

# Preludio al piacere: attivazione limbica mediante stimoli “non visti” legati a droga e sesso

**Razionale:** Il cervello umano risponde a segnali riconoscibili per quanto riguarda sesso e droghe “gratificanti”, mediante attivazione del circuito limbico del piacere. Il cervello risponde allo stesso modo a tali segnali di piacere anche quando questi “non sono visti”, es. presentati in modo da prevenire il loro riconoscimento consapevole? La risposta cerebrale a stimoli gratificanti “non visti” può predire la futura risposta affettiva a versioni riconoscibili di tali stimoli, rivelando un’associazione tra processi affettivi/motivazionali consapevoli e non consapevoli?

**Metodologia/ Risultati Principali:** Abbiamo utilizzato risoluzione temporale veloce della risonanza magnetica funzionale (fMRI) evento-correlata per testare la risposta cerebrale a stimoli non-visti (backward-masked) correlati alla cocaina, al sesso, sgradevoli e neutri della durata di 33 millisecondi in maschi cocainomani (n=22). Due giorni dopo lo scan la valenza affettiva per la versione visibile di ogni tipo di segnale veniva determinata usando un bias priming task affettivo. Abbiamo dimostrato per la prima volta, l’attivazione della corteccia limbica mediante stimoli “non visti” per sostanze d’abuso e sessuali di solo 33 millisecondi di durata. In maniera significativa, l’aumentata attività in un ampio gruppo interconnesso pallido ventrale/amigdala dovuta a stimolazioni “non viste” per la cocaina era fortemente predittivo di un futuro impatto positivo sulle versioni riconosciute degli stessi stimoli in successivi test, indicando sia il significato funzionale della risposta cerebrale rapida, sia i substrati cerebrali condivisi della motivazione consapevole o meno.

**Conclusioni/Significato:** Queste ricerche rappresentano la prima dimostrazione che il circuito cerebrale della gratificazione risponde a stimoli sessuali e per le sostanze d’abuso presentati al di sotto della soglia della consapevolezza. I risultati sottolineano la sensibilità dell’encefalo a stimoli di piacere “non visti” e possono rappresentare la traccia primordiale del meccanismo del desiderio. La risposta del cervello limbico a stimoli gratificanti non consapevoli può rappresentare una vulnerabilità potenziale nei disturbi (es. le dipendenze) per i quali il craving scarsamente controllato è una caratteristica fondamentale.

**Anna Rose Childress**<sup>1,3</sup>, **Ronald N. Ehrman**<sup>1</sup>,  
**Ze Wang**<sup>1,2,3</sup>, **Yin Li**<sup>1,2,3</sup>, **Nathan Sciotino**<sup>1</sup>,  
**Jonathan Hakun**<sup>1</sup>, **William Jens**<sup>1</sup>, **Jesse Suh**<sup>1</sup>,  
**John Listerud**<sup>1,3</sup>, **Kathleen Marquez**<sup>1,3</sup>,  
**Teresa Frankli**<sup>1</sup>, **Daniel Langleben**<sup>1,3</sup>, **John  
Detre**<sup>2</sup>, **Charles P. O’Brien**<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Psychiatry, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America

<sup>2</sup> Department of Neurology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America

<sup>3</sup> Veterans Integrated Services Network (VISN)

Titolo originale: “Prelude to passion: limbic activation by “unseen” drug and sexual cues” – PLoS ONE 3(1): e 1506. doi: 10.1371/journal.pone.0001506

Traduzione a cura di:

Addiction & Neuroscience Verona Group.

## INTRODUZIONE

Alla fine del XIX secolo, Freud (1) propose che molto della spinta motivazionale umana, sia le paure che i desideri, avviene in maniera inconsapevole. Questa affermazione ebbe un profondo impatto sulla cultura dell’ultimo secolo, senza essere facilmente documentabile. La diagnostica funzionale cerebrale per immagini può essere utilizzata per testare se il cervello risponde a stimoli di significato motivazionale, anche quando presentati a livello non consapevole. Gli studi di neuroimaging hanno evidenziato che l’encefalo (es. l’amigdala) può rispondere a segnali molto brevi di paura e minaccia anche quando presentati con procedure che prevengono il riconoscimento consapevole (2-6). Le risposte automatiche (Hair-trigger) a stimoli appresi, anche di minaccia al di sotto della soglia di consapevolezza, si possono essere formate per la loro vantaggiosità in termini di sopravvivenza.

Anche alcuni segnali di piacere (es. stimolazioni per opportunità sessuali) (7) hanno un chiaro significato di sopravvivenza; altri (es. stimolazioni studiate

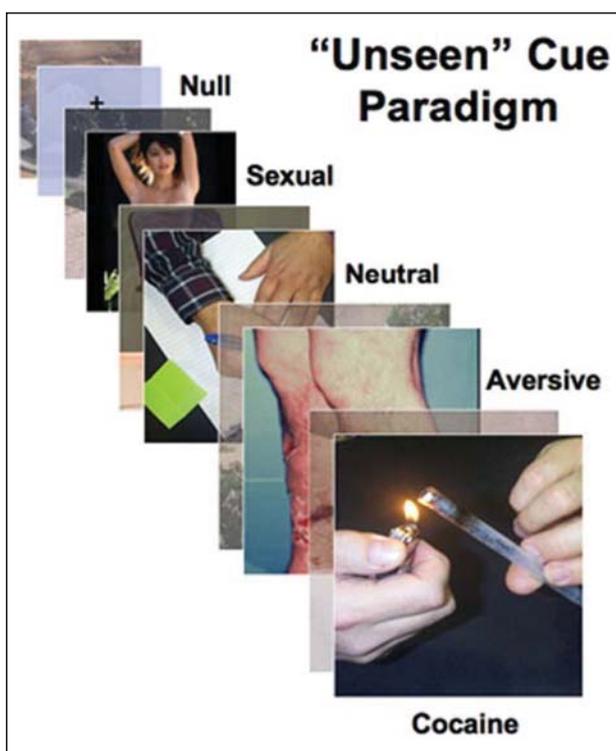


Figura 1. Paradigma stimolo “non visto”.

per il piacere legato all’assunzione di sostanze) (8) hanno potenti effetti motivazionali mediante le loro azioni sui circuiti di piacere naturali, ma non conferiscono nessun vantaggio sulla sopravvivenza. Non si sa ancora se il cervello risponda a stimolazioni di piacere di ciascun tipo quando presentate in maniera non consapevole; in questo studio sono stati testati entrambi i tipi di stimolo. Esposizioni prolungate (di secondi o minuti) a stimoli rilevanti per la cocaina (9) o di tipo sessuale (10,11) possono scatenare il desiderio consapevole e l’attivazione di regioni limbiche interconnesse (es. amigdala, striato/pallido, corteccia orbitofrontale, polo temporale, insula e corteccia prefrontale mediale) importanti nell’apprendimento del piacere (12). Per indagare la possibilità di un simile modello di risposta cerebrale a tali stimoli quando presentati in maniera inconscia, abbiamo fatto uso di un mascheramento retroattivo visivo (vedi Metodi), nel quale ogni stimolo molto breve è seguito immediatamente da stimoli molto più lunghi di contenuto diverso. In queste condizioni, i soggetti riferiscono di aver visto gli stimoli più lunghi di contenuto diverso, ma gli stimoli brevi sfuggono al riconoscimento visivo e vengono riportati come “non visti” (vedi Metodi). Per il nostro campione di 22 maschi cocainomani (età media 41 anni; media di assunzione di cocaina di 15,7 anni), le stimolazioni target sono state presentate randomizzate correlate alla cocaina, al sesso, di natura sgradevole e stimolazioni neutre di durata di 33 millisecondi, ognuna seguita da immagini neutre di durata di 467 millisecon (fig 1, sotto). Abbiamo utilizzato la rapida sequenza fMRI per consen-

tire una rapida presentazione di 24 stimoli unici in ogni categoria (con inter stimolo medio di 2 secondi), assieme con 24 presentazioni disseminate di valore zero (schermo su croce grigio). Sia una immediata unità di richiamo nei pazienti e una forzata scelta di unità categoriale in un campione indipendente (vedi Metodi) sono stati usati per stabilire l’adeguatezza delle procedure. Due giorni dopo (off-magnet), abbiamo testato un sottogruppo della coorte dell’imaging con un compito di priming (vedi Metodi) per determinare la valenza affettiva (positiva o negativa) di alcuni stimoli quando chiaramente visibili.

## RISULTATI

### Mascheramento retroattivo

I risultati di entrambi i compiti (richiamo immediato e la scelta forzata di riconoscimento categoriale) indicavano che i parametri di “backward-masking” erano efficaci nel prevenire il riconoscimento degli stimoli (vedi dettagli nei risultati supplementari nel testo S1: tabella S1). Il “debriefing” soggettivo successivo a ogni compito era congruo con i dati del compito (richiamo immediato o scelta categoriale forzata): gli stimoli target non erano stati visti al di sotto dei parametri temporali dello studio.

### Attivazione limbica mediante stimoli “non visti” relativi a cocaina e sesso

Sorprendentemente, sia gli stimoli relativi alla cocaina, sia quelli di tipo sessuale, (sebbene “non visti”, come misurato nei compiti di valutazione), producevano attivazione differenziale delle regioni limbiche cerebrali. Gli stimoli “non visti” relativi alla cocaina (fig. 2°; vedi commenti anatomici e referenze aggiuntive nel testo S1) attivavano l’amigdala (una regione cerebrale che assegna rapidamente una valenza edonica positiva o negativa a stimoli sopraggiungenti), lo striato ventrale e il pallido ventrale (critici nella processazione del piacere), l’insula (che registra le afferenze provenienti dai visceri autonomici/cuore; associati entrambi agli stati emozionali e alla vulnerabilità all’addiction), e i poli temporali, parte del classico circuito libico attivato da stimoli estesi per la cocaina (8).

Gli stimoli “non visti” relativi alla cocaina attivavano anche in modo differenziale la corteccia orbitofrontale caudale (importante per confrontare e aggiornare il valore delle gratificazioni (immagini non mostrate). Gli stimoli sessuali “non visti” producevano importanti attivazioni limbiche, includendo l’amigdala, il pallido/striato ventrale, la corteccia orbitofrontale, la porzione anteriore dell’insula, e i poli temporali (fig 2B), così come la parte posteriore dell’insula e l’ipotalamo e il tegmento del mesencefalo (ultime immagini non mostrate). Complessivamente, la risposta rapida del cervello a stimoli relativi

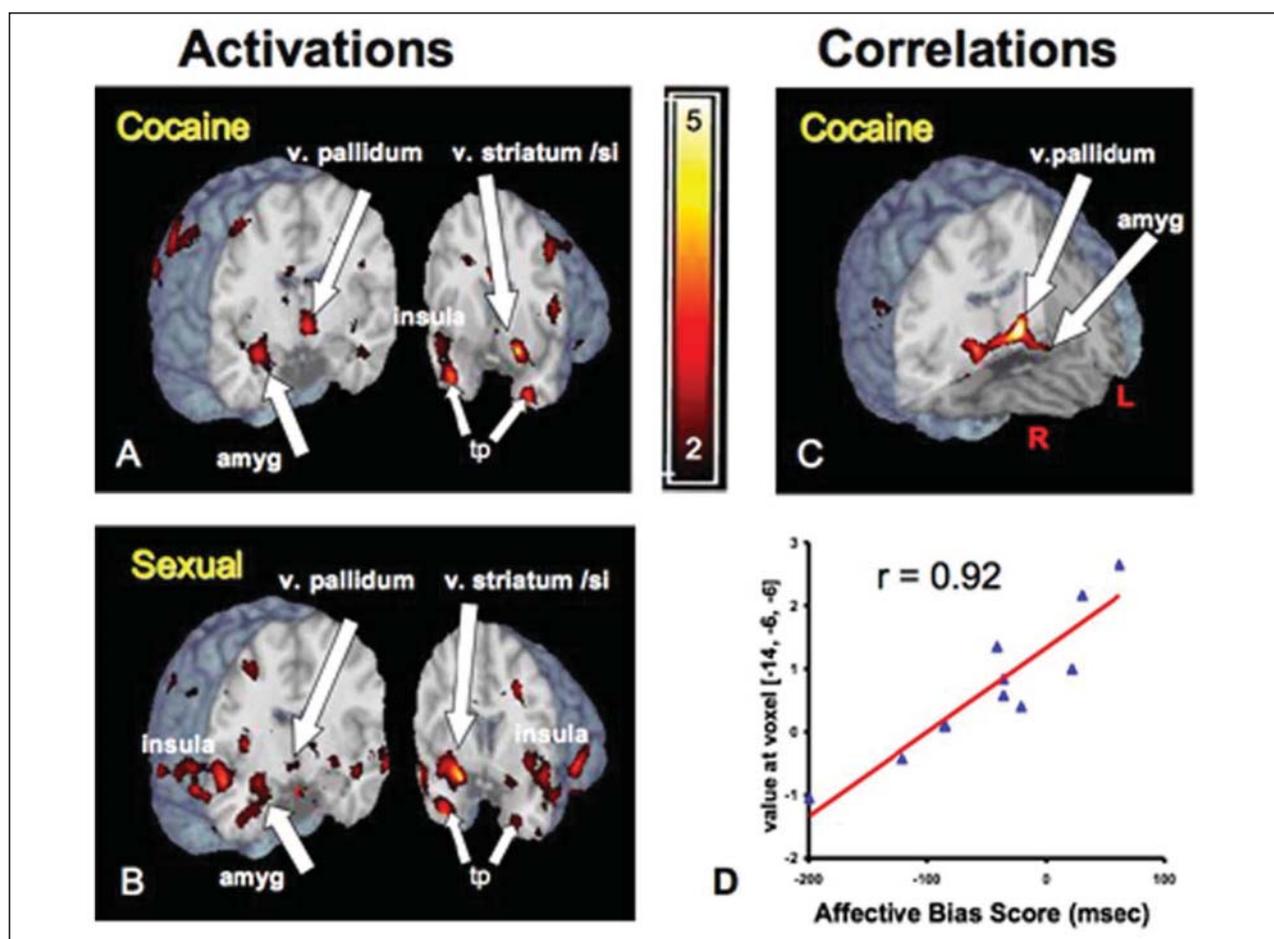


Figura 2. Attivazioni e correlazioni.

a droga e sesso, presentati al di sotto della soglia di coscienza, mostrava una sostanziale sovrapposizione anatomica con la sua conosciuta risposta alle stimolazioni più prolungate che provocano il desiderio consapevole, con la possibile eccezione delle regioni frontali ad attività modulatoria di alto livello (vedi commenti anatomici supplementari nel testo S1).

#### La risposta cerebrale a stimoli "non visti" relativi a cocaina prevede il futuro coinvolgimento alle versioni visibili degli stessi stimoli

Inserendo la media del punteggio di errore di ogni individuo per le stimolazioni per la cocaina, ottenuta dal compito di priming (vedi Metodi) nel rilevante contrasto di immagine, eravamo in grado di testare per correlazioni con la risposta cerebrale rapida agli stimoli "non visti" per la cocaina. Abbiamo visto che una maggiore attività cerebrale agli stimoli "non visti" per la cocaina nelle zone interconnesse del pallido ventrale e dell'amigdala prediceva una risposta affettiva più positiva alla versione visibile degli stessi stimoli in un test successivo di due giorni dopo (fig. 2, C e D). Questa correlazione sottolinea il significato funzionale della reazione dell'encefalo a

stimoli gratificanti "non visti", e suggerisce una potenziale continuità tra i processi affettivi/motivazionali che si verificano al di sotto e al di sopra della soglia di coscienza.

#### DISCUSSIONE

Queste ricerche sottolineano l'estrema sensibilità del cervello ai segnali di gratificazione, non solo per le gratificazioni con chiaro significato di sopravvivenza (es. opportunità sessuali) (7), ma anche per le gratificazioni legate alla droga, con l'acquisizione di un significato biologico a causa delle loro azioni sullo stesso circuito cerebrale. Sebbene l'amigdala sia meglio conosciuta per la sua rapida risposta ai segnali di pericolo (2); la risposta dimostrata qui agli stimoli sessuali e della droga "non visti" estende la sua importanza alla processazione dei segnali per la gratificazione (13-15), anche quando presentati al di sotto della soglia di coscienza. Inoltre, sebbene il ruolo dello striato/pallido nella processazione della gratificazione ha una lunga storia (vedi commenti anatomici supplementari e referenze aggiuntive nel testo S1), questa è la prima evidenza negli esseri umani per una rispo-

sta dello striato/pallido agli stimoli “non visti” relativi a droga e sesso.

### Contesto teorico

La nostra ipotesi di lavoro è che stimoli legati a droga e sesso acquisiscono l'abilità di innescare il circuito cerebrale del piacere attraverso il semplice condizionamento Pavloviano. Negli esperimenti classici di Pavlov (16) una campanella segnalante in maniera affidabile l'arrivo della ricompensa di cibo comportava l'inizio della salivazione e eccitava l'anticipazione del pasto. Sebbene la salivazione per il cibo era riflessa, la salivazione e l'eccitamento legato alla campana erano “condizionati”, stabiliti mediante apprendimento. Allo stesso modo, stimolazioni arbitrarie (es. la vista dei parafrenalia, il luogo dove si trova la sostanza, o anche un pensiero sulla cocaina) affidabili, determinano fisiologicamente l'innescamento del desiderio per la cocaina, l'anticipazione e l'attivazione del circuito limbico del piacere (8) nei tossicodipendenti. Poiché le risposte innescate dagli stimoli dipendono dall'apprendimento, gli individui “naive” per la cocaina non mostrano queste risposte agli stimoli della cocaina (8,17, 18). Secondo noi, la risposta cerebrale riflessa dei cocainomani agli stimoli della droga e del sesso non visti riflette l'apprendimento Pavloviano, ma con una potente spinta evolutiva. Gli organismi con una rapida risposta ai segnali gratificatori, anche veloci o “non visti”, per cibo e sesso avrebbero un vantaggio sulla sopravvivenza. La cocaina non conferirebbe tale vantaggio. Ciononostante, poiché la cocaina attiva fortemente il circuito del piacere, il cervello limbico tratta gli stimoli per la cocaina come se fossero segnali di una gratificazione naturale altamente desiderabile.

Da questa prospettiva, è interessante comparare direttamente l'intensità della risposta cerebrale a stimoli per una gratificazione “naturale” (es. sessuale) vs. una “non naturale” indotta da cocaina. Uno studio precedente nei cocainomani (18) ha infatti riportato una risposta cerebrale più forte allo stimolo visibile per cocaina rispetto alla stimolazione di tipo sessuale, consistente con le segnalazioni dei pazienti che il desiderio per la cocaina è molto simile al desiderio sessuale, ma molto più forte. Non abbiamo comparato direttamente la risposta cerebrale alle categorie di stimolazioni “non viste” di tipo sessuale vs quelle riferibili alla cocaina, a causa della difficoltà, per quanto riguarda gli studi di provocazione in campo umano, nel relazionare gli stimoli criticamente: la loro importanza per la storia unica di apprendimento dell'individuo. Anche quando le categorie di stimolo sono altrimenti bilanciate approssimativamente sulle caratteristiche percepite (luminosità, colore, complessità) o normalizzate su una popolazione di riferimento (19), l'impostazione sulla precedente storia di condizionamento è un forte determinante della risposta cerebrale. Poiché nella ricerca umana la storia di droga e sessuale costituiscono

variabili non controllate nella replicabilità, gli studi pre-clinici nell'ambito della fMRI potrebbero offrire una nuova alternativa per stabilire, e quindi comparare, la risposta cerebrale a stimolazioni “non viste” per sostanze d'abuso vs gratificazioni non collegate alla droga.

### Limitazioni

Come ogni nuova scoperta, la generalizzabilità e la replicabilità dei presenti risultati con stimoli “non viste” dipenderà da ulteriori studi. In maniera promettente, in uno studio molto recente, Pessiglione et al. (20) hanno dimostrato simili (amigdala, striato, pallido) risposte cerebrali a stimoli per gratificazioni monetarie “non viste”, estendendo la generalizzazione delle presenti ricerche ad una diversa gratificazione e ad una diversa popolazione di soggetti. Studi con stimoli “non visti” per cibo, una gratificazione naturale critica, sarà una estensione valutabile e una validazione delle presenti ricerche, come lo saranno studi con altre popolazioni cliniche (es. quelle che combattono per gestire la motivazione verso il cibo o la gratificazione sessuale).

### Implicazioni cliniche

La risposta cerebrale rapida a stimoli piacevoli “non visti” può avere delle implicazioni cliniche. Il cervello può iniziare l'anticipazione al desiderio in un momento, al di fuori dello stato cosciente, e senza il pesante controllo delle regioni frontali regolatorie. Prima che lo stato motivazionale venga sperimentato ed etichettato come desiderio cosciente, l'antico circuito limbico della gratificazione ha già iniziato a operare. Questo dilemma si può riflettere non solo sulla nostra lotta quotidiana per gestire la spinta delle gratificazioni naturali come cibo e sesso, ma anche su patologie croniche resistenti al trattamento per le quali il desiderio scarsamente controllato è una caratteristica fondamentale (es. le dipendenze). In modo incoraggiante i paradigmi di neuroimmagine basati su stimoli “non visti” possono essere usati per sviluppare trattamenti che sappiano trattare la motivazione problematica al momento della sua insorgenza, es., in modo inconsapevole.

## MATERIALI E METODI

### Soggetti

**Coorte dell'*imaging*.** Ventidue pazienti cocainomani maschi richiedenti trattamento (età media: 41,57; 15,68 anni antecedenti l'uso di cocaina), possedevano i criteri stabiliti medici generali e psichiatrici di inclusione/esclusione del nostro studio precedente PET 0-15 (8), con il criterio aggiuntivo di esclusione fMRI per la presenza di metallo nel corpo e claustrofobia nota. I pazienti stavano in un setting residenziale protetto (comunità diurna) per

7-10 giorni prima della scansione per assicurare uno stato stabilizzato drug-free. Gli ultimi undici di questi soggetti (che non differivano demograficamente dalla prima metà della coorte), parteciparono anche ad una prima unità off-magnet due giorni dopo la scansione per determinare la valenza affettiva delle stimolazioni per la cocaina quando visibili.

**Coorte Off-magnet per testare l'efficacia dei paradigmi di mascheramento retroattivo.** Altri 12 cocainomani appartenenti allo stesso setting residenziale di terapia sono stati accoppiati per similitudini demografiche (età, anni d'uso di cocaina, anni di studio; vedi Metodi) alla coorte dell'imaging. Questi pazienti hanno partecipato al test senza scansione per validare i parametri backward-masking usati nel setting dell'imaging.

**Consenso informato/approvazione soggetti umani.** Le procedure riportate per i soggetti umani sono state completamente approvate dall'Office of Human Research (OHR) dell'Università della Pennsylvania. Tutti i soggetti fornirono consenso informato scritto prima della partecipazione.

## Procedure

**Selezione degli stimoli.** I 24 stimoli per la cocaina e stimoli neutri sono stati selezionati dal nostro archivio di laboratorio di immagini per sostanze e non. Per gli stimoli sessuali e per gli stimoli di avversione abbiamo selezionato gli estremi di immagini affettive positive (piacevole) e negative (spiacevole) dal Sistema di Immagini Affettive Internazionale, IAPS (19); sostituendo immagini di nudi maschili solitari con immagini erotiche di coppie dal nostro archivio. Gli stimoli nulli erano semplicemente schermi grigi con una piccola croce nera sovrapposta.

**Presenza di paura, rabbia, sguardo fisso e lineamenti facciali negli stimoli selezionati dello studio.** Dal momento che l'amigdala può mostrare risposte preferenziali a diversi tipi di stimoli sopraggiunti (es. rabbia (6), paura (21), minaccia (2,5), "sguardo attonito" associato con espressione emozionale (22) e anche facce con espressione neutra (23), abbiamo monitorato gli stimoli del nostro studio per le caratteristiche che potrebbero complicare l'interpretazione dei risultati per gli stimoli legati alle sostanze e per gli stimoli sessuali. Il peggior stimolo dello IAPS era caratterizzato da un grave incidente, morto, persone e animali ammalati, piuttosto che espressioni facciali dirette di rabbia o paura. Cinque stimoli avversi e cinque stimoli sessuali coinvolgevano uno sguardo frontale diretto (sebbene non di rabbia o di paura); nessuno degli stimoli per la cocaina coinvolgeva uno sguardo frontale o un'espressione di rabbia/paura. Le facce erano rappresentate nel 52,4% degli stimoli aversivi (sebbene molte facce erano di individui non più vivi), nel 91,7% degli stimoli sessuali (sebbene le facce fossero raramente il centro dell'attività rappresentata), e

il 37,5% degli stimoli per la cocaina. I volti non sono stati usati negli obiettivi neutri e mascherati; questi stimoli erano caratterizzati semplicemente da oggetti di casa/ufficio, esterni e scene all'aperto.

**Backward masking task** Seguendo gli scan anatomici e localizzati, i soggetti furono istruiti a vedere una serie di brevi stimoli correlati ad immagini. Abbiamo utilizzato un progetto veloce evento correlato (24,25) per presentare in ordine randomizzato "jittered" (24) 24 immagini uniche dalle 4 categorie di stimoli target: cocaina, sesso, aversivi e neutri, con interposti stimoli nulli. Un proiettore da computer Epson LCD utilizzava un software EPrime per presentare gli stimoli su uno schermo bianco translucido 28 1/2" x 28 1/2" (12" x 20") dietro lo scanner; i contenuti dello schermo erano riflessi su uno specchio 6 1/2" x 3 1/2" posizionato proprio sopra gli occhi del soggetto.

I contrasti di attivazione erano basati sulla presentazione dei primi 120 stimoli per minimizzare il contributo dell'abitudine, del reclutamento, e gli effetti recentemente documentati del "carry over" che si possono presentare con stimoli emozionali presentati rapidamente (Yin Li, et al. Comunicazione Personale dell'abstract presentato al College sui problemi della Dipendenza da Farmaci, Scottsdale, AZ, 2006); le analisi correlazionali presentate erano basate su tutte le 240 presentazioni.

**Durata del target nel backward-masking task** Gli stimoli target duravano 33 msec (in realtà variava tra 33-34 msec, a causa del tasso di refresh dello schermo del computer). Ogni bersaglio era immediatamente seguito da un mascheramento neutrale di 467-466 msec, per un totale di 500 msec di stimoli visivi. Selezionando 33 msec per la durata del bersaglio, eravamo guidati dal range di durata degli stimoli in diversi studi di imaging più precoci dimostranti l'effettivo backward-masking degli stimoli con valenza affettiva. L'effettivo masking visivo è stato visto con bersagli di 33 msec di volti felici o terrorizzati (4,6), 30 msec di bersagli di volti arrabbiati (5,21) e 20 msec bersagli di volti felici o tristi (26,27), o stimoli combat/non-combat (28). A durate del bersaglio di 40 msec o più a lungo, alcuni soggetti hanno iniziato a riconoscere visivamente i bersagli (volti pieni di paura o felici) (29); stimoli combat/non-combat (28) a livelli sopra la possibilità. Poiché la masking efficacia dipende non solo dalla durata del bersaglio, ma può anche dipendere da altre variabili (caratteristiche qualitative di entrambi i target e le maschere, l'insorgenza asincrona dello stimolo etc.), abbiamo condotto anche una valutazione esplicita (descritta più avanti) per determinare l'efficacia dei nostri parametri di backward-masking.

**Valutazione del richiamo e riconoscimento del target mascherato retroattivo** I tipi di unità di riconoscimento utilizzati nei paradigmi di "percezione non cosciente" sono variati in relazione al contesto sperimentale (se il soggetto deve essere consapevole o inconsapevole

delle categorie esaminate del target), obiettivo degli esperimenti (se il focus è la detezione dell'oggetto alla soglia di consapevolezza o la piena identificazione dell'oggetto e l'interesse teorico dei ricercatori (vedi 30-34).

Nei compiti di richiamo immediato, ai soggetti può essere chiesto di descrivere cosa hanno appena visto durante il compito immediatamente precedente, per rilevare le immagini viste vs le non viste all'interno di un set (come in Whalen, et al. 1998) (6), o per designare gli item presentati individualmente come visti o non-visti. L'aggiunta di stimoli distraenti ai visti vs i non-visti all'immediato compito di richiamo permette una stima addizionale dell'unità di reclutamento (i distraenti dovrebbero essere consistentemente classificati come non-visti se il soggetto ha prestato adeguata attenzione) e la possibile detenzione dei set di risposta (certificando una particolare categoria di distattori a target come "visti").

Sebbene rispondendo a livelli di possibilità (o sotto) a un compito di richiamo immediato corrisponde all'esperienza soggettiva dei partecipanti che i bersagli mascherati non sono stati visti, la performance al compito è infatti dipendente non solo sul riconoscimento in sé ma anche sulla memoria (anche se il compito di richiamo è proposto solo qualche minuto più tardi).

La performance a livello della possibilità o sotto può riflettere scarsa memoria per i target; le richieste di memoria sono anche maggiori quando il numero dei bersagli è grande e i gli oggetti in una categoria presentano alcune similitudini (come nel presente studio).

Per evitare il potenziale confondente delle richieste di memoria, si può usare un compito di riconoscimento categoriale a scelta forzata, seguendo immediatamente ogni singolo target. Questo compito sarà sensibile a ogni informazione che può aiutare il soggetto a differenziare i target. La categorizzazione degli stimoli bersaglio a livello o al di sotto dei livelli di probabilità considerando la quota di falsi positivi, fornisce una forte evidenza che gli stimoli target sfuggivano al riconoscimento, e pertanto potevano essere considerati "non visti" (al di fuori della consapevolezza).

Nel nostro studio abbiamo utilizzato sia il richiamo immediato che un compito di riconoscimento categoriale a scelta forzata per stabilire l'efficacia dei paradigmi di mascheramento retrogrado. Un compito di richiamo immediato è stato eseguito per ogni soggetto sottoposto a scan magnetico. Subito dopo essere stati sottoposti al compito di mascheramento retroattivo, ai soggetti in risonanza magnetica furono presentate serie sequenziali di stimoli di 2,5 sec (5 per ogni categoria di bersaglio, oltre a distrattori mai visti in precedenza) e fu loro chiesto: "per favore mi dica se ha visto o no ogni immagine (nel compito immediatamente precedente)". Questa unità indagava un sottoinsieme di cinque target per ciascuna categoria, con un egual numero di stimoli distraenti.

Abbiamo anche testato il riconoscimento dei nostri stimoli mascherati retroattivamente di 33 msec in un

compito di riconoscimento categoriale a scelta forzata, indagando l'intero set di 96 stimoli bersaglio (24 in ognuna delle 4 categorie). Il compito di riconoscimento categoriale a scelta forzata è stato fatto senza risonanza magnetica, in un campione di 12 controlli di pazienti cocainomani appaiati demograficamente (vedi Risultati supplementari nel Testo S1) della stessa area residenziale della coorte sottoposta a scan. Questa conferma senza risonanza ci ha permesso di condurre un test indipendente, rigoroso per l'efficacia della nostra procedura di backward-masking, senza influenzare la caratteristica critica del progetto dell'esperimento di *imaging* per determinare la risposta dell'encefalo ad un flusso continuo di stimoli durante la visione naturale, passiva, senza le interruzioni e il potenziale confondente delle preoccupazioni per il compito di richiesta/prestazione. Sia i bersagli che i mascheramenti retroattivi erano esattamente uguali (numero, durata e contenuti) come nel caso della risonanza magnetica. Gli stimoli venivano presentati su uno schermo (15") di un computer portatile posizionato ad un'altezza approssimativa di 30 inches dalla testa del soggetto.

Per introdurre il compito richiesto, ai soggetti veniva detto che il loro lavoro consisteva nel categorizzare molto brevemente le immagini immediatamente seguite dalle immagini che sarebbero rimaste attive più a lungo sullo schermo. Ai soggetti fu spiegato che le immagini brevi sarebbero state prese da 4 categorie (neutrali, sessuali, relative a cocaina, e sgradevoli), con un egual numero di immagini per ogni categoria. ("...per es. le immagini sgradevoli potevano includere immagini di guerra, di traumi, incidenti, malattie o morte..."). Ai soggetti venne detto che avrebbero avuto 2,5 sec. per effettuare la loro scelta, e avrebbero dovuto effettuare la loro miglior ipotesi per categorizzare le immagini molto brevi, anche se non fossero stati certi della categoria. Le quattro categorie di scelta apparivano come una fila di 4 parole (a grandi caratteri, con cornice) nel mezzo dello schermo che seguivano ogni coppia di mascheramenti retroattivi, e rimanevano sullo schermo per 2,5 sec. o fino a che la scelta veniva effettuata. I soggetti effettuavano la loro selezione premendo uno dei quattro bottoni sopra una tastiera di risposta; ogni bottone era chiaramente etichettato con una delle 4 categorie di target. Dopo 2 prove (per familiarizzare con i bottoni), tutta la serie di 96 bersagli backward-masked, sono stati presentati per la categorizzazione. Alla fine del lavoro, i soggetti furono fatti esprimere sulla loro esperienza soggettiva durante l'azione, incluso se avevano visto uno o più dei bersagli brevi.

**Compito di priming affettivo (eseguito senza risonanza magnetica, 2 giorni dopo il compito di riconoscimento categoriale a scelta forzata con la risonanza magnetica).**

Questo compito, adattato da Fazio (35), determinava la valenza affettiva dei nostri target misurando la loro

abilità nel facilitare (come misurato mediante tempo di reazione, RT), o "indirizzare" la corretta identificazione della congrua sensazione dei nomi presentati immediatamente dopo il target. I paradigmi con valenza affettiva positiva facilitano la corretta identificazione dei nomi con valenza positiva (es. gioia, paradiso), e rallentano la corretta identificazione dei nomi con valenza negativa (es. vomito, assassinio). I paradigmi con valenza affettiva negativa hanno un effetto opposto.

Per ogni soggetto, un punteggio quantitativo di "errore affettivo" che riflette la valenza era stato calcolato per ogni immagine di categoria di stimolo, filtrato per risposta corretta ( $\text{meanRT (NEGword-trials)} - \text{meanRT (PO-Sword-trials)}$ ) = Mean Affective-Bias score per la categoria di stimolo). Con questa formula, i punteggi sul tempo di reazione positiva (msec) riflettono relativamente un errore affettivo positivo maggiore; i punteggi sul tempo di reazione negativa riflettono relativamente un errore affettivo negativo maggiore. Le immagini per il lavoro sull'errore affettivo senza risonanza magnetica erano un sottoinsieme selezionato in maniera randomizzata da quelle usate negli esperimenti fMRI; 12 immagini per ogni categoria, per un totale di 48 prototipi.

#### Acquisizione delle immagini e analisi

**Parametri di acquisizione dell'immagine.** Uno scanner Siemens 3T è stato usato per acquisire le immagini pesate T2\*- dipendenti dal livello di ossigeno del sangue (BOLD) con single shot gradiente echo (GRE) echo planar imaging (EPI) sequenza (campo o vista (FOV)=192 mm, matrice 64X64, TR=2 sec, TE=30 msec, angolo flip=80°).

**Pre-processamento dell'immagine e analisi statistica.** Dopo correzione "slice-timing" delle immagini, è stato utilizzato SPM2 (36) per il riallineamento dell'immagine, smoothing con 3-D 9 mm kernel isotropico gaussiano, e normalizzazione su template MNI dell'Istituto Neurologico di Montreal basato su immagini strutturali MR da 152 cervelli. Il modello generale lineare (GLI) con un HRF quale funzione di base è stato usato per i tre contrasti pre-programmati (cocaina vs neutrale, sesso vs neutrale, sgradevole vs neutrale) a livello individuale e di gruppo. Per l'analisi di correlazione, sono stati usati i punteggi di errore affettivo dal compito affettivo con i prototipi senza risonanza magnetica come covariate in una regressione semplice (es. cocaina vs contrasto neutrale). Contrast e correlazioni furono mostrate con

MRIcro, usando il template a singolo soggetto da MNI strutturale in t1 ("Colin brain template").

**Approccio analitico e costruzione di mappe parametriche statistiche.** A causa della vicinanza e della natura strettamente interconnessa di molti nodi del sistema di gratificazione (vedi commenti anatomici supplementari, che seguono i risultati supplementari nel testo S1) e la caratteristica limitazione di risoluzione spaziale associata con una informità di dati in uno spazio 3-D, abbiamo scelto un'analisi basata su voxel, che ci ha permesso di caratterizzare gli effetti che si potrebbero verificare al confine di due regioni interconnesse a priori (es. amigdala e pallido/striato ventrale).

Abbiamo utilizzato un gran numero di articoli precedentemente pubblicati che descrivono il circuito interconnesso attivato da stimoli gratificatori (12) (vedi commenti anatomici supplementari, nel testo S1) per limitare le nostre ipotesi e interpretazioni a regioni di forte interesse. Siamo stati sul punto di configurare le mappe statistiche a  $t=2,0$  (altezza),  $k=10$  voxel contigui (estensione) sia per i contrasti dell'"effetto di gruppo" es. stimoli per la cocaina verso stimoli neutrali) e per le analisi correlazionali per esaminare il significato della variazione individuale della risposta cerebrale a stimoli non visti. I valori calcolati della  $p$  ( $<0,029$  e  $0,038$ , rispettivamente) associati con questa soglia selezionata sono qualcosa di più preciso, ma nel range, della  $p<0,05$ , limite non corretto utilizzato negli studi di imaging con forti regioni di interesse a priori. È degno di nota che il picco dei valori  $t$ , specialmente per l'analisi correlazionale, eccedeva ampiamente la soglia di  $t=2,0$ : come mostrato nella figura 2, C e D, le differenze individuali nella risposta del cervello agli stimoli non visti per la cocaina (gruppo pallido/amigdala) predicevano il più tardivo affetto alle versioni visibili di questi stimoli con picco valore  $t=7,11$ ;  $p<0,000$  non corretto;  $p<0,015$  corretto per gruppo.

I valori di picco  $t$  per gli effetti correlazionali agli stimoli non visti per la cocaina erano generalmente più alti rispetto ai valori picco per effetti di attivazione di gruppo, sottolineando la forte variazione individuale nella risposta del cervello agli stimoli non visti. La variazione individuale era anche prevalente nella risposta agli stimoli comparati sgradevoli (vedi fig S1 nei Materiali di Supporto). Una caratteristica potente del nostro paradigma era l'incorporazione dei punteggi di errore affettivi come regressori per l'analisi delle immagini, permettendoci di testare per il significato funzionale della variabilità individuale in risposta agli stimoli non visti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Freud (1900) *The Interpretation of Dreams*. (1913) Brill AA, translator. New York: MacMillan.
2. Ohman A (2005) The role of the amygdala in human fear: automatic detection of threat. *Psychoneuroendocrinology* 30: 953–958.
3. Whalen PJ, Kagan J, Cook RG, Davis FC, Kim H, et al. (2004) Human amygdala responsivity to masked fearful eye whites. *Science* 306: 2061.
4. Rauch SL, Whalen PJ, Shin LM, McInerney SC, Macklin ML, et al. (2000) Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in post-traumatic stress disorder: a functional MRI study. *Biol Psychiatry* 47: 769–776.
5. Morris JS, Ohman A, Dolan RJ (1998) Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. *Nature* 393: 467–470.
6. Whalen PJ, Rauch SL, Etcoff NL, McInerney SC, Lee MB, et al. (1998) Masked presentations of emotional facial expressions modulate amygdala activity without explicit knowledge. *J Neurosci* 18: 411–418.
7. Darwin C (1876) Sexual selection in relation to monkeys. *Nature* 15: 18–19.
8. Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, et al. (1999) Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *American Journal of Psychiatry* 156: 11–18.
9. Childress AR, Franklin TR, Listerud J, Acton PD, O'Brien CP (2002) Neuroimaging of cocaine craving states: cessation, stimulant administration, and drug cue paradigms. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, eds. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Philadelphia. pp 1575–1590.
10. Karama S, Lecours AR, Leroux JM, Bourgoin P, Beaudoin G, et al. (2002) Areas of brain activation in males and females during viewing of erotic film excerpts. *Hum Brain Mapp* 16: 1–13.
11. Hamann S, Herman RA, Nolan CL, Wallen K (2004) Men and women differ in amygdala response to visual sexual stimuli. *Nat Neurosci* 7: 411–416.
12. McClure SM, York MK, Montague PR (2004) The neural substrates of reward processing in humans: the modern role of fMRI. *Neuroscientist* 10: 260–268.
13. Garavan H, Pendergrass JC, Ross TJ, Stein EA, Risinger RC (2001) Amygdala response to both positively and negatively valenced stimuli. *Neuroreport* 12: 2779–2783.
14. Hamann SB, Ely TD, Hoffman JM, Kilts CD (2002) Ecstasy and agony: activation of the human amygdala in positive and negative emotion. *Psychol Sci* 13: 135–141.
15. Everitt BJ, Cardinal RN, Parkinson JA, Robbins TW (2003) Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann NY Acad Sci* 985: 233–250.
16. Pavlov IP (1927) *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. Anrep GV, translator and editor. London: University Press.
17. Ehrman RN, Robbins SJ, Childress AR, O'Brien CP (1992) Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. *Psychopharmacology (Berl)* 107: 523–529.
18. Garavan H, Pankiewicz J, Bloom A, Cho JK, Sperry L, et al. (2000) Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. *Am J Psychiatry* 157: 1789–1798.
19. Lang PJ, Ohman A, Vaitl D (1988) *The International Affective Picture System*. Gainesville, Florida: University of Florida.
20. Pessiglione M, Schmidt L, Draganski B, Kalisch R, Lau H, et al. (2007) How the brain translates money into force: a neuroimaging study of subliminal motivation. *Science* 316: 904–906.
21. Morris JS, Ohman A, Dolan RJ (1999) A subcortical pathway to the right amygdala mediating “unseen” fear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1680–1685.
22. Adams RB Jr, Gordon HL, Baird AA, Ambady N, Kleck RE (2003) Effects of gaze on amygdala sensitivity to anger and fear faces. *Science* 300: 1536.
23. Wright P, Liu Y (2006) Neutral faces activate the amygdala during identity matching. *Neuroimage* 29: 628–636.
24. Dale AM (1999) Optimal experimental design for event-related fMRI. *Hum Brain Mapp* 8: 109–114.
25. Greve D (2002) *OptSeq*. Boston, Massachusetts: Harvard University (Mass General).
26. Killgore WD, Yurgelun-Todd DA (2001) Sex differences in amygdala activation during the perception of facial affect. *Neuroreport* 12: 2543–2547.
27. Killgore WD, Yurgelun-Todd DA (2004) Activation of the amygdala and anterior cingulate during nonconscious processing of sad versus happy faces. *Neuroimage* 21: 1215–1223.
28. Hendler T, Rotshtein P, Yeshurun Y, Weizmann T, Kahn I, et al. (2003) Sensing the invisible: differential sensitivity of visual cortex and amygdala to traumatic context. *Neuroimage* 19: 587–600.
29. Sheline YI, Barch DM, Donnelly JM, Ollinger JM, Snyder AZ, et al. (2001) Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. *Biol Psychiatry* 50: 651–658.
30. Merikle PM, Smilek D, Eastwood JD (2001) Perception without awareness: perspectives from cognitive psychology. *Cognition* 79: 115–134.
31. Holender D, Duscherer K (2004) Unconscious perception: the need for a paradigm shift. *Percept Psychophys* 66: 872–881; discussion 888–895.
32. Overgaard M, Rote J, Mouridsen K, Ramsøy TZ (2006) Is conscious perception gradual or dichotomous? A comparison of report methodologies during a visual task. *Conscious Cogn* 15: 700–708.
33. Greenwald AG, Draine SC, Abrams RL (1996) Three cognitive markers of unconscious semantic activation. *Science* 273: 1699–1702.
34. Murphy ST, Zajonc RB (1993) Affect, cognition, and awareness: affective priming with optimal and suboptimal stimulus exposures. *J Pers Soc Psychol* 64: 723–739.
35. Fazio RH, Jackson JR, Dunton BC, Williams CJ (1995) Variability in automatic activation as an unobtrusive measure of racial attitudes: a bona fide pipeline? *J Pers Soc Psychol* 69: 1013–1027.
36. SPM 2 (2002) Wellcome Department of Imaging Neuroscience. London, UK, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>.