

NEUROBIOLOGIA DELLA TOSSICODIPENDENZA: RIFLESSIONI

Andrea Vendramin

Di tutte le sostanze d'abuso conosciamo ormai bersagli specifici, effetti e tossicità. Per quanto riguarda la tossicodipendenza, (o tossicomania, in inglese addiction), senza entrare nel merito dei modelli sperimentali, essa può rappresentarsi come un paradigma comportamentale che presuppone la ripetuta esposizione di un substrato biologico (cervello) ad un mezzo biologico (droga). Tale esposizione provoca nei singoli neuroni adattamenti capaci di alterare il funzionamento dei circuiti neuronali di cui essi fanno parte determinando i comportamenti che caratterizzano la condizione tossicomantica. All'evento iniziale, rappresentato dall'azione acuta della sostanza sulle proteine bersaglio e sui neuroni che le esprimono, fanno seguito adattamenti molecolari e cellulari che si determinano per esposizione cronica.

Tali adattamenti, indotti dalle sostanze e dipendenti dal tempo di esposizione, costituiscono il substrato neurobiologico di craving e ricaduta e producono i comportamenti che definiscono la tossicomania. Vi è un sostanziale accordo sul fatto che craving e ricaduta rappresentino gli aspetti patognomici di questo disturbo e ne costituiscano i principali fattori di cronicità.

Mentre risultano meglio compresi gli adattamenti di breve durata che mediano fenomeni transitori come tolleranza e sindrome d'astinenza, (che peraltro, più propriamente, configurano la farmacodipendenza piuttosto che la tossicomania), permane la necessità di caratterizzare gli adattamenti di lunga durata sottesi a craving e ricaduta i quali presumibilmente persistono tutta la vita.

La tossicodipendenza appare come un circolo vizioso di disregolazione dei sistemi cerebrali di ricompensa che conduce all'uso forzato ed alla perdita del controllo sull'assunzione di droga.

Nella specie umana la maggior parte delle persone che usano droga non diventa tossicodipendente. Allo stesso modo, nel modello animale, si può osservare che assumere droga, anche per somministrazione endovenosa, in situazioni di accesso limitato, non provoca segni evidenti di tossicomania. Molti fattori come disponibilità di sostanza, modalità di somministrazione, patrimonio genetico, stress e avvenimenti della vita contribuiscono al passaggio alla tossicomania ma la sfida attuale riguarda gli elementi neurobiologici che sottendono le differenze individuali in termini di vulnerabilità alla transizione verso l'addiction.

L'introduzione di metodi propri della biologia molecolare (in particolare clonazione e delezione genica) e l'individuazione e la quantificazione degli effettori biologici intracellulari ed

extracellulari mediante microdialisi cerebrale nell'animale sveglio e libero di muoversi hanno caratterizzato le ricerche effettuate negli ultimi anni. Ciò ha permesso di studiare più direttamente l'effetto delle droghe sull'espressione dei messaggeri cellulari, il ruolo di ambiente e stress e la relazione tra assunzione di sostanze e processi cerebrali. I modelli animali sono stati adattati allo scopo di riprodurre al meglio le condizioni dell'uso nell'uomo e permettono di prevedere per le singole sostanze il rischio d'abuso, farmacodipendenza o tossicomania. Il cervello dell'uomo non sfugge alle regole evolutive enunciate da Darwin, e più tardi dimostrate dalla genetica molecolare: le grandi funzioni vitali che condizionano la sopravvivenza delle specie, compreso quella umana, quali ricerca del cibo, riproduzione e condotta di fuga alla vista dei predatori si realizzano nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) mediante un insieme di connessioni neuronali di cui si comincia ad avere documentazione. Questi comportamenti sono associati all'attivazione del sistema di ricompensa e la loro modulazione si effettua attraverso sistemi di controllo ancora relativamente poco chiari, ma che appaiono importanti anche nella tossicomania.

Diverse esperienze hanno permesso di attribuire alla via dopaminergica mesocortico-limbica un ruolo importante nei sistemi di ricompensa. Il Nucleo Accumbens (N.Ac.) che rappresenta l'elemento centrale di questo sistema, è costituito da due strutture chiamate rispettivamente core e shell. Quest'ultima, che è strettamente connessa all'amigdala a formare la cosiddetta amigdala estesa, è particolarmente implicata nell'attivazione del sistema dopaminergico mesocortico-limbico da parte delle droghe. Anche l'ippocampo, che interviene nei processi di memorizzazione, è con ogni probabilità un elemento di questo circuito. Esistono schematicamente tre modi di attivare la via dopaminergica mesolimbico corticale:

- direttamente aumentando la liberazione di dopamina (DA)
- inibendo la ricaptazione di DA
- limitando l'attività gabaergica inibitoria a livello dei neuroni dopaminergici dell'Area Ventrale Tegmentale (VTA)

Questi differenti meccanismi conducono in ogni caso ad un significativo aumento della concentrazione di DA nel N.Ac.

Sul piano neurobiologico l'aumento di concentrazione di DA nel N.Ac. non rappresenta necessariamente un segno di tossicomania. La stimolazione dei recettori CCK-B tramite colecistochinina (CCK-8), produce liberazione importante di DA e di Met-enkefalina nel N.Ac. ma non induce, nell'animale, alcun effetto tossicomaniogeno. Del resto l'attivazione del

sistema dopaminergico mesolimbico attraverso la somministrazione ripetuta di droghe come oppioidi o psicostimolanti, ha conseguenze differenti rispetto a quelle indotte attraverso l'esposizione ripetuta a stimoli naturali. I meccanismi adattativi a livello del sistema dopaminergico e dell'asse ipotalamo-ipofisario sembrano essere molto differenti nei due casi: in particolare mentre con i reward naturali il sistema va rapidamente incontro ad abitudine, questo non si verifica con le sostanze tossicomane. D'altra parte i neurolettici riducono gli effetti rinforzanti delle droghe ma è noto che il loro impiego minimizza motivazioni e reazioni emotive tanto da evidenziare fino a che punto sia indispensabile il funzionamento armonioso del sistema di ricompensa.

La teoria attualmente più accettata per spiegare il passaggio dall'abuso alla tossicomania deriva dalla definizione neurobiologica degli stati emozionali. In ultima analisi questi ultimi corrispondono ad una stabilizzazione delle funzioni neuronali mantenuta attraverso una concentrazione definita di neurotrasmettitori, fra cui DA e neuropeptidi. La somministrazione di sostanze psicoattive, compresi i farmaci, modificando quest'equilibrio, associa sensazioni di benessere o di malessere a cambiamenti delle concentrazioni sinaptiche di questi effettori determinando nuovi stati emozionali e nuovi bilanciamenti a livello sinaptico. L'uso prolungato di una droga comporta una certa stabilizzazione di questi nuovi segnali emozionali, modificando poco a poco gli effetti soggettivi della sostanza. Così nel corso dello sviluppo della tossicomania si osserva diminuzione progressiva della sensazione di piacere prodotta dalla somministrazione di sostanza e concomitante aumento della disforia quando la droga non è più presente nell'organismo. Conseguentemente i tossicodipendenti finiscono per utilizzare la droga più per placare un malessere che per ottenere effetti positivi. Un elemento molto importante nella tossicomania riguarda le condizioni nelle quali si effettua l'assunzione di droga. È dimostrato che l'addiction è maggiore nel ratto che si autosomministra una droga, che in quello che passivamente riceve un'eguale dose della stessa sostanza. In effetti la liberazione di dopamina è associata ad una situazione piacevole, ma addirittura precede la ricompensa se l'esperienza è ripetitiva. Nell'uomo, il desiderio compulsivo di droga si acuisce quando il consumatore è nel medesimo ambiente in cui si trovava nel momento delle precedenti assunzioni. Una spiegazione a questo fenomeno potrebbe essere trovata nell'instaurarsi di un nuovo equilibrio omeostatico caratterizzato da un cambiamento nella concentrazione sinaptica di DA e oppioidi endogeni, prodotto dalla ripetizione dell'esperienza. Se questo desiderio non viene realizzato si determina una frustrazione emotiva che potrebbe

tradursi nel bisogno violento e imperioso della sostanza. D'altra parte l'importanza dell'ambiente nel manifestarsi di una sensazione di malessere non è limitata al caso della tossicomania ma è tipica anche del Disturbo da Attacco di Panico (DAP). Questi dati suggeriscono che i processi mnesici ricoprano un ruolo importante nella tossicomania.

Tra le numerose questioni poste dalla tossicodipendenza, quella relativa alla persistenza del craving verso la sostanza rimane la più importante. Spesso dopo anni di astinenza la ricaduta avviene in circostanze che hanno caratterizzato in maniera ripetitiva il precedente consumo. Probabilmente è la memorizzazione dei rituali e dello stato emozionale che li accompagna che conduce alla ricaduta, sebbene il meccanismo biochimico di questo fenomeno sia ancora sconosciuto. Si presume tuttavia che si determinino dei cambiamenti biochimici la cui permanenza sia molto duratura. I processi più studiati attualmente sono quelli che riguardano l'esposizione cronica agli oppioidi ed è in questo campo che sono stati ottenuti i risultati più interessanti.

Recettori e sistemi di trasduzione

I recettori per gli oppioidi sono accoppiati negativamente al sistema adenilatociclasa per mezzo delle proteine eterotrimeriche Gi mentre il reclutamento delle proteine Go media il cambiamento della permeabilità agli ioni K^+ e Na^+ attraverso equilibri di fosforilazione/defosforilazione dei canali. L'esposizione cronica agli agonisti oppioidi produce, attraverso un meccanismo di adattamento, la superespressione di differenti forme di adenilatociclasa (in particolare i tipi I e VIII) la cui azione produce aumento di AMP ciclico (AMPC) intracellulare e un'attivazione della proteinchinasi A (PKA) il cui funzionamento è controllato dalla concentrazione di AMPC. La PKA fosforila numerose proteine, compresi i canali ionici, determinando un cambiamento dello stato di eccitabilità neuronale. Questi processi adattativi, in parte, spiegano i fenomeni di tolleranza e di dipendenza fisica. In effetti nel divezzamento da morfina si osserva aumento di espressione dell'adenilatociclasa nelle regioni cerebrali che, come il Locus Coeruleus (LC), contengono neuroni noradrenergici e l'aumento dell'attività adenilciclasica e noradrenergica si correla in modo soddisfacente all'intensità della sindrome di astinenza. In accordo con questo schema adattativo, la somministrazione di PKA-inibitori nel LC mitiga la sindrome di astinenza mentre quella nel N.Ac. riduce la dipendenza psichica. L'aumento di attività della PKA conduce alla fosforilazione delle proteine cellulari ed in particolare dei fattori di trascrizione come la proteina CREB (Cyclic AMP Responsive Element Binding). Dopo la fosforilazione, la CREB

attiva la trascrizione dei geni codificanti per diverse proteine (tra le quali l'adenilato ciclasi) sia in maniera diretta sia attraverso il cFOS, la cui espressione è controllata dal CREB. Oligonucleotidi antisenso diretti contro l'RNAm della CREB introdotti nel LC, bloccando la sintesi della CREB diminuiscono l'espressività della sindrome d'astinenza. Nello stesso modo la delezione del gene CREB nel topo riduce in maniera notevole gli effetti dell'astinenza. In quest'ultimo caso, si osserva spesso un'iperespressione di cFOS e questo presuppone una via di regolazione diversa dal CREB per questo fattore.

Disequilibrio dei processi di fosforilazione-defosforilazione

La somministrazione cronica di oppioidi conduce a un iperfunzionamento dei processi di fosforilazione AMPc dipendenti e numerose proteine regolatrici intracellulari sono probabilmente fosforilate dalla PKA in seguito a iperproduzione di AMPc. Queste proteine possono partecipare all'internalizzazione dei recettori oppioidi (tolleranza) come nel caso delle chinasi fosforilanti il recettore adrenergico.

In particolare possono essere alterati l'espressione e/o le proprietà di accoppiamento al recettore delle diverse forme di proteine G e ciò determina modificazioni nella trasduzione dei messaggi extracellulari. Così il trattamento cronico mediante oppioidi o cocaina diminuisce l'espressione di proteine G appartenenti alla famiglia Gi/Go coinvolte nell'accoppiamento ai recettori oppioidi e D₂. Un altro meccanismo di modulazione della trasduzione dei messaggi implica il disaccoppiamento delle tre subunità α , β e γ delle proteine G. Dopo il legame all'adenilato ciclasi la subunità α è recuperata dalle subunità β e γ per formare nuovamente una proteina eterotrimerica funzionante. Questo processo può essere influenzato dal legame delle subunità β e γ a diverse proteine coinvolte in endocitosi, riciclaggio dei recettori e divisione e differenziazione cellulare. Attualmente appare crescente l'importanza dei sistemi che coinvolgono recettori accoppiati alle proteine G e recettori che possiedono attività tirosinchinasica, che sono stimolati dai fattori di crescita e la cui attivazione conduce a una cascata di eventi intracellulari che coinvolgono proteinchinasi (map-chinasi) e fosfatasi.

In queste condizioni la presenza di un'eccessiva stimolazione della via AMPc dipendente tramite il reclutamento permanente di recettori oppioidi e/o dopaminergici, condurrebbe, attraverso due meccanismi distinti, ad una concentrazione intracellulare di proteine fosforilate eccessiva rispetto alle possibilità di regolazione fisiologica operata dalle fosfatasi cellulari. La

lunga vita delle proteine fosforilate potrebbe spiegare l'estremo perdurare degli effetti tossicomani di certe droghe. Un risultato interessante è la presenza nel N.Ac. del ratto, 24 ore dopo la somministrazione di cocaina, di un nuovo mRNA, indicato come N.Ac-1 la cui sequenza proteica mostra, nei primi 120 aminoacidi, un domain proprio dei fattori di trascrizione. Queste proteine fosforilate possono agire direttamente modificando lo stato funzionale del neurone e, per estensione, quello dei sistemi coi quali esso si connette. Inoltre esse possono agire come fattori di trascrizione e indurre l'espressione di proteine normalmente represses. Per esempio, dopo assunzione cronica di oppioidi, psicostimolanti o nicotina, sono espresse e si accumulano nuove forme di cFos. Queste isoforme caratterizzate da alcune delezioni nella sequenza, sono denominate varianti Δ FOS. Un'eteroproteina di 35KDa (AP-1) costituita da un accumulo di complessi proteici formati da cFos o da sue isoforme legate a cJun è stato trovato nel N.Ac., ma non nella corteccia prefrontale, dopo trattamento con cocaina o nicotina. L'insieme di queste osservazioni suggerisce l'esistenza di un meccanismo tossicomani comune a queste droghe. Corteccia prefrontale, ippocampo ed amigdala giocano un ruolo ugualmente importante nei processi mnesici. La dopamina modula l'archiviazione delle informazioni corticali ed è possibile che le perturbazioni indotte nella via dopaminergica mesocortico-limbica da stimolazioni ripetute, rinforzino la memorizzazione delle situazioni riguardanti il consumo di droghe. L'amigdala, implicata nella memorizzazione a lungo termine delle emozioni, potrebbe ugualmente partecipare alla conservazione del ricordo degli effetti piacevoli e spiacevoli associati alla tossicomania. La liberazione di CRF, associata alle situazioni di stress ma anche al consumo di droghe, potrebbe rinforzare la memorizzazione delle emozioni attraverso l'amigdala ed i recettori β adrenergici giocherebbero un ruolo critico in questo processo. Sembra interessante l'ipotesi che riguarda l'espressione di geni soppressori nel momento della memorizzazione a lungo termine. La memorizzazione a lungo termine necessita di uno stoccaggio d'informazione (consolidamento) in alcuni neuroni specializzati come quelli dell'ippocampo. Il reclutamento di numerose proteinchinasi, AMPc e CREB-1 permetterebbe il consolidamento dell'informazione immediata (memoria a breve termine). La scelta delle informazioni da consolidare potrebbe effettuarsi attraverso l'espressione o meno di fattori che si oppongono al consolidamento e Δ PCREB-2 sarebbe uno di questi fattori. Δ PCREB-2 avrebbe grandi analogie con CREB-1 e inibirebbe l'espressione di quest'ultimo; effettivamente anticorpi anti- Δ PCREB-2 consolidano i processi mnesici prodotti dalla stimolazione di un recettore serotonergico accoppiato alle

proteine G. Lo stoccaggio dell'informazione è ugualmente accompagnato da cambiamenti di certi costituenti intracellulari come l'espressione di una proteina enzimatica, l'ubiquitina idrolasi, che induce l'attivazione permanente della PKA determinando l'esaltazione dei processi di internalizzazione ad opera della cellula. Sono evidenti le analogie tra i processi biochimici implicati nella memorizzazione e quelli coinvolti nella sensibilizzazione e nella tossicomania. È necessario tuttavia sperimentare se questi processi di "stoccaggio mnesico", scoperti in organismi molto primitivi, esistono anche nel SNC dei mammiferi e se essi sono modificati in seguito alla somministrazione di differenti sostanze tossicomanigene.

Conclusioni

Le basi neurobiologiche della tossicomania cominciano ad essere esplorate ed è chiaro che molte ipotesi saranno smentite o confermate in un futuro ormai prossimo. È sempre più probabile che le alterazioni comportamentali a lungo termine indotte dalle sostanze tossicomanigene siano dovute a modificazioni biochimiche simili a quelle che entrano in gioco nei processi di memorizzazione. Peraltro, l'idea semplicistica di una regolazione unica dei sistemi di trasferimento coinvolti nel legame di una droga con il suo bersaglio è da rivedere.

Attualmente si pensa ad un coinvolgimento di meccanismi complessi che riguardano i sistemi di transduzione dei segnali e probabilmente la differenziazione cellulare. La cellula cronicamente stimolata da una droga si modificherebbe in modo tale da rinnovare, se non addirittura amplificare in maniera automatica gli effetti del messaggio extracellulare iniziale, e poi conservare questa capacità di adattamento per mesi o addirittura per anni.

Non c'è alcun dubbio che la comprensione dei meccanismi molecolari sottesi alla tossicomania risulti indispensabile per individuare strumenti idonei a ridurre la ricerca compulsiva delle droghe e la vulnerabilità alle ricadute che costituiscono i veri problemi di questo disturbo.

BIBLIOGRAFIA

Abel T., Martin K.C., Bartsch D., & Kandel E.R. (1998) Memory suppressor genes: Inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 279, 338-341.

- Cador M., Robbins T.W., & Everitt B.J. (1989) Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience* 30,77-86.
- Chen I., Kelz M.B., Hope B.T., Nakabeppu Y. & Nestler E.J. (1997) Chronic Fos-related antigens: Stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *J. Neurosci* 17, 4933-4941.
- Daaka Y., Luttrell L.M., & Lefkowitz R.I. (1997) Switching the coupling of the B2-adrenetic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390,88-91.
- Daugé V., Mauborgne A., Cesselin F., Fournié-Zaluski M.C. & Roques B.P. (1996) The dual peptidase inhibitor RB 101 induces a long lasting increase in the extracellular level of Met-enkephalin in the nucleus accumbens of freely moving rats. *J. Neurochem.* 67, 1301-1308.
- Di Chiara G. & Imperato A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 85, 5274-5278.
- Di Chiara G., Tanda G., Cadoni C., Acquas E., Bassareo V., Carboni E. (1998) Homologies and differences in the action of drugs of abuse and conventional reinforcer (food) on dopamine transmission: an interpretative framework of the mechanism of drug dependence *Adv Pharmacol* 42, 983-87.
- Gold S.J., Ni Y.G., Dohlsman H.G., & Nestler E.J. (1997) Regulators of Gprotein signaling (RGS) proteins : region-specific expression of nine subtypes in rat brain. 1. *Neurosci.* 17, 8024-8037.
- Kalivas P.W., and Mackler S.A. (1997) A novel mRNA regulated by cocaine and capable of affecting cocaine behaviour. In 36th Annual Meeting from American College of Neuropsychopharmacology Scientific Abstract, December 8-12, p. 214.
- Koob G.F. & Le Moal M. (1997) Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278,52-58.
- Kreek M.J. (1996) Opiates, opioids and addiction. *Mol. Psychiatr.* 1, 232-254.
- Inglese J., Koch W.J., Touhara K., & Lefkowitz R.J. (1995) GBg interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *Trends Biochemn. Sci.* 20, 151-156.
- Ladurelle N., Keller G., Blommaert A., Roques B.P., & Daugé V. (1997) The CCK-B agonist. BC 264, increases dopamine in the nucleus accumbens and facilitates motivation and attention after intraperitoneal injection in rats. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1804-1814.

- Lane-Ladd S.B., Pineda J., Boundy V.A., Pfeuffer T., Krupinski 1., Aghajanian G.K., & Nestler E.J. (1997) CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: Biochemical, physiological, and behavioural evidence for a role in opiate dependence. *J. Neurosci.* 17, 7890-7901.
- Maisonneuve I.M., Ho A., & Kreek M.J. (1995) Chronic administration of a cocaine "binge" alters basal extracellular levels in male rats: an in vivo microdialysis study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 652-657.
- Maldonado R., Blendy J.A., Tzavara E., Gass P., Roques B.P, Hanoune J., & Schultz G. (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 273,657-659.
- Pathways of addiction (1996), National Academy Press, Washington, D.C..
- Pontieri F.E., Tanda G., & Di Chiara D. (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12304-12308.
- Roberts A.J., Cole M., & Koob G.F. (1996) Intra-amygdala muscimol decreases operant ethanol self-administration in dependent rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20, 1289-1298.
- Robinson T.E., & Berridge K.C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.* 18, 247-291.
- Romo R., & Schultz W. (1990) Dopamine neurons of the monkey midbrain contingencies of responses to active touch self-initial arm movements. *J. Neurophysiol* 63, 592-606.
- Roques B.P., Noble F., Dugé V., Fournié-Zaluski M.C., & Beaumont A. (1993) Neutral endopeptidase 24.11. Structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev.* 45, 87-146.
- Schultz W., Dayan P., & Montagne R. (1997) A neural substrates of prediction and reward. *Science* 275, 1593-1599.
- Siegel S. (1988) Drug anticipation and drug tolerance. In: *The psychopharmacology of addiction*. Lader M.H. (ed.) Oxford University Press, Oxford, pp. 73-96.
- Simon H. (1997) Pharmacodépendance. Quel modèle animal? Pour quoi faire? in *Dépendance et Conduites de Consommation* (Padieu R., Beaugé F., Choquet M., Molimard R., Parquet P., & Stinus L., Eds.) Question en santé publique, Intercommissions INSERM, Les Editions INSERM. Ch. 9, 119-143.

- Solomon R.L., & Corbit J.D. (1974) An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychol. Rev.* 31, 119-145.
- Striplin CD., & Kalivas P.W. (1993) Robustness of G protein changes in cocaine sensitization shown with immunoblotting. *Synapse* 14, 10-15.
- Valverde O., Tzavara E., Hanoune J., Roques B.P., & Maldonado R. (1996) Protein kinases in the rat nucleus accumbens are involved in the aversive component of opiate withdrawal. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2671-2678.
- Williams G.V., & Goidman-Rakic P.S. (1995) Modulation of memory fields by dopamine D₁ receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376, 572-575.