, Krosgaard-Larsen P;** “Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications and therapeutic inspirations” *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 4705-4745, 2005
- ✚ **Ji D, Lape R, Dani JA;** “Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity” *Neuron* 31: 131-141, 2001

- ✚ **Jiménez-Ruiz C, Berlin I, Hering T;** “Varenicline: a novel pharmacotherapy for smoking cessation” *Drugs* 69: 1319-1338, 2009
- ✚ **Jimenez-Ruiz C, Berlin I, Hering T;** “Varenicline: a novel pharmacotherapy for smoking cessation” *Drugs* 69: 1319-1338, 2009
- ✚ **Jones GM, Sahakian BJ, Levy R, Warburton DM, Gray JA;** “Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer’s disease” *Psychopharmacology (Berl)* 108(4): 485-494, 1992
- ✚ **Jonkman S, Henry B, Semenova S, Markou A;** “Mild anxiogenic effects of nicotine withdrawal in mice” *European Journal of Pharmacology* 516: 40-45, 2005
- ✚ **Jorenby DE, Hays JT, Rigotti NA, Azoulay S, Watsky EJ, Williams KE, Billing CB, Gong J, Reeves KR, Varenicline Phase 3 Study Group;** “Efficacy of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial” *JAMA* 296(1): 56-63, 2006
- ✚ **Joshua M, Adler A, Bergman H;** “The dynamics of dopamine in control of motor behavior” *Current Opinion in Neurobiology* 19: 615-620, 2009
- ✚ **Jung S, Lee IS, Kim SB, Moon CS, Jung JY, Kang YA, Park MS, Kim YS, Kim SK, Chang J, Kim EY;** “Urine cotinine for assessing tobacco smoke exposure in Korean: Analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES)” *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 73(4): 210-218, 2012
- ✚ **Justinova Z, Tanda G, Munzar P, Goldberg SR;** “The opioid antagonist naltrexone reduces the reinforcing effects of delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) in squirrel monkeys” *Psychopharmacology (Berl)* 173: 186-194, 2004
- ✚ **Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, Golberg SR;** “Self-administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys” *Psychopharmacology (Berl)* 169:135-140, 2003
- ✚ **Kalantari-Dehaghi M, Bernard HU, Grando SA;** “Reciprocal effects of NNK and SLURP-1 on oncogene expression in target epithelial cells” *Life Sciences* 91(21-22): 1122-1125, 2012

- ✚ **Kallen K**; “Maternal smoking during pregnancy and infant head circumference at birth” *Early Human Development* 58: 197-204, 2000
- ✚ **Kalman D**; “The subjective effects of nicotine: methodological issues, a review of experimental studies, and recommendation for future research” *Nicotine and Tobacco Research* 4: 25-70, 2002
- ✚ **Kauer JA, Malenka RC**; “Synaptic plasticity and addiction” *Nature reviews Neuroscience* 8: 844-858, 2007
- ✚ **Kedikian X, Faillace MP, Bernabeu R**; “Behavioral and molecular analysis of nicotine-conditioned place preference in zebrafish” *PLoS One* 8: e6945, 2013
- ✚ **Kedikian X, Faillace MP, Bernabeu R**; “Behavioral and molecular analysis of nicotine-conditioned place preference in zebrafish” *PlosOne* 8(7): e69453, 2013
- ✚ **Keenan R, Hatsukami D, Pentel P, Thompson T, Grillo M**; “Pharmacodynamic effects of nicotine in abstinent cigarette smokers” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 55(5): 581-590, 1994
- ✚ **Kelley AE, Berridge KC**; “The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs” *The Journal of Neuroscience* 22: 3306-3311, 2002
- ✚ **Kenney JW, Adoff MD, Wilkinson DS, Gould TJ**; “The effects of acute, chronic and withdrawal from chronic nicotine on novel and spatial object recognition in male C57BL/6J mice” *Psychopharmacology (Berl)* 217(3): 353-365, 2011
- ✚ **Kenney JW, Gould TJ**; “Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine” *Molecular Neurobiology* 38: 101-121, 2008
- ✚ **Kenny PJ, Markou A**; “Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 70: 531-549, 2001
- ✚ **Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH**; “Ligand gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity” *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 86: 161-204, 2004
- ✚ **Khaled MATM, Araki KF, Li B, Coen KM, Marinelli PW, Varga J, Gaàl J, Le Foll B**; “The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011-A, but not the partial

- agonist BP 897, blocks cue-induced reinstatement of nicotine-seeking” *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 13: 181-190, 2010
- ✚ **Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T, Kochiyama H, Maeda T, Akaike A**; “Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity” *Annals of Neurology* 42(2): 159-163, 1997
- ✚ **Kily LJM, Cowe YCM, Hussain O, Patel S, McElwaine S, Cotter FE**; “Gene expression changes in a zebrafish model of drug dependency suggest conservation of neuroadaptation pathways” *Journal of Experimental Biology* 211(10): 1623-1634, 2008
- ✚ **King A, Cao D, Zhang L, Rueger SY**; “Effects of the opioid receptor antagonist Naltrexone on smoking and related behaviors in smokers preparing to quit: a randomized controlled trial” *Addiction*, 108(10): 1836-1844, 2013
- ✚ **King AC, Cao D, O’Malley SS, Kranzler HR, Cai X, deWit H, Matthews AK, Stachowiak RJ**; “Effects of naltrexone on smoking cessation outcomes and weight gain in nicotine-dependent men and women” *Journal of Clinical Psychopharmacology* 32: 630-636, 2012
- ✚ **Klee EW, Ebbert JO, Schneider H, Hurt RD, Ekker SC**; “Zebrafish for the study of the biological effects of nicotine” *Nicotine and Tobacco Research* 13(5): 301-312, 2011
- ✚ **Klee EW, Schneider H, Clark KJ, Cousin MA, Ebbert JO, Hooten WM, Karpyak VM, Warner DO, Ekker SC**; “Zebrafish: a model for the study of addiction genetics” *Human Genetics* 131: 977-1008, 2012
- ✚ **Klein LC, Stine MM, Vandenbergh DJ, Whetzel CA, Kamens HM**; “Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose response experiment” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 78: 13-25, 2004
- ✚ **Klink R, de Kerchov d’Exaerde A, Zoli M, Changeux JP**; “Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei” *Journal of Neuroscience* 21(5): 1452-1463, 2001
- ✚ **Kobiella A, Ripke S, Kroemer NB, Vollmert C, Vollstadt-Klein S, Ulshofer DE, Smolka MN**; “Acute and chronic nicotine effects on behavior and brain activation during intertemporal decision making” *Addiction Biology* doi: 10.1111/adb.12057, 2013

- ✚ **Kokel D, Peterson RT**; “Chemobehavioural phenomics and behavior-based psychiatric drug discovery in the zebrafish” *Briefings in functional genomics & proteomics* 7: 483-490, 2008
- ✚ **Konoishi H, Wu J, Cooke JP**; “Chronic exposure to nicotine impairs cholinergic angiogenesis” *Vascular Medicine* : 47-54, 2010
- ✚ **Koob GF, Le Moal M**; “Neurobiological theories of addiction” *Academic Press London* 377-428, 2001
- ✚ **Koob GF, Le Moal M**; “Neurobiology of addiction” *Academic Press London*, 2005
- ✚ **Koob GF, Le Moal M**; “Neurobiology of Addiction” *Academic Press*, 2006
- ✚ **Koob GF, Volkow ND**; “Neurocircuitry of addiction” *Neuropsychopharmacology* 35: 217-238, 2010
- ✚ **Koob GF**; “Neuronal mechanisms of drug reinforcement” *Annals of the New York Academy of Sciences* 654: 171-191, 1992
- ✚ **Kota D, Martin BR, Robinson SE, Damaj MI**; “Nicotine dependence and reward differ between adolescent and adult male mice” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322(1): 399-407, 2007
- ✚ **Kralikova E, Novak J, West O, Kmetova A, Hajek P**; “Do e-cigarettes have the potential to compete with conventional cigarettes? A survey of conventional cigarette smokers experiences with e-cigarettes” *Chest* 144: 1609-1614, 2013
- ✚ **Krebs MO, Desce JM, Kemel ML, Gauchy C, Godeheu G, Cheramy A et al.**; “Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: evidence of presynaptic N-Methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals” *Journal of Neurochemistry* 56: 81-85, 1991
- ✚ **Kulak JM, McIntosh JM, Yoshikami D, Olivera BM**; “Chemical synthesis and characterization of two  $\alpha 4/7$ -conotoxins” *Journal of Neurochemistry* 77: 1581-1589, 2001
- ✚ **Kuryatov A, Luo J, Cooper J, Lindstrom J**; “Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human  $\alpha 4\beta 2$  acetylcholine receptors” *Molecular Pharmacology* 68: 1839-1851, 2005

- ✚ **Kyosseva SV**; “Mitogen activated protein kinase signalling” *International Review of Neurobiology* 59: 201-220, 2004
- ✚ **Lakier JB**; “Smoking and cardiovascular disease” *American Journal of Medicine* 93: 8S-12S, 1992
- ✚ **Langheinrich U**; “Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk” *Bioessays* 25: 904-912, 2003
- ✚ **Lathe R**; “The individuality of mice” *Genes, Brain and Behavior* 3: 317-327, 2004
- ✚ **Lau B, Bretaud S, Huang Y, Lin E, Guo S**; “Dissociation of food and opiate preference by a genetic mutation in zebrafish” *Genes, Brain and Behavior* 5: 597-505, 2006
- ✚ **Laviolette SR, Alexson TO, van der Kooy D**; “Lesions of the tegmental pedunculopontine nucleus block the rewarding effects and reveal the aversive effects of nicotine in the ventral tegmental area” *The Journal of Neuroscience* 22(19): 8653-8660, 2002
- ✚ **Laviolette SR, van der Kooy D**; “Blockade of mesolimbic dopamine transmission dramatically increases sensitivity to the rewarding effects of nicotine in the ventral tegmental area” *Molecular Psychiatry* 8(1): 50-59, 2003
- ✚ **Laviolette SR, van der Kooy D**; “The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behavior” *Nature Reviews Neuroscience* 5: 55-65, 2004
- ✚ **Le Doux J**; “Il sé sinaptico” *Raffaello Cortina Editore*, 2002
- ✚ **Le Foll B, Forget B, Aubin HJ, Goldberg SR**; “Blocking cannabinoid CB1 receptors for the treatment of nicotine dependence: insights from preclinical and clinical studies” *Addiction Biology* 13: 239-252, 2008
- ✚ **Le Foll B, Goldberg SR, Sokoloff P**; “D3 receptor and drug dependence: effects on reward or beyond?” *Neuropharmacology* 49: 525-541, 2005
- ✚ **Le Foll B, Goldberg SR, Sokoloff**; “Dopamine D3 receptor ligands for the treatment of tobacco dependence” *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16: 45-57, 2007

- ✚ **Le Foll B, Goldberg SR;** “Control of the reinforcing effect of nicotine by associated environmental stimuli in animals and humans” *Trends in Pharmacological Sciences* 26(6): 287-293, 2005
- ✚ **Le Foll B, Goldberg SR;** “Effects of nicotine in experimental animals and humans: an update on addictive properties” *Handbook of Experimental Pharmacology* 192: 335-367, 2009
- ✚ **Le Foll B, Wertheim C, Goldberg SR;** “High reinforcing efficacy of nicotine in non-human primates” *PLoS One* 2: 1-9, 2007
- ✚ **Le Moal M, Simon H;** “Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles” *Physiological Reviews* 71(1): 155-234, 1991
- ✚ **Le Novère N, Changeux JP;** “Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells” *Journal of Molecular Evolution* 40: 155-172, 1995
- ✚ **Le Novère N, Corringer P, Changeux JP;** “A7DB: a relational database for mutational, physiological and pharmacological data related to the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor” *Journal of Neurobiology* 53: 447-456, 2002
- ✚ **Lee S, Kimm H, Yun JE, Jee SH;** “Public health challenges of electronic cigarettes in South Korea” *Journal of Preventive Medicine and Public Health* 44(6): 235-241, 2011
- ✚ **Leonard S, Adler LE, Benhammou K, Berger R, Breese CR, Drebing C, Gault J, Lee MJ, Logel J, Olincy A, Ross RG, Stevens K, Sullivan B, Vianzon R, Virnich DE, Waldo M, Walton K, Freedman R;** “Smoking and mental illness” *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 70: 561-570, 2001
- ✚ **Lerman C, LeSage MG, Perkins KA, O’Malley SS, Siegel SJ, Benowitz NL, Corrigan WA;** “Translational research in medication development for nicotine dependence” *Nature Reviews Drug Discovery* 6(9): 746-762, 2007
- ✚ **LeSage MG, Keyler DE, Collins G, Pentel PR;** “Effects of continuous nicotine infusion on nicotine self-administration in rats: relationship between continuously infused and self-administered nicotine doses and serum concentrations” *Psychopharmacology* 170(3): 278-286, 2003



- ✚ **Leshner AL, Koob GF**; “Drugs of abuse and the brain” *Proceedings of the Association of American Physicians* 111: 99-108, 1999
- ✚ **Leslie FM, Mojica CY, Reynaga DD**; “Nicotinic receptors in addiction pathways” *Molecular Pharmacology* 83: 753-758, 2013
- ✚ **Lester RA, Dani JA**; “Time-dependent changes in central nicotinic acetylcholine channel kinetics in excised patches” *Neuropharmacology* 33: 27-34, 1994
- ✚ **Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT**; “Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish” *Physiology and Behavior* 90: 54-58, 2007
- ✚ **Levin ED, Cerutti DT**; “Behavioral Neuroscience of Zebrafish” *Buccafusco JJ, editor. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, 2<sup>nd</sup> edition, Boca Raton (FL): CRC Press, 2009*
- ✚ **Levin ED, Chen E**; “Nicotinic involvement in memory function in zebrafish” *Neurotoxicology and Teratology* 26(6): 731-735, 2004
- ✚ **Levin ED, Connors CK, Sparrow E, Hinton SC, Erhardt D, Meck WH, Rose JE, March J**; “Nicotine effects on adults with attention-deficit/hyperactivity disorder” *Psychopharmacology (Berl)* 123(1): 55-63, 1996
- ✚ **Levin ED, Limpuangthip J, Rachakonda T, Peterson M**; “Timing of nicotine effects on learning in zebrafish” *Psychopharmacology* 184: 547-552, 2006
- ✚ **Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH**; “Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification and anatomic localization” *Psychopharmacology* 184: 523-539, 2006
- ✚ **Levin ED, Rezvani AH**; “Nicotinic treatment for cognitive dysfunction” *Current Drug Targets CNS Neurological Disorders* 1(4): 423-431, 2002
- ✚ **Levin ED, Tizaby Y, Rezvani AH, Caldwell DP, Petro A, Getachew B**; “Chronic nicotine and dizocilpine effects on regionally specific nicotinic and NMDA glutamate receptor binding” *Brain Research* 1041: 132-142, 2005
- ✚ **Levin ED**; “Nicotinic receptor subtypes and cognitive function” *Journal of Neurobiology* 53(4): 633-640, 2002

- ✚ **Li J, Bullen C, Newcome R, Walker N, Walton D;** “The use and acceptability of electronic cigarettes among New Zealand smokers” *The New Zealand Medical Journal* 126(1375): 48-57, 2013
- ✚ **Li MD;** “Identifying susceptibility loci for nicotine dependence: 2008 update based on recent genome-wide linkage analysis” *Human Genetics* 123: 119-131, 2008
- ✚ **Li X, Rainnie DG, McCarley RW, Greene RE;** “Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission” *Journal of Neuroscience* 18: 1904-1912, 1998
- ✚ **Li YF, Lacroix C, Freeling J;** “Cytisine induces autonomic cardiovascular responses via activations of different nicotinic receptors” *Autonomic Neuroscience* 154: 14-19, 2010
- ✚ **Lieschke GJ, Currie PD;** “Animal models of human disease: zebrafish swim into view” *Nature Reviews Genetics* 8: 353-367, 2007
- ✚ **Lindley AA, Becker S, Gray RH, Herman AA;** “Effect of continuing or stopping smoking during pregnancy on infant birth weight, crown-heel length, head circumference, ponderal index and brain: body weight ratio” *American Journal of Epidemiology* 152: 219-225, 2000
- ✚ **Lindstrom J;** “Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease” *Molecular Neurobiology* 15(2): 193-222, 1997
- ✚ **Lindstrom J;** “The structures of neuronal nicotinic receptors” *Handbook of Experimental Pharmacology* 144: 101-162, 2000
- ✚ **Lippi G, Mattiuzzi C;** “Smoking-related mortality in the United States” *The New England Journal of Medicine* 368: 1752, 2013
- ✚ **Lister RG;** “The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse” *Psychopharmacology (Berl)* 92(2): 180-185, 1987
- ✚ **Liu Z, Zhang J, Berg DK;** “Role of endogenous nicotinic signaling in guiding neuronal development” *Biochemical Pharmacology* 74: 1112-1119, 2007
- ✚ **Lloyd GK, Williams M;** “Neuronal nicotinic acetylcholine receptor as novel drug target” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292: 461-467, 2000

- ✚ **Lockwood B, Bjerke S, Kobayashi K, Guo S**; “Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 77: 647-654, 2004
- ✚ **López Patino MA, Yu L, Yamamoto BK, Irina V**; “Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal” *Physiology and Behavior* 95(1-2): 36-47, 2008
- ✚ **Loy SL, Jan Mohamed HJ**; “Associations between prenatal nicotine exposure, oxidative stress and postpartum visceral fat” *Women Health* 54(2): 145-160, 2014
- ✚ **Lu H, Zhu L**; “Pollution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons in tobacco smoke” *Journal of Hazardous Materials* 139(2): 193-198, 2007
- ✚ **Luetje CW, Patrick J**; “Both alpha- and beta subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic receptors” *The Journal of Neuroscience* 11(3): 837-845, 1991
- ✚ **Lukas RJ, Changeux JP, Le Novere N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PB, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonnacott S, International Union of Pharmacology XX**; Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits” *Pharmacological Reviews* 51: 397-401, 1999
- ✚ **Luo LZ, Werner KM, Gollin SM, Saunders WS**; “Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells” *Mutation Research* 554(1-2): 375-385, 2004
- ✚ **Lupica CR, Riegel AC, Hoffman AF**; “Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits” *British Journal of Pharmacology* 143: 227-234, 2004
- ✚ **Macho Sanchez-Simon F, Rodriguez RE**; “Expression of the nociceptin receptor during zebrafish development: influence of morphine and nociceptin” *International Journal of Developmental Neuroscience* 27: 315-320, 2009
- ✚ **Mahler SV, Smith KS, Berridge KC**; “Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances ‘liking’ of a sweet reward” *Neuropsychopharmacology* 32: 2267-2278, 2007

- ✚ **Malin DH, Lake JR, Newlin-Maultsby P, Roberts LK, Lanier JG, Carter VA, Cunningham JS, Wilson OB;** “Rodent model of nicotine abstinence syndrome” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 43(3): 779-784, 1992
- ✚ **Man CN, Fathelrahman AL, Harn GL, Lajis R, Samin AS, Omar M, Awang R, Bayanuddin NA;** “Correlation between urinary nicotine, cotinine and self-reported smoking status among educated young adults” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28(1): 92-96, 2009
- ✚ **Mannucci C, Tedesco M, Bellomo M, Caputi A, Calapai G;** “Long-term effects of nicotine on the forced swimming test in mice: an experimental model for the study of depression caused by smoke” *Neurochemistry International* 49(5): 481-486, 2006
- ✚ **Mansvelder HD, McGehee DS;** “Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction” *Journal of Neurobiology* 53: 606-617, 2002
- ✚ **Mansvelder HD, McGehee DS;** “Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine” *Neuron* 27: 349-357, 2000
- ✚ **Markou A;** “Neurobiology of nicotine dependence” *Philosophical transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences* 363: 3159-3168, 2008
- ✚ **Marks MJ, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann SF, Collins AC;** “Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotinic treatment” *The Journal of Neuroscience* 12: 2765-2784, 1992
- ✚ **Marks MJ, Whiteaker P, Collins AC;** “Deletion of the alpha7, beta2 or beta4 nicotinic receptor subunit genes highly expressed subtypes with relatively low affinity of [<sup>3</sup>H]epibatidine” *Molecular Pharmacology* 70(3): 947-959, 2006
- ✚ **Martin KAC, Spuhler IA;** “The fine structure of dopaminergic innervation of area 10 of macaque prefrontal cortex” *European Journal of Neuroscience* 37: 1061-1071, 2013
- ✚ **Martin W;** “Drug addiction I, morphine sedative/hypnotic and alcohol dependence: handbook of experimental pharmacology” *Springer – Verlag* Vol. 45, 1977
- ✚ **Martin-Soelch C, Leenders KL, Chevalley AF, Missimer J, Kunig G, Magyar S, Mino A, Schultz W;** “Reward mechanisms in the brain and their role in dependence:

- evidence from neurophysiological and neuromaging studies” *Brain Research Reviews* 36: 139-149, 2001
- ✚ **Marubio L, Gardier AM, Durier S, David DJ, Klink R, Arroyo-Jimenez MM, McIntosh JM, Rossi F, Champtiaux N, Zoli M, Changeux JP;** “Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors” *European Journal of Neuroscience* 17: 1329-1337, 2003
- ✚ **Mascia P, Pistis M, Justinova Z, Panlilio LV, Luchicchi A, Lecca S, Scherma M, Fratta W, Fadda P, Barnes C, Redhi GH, Yasar S, Le Foll B, Tanda G, Piomelli D, Goldberg SR;** “Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors” *Biological Psychiatry* 69: 633-641, 2011
- ✚ **Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N, Cloëz-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP;** “Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors” *Nature* 436(7047): 103-107, 2005
- ✚ **Mathur P, Guo S;** “Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes” *Neurobiology of Disease* 40: 66-72, 2010
- ✚ **Mathur P, Lau B, Guo S;** “Conditioned Place Preference behavior in zebrafish” *Nature Protocols* 6: 338-345, 2011
- ✚ **Mato S, Chevalayre V, Robbe D, Pazos A, Castello PE, Manzoni OJ;** “A single in vivo exposure to  $\Delta^9$ -THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity” *Nature Neuroscience* 7: 585-586, 2004
- ✚ **Matrix Insight;** “Economic analysis of the EU market of tobacco, nicotine and related products” *London: Matrix Insight Ltd*, 2013
- ✚ **Matta S, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd T, Boccafusco FF, Caggiula AR, Craiq CR, Collins AC, Damaj MI, Donni EC, Garniner PS, Grady SR, Heberlein U, Leonard SS, Lukas RJ, Markou A, Marks KJ, McCallum SE, Parameswaran N, Perkins KA, Picciotto MR, Quik M, Rose JE, Rothenfluh A, Schafer WR, Stolerman IP, Tyndale**

- RF, Wehner JM, Zirger JM;** “Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research” *Psychopharmacology* 190: 269-319, 2007
- ✚ **Mazzo F, Pistillo F, Borgese N, Clementi F, Gotti C, Colombo S;** “Assembly, trafficking and up-regulation of the  $\alpha_3\beta_4$  neuronal nicotinic receptor” *Abstract, New Orleans* 217.02, 2012
- ✚ **McClung C, Hirsh J;** “Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*” *Current Biology* 8: 109-112, 1998
- ✚ **McCluskie MJ, Pryde DC, Gervais DP, Stead DR, Zhang N, Benoit M, Robertson K, Kim IJ, Tharmanathan T, Merson JR, Davis HL;** “Enhancing immunogenicity of a 3’aminomethyl-nicotine-DT-conjugate anti-nicotine vaccine with CpG adjuvant in mice and non-human primates” *International Immunopharmacology* 16: 50-56, 2013
- ✚ **McEwen BS;** “Stress and hippocampal plasticity” *Annual Review of NeuroSciences* 22:105-122, 1999
- ✚ **McGinnis J, Foege W;** “Mortality and morbidity attributable to use of addictive substances in the United States” *Proceedings of the Association of American Physicians* 111: 109-118, 1999
- ✚ **Melis M, Carta G, Pistis M, Banni S;** “Physiological role of peroxisome proliferator-activated receptors type alpha on dopamine systems” *CNS & Neurological disorders drug targets* 12: 70-77, 2013
- ✚ **Melis M, Carta S, Fattore L, Tolu S, Yasar S, Goldberg SR, Fratta W, Maskos U, Pistis M;** “Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha modulate dopamine cell activity through nicotinic receptors” *Biological Psychiatry* 68: 256-264, 2010
- ✚ **Melis M, Muntoni AL, Pistis M;** “Endocannabinoids and the processing of value-related signals” *Frontiers in Pharmacology* 3:7, 2012
- ✚ **Melis M, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR, Pistis M;** “Endogenous Fatty Acid Ethanolamides Suppress Nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptor” *The Journal of Neuroscience* 28: 13985-13994, 2008

- ✚ **Mello NK, Fivel PA, Stephen JK, Carroll FI;** “Effects of chronic varenicline treatment on nicotine, cocaine and concurrent nicotine + cocaine self-administration” *Neuropsychopharmacology* 39: 1222-1231, 2014
- ✚ **Mena-Segovia J, Winn P, Bolam JP;** “Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems” *Brain Research Reviews* 58: 265-271, 2008
- ✚ **Merlo Pich E, Chiamulera C, Carboni L;** “Molecular mechanisms of the positive reinforcing effect of nicotine” *Behavioural Pharmacology* 10: 587-596, 1999
- ✚ **Merlo Pich E, Pagliusi SR, Tessari M, Hooft R, Van Huijsduijnen, Chiamulera C;** “Common anatomical targets for nicotine and cocaine self-administration identified by mapping inducible Fos-related proteins” *Science* 275: 83-86, 1997
- ✚ **Messi ML, Renganathan M, Grigorenko E, Delbono O;** “Activation of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor promotes of spinal cord motoneurons” *FEBS Letters* 411(1): 32-38, 1997
- ✚ **Metelitsa AI, Lauzon GJ;** “Tobacco and the skin” *Clinics in Dermatology* 28(4): 384-390, 2010
- ✚ **Meye FJ, Trezza V, Vanderschuren LJ, Ramakers GM, Adan RA;** “Neutral antagonism ant the cannabinoid 1 receptor: a safer treatment for obesity” *Molecular Psychiatry* 18(12): 1294-1301, 2012
- ✚ **Mihalak KB, Carroll FI, Luetje CW;** “Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors” *Molecular Pharmacology* 70(3): 801-805, 2006
- ✚ **Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, Salas R, DiLeone RJ, Gündisch D, Diano S, De Biasi M, Horvath TL, Gao XB, Picciotto MR;** “Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons” *Science* 332: 1330-1332, 2011
- ✚ **Mineur YS, Eibl C, Young G, Kochevar C, Papke RL, Gündisch D, Picciotto MR;** “Cytisine-based nicotinic partial agonists as novel antidepressant compounds” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 329: 377-386, 2009
- ✚ **Mineur YS, Obayemi A, Wigstrand MB, Fote GM, Calarco CA, Li AM, Picciotto MR;** “Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and

- anxiety- and depression-like behavior” *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(9): 3573-3578, 2013
- ✚ **Mirbod SM, Ahing SI**; “Tobacco associated lesions of the oral cavity: part I. Nonmalignant lesions” *Journal of the Canadian Dental Association* 66: 252-256, 2000
- ✚ **Misery L**; “Nicotine effects on skin: Are they positive or negative?” *Experimental Dermatology* 13: 665-670, 2004
- ✚ **Mitchell MR, Mendez IA, Vokes CM, Damborsky JC, Winzer-Serhan UH, Setlow B**; “Effects of developmental nicotine exposure in rats on decision making in adulthood” *Behavioural Pharmacology* 23: 34-42, 2012
- ✚ **Miwa JM, Freedman R, Lester HA**; “Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses” *Neuron* 70(1): 20-33, 2011
- ✚ **Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N**; “Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore” *Nature* 423: 949-956, 2003
- ✚ **Modi N, Schmid B, Miller R**; “Clearing the smoke on e-cigarettes” *UBS Investment Research* <http://www.steevape.com>, 2012
- ✚ **Mogenson GJ, Wu M, Jones DL**; “Locomotor activity elicited by injections of picrotoxin into the ventral tegmental area is attenuated by injections of GABA into the globus pallidus” *Brain Research* 191(2): 569-571, 1980
- ✚ **Money KM, Stanwood GD**; “Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 260, 2013
- ✚ **Moran V**; “Cotinine: Beyond that expected, more than a biomarker of tobacco consumption” *Frontiers in Pharmacology* 3: 173, 2012
- ✚ **Moretti M, Mugnaini M, Tessari M, Zoli M, Gaimarri A, Manfredi I, Pistillo F, Clementi F, Gorri C**; “A comparative study of the effects of the intravenous self-administration or subcutaneous minipump infusion of nicotine on the expression of brain neuronal nicotinic receptor subtypes” *Molecular Pharmacology* 78(2): 287-296, 2010
- ✚ **Morgan G, Backinger C, Lerman C, Vocci F**; “Traslational medication development for nicotine addiction” *American Journal of Health Behavior* 34: 267-274, 2010



- ✚ **Morin C, de Souza Silva MA, Müller CP, Hardigan P, Spieler RE;** “Active avoidance learning in zebrafish (*Danio rerio*) – the role of sensory modality and inter-stimulus interval” *Behavioural Brain Research* 248: 141-143, 2013
- ✚ **Morita A;** “Tobacco smoke causes premature skin aging” *Journal of Dermatological Science* 48: 169-175, 2007
- ✚ **Munson PJ, Rodbard D;** “LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems” *Analytical Biochemistry* 107(1): 220-239, 1980
- ✚ **Museo E, Wise RA;** “Place preference conditioning with ventral tegmental injections of cytosine” *Life Sciences* 55: 1179-1186, 1994
- ✚ **Muto A, Orger MB, Wehman AM, Smear MC, Kay JN, Page-McCaw PS, Gahtan E, Xiao T, Nevin LM, Gosse NJ, Staub W, Finger-Baier K, Baier H;** “Forward genetic analysis of visual behavior in zebrafish” *Plos Genetics* 1: 575-588, 2005
- ✚ **Myers MG, Kelly JF;** “Cigarette smoking among adolescents with alcohol and other drug use problems” *Alcohol Research and Health* 29: 221-227, 2006
- ✚ **Nabi Biopharmaceuticals;** “Nabi Biopharmaceuticals Announces Results of First NicVAX(R) Phase III Clinical Trial” *In: Nabi Biopharmaceuticals*, 2011
- ✚ **Nabi Biopharmaceuticals;** “Nabi Biopharmaceuticals Announces Results of First NicVAX(R) Phase III Clinical Trial” *In: Nabi Biopharmaceuticals*, 2011
- ✚ **Nader MA, Morgan D, Gage HD, Nader SH, Calhoun TL, Buchheimer N, Ehrenkauf R, Mach RH;** “PET imaging of dopamine D<sub>2</sub> receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys” *Nature Neuroscience* 8: 1050-1056, 2006
- ✚ **Nakajima M, Kwon JT, Tanaka N, Zenta T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yamazaki H, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T;** “Relationships between interindividual differences in nicotine metabolism and CYP2A6 genetic polymorphism in humans” *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 68: 72-78, 2001
- ✚ **Napolitano C;** “Il fumo: quali rischi per la salute?” 2009

- ✚ **Nashmi R, Xiao C, Deshpande P, McKinney S, Grady SR, Whiteaker P, Huang Q, McClure-Begley T, Lindstrom JM, Labarca C, Collins AC, Marks MJ, Lester HA;** “Chronic nicotine cell specifically upregulates functional alpha4 nicotinic receptors: basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path” *The Journal of Neuroscience* 27: 8202-8218, 2007
- ✚ **Natarajan R, Wright JW, Harding JW;** “Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent rats” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 99: 519-523, 2011
- ✚ **Navas-Acien A, Selvin E, Sharrett AR, Calderon-Aranda E, Silbergeld E, Guallar E;** “Lead, cadmium, smoking and increased risk of peripheral arterial disease” *Circulation* 109: 3196-3201, 2004
- ✚ **Neelkantan N, Mikhaylova A, Stewart AM, Arnold R, Gjeloši V, Kondaveeti D, Poudel MK, Kalueff AV;** “Perspectives on zebrafish models of hallucinogenic drugs and related psychotropic compounds” *ACS chemical neuroscience* 4: 1137-1150, 2013
- ✚ **Nestler EJ, Berhow MT, Brodtkin ES;** “Molecular mechanisms of drug addiction: adaptations in signal transduction pathways” *Molecular Psychiatry* 1: 190-199, 1996
- ✚ **Nestler EJ;** “Molecular basis of long term plasticity underlying addiction” *American Journal on Addictions*, 10: 201-217, 2001
- ✚ **Nestler EJ;** “Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB” *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 3245-3255, 2008
- ✚ **Newhouse PA, Kelton M;** “Nicotinic systems in central nervous systems disease: degenerative disorders and beyond” *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 74(2-3): 91-101, 2000
- ✚ **Newhouse PA, Potter A, Levin ED;** “Nicotinic system involvement in Alzheimer’s and Parkinson’s diseases” *Drugs Aging* 11(3): 206-228, 1997
- ✚ **Newhouse PA, Potter AS, Dumas JA, Thiel CM;** “Functional brain imaging of nicotinic effects on higher cognitive processes” *Biochemical Pharmacology* 82: 943-951, 2011
- ✚ **Newhouse PA, Potter AS, Sing A;** “Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance” *Current Opinion in Pharmacology* 4: 36-46, 2004

- ✚ **Newman AH, Blaylock BL, Nader MA, Bergman J, Sibley DR, Skolnick P;** “Medication discovery for addiction: translating the dopamine D3 receptor hypothesis” *Biochemical Pharmacology* 84: 890-992, 2012
- ✚ **Newman AH, Grundt P, Nader MA;** “Dopamine D3 receptor partial agonists and antagonists as potential drug abuse therapeutic agents” *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 3663-3679, 2005
- ✚ **Nguyen H, Rasmussen B, Perry D;** “Subtype-selective upregulation by chronic nicotine of high affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307(3): 1090-1097, 2003
- ✚ **Nianura RS, Rohsenow DJ, Binkoff JA, Monti PM, Pedrazza M, Abrams DB;** “Relevance of cue reactivity to understanding alcohol and smoking relapse” *Journal of Abnormal Psychology* 97: 133-152, 1988
- ✚ **Nieh EH, Kim SY, Namburi P, Tye KM;** “Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors” *Brain Research* 1511: 73-92, 2013
- ✚ **Ninkovic J, Folchert A, Makhankov YV, Neuhauss SCF, Sillaber I, Straehle U, Bally-Cuif L;** “Genetic identification of AChE as a positive modulator of addiction to the psychostimulant D-Amphetamine in zebrafish” *Journal of Neurobiology* 66(5): 463-475, 2006
- ✚ **Njung’e K, Handley SL;** “Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 38(1): 63-67, 1991
- ✚ **Novak CM, Jiang X, Wang C, Teske JA, Kotz CM, Levine JA;** “Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*)” *Neuroscience Letters* 383: 99-104, 2005
- ✚ **Nowakowska E, Kus K, Florek E, Czubak A, Jodynis-Liebert J;** The influence of tobacco smoke and nicotine on antidepressant and memory-improving effects of venlafaxine” *Human & Experimental Toxicology* 25(4): 199-209, 2006
- ✚ **Nusslein-Volhard C, Daham R;** Zebrafish – A Practical Approach” *Oxford England: Oxford University Press*, 2002

- ✚ **O'Brien C, Childress AR, Ehrman R, Robbins S, McJellan AT;** "Conditioning mechanisms in drug dependence" *Clinical Neuropharmacology* 15: 66A-67A, 1992
- ✚ **O'Connor EC, Parker D, Rollema H, Mead AN;** "The alpha4beta2 nicotinic acetylcholine-receptor partial agonist varenicline inhibits both nicotine self-administration following repeated dosing and reinstatement of nicotine seeking in rats" *Psychopharmacology (Berl)* 208(3): 365-376, 2010
- ✚ **O'Dell L, Khroyan TV;** "Rodent models of nicotine reward: what do they tell us about tobacco abuse in humans?" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 91(4): 481-488, 2009
- ✚ **O'Dell L, Koob GF;** "Nicotine deprivation effects in rats with intermittent 23 h access to intravenous nicotine self-administration" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 86: 346-353, 2007
- ✚ **O'leary K, Parameswaran N, McIntosh J, Quik M;** "Cotinine selectively activates a subpopulation of alpha3/alpha6beta2 nicotinic receptors in monkey striatum" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325(2): 646-654, 2008
- ✚ **Obach RS, Reed-Hagen AE, Krueger SS, Obach BJ, O'Connell TN, et al;** "Metabolism and disposition of varenicline, a selective alpha4beta2 acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro" *Drug Metabolism and Disposition* 34: 121-130, 2006
- ✚ **Ortiz A, Grando SE;** "Smoking and the skin" *International Journal of Dermatology* 51: 250-262, 2012
- ✚ **Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ;** "Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine" *The Journal of Neuroscience* 15: 1285-1297, 1995
- ✚ **Pabreza LA, Dhawan S, Kellar KJ;** "[3H]cytisine binding to nicotinic cholinergic receptors in brain" *Molecular Pharmacology* 39(1): 9-12, 1991
- ✚ **Pak AC, Ashby CR, Heidbreder CA, Pilla M, Gilbert JG, Xi XZ, Gardner EL;** "The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011A reduces nicotine-enhanced brain

- reward and nicotine-paired environmental cue functions” *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 9: 1-18, 2006
- ✚ **Panlilio LV, Justinova Z, Mascia P, Pistis M, Luchicchi A, Lecca S, Barnes C, Redhi GH, Adair J, Heishman SJ, Yasar S, Aliczki M, Haller J, Goldberg SR;** “Novel use of a lipid-lowering fibrate medication to prevent nicotine reward and relapse: preclinical findings” *Neuropsychopharmacology* 37: 1838-1847, 2012
- ✚ **Panula P, Chen YC, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, Sallinen V;** “The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases” *Neurobiology of disease* 40: 46-57, 2010
- ✚ **Papke RL, Ono F, Stokes C, Urban JM, Boyd RT;** “The nicotinic acetylcholine receptors in zebrafish and an evaluation of pharmacological tools used for their study” *Biochemical pharmacology* 84: 352-365, 2012
- ✚ **Pappas RS;** “Toxic Elements in Tobacco and in Cigarette Smoke” *World Health Organization Report on the Scientific Basis of Tobacco Product Regulation: Fourth Report of a WHO Study Group. World Health Organization.* 37-83, 2012
- ✚ **Pardo-Martin C, Chang TY, Koo B, Gilleland CL, Wasserman SC, Yanik MF;** “High-throughput in vivo vertebrate screening” *Nature Methods* 7: 634-636, 2010
- ✚ **Parker MO, Brock AJ, Walton RT, Brennan CH;** “The role of zebrafish (*Danio rerio*) in dissecting the genetics and neural circuits of executive function” *Front Neural Circuits* doi: 10.3389/fncir.2013.00063, 2013
- ✚ **Parng C, Roy NM, Ton C, Lin Y, McGrath P;** “Neurotoxicity assessment using zebrafish” *Journal of Pharmacology and Toxicological Methods* 55: 103-112, 2007
- ✚ **Paterson D, Nordberg A;** “Neuronal nicotinic receptors in the human brain” *Progress in Neurobiology* 61: 75-111, 2000
- ✚ **Pauly JR, Marks MJ, Robinson SF, van de Kamp JL, Collins AC;** “Chronic nicotine and mecamylamine treatment increase brain nicotinic receptor binding without changing alpha 4 or beta 2 mRNA levels” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 278: 361-369, 1996

- ✚ **Peitsaro N, Kaslin J, Anichtchik OV, Panula P;** “Modulation of the histaminergic system and behavior by  $\alpha$ -fluoromethylhistidine in zebrafish” *Journal of Neurochemistry* 86: 432-441, 2003
- ✚ **Pellegrino RM, Tinghino B, Mangiarancina G, Marani A, Vitali M, Protano C, Osborn JF, Cattaruzza MS;** “Electronic cigarettes: an evaluation of exposure to chemicals and fine particulate matter (PM)” *Annali di igiene: medicina preventiva e di comunità* 24: 279-288, 2012
- ✚ **Peng X, Gerzanich V, Anand R, Wang F, Lindstrom J;** “Chronic nicotine treatment up-regulates  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 7 acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y” *Molecular Pharmacology* 51: 776-784, 1997
- ✚ **Peng X, Gerzanich V, Anand R, Whiting PJ, Lindstrom J;** “Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover” *Molecular Pharmacology* 46: 523-530, 1994
- ✚ **Pentel PR, Malin DH, Ennifar S, Hieda Y, Keyler DE, Lake JR, Milstein JR, Basham LE, Coy RT, Moon JW, Naso R, Fattom A;** “A nicotine conjugate vaccine reduces nicotine distribution to brain and attenuates its behavioral and cardiovascular effects in rats” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 65: 191-198, 2000
- ✚ **Perez-Stable EJ, Herrera B, Jacob P;** “Nicotine metabolism and intake in black and white smokers” *JAMA* 280: 152-156, 1998
- ✚ **Perfetti TA, Rodgman A;** “The chemical components of tobacco and tobacco smoke” *CRC Press*, 2008
- ✚ **Perkins K;** “Nicotine self-administration” *Nicotine & Tobacco Research* 1: S133-S138, 1999
- ✚ **Perrotti LI, Weaver RR, Robinson B, Renthal W, Maze I, Yazdani S, Elmore RG, Knapp DJ, Selley DE, Martin BR, Sim-Selley L, Bachtell RK, Self DW, Nestler EJ;** “Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse” *Synapse* 62: 358-369, 2008

- ✚ **Perry DC, Davila-Garcia MI, Stockmeimer CA, Kellar KJ;** “Increased nicotinic receptors in the brain from smokers: membrane binding and autoradiography studies” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289: 1545-1552, 1999
- ✚ **Peterson J, Taylor HG, Minich N, Klein N, Hack M;** “Subnormal head circumference in very low birth weight children: neonatal correlates and school-age consequences” *Early Human Development* 82: 325-334, 2006
- ✚ **Petzold AM, Balciunas D, Sivasubbu S, Clark KJ, Bedell VM, Westcot SE;** “Nicotine response genetics in the zebrafish” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 18662-18667, 2009
- ✚ **Picciotto MR, Zoli M;** “Nicotinic receptors in aging and dementia” *Journal of Neurobiology* 53(4): 641-655, 2002
- ✚ **Picciotto MR, Corrigall WA;** “Neuronal systems underlying behaviours related to nicotine addiction: neuronal circuits and molecular genetics” *The Journal of Neuroscience* 22(9): 3338-3341, 2002
- ✚ **Picciotto MR, Kenney PJ;** “Molecular mechanisms underlying behaviors related to nicotine addiction” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(1):a012112, 2013
- ✚ **Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K, Changeux JP;** “Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine” *Nature* 391(6663): 173-177, 1998
- ✚ **Picciotto MR, Zoli M;** “Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer’s and Parkinson’s diseases” *Frontiers in Bioscience* 13: 492-504, 2008
- ✚ **Picciotto MR;** “Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U” *Trends Pharmacological Sciences* 24: 1493-1499, 2003
- ✚ **Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA;** “Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons” *Nature* 390: 401-404, 1997
- ✚ **Pipe AL, Papadakis S, Reid, RD;** “The role of smoking cessation in the prevention of coronary artery disease” *Current Atherosclerosis Reports* 12: 145-150, 2010

- ✚ **Pistelli F, Aquilini F, Carrozzi L;** “Weight gain after smoking cessation” *Monaldi archives for chest disease* 71: 81-87, 2009
- ✚ **Pogocki D, Ruman T, Danilczuk M, Celuch M, Walajtys-Rode E;** “Application of nicotine enantiomers, derivatives and analogues in therapy of neurodegenerative disorders” *European Journal of Pharmacology* 563: 18-39, 2007
- ✚ **Polosa R, Caponetto P, Morjaria JB, Papale G, Campagna D, Russo C;** “Effect of an electronic nicotine delivery device (e-Cigarette) on smoking cessation and reduction: a prospective pilot study” *BMC Public Health* 11: 786-828, 2011
- ✚ **Polzin GM, Kosa-Maines RE, Ashley DL, Watson CH;** “Analysis of volatile organic compounds in mainstream cigarette smoke” *Environmental Science & Technology* 41(4): 1297-1302, 2007
- ✚ **Pomerleau 1995**
- ✚ **Pons S, Fattore L, Cossu G, Tolu S, Porcu E, McIntosh J, Changeux J, Maskos U, Fratta W;** “Crucial role of  $\alpha 4$  and  $\alpha 6$  nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration” *Journal of Neuroscience* 28(47): 12318-12327, 2008
- ✚ **Poorthuis RB, Mansvelder HD;** “Nicotinic acetylcholine receptors controlling attention: behavior, circuits and sensitivity to disruption by nicotine” *Biochemical Pharmacology* 86(8): 1089-1098, 2013
- ✚ **Portavella M, Vergas JP, Torres B, Salas C;** “The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal and emotional learning in goldfish” *Brain Research Bulletin* 57(3/4): 397-399, 2002
- ✚ **Postma A, Kessels, RP, van Asselen M;** “How the brain remembers and forgets where things are: the neurocognition of object-location memory” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32: 1339-1345, 2008
- ✚ **Prabhat J, Chaloupka F;** “Tobacco control in developing countries” *Oxford University Press*, 2000



- ✚ **Prus AJ, James JR, Rosecrans JA**; “Conditioned place preference” In: *Methods of Behaviour Analysis in Neuroscience*, and by JJ Buccafusco, *CRC Press Boca Raton (FL)*, 2009
- ✚ **Pucci L, Grazioso G, Dallanoe C, Rizzi L, De Micheli C, Clementi F, Bertrand S, Bertrand D, Longhi R, De Amici M, Gotti C**; “Engineering of alpha-conotoxin MII-derived peptides with increase selectivity for native alpha6beta2 nicotinic acetylcholine receptors” *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25: 3775-3789, 2011
- ✚ **Quattrochi E, Baird A, Yurgelun-Todd D**; “Biological aspects of the link between smoking and depression” *Harvard Review of Psychiatry* 8: 99-110, 2000
- ✚ **Quick MW, Lester RA**; “Desensitization of neuronal nicotinic receptors” *Journal of Neurobiology* 53(4): 457-478, 2002
- ✚ **Rahaman Z, Schwarz J, Gold SJ, Nestler EJ**; “RGS9 modulates dopamine signalling in the basal ganglia” *Neuron* 38: 941-952, 2003
- ✚ **Rao TS, Correa LD, Reid RT, Lloyd GK**; “Evaluation of anti-nociceptive effects of neuronal nicotinic acetylcholine receptor (NACHR) ligands in the rat tail-flick assay” *Neuropharmacology* 35(4): 393-405, 1996
- ✚ **Rasmussen T, Swedberg MD**; “Reinforcing effects of nicotinic compounds: intravenous self-administration in drug-naïve mice” *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 60: 567-573, 1998
- ✚ **Rauhut AS, Neugebauer N, Dwoskin LP, Bardo MT**; “Effect of bupropion on nicotine self-administration in rats” *Psychopharmacology* 169: 1-9, 2003
- ✚ **Rezvani AH, Levin ED**; “Cognitive effects of nicotine” *Biological Psychiatry* 49(3): 258-267, 2001
- ✚ **Rezvani K, Teng Y, Shim D, De Biasi M**; “Nicotine regulates multiple synaptic proteins by inhibiting proteasomal activity” *Journal of Neuroscience* 27: 10508-10519, 2007
- ✚ **Riah O, Dousset J, Courriere P, Stigliani J, Baziard-Mouysset G, Belahsen Y**; “Evidence that nicotine acetylcholine receptors are not the main targets of cotinine toxicity” *Toxicology Letters* 109(1-2): 21-29, 1999

- ✚ **Riah O, Doussett J, Bofill-Cardona E, Courrière P;** “Isolation and microsequencing of a novel cotinine receptor” *Cellular and Molecular Neurobiology* 20(6): 653-664, 2000
- ✚ **Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Nunes-Freitas AL, Filgueiras CC, Manhaes AC, Abreu-Villaça Y;** “Exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on depressive-like behavior during exposure and withdrawal” *Behavioural Brain Research* 221: 282-289, 2011
- ✚ **Rice ME, Cragg SJ;** “Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway” *Brain Research Reviews* 58:303-313, 2008
- ✚ **Riganti L, Matteoni C, Di Angelantonio S, Nistri A, Gaimarri A, Sparatore F, Canu-Boido C, Clementi F, Gotti C;** “Long term exposure to the new nicotinic antagonist 1,2bis-N-cytisinylethane upregulates nicotinic receptor subtypes of SH-Sy5Y human neuroblastoma cells” *British Journal of Pharmacology* 146: 1096-1109, 2005
- ✚ **Rink E, Willimann MF;** “Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost” *Brain research bulletin* 57: 385-387, 2002
- ✚ **Rink E, Wullimann MF;** “The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalons (posterior tuberculum)” *Brain Research* 889: 316-330, 2001
- ✚ **Robinson SF, Marks MJ, Collins AC;** “Inbred mouse strains vary in oral self-selection of nicotine” *Psychopharmacology* 124: 332-339, 1996
- ✚ **Robinson TE, Berridge KC;** “The neural basis of drug craving: an incentive sensitization theory of addiction” *Brain Research Reviews* 18:247-291, 1993
- ✚ **Robinson TE, Kolb B;** “Structural plasticity associated with exposure to drugs od abuse” *Neuropharmacology* 47:33-46, 2004
- ✚ **Rodgam A, Green CR;** “Toxic chemicals in cigarette mainstream smoke-hazard and hoopla” *Contribution to tobacco Research* 20(8): 481-545, 2003
- ✚ **Rogers JM;** Tobacco and pregnancy: overview of exposures and effects” *Birth Defects Research Part C: Embryo Today* 84: 1-15, 2008

- ✚ **Rollema H, Coe JW, Chambers LK, Hurst RS, Stahl SM, Williams KE;** “Rationale, pharmacology and clinical efficacy of partial agonists of  $\alpha_4\beta_2$  nACh receptors for smoking cessation” *Trends in Pharmacological Science* 28(7): 316-325, 2007
- ✚ **Rollema H, Wilson GG, Lee TC, Folgering JH, Flik G;** “Effect of co-administration of varenicline and antidepressants on extracellular monoamine concentrations in rat prefrontal cortex” *Neurochemistry international* 58: 78-84, 2011
- ✚ **Rosa SA, Wong JY, Clifford JJ, Kinsella A, Massalas JS, Home MK, Scheffer IE, Kola I, Waddington JL, Berkovic SF, Drago J;** “Phenotypic characterization of an alpha4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse” *The Journal of Neuroscience* 20: 6431-6441, 2000
- ✚ **Rose JE, Corrigall WA;** “Nicotine self-administration in animals and humans: similarities and differences” *Psychopharmacology (Berl)* 130: 28-40, 1997
- ✚ **Ross JT, Corrigall WA, Heidbreder CA, LeSage MG;** “Effects of the selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011A on the reinforcing effects on nicotine as measured by a progressive-ratio schedule in rats” *European Journal of Clinical Pharmacology* 559: 173-179, 2007
- ✚ **Ross S, Peselow E;** “Pharmacotherapy of Addictive Disorders” *Clinical Neuropharmacology* 32: 277-289, 2009
- ✚ **Roth N, Lutiger B, Hasenfratz M, Bättig K, Knye M;** “Smoking deprivation in early and late smokers and memory functions” *Psychopharmacology (Berl)* 106(2): 253-260, 1992
- ✚ **Rowell PP, Carr LA, Garner AC;** “Stimulation of [H3] dopamine release by nicotine in rat nucleus accumbens” *Journal of Neurochemistry* 49(5): 1449-1454, 1987
- ✚ **Rowell PP, Li M;** “Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors” *Journal of Neurochemistry* 68: 1982-1989, 1997
- ✚ **Rubin H;** “Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates” *Carcinogenesis* 22(12): 1903-1930, 2001

- ✚ **Russell MA**; “Subjective and behavioural effects of nicotine in humans: some sources of individual variation” *Progress in Brain Research* 79: 289-302, 1989
- ✚ **Rusted JM, Graupner L, Tennant A, Warburton DM**; “Effortful processing is a requirement for nicotine-induced improvements in memory” *Psychopharmacology (Berl)* 138(3-4): 362-368, 1998
- ✚ **Rustemeier K, Stabbert R, Haussmann HJ, Roemer E, Carmines EL**; “Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke” *Food and Chemical Toxicology* 40: 93-104, 2002
- ✚ **Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC**; “Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons” *Neuron* 37:577-582, 2003
- ✚ **Sager JJ, Bai Q, Burton EA**; “Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases” *Brain Structure and Function* 214: 285-302, 2010
- ✚ **Sajja RK, Rahaman S**; “Lobeline and cytosine reduce voluntary ethanol drinking behavior in male C57BL/6J mice” *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 35(1): 257-264, 2010
- ✚ **Salas R, Pieri F, De Biasi M**; “Decreased signs of nicotine withdrawal in mice null for the  $\beta_4$  nicotinic acetylcholine receptor subunit” *Journal of Neuroscience* 24: 10035-10039, 2004
- ✚ **Salette J, Bohler S, Benoit P, Soudant M, Pons S, Le Novère N, Changeux JP, Corringer PJ**; “An extracellular protein microdomain controls up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by nicotine” *The Journal of Biological Chemistry* 279(18): 18767-18775, 2004
- ✚ **Salette J, Pons S, Devillers-Thierry A, Soudant M, Prado de Carvalho L, Changeux JP, Corringer PJ**; “Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation” *Neuron* 46(4): 595-607, 2005
- ✚ **Satel SL, Kosten TR, Schuckit MA**; “Should protracted withdrawal from drugs be included in DSM-IV?” *American Journal of Psychiatry* 150: 695-704, 1993
- ✚ **Schripp T, Markewitz D, Uhde E, Salthammer T**; “Does e-cigarette consumption cause passive vaping?” *Indoor Air* 23(1): 25-31, 2013

- ✚ **Schultz W, Dayan P, Montague PR;** “A neural substrate of prediction and reward” *Science* 275:1593-1599, 1997
- ✚ **Schultz W;** “Predictive reward signal of dopamine neurons” *Journal of Neurophysiology* 80: 1-27, 1998
- ✚ **Schultz W;** “Updating dopamine reward signals” *Current Opinion in Neurobiology* 23:229-238, 2013
- ✚ **Seller MJ, Bnait KS;** “Effects of tobacco smoke inhalation on the developing mouse embryo and fetus” *Reproductive Toxicology* 9(5): 449-459, 1995
- ✚ **Semenova S, Bespalov A, Markou A;** “Decreased prepulse inhibition during nicotine withdrawal in DBA/2J is reversed by nicotine self-administration” *European Journal of Pharmacology* 472: 99-110, 2003
- ✚ **Sepelloni G, Madera P, Fanini S;** “Smettere di fumare? Anche una questione etica” *In Tabaccologia, anno III*, 2005
- ✚ **Shakarchi K, Zachar PC, Jonz MG;** “Serotonergic and cholinergic elements of the hypoxic ventilator response in developing zebrafish” *The Journal of Experimental Biology* 216: 869-880, 2013
- ✚ **Shaw-Lutchman TZ, Barrot M, Fallace T, Gilden L, Zachariou V, Impey S, Duman RS, Storm D, Nestler EJ;** “Regional and cellular mapping of CRE-mediated transcription during naltrexone precipitated morphine withdrawal” *Journal of Neuroscience* 22: 3663-3672, 2002
- ✚ **Shoaib M, Gommans J, Morley A, Stolerman IP, Grailhe R, Changeux JP;** “The role of nicotinic receptor beta-2 subunits in nicotine discrimination and conditioned taste aversion” *Neuropharmacology* 42(4): 530-539, 2002
- ✚ **Shuller HM;** “Is cancer triggered by altered signaling of nicotinic acetylcholine receptor?” *Nature Reviews Cancer* 9: 195-205, 2009
- ✚ **Shytle RD, Silver AA, Sheehan KH, Sheehan DV, Sanberg PR;** “Neuronal nicotinic receptor inhibition for treating mood disorders: preliminary controlled evidence with mecamylamine” *Anxiety & Depression* 16(3): 89-92, 2002

- ✚ **Siegel M**; “Smoking and leukemia: evidence of a casual hypotesis” *American Journal of Epidemiology* 138: 1-9, 1993
- ✚ **Siegel MB, Tanwar KL, Wood KS**; “Electronic cigarettes as a smoking-cessation: tool results from an online survey” *American Journal of Preventive Medicine* 40(4): 472-475, 2011
- ✚ **Sieminska A**; “Genetic factors influencing tobacco dependence (Polish)” *Alergia Astma Immunologia* 10: 69-73, 2005
- ✚ **Singer G, Wallace M, Hall R**; “Effects of dopaminergic nucleus accumbens lesions of the acquisition of schedule induced self injection of nicotine in the rat” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 17(3): 579-581, 1982
- ✚ **Sison M, Gerlai R**; “Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801” *Neurobiology of Learning and Memory* 96: 230-237, 2011
- ✚ **Slemmer JE, Martin BR, Damaj MI**; “Bupropion is a nicotinic antagonist” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295: 321-327, 2000
- ✚ **Smedberg J, Lupattelli A, Mardby AC, Nordeng H**; Characteristics of women who continue smoking during pregnancy: a cross-sectional study of pregnant women and new mothers in 15 European countries” *BMC Pregnancy Childbirth* 14(1): 213, 2014
- ✚ **Smith CJ, Hansch C**; “The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate” *Food and Chemical Toxicology* 38: 637-646, 2000
- ✚ **Smith DM, Mizumori SJ**; “Hippocampal place cells, context, and episodic memory” *Hippocampus* 16(9): 716-729, 2006
- ✚ **Smith JB, Fenske NA**; “Cutaneous manifestations and consequences of smoking” *J Am Journal of the American Academy of Dermatology* 34: 717-732, 1996
- ✚ **Smith JW, Mogg A Tafi E, Peacey E, Pullar IA, Szekeres P, Tricklebank M**; “Ligands selective for alpha4beta2 but not alpha3beta4 or alpha7 nicotinic receptors genera lise to the nicotine discriminative stimulus in the rat” *Psychopharmacology* 190: 157-170, 2007

- ✚ **Snyder FR, Davis FC, Henningfield JE**; “The tobacco withdrawal syndrome: performance decrements assessed on a computerized test battery” *Drug and Alcohol Dependence* 23(3): 259-266, 1989
- ✚ **Soderpalm B, Ericson M**; “Neurocircuitry involved in the development of alcohol addiction: the dopamine system and its access points” *Current topics in behavioral neurosciences* 13: 127-161, 2013
- ✚ **Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, Wichems C, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR**; “Molecular mechanism of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference” *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98: 5300-5305, 2001
- ✚ **Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Lopez-Real AM, Labandeira-Garcia JL**; “Effects of nicotine and cotinine on 6-hydroxidopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson’s disease” *Biochemical Pharmacology* 64:125-135, 2002
- ✚ **Spanagel R, Weiss F**; “The dopamine hypothesis of reward: past and current status” *Trends in Neurosciences* 22: 521-527, 1999
- ✚ **Spealman RD, Goldberg SR**; “Maintenance of schedule- controlled behavior by intravenous injections of nicotine in squirrel monkeys” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 223(2): 402-408, 1982
- ✚ **Spiller K, Xi ZX, Li X, Ashby CR Jr, Callahan PM, Tehim A, Gardner EL**; “Varenicline attenuates nicotine-enhanced brain-stimulation reward by activation of alpha4beta2 nicotinic receptors in rats” *Neuropharmacology* 57: 60-66, 2009
- ✚ **Spinella M**; “Compulsive behavior in tobacco users” *Addictive Behaviors* 30(1): 183-186, 2005
- ✚ **Sprague J, Bayraktaroglu L, Clements D, Conlin T, Fashena D, Frazer K**; “The zebrafish information network: the zebrafish model organism database” *Nucleic Acids Research* 34: 581-585, 2006

- ✚ **Stabbert R, Voncken P, Rustemeier K, Haussman HJ, Roemer E, Schaffernicht H, Patskan G;** “Toxicological evaluation of an electrically heated cigarette. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke” *Journal of Applied Toxicology* 23: 329-339, 2003
- ✚ **Stanley S, Gairola CG, Diana J, Huffman M, Sadove R, Kwiatkowski H et al;** “Cotinine: detection by elisa in blood, saliva, and urine” <http://legacy.library.ucsf.edu/;jsessionid=46D7C18D6DE21EB1C03BB92C5EB8EF19.to> bacco04, 1992
- ✚ **Steensland P, Simms JA, Holgate J, Richards JK, Bartlett SE;** “Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, selectively decreases ethanol consumption and seeking” *Proceedings of the National Academy of Science USA* 104: 12518-12523, 2007
- ✚ **Stein EA, Pankiewicz J, Harsch HH, Cho JK, Fuller SA, Hoffmann RG, Hawkins M, Rao SM, Bandettini PA, Bloom AS;** “Nicotine-induced limbic cortical activation in the human brain: a functional MRI study” *American Journal of Psychiatry* 155(8): 1009-1015, 1998
- ✚ **Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P;** “The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice” *Psychopharmacology (Berl)* 85(3): 267-270, 1985
- ✚ **Stewart A, Wong K, Cachat J, Gaikwad S, Kyzar E, Wu N, Hart P, Piet V, Utterback E, Elegante E, Tien D, Kalueff AV;** “Zebrafish models to study drug abuse-related phenotypes” *Annual Review of Neuroscience* 22: 95-105, 2011
- ✚ **Stoker AK, Semenova S, Markou A;** “Affective and somatic aspects of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in C57BL/6J and BALB/c mice” *Neuropharmacology* 54(8): 1223-1232, 2008
- ✚ **Stolerman IP, Shoaib M;** “The neurobiology of tobacco addiction” *Trends in Pharmacological Sciences* 12(12): 467-473, 1991
- ✚ **Stone WL, Bailey B, Khraisha N;** “The pathophysiology of smoking during pregnancy: a systems biology approach” *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)* 6: 318-328, 2014
- ✚ **Streisinger G;** “The Zebrafish book” *Oregon Press, Eugene, Oregon*, 2000



- ✚ **Stuber GD, Britt JP, Bonci A;** “Optogenetic modulation of neural circuits that underlie reward seeking” *Biological Psychiatry* 71:1061-1067, 2012
- ✚ **Su LH, Chen TH;** “Association of androgenetic alopecia with smoking and its prevalence among Asian men: a community-based survey” *Archives of Dermatology* 143: 1401-1406, 2007
- ✚ **Suto N, Austin JD, Vezina P;** “Locomotor response to novelty predicts a rat’s propensity to self-administer nicotine” *Psychopharmacology* 158: 175-180, 2001
- ✚ **Svoboda K, Vijayaraghavan S, Tanguay R;** “Nicotinic receptors mediate changes in spinal motoneuron development and axonal pathfinding in embryonic zebrafish exposed to nicotine” *Journal of Neuroscience* 22: 10732, 2002
- ✚ **Swain HA, Sigstad C, Scalzo FM;** “Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity and place preference in zebrafish (*Danio rerio*)” *Neurotoxicology and Teratology* 26: 725-729, 2004
- ✚ **Swan GE, Lessov-Schlaggar CN;** “The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain” *Neuropsychology Reviews* 17: 259-273, 2007
- ✚ **Sweatt JD;** “Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory” *Current Opinion in Neurobiology*. 14(3): 311-317, 2004
- ✚ **Taber KH, Hurley RA;** “Volume transmission in the brain: beyond the synapse” *J The Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* 26: 1-4, 2014
- ✚ **Taly A, Corringier PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP;** “Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system” *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 733-750, 2009
- ✚ **Tanda G, Munzar P, Goldberg SR;** “Self-administration behaviour is maintained by the psychoactive ingredient of Marijuana in squirrel monkeys” *Nature Neuroscience* 3: 1073-1074, 2000
- ✚ **Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC, Lester HA;** “Nicotine activation of  $\alpha_4$  receptors: sufficient for reward, tolerance and sensitization” *Science* 306: 1029-1032, 2004

- ✚ **Taybos G**; “Oral changes associated with tobacco use” *American Journal of Medicine Sci* 326: 179-182, 2003
- ✚ **Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, et al**; “Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study” *Lancet* 368: 647-658, 2006
- ✚ **Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, Hartge P, Gapstur SM**; “50-year trends in smoking related mortality in the United States” *The New England Journal of Medicine* 368: 351-364, 2013
- ✚ **Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians**; “Harm reduction in nicotine addiction: helping people who can’t quit”, 2007
- ✚ **Tonstad S, Heggen E, Giljam H, Lagerback PA, Tonnesen P, Wikingsson LD, Lindblom N, de Villiers S, Svensson TH, Fagerstrom KO**; “Nicotine(R), a nicotine vaccine, for relapse prevention: a phase II, randomized, placebo-controlled, multicenter clinical trial” *Nicotine & Tobacco Research: official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 2013
- ✚ **Tonstad S**; “Smoking cessation efficacy and safety of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist” *European Journal of Cardiovascular Nursing* 21(6): 433-436, 2006
- ✚ **Trauth JA, Seidler FJ, McCook EC, Slotkin TA**; “Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions” *Brain Research* 851: 9-19, 1999
- ✚ **Trigo JM, Martin-Garcia E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R**; “The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction” *Drug Alcohol Dependence* 108: 183-194, 2010
- ✚ **Tritsch NX, Sabatini BL**; “Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum” *Neuron* 76:33-50, 2012
- ✚ **Tropepe V, Sive HL**; “Can Zebrafish be used as a model to study neurodevelopmental causes of autism?” *Genes, Brain and Behavior* 2: 268-281, 2003

- ✚ **Trtchounian A, Williams M, Talbot P;** “Conventional and electronic cigarettes (e-cigarettes) have different smoking characteristics” *Nicotine & Tobacco Research* 12: 905-912, 2010
- ✚ **Turner JR, Castellano LM, Blendy JA;** “Parallel anxiolytic-like effects and upregulation nicotinic acetylcholine receptors following chronic nicotine and varenicline” *Nicotine & Tobacco Research* 13(1): 41-46, 2011
- ✚ **Tzschentke TM;** “Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues” *Progress in Neurobiology* 56: 613-672, 1998
- ✚ **U.S. Department of Health and Human Services;** “How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease” A report of the Surgeon General U.S. *Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General, Rockville, MD, USA*, 2010
- ✚ **Ulrich YM, Hargreaves KM, Flores CM;** “A comparison of multiple injections versus continuous infusion of nicotine for producing up-regulation of neuronal [<sup>3</sup>H]-epibatidine binding sites” *Neuropharmacology* 36: 1119-1125, 1997
- ✚ **US Department of Health and Human Services;** “The Health consequences of smoking: 50 Years of Progress: A report of the Surgeon General” *Atlanta*, 2014
- ✚ **USDHHS;** “Treating use and dependence” *Clinica Parctice Guideline* (ISBN 1-58763-007-9), 2000
- ✚ **Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J;** “Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain” *European Journal of Neuroscience* 19: 1826-1836, 2004
- ✚ **Van Duijn CM, Hofman A;** “Relation between nicotine intake and Alzheimer disease” *British Medical Journal* 302(6791): 1491-1494, 1991
- ✚ **Vanscheeuwijck PM, Teredesai A, Terpstra PM, Verbeeck J, Kuhl P, Gerstenberg B, Gebel S, Carmines EL;** “Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 4: Subchronic inhalation toxicity” *Food and Chemical Toxicology* 40: 113-131, 2002

- ✚ **Vansickel AR, Cobb CO, Weaver MF, Eissenberg TE;** “A clinical laboratory model for evaluating the acute effects of electronic cigarettes nicotine delivery profile and cardiovascular and subjective effects” *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 19(8): 1945-1953, 2010
- ✚ **Varani AP, Moutinha LM, Bettler B, Balerio GN;** “Acute behavioural responses to nicotine and nicotine withdrawal syndrome are modified in GABA(B1) knockout mice” *Neuropharmacology* 63: 863-872, 2012
- ✚ **Vardavas CI, Anagnostopoulos N, Kougias M, Evangelopoulou V, Connolly GN, Behrakis PK;** “Short-term pulmonary effects of using an electronic cigarette: impact on respiratory flow resistance, impedance and exhaled nitric oxide” *Chest* 141(6): 1400-1406, 2012
- ✚ **Veldman MB, Lin S;** “Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research” *Pediatric Research* 64(5): 470-476, 2008
- ✚ **Vieira-Brock PL, Miller EI, Nielsen SM, Fleckenstein AE, Wilkins DG;** “Simultaneous quantification of nicotine and metabolites in rat brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry” *Journal of chromatography B* 879: 3465-3474, 2011
- ✚ **Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ;** “Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans” *Journal of Pharmacology* 13(4): 337-345, 1999
- ✚ **Wall PM, Messier C;** “Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25(3): 275-286, 2001
- ✚ **Walters AJ, Sutton SR;** “Direct and indirect of nicotine/smoking on cognition in humans” *Addictive Behaviors* 25: 29-43, 2000
- ✚ **Walters CL, Brown S, Changeaux JP, Martin B, Damaj MI;** “The beta2 but not alpha7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice” *Psychopharmacology (Berl)* 184(3-4): 339-344, 2006

- ✚ **Wang B, Ho SSH, Ho KF, Huang Y, Chan CS, Feng NSY, Ip SHS;** “An environmental chamber study of the characteristics of air pollutants released from environmental tobacco smoke” *Aerosol and Air Quality Research* 12: 1269-1281, 2012
- ✚ **Wang F, Nelson ME, Kuryatov A, Olale F, Cooper J, Keyser K, Lindstrom J;** “Chronic nicotine treatment up-regulates human alpha3 beta2 but not alpha3 beta4 acetylcholine receptors stably transfected in human embryonic kidney cell” *The Journal of Biological Chemistry* 273: 28721-28732, 1998
- ✚ **Wang H, Sun X;** “Desensitized nicotinic receptors in brain” *Brain Research Reviews* 48: 420-437, 2005
- ✚ **Wang JC, Cruchaga C, Saccone LN, Bertelsen S, Liu P, Budde JP, Duan W, Fox L, Gruzca RA, Kern J;** “Risk of nicotine dependence and lung cancer is conferred by mRNA expression levels and amino acid change in CHRNA5” *Human Molecular Genetics* 18(6): 3125-3135, 2009
- ✚ **Wang SH, Morris RG;** “Hippocampal-neocortical interaction in memory formation, consolidation and reconsolidation” *Annual Review of Psychology* 61: 49-79, 2010
- ✚ **Wang Y, Broderick P, Matakidou A, Eisen T, Houlston RS;** “Role of 5p15.33 (TERT-CLPTM1L), 6p21.33 and 15q25.1 (CHRNA5-CHRNA3) variation and lung cancer risk in never-smokers” *Carcinogenesis* 31(2): 234-238, 2010
- ✚ **Warner KE;** “Tobacco harm reduction: promise and perils” *Nicotine & Tobacco Research* 4 Suppl 2: S61-S71, 2002
- ✚ **Washko GR, Hunninghake GM, Fernandez IE, Nishino M, Okajima Y, Yamashiro T, Ross JC, Estépar RS, Lynch DA, Brehm JM, Andriole KP, Diaz AA, Khorasani R, D’aco K, Sciurba FC, Silverman EK, Hatabu H, Rosas IO, COPDGene Investigators;** “Lung volumes and emphysema in smokers with interstitial lung abnormalities” *New England Journal of Medicine* 364: 897-906, 2011
- ✚ **Watkins SS, Koob GF, Markou A;** “Neuronal mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal” *Nicotine and Tobacco Research* 2: 19-37, 2000

- ✚ **Watts RR, Langone JJ, Knight GJ, Lewtas J;** “Cotinine analytical workshop report: consideration of analytical methods for determining cotinine in human body fluids as a measure of passive exposure to tobacco smoke” *Environmental Health Perspectives* 84: 173-182, 1990
- ✚ **Webb JK, Norton WH, Trumbach D, Meijer AH, Ninkovic J, Topp S, Heck D, Marr C, Wurst W, Theis FJ, Spaink HP, Bally-Cuif L;** “Zebrafish reward mutants reveal novel transcripts mediating the behavioral effects of amphetamine” *Genome Biology* 10: 231, 2009
- ✚ **Weinberg CR, Wilcox AJ, Baird DD;** “Reduced fecundability in women with prenatal exposure to cigarette smoking” *American Journal of Epidemiology* 129(5): 1072-1078, 1989
- ✚ **Weinberg MA, Segelnick SL;** “A profile of Electronic Cigarettes” *U.S. Pharmacist* 36(7): 37-41, 2011
- ✚ **Weinberger AH, Reutenauer EL, Jatlow PI, O’Malley SS, Potenza MN, George TP;** “A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial of oral seleginine hydrochloride for smoking cessation in nicotine-dependent cigarette smokers” *Drug Alcohol Dependence* 107: 188-195, 2010
- ✚ **West R, Hack S;** “Effect of cigarettes on memory search and subjective ratings” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 38(2): 281-286, 1991
- ✚ **West R, Zatonski W, Cedzynska M, Lewandowska D, Pazik J, Aveyard P, Stapleton J;** “Placebo-controlled trial of cytosine for smoking cessation” *The New England Journal of Medicine* 365: 1193-1200, 2011
- ✚ **West RJ, Hajek P, Belcher M;** “Severity of withdrawal symptoms as a as a predictor of outcome of an attempt to quit smoking” *Psychological Medicine* 19: 981-985, 1989
- ✚ **Westenberger BJ;** “Evaluation of e-cigarette” *US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Division of Pharmaceutical Analysis, St Lous, MO,* 2009

- ✚ **Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R;** “Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant” *Psychopharmacology (Berl)* 93(3): 358-364, 1987
- ✚ **Wilson AL, Langley LK, Monley J, Bauer T, Rottunda S, McFalls E, Kovera C, McCarten JR;** “Nicotine patches in Alzheimer’s disease: pilot study on learning, memory and safety” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 51(2-3): 509-514, 1995
- ✚ **Wing VC, Shoaib M;** “A second-order schedule of food reinforcement in rats to examine the role of CB1 receptors in the reinforcement-enhancing effects of nicotine” *Addiction Biology* 15(4): 380-392, 2010
- ✚ **Wise RA, Bozarth MA;** “A psychomotor stimulant theory of addiction” *Psychological Review* 94: 469-492, 1987
- ✚ **Wonnacott D, Drasdo A, Sanderson E, Rowell P;** “Presynaptic nicotinic receptors and the modulation of transmitter release” *Ciba Foundation symposium* 152: 87-101, 1990
- ✚ **Wonnacott K, Sidhpura N, Balfour DJK;** “Nicotine: from molecular mechanisms to behavior” *Current Opinion in Pharmacology* 5: 53-59, 2005
- ✚ **Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA;** “Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas” *The Journal of Neuroscience* 23(8): 3176-3185, 2003
- ✚ **World Health Organization;** “WHO Report on the Global Tobacco Epidemic”, 2013
- ✚ **Wounda JA, Riga D, De Vries W, Stegerman M van Mourik Y, Schetters D, Schoffemeer AN, Pattij T, De Vries TJ;** “Varenicline attenuates cue-induced relapse to alcohol, but not nicotine seeking, while reducing inhibitory response control” *Psychopharmacology* 216: 267-277, 2011
- ✚ **Wu KK, Cho CH;** “The pharmacological actions of nicotine on gastrointestinal tract” *Journal of Pharmacological Sciences* 94: 348-358, 2004
- ✚ **Yao WD, Gainetdinov RR, Aebuckle MI, Sotnikova TD, Cyr M, Bleaulieu JM, Torres GE, Grant SG, Caron MG;** “Identification of PSD95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity” *Neuron* 41: 625-638, 2004

- ✚ **Yates SL, Bencherif M, Fluhler EN, Lippiello PM;** “Up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors following chronic exposure of rats to mainstream cigarette smoke or alpha4 beta2 receptors to nicotine” *Biochemical Pharmacology* 50: 2001-2008, 1995
- ✚ **Yeomans MR, Gray RW;** “Opioid peptides and the control of human ingestive behavior” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26: 713-728, 2002
- ✚ **Zamani MR, Allen YS, Owen GP, Gray JA;** “Nicotine modulates the neurotoxin effect of beta-amyloid protein (25-35) in hippocampal cultures” *NeuroReport* 8(2): 513-517, 1997
- ✚ **Zaniewska M, Przegalinski E, Filip M;** “Nicotine dependence – human and animal studies, current pharmacotherapies and future perspectives” *Pharmacological Reports* 61: 957-965, 2009
- ✚ **Zhai H, Li Y, Wang X, Lu L;** “Drug-induced alterations in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway: implications for reinforcement and reinstatement” *Cellular and Molecular Neurobiology* 28: 157-172, 2008
- ✚ **Zhao J, Hopke PK;** “Concentration of reactive oxygen species (ROS) in mainstream and sidestream cigarette smoke” *Aerosol Science and Technology* 46(2): 191-197, 2012
- ✚ **Zhu SH, Gamst A, Lee M, et al;** “The use and perception of electronic cigarettes and snus among the U.S. population” *PLoS One* 8: e79332, 2013
- ✚ **Zirger JM, Beattie CE, McKay DB, Boyd RT;** “Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors” *Gene Expression Patterns* 3: 747-754, 2003
- ✚ **Zoli M, Limantola C, Marchi M, De Amici M, Clementi F;** “Funzione e disfunzione dei recettori nicotinici neurali coinvolti in fenomeni trofici ed attività cognitive” *Ministero dell’istruzione, dell’Università e della ricerca scientifica, Progetto di ricerca, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia*, 2005
- ✚ **Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh JM, Clementi F, Gotti C;** “Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum” *The Journal of Neuroscience* 22(20): 8785-8789, 2002
- ✚ **Zon LI, Peterson RT;** “In vivo drug discovery in the zebrafish” *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 35-44, 2005



- ✚ **Zon LI, Peterson RT;** “The new age of chemical screening in zebrafish” *Zebrafish* 7: 1, 2010

*Figure*

# *Ringraziamenti*

Non è facile citare e ringraziare, in poche righe, tutte le persone che hanno contribuito alla nascita e allo sviluppo di questa tesi di dottorato: chi con una collaborazione costante, chi con un supporto morale o materiale, chi con consigli e suggerimenti o solo con parole di incoraggiamento.

Innanzitutto ricordo la Fondazione Fratelli Confalonieri per avermi supportato finanziariamente durante il mio dottorato di ricerca.

Ringrazio le Professoresse Mariaelvina Sala e Daniela Braidà, per la disponibilità, la sincerità e la competenza con cui hanno seguito la mia crescita non solo professionale ma anche umana. Le ringrazio per aver creduto in me fin dall'inizio, dandomi piena fiducia, e per la passione con cui ogni giorno mi insegnano a essere una "vera ricercatrice".

Grazie ancora alla Professoressa Cecilia Gotti, il cui sostegno mi ha permesso di intraprendere questo percorso di dottorato, avvicinandomi al mondo della ricerca con sempre maggiore passione e curiosità.

Vorrei ancora ricordare con infinita gratitudine ed affetto la mia famiglia che, in tutti questi anni, ha sempre creduto in me: "Mamma, grazie di avermi aiutato nei momenti difficili in cui credevo di non farcela; Papà, il tuo sostegno tecnico nel laboratorio è stato indispensabile e senza di te questo lavoro non sarebbe stato possibile".

Un pensiero al mio "piccolo gruppo di studenti", che mi ha dato coraggio, forza ed aiuto per il mio lavoro di ricerca: "Milena, Laura, Marta, Aurora, Giuditta, Veronica, Mario e Ilaria: abbiamo affrontato insieme momenti difficili ma che, tuttavia, ci hanno permesso di crescere e di apprezzare il percorso che stavamo facendo insieme".

Ringrazio tutti i miei amici e tutti coloro che mi sono stati vicini in questi tre anni. In particolare Giulia che, con i suoi cari genitori, non mi ha fatto mai mancare il suo affetto e la sua infinita disponibilità, Mario per i suoi consigli e la sua costante positività e Giuseppe per i suoi competenti suggerimenti.

Ultimo ma non certo per importanza, un ringraziamento particolare va a Francesco, per non avermi mai fatto sentire priva il suo affetto, per essermi sempre stato vicino, per aver condiviso con me tutti i momenti, anche i più difficili, e per l'amorevole pazienza con cui mi sopportato, soprattutto nelle fasi finali di preparazione di questo lavoro.

A tutti Voi, Grazie!