



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

SCIENZE E TECNOLOGIE FARMACEUTICHE

Ciclo XXVII

Analisi dell'espressione della fosfoERK quale strumento di indagine per la caratterizzazione della sensibilità alle sostanze d'abuso in linee di ratti geneticamente selezionati

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO14/FARMACOLOGIA

Presentata da Dott.ssa Michela Rosas

Coordinatore Dottorato Prof. Elias Maccioni

Relatore Prof. Elio Acquas

Esame finale anno accademico 2013 – 2014

INDICE

<i>Abstract</i>pag 1
<i>Introduzione</i>	
➤ <i>Il cervello emotivo: anatomia del sistema limbico</i>pag 5
La corteccia prefrontale (PFCx)pag 7
Il nucleus accumbens (Acb)pag 9
➤ <i>La pathway delle ERK</i>pag 12
ERK e Tossicodipendenza (drug addiction)pag 15
ERK e comportamenti correlati alla tossicodipendenza (addiction-related behaviors)pag 17
ERK e morfinapag 19
ERK ed etanolopag 23
ERK e cocainapag 26
➤ <i>Selezione genetica e drug addiction</i>pag 29
Ratti Sardinian alcohol-preferring (sP) e -non-preferring (sNP)pag 30
Ratti Roman High (RHA) e Low- (RLA) avoidancepag 32
<i>Scopo dello studio</i>pag 37
<i>Materiali e Metodi</i>pag 41
<i>Risultati</i>pag 47
<i>Figure</i>pag 54
<i>Discussione</i>pag 69
<i>Bibliografia</i>pag 84

ABSTRACT

Clinical studies indicate that genetically determined personality traits, such as sensation seeking and impulsivity, are associated with increased drug addiction liability. Thus, in spite of the fact that for instance a prolonged ethanol exposure is an essential precondition to develop the disease, genetic factors account for about 50-60% of the risk of developing alcoholism. These observations have stimulated the use of selected strains and lines of rodents as models to investigate genetically determined differences in behavioral and neurochemical traits related to addictive disorders. Among those, the Roman high (RHA)- and low (RLA)-avoidance rats are selectively bred for rapid vs poor acquisition of active avoidance, respectively, and differ markedly in emotional reactivity, coping style, and behavioral and neurochemical responses to a number of drugs of abuse such as morphine, ethanol and psychostimulants. On the other hand, one of the most efficacious approaches to model several aspects of alcoholism is represented by the use of rat lines selectively bred for high ethanol preference or excessive ethanol drinking that represent well-suited experimental models to investigate the biological bases of alcoholism by virtue of their predictive, face, and construct validity. In particular, Sardinian alcohol-preferring (sP) rats constitute one of these rat lines selectively bred for excessive ethanol intake. Thus, when given a choice between 10% (v/v) ethanol and water, under the standard, home cage 2-bottle regimen, with unlimited access for 24 h/day, sP rats display a clear preference for the ethanol solution and daily consume 6 to 7 g/kg of pure ethanol.

Among the kinases and transcription factors that have been deeply investigated in the recent years for their involvement in the molecular basis of addiction, the extracellular signal-regulated kinase (ERK) occupies a strategic position, both at the cytoplasmic and nuclear level. In fact, activation of ERK is critical for memory formation and consolidation in different tasks such as conditioned taste aversion and fear conditioning, but it also appears critical in synaptic plasticity, as well as in synapse formation and function. Activation of ERK is also critical for long-term potentiation, a phenomenon of long-lasting synaptic plasticity that allows the characterization of the role of transduction molecules in the processes of learning and formation of long-term memories. In addition, in mature neurons, activation of ERK is involved in the mechanism of action of addictive drugs and its expression in dopamine-rich terminal areas plays a critical role in several of their psychopharmacological effects, including their ability to sustain acquisition of conditioned place preference. However, some

controversial findings still remain on the effects of morphine on ERK phosphorylation in the nucleus accumbens. Similarly, the issue of genetically determined differences among pairs of rat lines selectively bred for rapid vs slow acquisition of active avoidance (RHA vs RLA) and for high vs poor ethanol preference or excessive ethanol drinking (sP vs sNP) has never been systematically investigated. Hence, in order to gain insights on the differential sensitivity in terms of activated ERK in brain structures of the mesolimbic system and extended amygdala of such rat lines, the present study was devoted to investigate these issues by assessing the ability of morphine to activate ERK phosphorylation in the shell (AcbSh) and core (AcbC) of the nucleus accumbens (Acb) of Roman RHA and RLA, Sprague-Dawley and Wistar rats as well as in CD-1 mice and C57BL6J mice. This study was also aimed at comparing the effects of acute cocaine administration in Roman rats, and of ethanol administration in sP vs sNP rats, on ERK phosphorylation in Acb, prelimbic (PrL) and infralimbic (IL) prefrontal cortex (PFCx) and nuclei of the extended amygdala (BSTL, CeA and BLA).

The results of these experiments demonstrate 1) that morphine significantly decreased Acb pERK expression, as determined by counting the number of pERK positive cells/area, in RLA, Sprague-Dawley and Wistar rats, 2) failed to either decrease or increase this measure in Acb of RHA rats and 3) significantly increased pERK expression in both CD-1 and C57BL6J mice. Ethanol (1 g/kg) significantly increased pERK immunoreactivity in AcbSh and AcbC of sP but not sNP rats. Conversely, ethanol failed to affect pERK expression in PrL and IL PFCx as well as in BSTL and CeA of both sP and sNP rats. In RHA but not RLA rats, cocaine (5 mg/kg) increased pERK in the IL PFCx and AcbSh, two areas involved in its acute effects, but did not modify pERK in the PrL PFCx and AcbC, which mediate the chronic effects of cocaine.

These findings suggest that the lack of stimulation of pERK expression observed in RHA rats after morphine administration may be of considerable importance and significance, given the enhanced responsiveness of these animals to the neurochemical and behavioral effects of morphine; these findings also confirm previously reported differential effects of morphine on ERK phosphorylation in the Acb of rats vs mice and call for further experiments to elucidate the significance of the property of morphine to either increase and decrease pERK expression in rodents' AcbSh and AcbC. The results also show that ethanol activated ERK differentially in Acb and PFCx of sP and sNP rats and indicate that selective breeding of these rat lines resulted in a double dissociation of the effects of acute ethanol on ERK

phosphorylation in brain regions critical for ethanol's psychopharmacological effects. Furthermore, these results extend to pERK expression previous findings on the greater sensitivity to acute cocaine of RHA vs RLA rats and confirm the notion that genetic factors influence the differential responses to addictive drugs. In conclusion, these findings support the view that the genetically selected rat lines represent a valid model to investigate the neural basis of the individual vulnerability to drug addiction and that pERK phosphorylation in nuclei of extended amygdala represents a valuable dynamic marker of drug-induced neuronal activation .

INTRODUZIONE

Il cervello emotivo: anatomia del sistema limbico

Le emozioni possono essere definite come un gruppo di correlate funzioni cerebrali superiori, risultanti da condizioni di ricompensa e/o punizione (LeDoux 1987; Rolls 2001). Secondo LeDoux, uno dei più autorevoli studiosi contemporanei di neurobiologia, si tratta di funzioni biologiche che si sono evolute per permettere agli esseri viventi di sopravvivere in un ambiente ostile e di riprodursi. E' infatti l'uomo stesso a strutturare le circostanze al fine di trarne piacere e gioia, evitando le situazioni che possano portare a delusioni, tristezza o dolore. L'eccitazione emotiva esercita potenti influenze sui processi di elaborazione cognitiva. L'attenzione, la percezione, la memoria e i processi decisionali sono condizioni dominate da stati emotivi: contesti gratificanti rafforzano le reazioni volte alla ricerca di un risultato favorevole che porti soddisfazione, comfort e benessere, così come, in linea di principio, il profilarsi di eventuali punizioni o conseguenze negative induce alla fuga o all'evitamento di determinate situazioni (LeDoux 1987). Numerosi studi nel campo delle neuroscienze affettive hanno delineato i circuiti neuronali che comprendono strutture corticali e sottocorticali e che sono responsabili della generazione delle emozioni umane. Ad oggi, infatti, è accertato che le aree che contribuiscono a tali funzioni cognitive includono la corteccia prefrontale, l'amigdala, la corteccia cingolata anteriore, l'ippocampo, e l'insula, aree che nel complesso vanno a costituire quello che viene comunemente definito "sistema limbico".

Il sistema limbico è costituito dal *filogeneticamente antico* lobo limbico e da altre strutture sottocorticali e dalle loro connessioni. Il termine "limbico" venne utilizzato per la prima volta dall'anatomista francese Paul Broca nel 1878 (*le grand lobe limbique*, dal termine latino *limbus*), per identificare la cresta curva della corteccia che include i giri cingolato e paraippocampale. Il lobo limbico situato nel lato inferomediale degli emisferi cerebrali, consiste di due giri concentrici che circondano il corpo calloso. Broca denominò il giro esterno, più grande, "limbic gyrus" mentre quello interno, più piccolo, "intralimbic gyrus"; il primo costituito dall'istmo del giro cingolato, dal giro ippocampale e dall'area sottocallosa, il secondo dorsale rispetto al corpo calloso e strettamente interconnesso con le aree associative della corteccia prefrontale.

La funzione del lobo limbico nelle emozioni venne elaborata successivamente nel 1937 dall'anatomista americano James Papez, nel suo fondamentale scritto "A proposed mechanism

of emotion", il cui modello anatomico descritto viene ancora ad oggi definito "circuito di Papez" (l'asse corteccia cerebrale-ipotalamo-talamo-corteccia) (Papez 1937).

Nel 1948 Yakovlev propose un altro modello di circuito coinvolto nel controllo delle emozioni che coinvolgeva la corteccia orbito-frontale, quella insulare, il lobo temporale anteriore della corteccia, l'amigdala e il nucleo dorsomediale del talamo (Yakovlev 1948).

Successivamente, nel 1952, fu Paul D. MacLean a coniare il termine "sistema limbico" per descrivere la correlazione anatomica esistente tra il lobo limbico di Broca e i nuclei sottocorticali, definendo così il substrato neuronale dell'emozione (Maclean 1952).

Anatomicamente le strutture che compongono il sistema limbico si trovano localizzate in differenti zone degli emisferi cerebrali, ovvero nel telencefalo, nel diencefalo e nel mesencefalo. Da un punto di vista morfologico è possibile distinguere il sistema limbico in due definite aree, le *aree paralimbiche* (costituite da mesocorteccia, ossia una corteccia "di transizione" meno complessa e differenziata della corteccia granulare dell'isocorteccia), e le *aree limbiche* propriamente dette (Mesulam 2000), costituite da allocorteccia e corteccia corticoide.

Le *aree paralimbiche* (aree corticali), formano il classico *limbus* (secondo il concetto di Broca) e comprendono il complesso del cingolo (che include l'area retrospleniale, il giro del cingolo e l'area poliolfattoria), il giro ippocampale (che include le aree entorinale, prorinale e peririnale e il subicolo), il polo temporale, l'insula e la corteccia orbito-frontale caudale. Le *aree limbiche* (aree sottocorticali), sono costituite dall'amigdala, dalla formazione dell'ippocampo, dalla corteccia olfattoria primaria, dal setto e dalla sostanza innominata. A livello del mesencefalo sono localizzate altre strutture del sistema limbico quali alcuni nuclei del tronco encefalico contenenti neurotrasmettitori monoaminergici che proiettano al sistema limbico e che costituiscono il sistema mesolimbico-corticale. L'ipotalamo, essendo interconnesso con tutte le strutture limbiche, svolge un importante ruolo di coordinazione di molte delle attività del sistema limbico; l'interconnessione tra tali strutture in aggiunta alle connessioni stabilite tra le diverse strutture del sistema limbico crea una fitta rete di circuiti neuronali. Il sistema mesolimbico (vie DAergiche mesolimbiche) costituito da nuclei DAergici che hanno origine principalmente a livello dell'area A10 mesencefalica (area ventrale tegmentale, VTA) e nella parte mediale dell'area A9 (substantia nigra SN), innerva il nucleus accumbens (Acb), il tubercolo olfattorio e il nucleo interstiziale della stria terminalis, tutte strutture

appartenenti al sistema limbico, la cui primaria funzione risiede nella modulazione del comportamento emotivo.

Dall'area A10 si originano altre fibre che innervano il setto (soprattutto il nucleo del setto laterale) l'ippocampo, l'amigdala, la corteccia entorinale, la corteccia prefrontale, la corteccia peririnale e quella piriforme (*sistema mesolimbocorticale*).

La corteccia prefrontale (PFCx)

La PFCx occupa la parte più rostrale del lobo frontale e rappresenta una struttura di tipo neocorticale. È composta principalmente da porzioni ventrolaterale, dorsolaterale, orbitofrontale e mediale.

La PFCx è collegata in maniera bidirezionale con talamo, ipotalamo, subtalamo, mesencefalo e sistema limbico, e tramite vie transcorticali con le aree somatiche visive e uditive. Le uniche proiezioni efferenti sono rivolte ai gangli della base e alle altre strutture subcorticali implicate nel controllo del movimento. Comprende diverse aree corticali, le quali differiscono tra loro per dimensione, densità e disposizione neuronale. Data la sua localizzazione e l'intenso network di collegamenti, la PFCx può essere considerata come un centro integrativo di messaggi provenienti dalle principali aree funzionali cerebrali, invia infatti fibre ad ogni struttura cerebrale da cui riceve, creando dei circuiti essenziali nel controllo cognitivo, così come nei processi esecutivi che coinvolgono la motivazione, l'emozione, l'apprendimento e la memoria (Robbins 2000a; Öngür & Price 2000; Miller & Cohen 2001; Dalley et al., 2004).

La PFCx è in grado di integrare informazioni sensoriali e limbiche e promuovere comportamenti finalizzati mediante le efferenze al Acb (Robbins & Everitt 1996); è innervata da assoni DAergici che originano nella VTA e nella substantia nigra pars compacta (SNc) (Levitt et al 1984) che ne modulano le funzioni tramite i recettori DAergici D₁ e D₂. La porzione mediale della PFCx è costituita dalla corteccia anteriore cingolata, dall'area prelimbica nella parte inferiore, e dall'area infralimbica, ventralmente. La corteccia infralimbica proietta alla shell del Acb (AcbSh), mentre la prelimbica proietta al core del Acb e alla porzione mediale del nucleo caudato (Öngür & Price 2000); inoltre, la corteccia prelimbica proietta principalmente all'amigdala basale, mentre la infralimbica proietta preferenzialmente alle aree contenenti neuroni GABA, ovvero alla suddivisione laterale del

nucleo centrale dell'amigdala e all'area compresa tra l'amigdala basolaterale e quella centrale (Vertes 2004; Peters 2009).

La PFCx invia efferenze anche ad altre aree limbiche quali l'ippocampo che assieme all'amigdala, modulano l'attività del Acb tramite proiezioni glutamatergiche (Grace 2007; Del Arco & Mora 2009). In virtù di tali connessioni, la PFCx presiede a specifiche funzioni nel controllo cognitivo (Miller & Cohen 2001). I collegamenti afferenti dai gangli della base e dal talamo trasmettono alla corteccia le informazioni riguardanti la rappresentazione interna degli obiettivi e dei mezzi per raggiungerli (Bradshaw 2001; Miller & Cohen 2001), inibendo così rappresentazioni concorrenti. La PFCx è dunque responsabile del mantenimento attivo dei pattern di attività che rappresentano gli obiettivi e che provengono da altre regioni del cervello (Burruss et al 2000; Miller & Cohen 2001). Più semplicemente, la PFCx presiede alla selezione e al mantenimento delle informazioni relative alle attività rilevanti, funzione questa che richiede flessibilità e un certo livello di resistenza a interferenze e distrazioni (Feil et al 2010). Per tale ragione la PFCx comprende il più alto livello gerarchico corticale, responsabile sia della rappresentazione che della attuazione delle azioni (Bradshaw 2001). È noto che la PFCx è coinvolta nella mediazione degli effetti gratificanti primari degli stimoli rinforzanti, incluse le sostanze d'abuso (Tzschentke 2000). Studi di brain imaging sull'uomo hanno evidenziato il coinvolgimento della PFCx nelle sensazioni di desiderio e di ricerca della sostanza suscitate da stimoli ad essa associati nei periodi di astinenza. Si è osservata infatti una persistente riduzione del metabolismo cellulare e del flusso sanguigno a livello della PFCx in soggetti che abusano di oppiacei e psicostimolanti (Bothelo et al 2006; Goldstein & Volkow 2002). Di contro, l'incremento dell'attività metabolica o del flusso sanguigno dell'area dorsale della PFCx si osserva nei tossicodipendenti esposti a stimoli associati al farmaco (Childress 1999; Goldstein & Volkow 2002), riflettendo l'attività neuronale in queste aree durante il desiderio evocato dal segnale associato al farmaco. Questi dati suggeriscono che il desiderio indotto da stimoli associati al farmaco è accompagnato da una iperattività e da una ipofunzione delle porzioni dorsale e ventrale della PFCx mediale, rispettivamente. Nei tossicodipendenti si osserva inoltre un ridotto incentivo all'ottenimento di sostanze naturalmente gratificanti (Goldstein & Volkow 2002), parallelamente ad una diminuita attivazione della PFCx in risposta a tali stimoli (Garavan et al 2000). Nel loro insieme tali processi risulterebbero implicati nella ridotta capacità della PFCx di avviare comportamenti in

risposta a ricompense naturali, nell'aumento della responsività agli stimoli farmaco-associati e nella riduzione del controllo inibitorio nel comportamento di ricerca del farmaco (*drug-seeking*) (Bechara 2005; Kalivas & Volkow 2005).

Tali studi sottolineano pertanto l'importanza di studiare il malfunzionamento adattativo dei neuroni della PFCx, dopo esposizione ad un farmaco, sia a livello cellulare che a livello molecolare.

Il nucleus accumbens (Acb)

Il Acb è una struttura localizzata a livello del proencefalo rostromediale, posta ventrolateralmente rispetto ai nuclei del setto e ventromedialmente rispetto al caudato-putament, e rappresenta la principale componente dello striato ventrale. Il Acb da un punto di vista anatomico-funzionale può essere suddiviso in tre sub-regioni: una regione medioventrale chiamata "*shell*" (AcbSh) con funzioni prettamente limbiche (integrazione delle emozioni e motivazione), una dorsolaterale chiamata "*core*" (AcbC), deputata all'espressione motoria dei comportamenti motivati (Stolerman, 1992; Alheid & Heimer, 1988; Zahm & Brog, 1992; Groenewegen & Russchen, 1984; Heimer et al., 1991b) e una terza definita invece polo rostrale (Heimer et al., 1991 a,b; Jongen-Relo et al., 1994).

Le sue afferenze sono principalmente di natura glutamatergica, originano a livello delle aree limbiche corticali (quali il subicolo della formazione ipocampale, il complesso dell'amigdala basolaterale e le cortecce rinale e prefrontale) e risultano coinvolte negli aspetti cognitivi ed emozionali del comportamento (McGeorge & Faull 1989; Heimer et al., 1995; Parent 1996). Altre importanti afferenze includono nuclei talamici della linea mediana e neuroni DAergici provenienti dalla VTA. Le afferenze del Acb sono indirizzate a diverse aree secondo la subregione da cui esse stesse provengono, infatti dal AcbSh, si originano proiezioni dirette alle aree ipotalamiche laterali, al pallido ventrale, alla regione preottica, alla VTA, al tegmento mesencefalico e al grigio periacqueduttale (Groenewegen 1984; Heimer 1991; Mogenson et al., 1983), ma dirette anche al AcbSh stesso attraverso le robuste collaterali dei suoi neuroni di proiezione spinosi medi (Chang & Kitai 1985).

Sebbene molti assoni sembrano proiettare dal AcbSh fino alle strutture più distali, il relativo declino dell'abbondanza delle proiezioni a distanze crescenti dalla loro origine, suggerisce che

sottoinsiemi di neuroni del Acb possano proiettare esclusivamente a determinate strutture lungo il percorso (Zham 2000).

Le efferenze del AcbC proiettano al pallido ventrale dorsolaterale, alla regione mediale del nucleo subtalamico e alla substantia nigra sia compacta che reticulata (Heimer 1991), tali efferenze passano in piccoli fasci e non mostrano varicosità o collaterali tranne che nelle immediate vicinanze delle strutture che innervano, a differenza delle efferenze del AcbSh, le quali scorrono individualmente e sono punteggiate per tutto il loro corso attraverso il proencefalo, l'ipotalamo laterale e il tronco cerebrale, di varicosità assonali e brevi assoni collaterali (Heimer 1991; Zham 1990).

A livello cellulare, in entrambe le aree sono principalmente presenti (95%) neuroni spinosi medi (MSNs) che agiscono su bersagli a valle tramite un rilascio GABAergico (Cassaday et al., 2005), proiettando in maniera massiccia al pallido ventrale, alla substantia nigra e alla VTA (Chang & Kitai 1985; Kalivas et al., 1993). I neuroni spinosi medi formano inoltre interconnessioni GABAergiche funzionali all'interno del Acb stesso (Taverna et al., 2004) fornendo così un reciproco loop inibitorio al sistema mesolimbico (van Bockstaele & Pickel 1995) e ricevono input glutamatergici dalle aree limbiche quali PFCx, ippocampo e amigdala basolaterale (Brog et al., 2003; Sesack & Grace 2010). La restante componente cellulare è costituita da una sottopopolazione di circuiti colinergici locali ed interneuroni GABAergici (Bennet & Bolam 1994; Zhou et al., 2002).

Da un punto di vista funzionale, il ruolo di tale area è correlato al mantenimento delle funzioni comportamentali essenziali al fine di salvaguardare la sopravvivenza dell'individuo e della specie; queste funzioni possono essere indicate sotto il nome di "motivazione" ovvero l'abilità, esclusiva tra gli organismi viventi, di rispondere agli stimoli in relazione al bisogno individuale e avente il fine ultimo di preservare la specie (Di Chiara, 2002); è noto infatti che il Acb rappresenta una delle principali strutture che presiedono ai meccanismi di incentivo/ricompensa in risposta a stimoli nuovi (Rebec et al., 1997), edonici (Everitt 1990), e forse stressanti o avversivi (Salamone 1994; Goeders & Guerin 1994).

Uno dei ruoli del Acb potrebbe essere quello di aumentare la linea di base dell'attività locomotoria durante la fase anticipatoria che precede la ricompensa attesa, agendo come "base funzionale" in grado di agevolare (od ostacolare) in risposta a stimoli avversivi

l'attuazione di azioni necessarie ad ottenere l'oggetto desiderato o al raggiungimento di uno stato affettivo (Zham 2000).

Data la sua composizione anatomica, è stato proposto (Mogenson 1987), e successivamente elaborato (Everitt & Robbins 1992), il concetto secondo cui il Acb si comporta da sito di integrazione di informazioni limbiche correlate alla memoria, alla motivazione e alla generazione di comportamenti motori finalizzati (integrazione limbico-motoria) (Mogenson & Yang 1991).

All'interno di tale modello, il neurotrasmettitore dopamina (DA) riveste un ruolo cruciale nella modulazione del trasferimento dei segnali neuronali e dunque nell'attuazione dei comportamenti motivati (Cepeda & Levine 1998). La pathway DAergica mesolimbica (neuroni DAergici che dalla VTA proiettano al Acb), svolge un ruolo chiave nei processi neurocognitivi alla base della gratificazione indotta da sostanze (Wise 2009); tutte le sostanze in grado di determinare fenomeni di dipendenza, inducono un aumento dei livelli di DA nel Acb (Koob 1992). Un rinforzo viene operativamente definito come un evento in grado di incrementare le probabilità di una risposta successiva, e le sostanze d'abuso sono considerate rinforzi molto più forti rispetto a quelli naturali (ad esempio sesso e cibo) (Wightman & Robinson 2002).

Studi di brain imaging condotti sugli essere umani, attraverso l'utilizzo della tomografia ad emissione di positroni (PET), hanno mostrato come numerose sostanze quali gli stimolanti (Volkow et al., 1999), la nicotina (Brody et al., 2009), l'alcool (Boileau 2003) e la cannabis (Bossong 2009) aumentano la DA nello striato ventrale e dorsale (ovvero dove si trova localizzato il Acb) in maniera preferenziale nel AcbSh (Di Chiara & Imperato 1988), condizione, quest'ultima, essenziale per la cascata di eventi che esita con l'instaurarsi della dipendenza (addiction) in accordo con la teoria dell'apprendimento associativo (Di Chiara, 2002) secondo cui la stimolazione DAergica nel AcbSh sarebbe in grado di produrre effetti legati all'apprendimento associativo dello stimolo gratificante (Di Chiara and Imperato, 1988a), mentre la stimolazione DAergica nel AcbC sarebbe legata al comportamento motorio legato allo stimolo stesso (Di Chiara et al., 1999).

La pathway delle ERK

Le ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) sono una sottofamiglia delle MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (Derkinderen et al., 1999) caratterizzate dalla presenza di un residuo aminoacidico di Thr-Glu-Tyr nel loop di attivazione e la cui attivazione necessita della fosforilazione di entrambi i residui Thr-Tyr (Girault et al., 2007). La cascata chinasi che culmina con la fosforilazione delle ERK è classicamente attivata da recettori ad attività tirosin chinasi per i fattori di crescita, ma tale ruolo può essere svolto anche da recettori tirosin chinasi per neurotrofine, indicati come recettori Trks, da altri recettori associati a proteine G (fra cui i recettori DAergici) e attraverso l'apertura dei canali al calcio con conseguenti aumenti di calcio intracitoplasmatici.

Il legame del recettore tirosin-chinasi con l'opportuno ligando provoca l'autofosforilazione del recettore ed il suo legame a proteine adattatrici come GRB2 o SOS. Tutto ciò conduce verso l'attivazione della proteina Ras (appartenente alla superfamiglia di proteine ad attività GTPasica, che passa alternativamente da una forma attiva ad una inattiva). Quando si trova nella sua forma inattiva, Ras lega il guanosin-difosfato (GDP); dopo essere stata attivata, la proteina Ras rilascia il GDP per legare il guanosin-trifosfato (GTP). Questo dà inizio ad una cascata di attivazione di chinasi localizzate più a valle, che esita in modificazioni dell'espressione genica. Infatti nella forma attivata, Ras lega anche la proteina Raf, soprattutto Raf-1 e B-Raf, (Kolch et al., 2005), la quale lega e fosforila MEK (ERK chinasi, membro della famiglia delle MAP chinasi) che a sua volta fosforila le ERK in residui di Thr e Tyr.

Le ERK trasferiscono il segnale al nucleo, originando una risposta cellulare immediata o dando luogo a cambiamenti duraturi. Infatti le ERK fosforilate (attive) si dissociano dalle MEK e traslocano dal citoplasma al nucleo, qui regolano l'espressione genica fosforilando in Ser/Thr, sia in modo diretto che indiretto, fattori di trascrizione di geni precoci (Elk-1, cAMP response element binding protein (CREB), c-Myc) (Girault et al., 2007).

La selettività e l'efficienza della reazione enzimatica sono garantite dalla presenza sulle MAPK di determinati residui di attacco (docking sites) (Pouyssègur et al., 2002). Infatti numerose proteine presentano un residuo di Ser-Thr con cui le ERK potenzialmente potrebbero interagire. Studi in merito alla struttura tridimensionale delle ERK hanno permesso di identificare un comune docking site, localizzato al lato opposto dell'avvallamento

contenente il sito catalitico dell'enzima; in tal modo i substrati devono prima staccarsi dal sito catalitico per essere fosforilati, indicando che l'associazione tra i siti chinasici e i docking sites è altamente dinamica (Tanoue et al., 2001). Per assolvere al loro ruolo le ERK migrano nel nucleo per diffusione passiva passando attraverso i pori della membrana nucleare come monomeri o per mezzo di un meccanismo di trasporto attivo, in forma di dimeri (Adachi et al., 1999). L'accumulo nucleare tuttavia necessita dell'induzione, ERK-dipendente, della trascrizione di particolari proteine di ancoraggio che impediscono alle ERK di diffondere nuovamente nel citoplasma (Lenormand et al., 1993).

Le ERK grazie alla loro azione a livello citoplasmatico possono influenzare le risposte adattative a lungo termine anche attraverso altri meccanismi oltre a quelli della trascrizione (Girault et al., 2007). Il segnale mediato dalle ERK si spegne a seguito dell'azione di specifiche fosfatasi la cui azione è proprio quella di defosforilare le ERK attivate. Sono state identificate otto differenti isoforme di ERK e fra queste le ERK₁ (p44) e le ERK₂ (p42) che sono le più studiate e le più note. Nei neuroni le ERK non sono localizzate solo a livello nucleare ma sono distribuite in tutta la cellula, dendriti e assoni inclusi (Fiore et al., 1993; Flood et al., 1998), sono di fondamentale importanza nel controllo della crescita e della differenziazione cellulari e sono inoltre coinvolte nei meccanismi di plasticità (Thomas e Huganir, 2004; Sweatt, 2004). Le ERK₅ sono ampiamente espresse nel cervello e implicate nella differenziazione corticale (Nishimoto & Nishida, 2006), mentre il ruolo delle ERK₃ e delle ERK₈ ad oggi non risulta ancora chiarito (Girault et al., 2007).

Nonostante ERK₁ e ERK₂ abbiano circa il 90% di omologia nella sequenza aminoacidica, sembrano comunque avere differenti proprietà funzionali (Vantaggiato et al., 2006; Mazzucchelli et al., 2002).

Le ERK₁ possono inibire il segnale delle ERK₂ probabilmente tramite competizione per la fosforilazione da parte delle MEK (Girault et al., 2007). I topi knockout per le ERK₁ sono vitali, fertili e di taglia normale (Pagès et al., 1999) dimostrando così che le ERK₂ possono sopperire all'assenza delle ERK₁. Viceversa, la rottura del locus per le ERK₂ porta a precoce letalità embrionale (Pouyssegur et al., 2002) evidenziando così che l'isoforma 2 ha una rilevanza superiore rispetto all'isoforma 1.

La pathway delle ERK_{1/2} è importante nei processi di plasticità sinaptica (Sweatt, 2004), ossia la capacità del sistema nervoso di adattarsi all'ambiente e di perfezionare il proprio

rendimento in funzione del tempo e dell'esperienza, definita anche come "la proprietà in virtù della quale si osservano cambiamenti funzionali in specifici sistemi neuronali come conseguenza della presentazione di appropriati stimoli ambientali o combinazioni di questi" (Studi sulla degenerazione e rigenerazione del sistema nervoso centrale, 1914 Santiago Ramon Y Cajal (Petilla de Aragón 1852 - Madrid 1934)).

L'attivazione delle ERK_{1/2} nei processi di plasticità sinaptica, passaggio indispensabile per i processi di apprendimento e memoria, è stata evidenziata sia in vitro che in vivo attraverso vari protocolli sperimentali che testano l'apprendimento dei mammiferi. Tra questi modelli possono essere inclusi la conditioned taste aversion (CTA) (Swank, 2000), la conditioned place preference (CPP) (Gerdjikov et al., 2004) la conditioned fear (Schafe et al., 1999) e il Morris water maze (Selcher et al., 1999).

Nelle cellule perenni del SNC, le ERK_{1/2} sono responsabili oltre che dell'adattamento cellulare e della plasticità coinvolta nei processi di apprendimento e memoria, nonché a livello dell'ippocampo, dell'inserzione nelle sinapsi di recettori per il glutammato, nella regolazione della dinamicità delle spine dendritiche (Wu et al., 2001; Goldin e Segal., 2003) e nella sintesi di proteine dendritiche (Zhu et al., 2002; Keller et al., 2004).

Numerosi studi supportano l'ipotesi secondo cui le ERK_{1/2} influenzano l'adattamento cellulare, la plasticità morfologica, alcune performance comportamentali e la modulazione del tono dell'umore (Zhu et al., 2002; Einat et al., 2003). Inoltre, le MAPK, che sono attivate da stimoli stressori, sono un link necessario per la Long-Term Potentiation (LTP), una forma di plasticità sinaptica chiamata "potenziamento a lungo termine" che si osserva a livello dell'ippocampo (Atkins et al., 1998; Thiels & Klann, 2001). La LTP descrive un potenziamento notevole e duraturo della trasmissione sinaptica che si instaura dopo una breve e intensa stimolazione presinaptica; mentre la memoria a lungo termine richiede nuovo mRNA e nuove proteine, la memoria a breve termine non sembra coinvolgere la sintesi di nuove proteine poiché il processo è insensibile all'inibizione dei meccanismi di trascrizione e traduzione proteica.

Poiché l'attività delle ERK_{1/2} è regolata dalla stimolazione dei recettori della DA e del glutammato e poiché le ERK_{1/2} sono in grado di integrare segnali provenienti da molte vie di secondi messaggeri, sembra che possano funzionare da rilevatore di coincidenza tra la gratificazione e le informazioni contestuali nei processi di apprendimento (Girault et al.,

2007), attribuendo in tal modo alle ERK_{1/2} la capacità di svolgere un ruolo integrativo nello sviluppo della tossicodipendenza (Lee & Messing 2008).

Bersagli a valle delle ERK_{1/2} includono fattori di trascrizione e geni immediati precoci che svolgono un ruolo nella mediazione della plasticità sinaptica farmaco-indotta, compresi la chinasi ribosomiale S6 (RSK) e la chinasi mitogeno- e stress-stimolata 1 (MSK1). Queste chinasi a valle fosforilano e attivano la proteina CREB. Le ERK possono anche fosforilare direttamente il fattore di trascrizione Elk-1. L'attivazione di CREB e di Elk-1 può portare alla trascrizione dei geni immediati precoci c-fos e zif268, che sono indotti da varie sostanze d'abuso (Hyman et al., 2006).

ERK e Tossicodipendenza (drug addiction)

Con il termine "drug addiction" si intende un disturbo cronico, caratterizzato da alterazioni del comportamento, in cui la ricerca compulsiva della sostanza svolge un ruolo centrale, e il cui rischio di ricaduta persiste, in maniera importante, anche dopo anni di astinenza (Berke & Hyman 2000; Koob & Le Moal 2001; Nestler 2001). Lo sviluppo della dipendenza comporta cambiamenti patologici dei meccanismi cellulari e molecolari che sottendono ai normali fenomeni di apprendimento e memoria (Hyman 2005; Kelley 2004)

Una estesa meta-analisi genetica ha portato all'identificazione di alcune vie di segnale e geni comuni coinvolti nella "drug addiction", sottolineando l'importanza delle protein-chinasi quali componenti comuni cruciali all'interno di tale network molecolare (Li 2008). L'abuso di sostanze infatti, stimola vie di segnale che attivano protein-chinasi, portando ad una alterazione della trascrizione genica e sintesi proteica, eventi che contribuiscono alla comparsa dei cambiamenti a lungo termine a livello di funzionalità sinaptica e circuiti neuronali, e che esitano in ultima analisi nell'instaurarsi della dipendenza (Lee & Messing 2008).

Le ERK_{1/2} sono tra le protein-chinasi meglio studiate e che sembrano svolgere un ruolo cruciale nella drug-addiction. È stato osservato, infatti, che la somministrazione di sostanze d'abuso in ratti e topi, può attivare la ERK_{1/2} in molte delle aree target che costituiscono il sistema DAergico mesolimbico, tra cui l'area ventrale del tegmento mesencefalico (VTA), il Acb, la PFCx, il nucleo del letto della stria terminalis (BSTL) e l'amigdala (Valijent 2004; Everitt &

Robbins 2005). Sebbene con leggere differenze relative alle cinetiche di attivazione, la nicotina, la morfina, il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC) e gli psicostimolanti attivano la fosforilazione delle ERK_{1/2} nelle aree appartenenti al circuito della gratificazione; inoltre, in tutti i casi tale attivazione è bloccata dall'antagonista D₁, SCH 23390 (Valijent et al., 2004); anche la 3,4-metilenediossimetanfetamina (ecstasy) (Acquas et al., 2007; Salzman et al., 2003) e l'etanolo (Ibba et al., 2009) determinano una attivazione delle ERK_{1/2} nello striato ventrale.

L'attivazione delle ERK_{1/2} indotta dai farmaci d'abuso risulta inoltre essere funzionalmente rilevante, dato che il composto farmacologico SL327, che agisce inibendo le MEK e che attraversa la barriera emato-encefalica (BEE), è in grado di prevenire l'espressione delle proprietà di rinforzo indotte dalla cocaina (effetto valutato attraverso studi di CPP) (Valijent et al., 2000) o lo sviluppo della sensibilizzazione motoria (Valijent et al., 2006a).

È stato inoltre osservato che la somministrazione locale nel AcbC di un altro inibitore delle MEK, il PD98059, sia prima che dopo le sessioni di training della CPP, è in grado di prevenire l'espressione della preferenza spaziale indotta dall'amfetamina (Gerdjikov et al.; 2004). Le ERK_{1/2} risultano anche coinvolte nei processi di riconsolidamento delle memorie associate alla sostanza, dato che queste vengono riattivate in seguito all'esposizione diretta ad un contesto associato al farmaco, e dato che l'inibizione delle MEK è in grado di cancellare la preferenza spaziale precedentemente acquisita (Miller & Marshall 2005; Valijent et al. 2006b). L'attivazione striatale delle ERK_{1/2} coinvolge sia i recettori DAergici D₁, sia quelli al glutamato NMDA, dato che risulta prevenuta sia da antagonisti DAergici che glutamatergici (Valijent et al., 2000; 2005), tuttavia, soltanto un sottoinsieme di neuroni nigrostriatali esprime recettori D₁ (Bertran-Gonzalez et al., 2008), pertanto, sulla base di tale osservazione, è stato proposto che la modalità di attivazione delle ERK_{1/2} possa dipendere dalla convergenza del segnale DAergico e glutamatergico sui MSNs, attribuendo in tal modo alle ERK_{1/2} il ruolo di "rilevatori di coincidenza" in grado di individuare il simultaneo arrivo delle informazioni contestuali codificate dagli input glutamatergici corticostriatali e talamostriatali, e l'erroneo segnale di ricompensa positiva codificato dai neuroni DAergici (Girault 2007).

Sebbene le due isoforme ERK₁ ed ERK₂ abbiano una elevata omologia di sequenza, queste esercitano effetti funzionalmente distinti (Vantaggiato 2002; Mazzucchelli et al.; 2002). È interessante notare che la fosforilazione della ERK₂ indotta da farmaci d'abuso risulta essere

molto più consistente rispetto a quella della ERK₁ (Valijent et al.; 2005); inoltre, in topi KO per l'isoforma ERK₁, è stato osservato che la rimozione di quest'ultima risulta in una ipersensibilità alle proprietà di rinforzo della morfina e a quelle gratificanti e psicomotorie della cocaina (Mazzucchelli et al., 2002; Ferguson et al., 2006); inoltre è stato osservato un incremento della plasticità sinaptica del tipo LTP nel AcbC, nell'ippocampo e nell'amigdala basolaterale di topi KO per ERK₁, effetto prevenuto dal trattamento con l'inibitore selettivo delle MEK U0126 (Mazzucchelli et al., 2002). Nel complesso tali evidenze supportano la teoria secondo la quale l'isoforma ERK₂ sia quella dominante ed essenziale per i processi di plasticità neuronale e di adattamento comportamentale indotti dalle sostanze d'abuso (Cahill et al., 2014).

ERK e comportamenti correlati alla tossicodipendenza (addiction-related behavior)

Le ERK risultano essere implicate anche in numerosi aspetti comportamentali caratteristici dei modelli per lo studio della tossicodipendenza, tra i quali la sensibilizzazione, la tolleranza, l'astinenza e la ricaduta (relapse) così come il desiderio compulsivo di assunzione della sostanza (drug craving).

La sensibilizzazione psicomotoria che si osserva come conseguenza dell'assunzione acuta o cronica di farmaci d'abuso, è associata ad un aumento della gratificazione (Allen et al., 2007), dei fenomeni di ricaduta (De Vries 1998) e di assunzione della sostanza (Risinger et al., 1994) nei roditori. L'importanza dell'attività delle ERK nell'espressione della sensibilizzazione motoria è confermata da vari studi presenti in letteratura secondo cui l'inibitore delle MEK, SL327, somministrato per via sistemica, previene l'iperlocomozione indotta dalla somministrazione acuta di cocaina (Valijent et al., 2006), amfetamina (Valijent et al., 2006) e MDMA (Salzmann et al., 2003); la comparsa dell'iperlocomozione è prevenuta anche dal pretrattamento intra-VTA con SL327 in ratti ripetutamente trattati con cocaina (Pierce et al., 1999), e dal pretrattamento sistemico con lo stesso inibitore in topi ripetutamente trattati con amfetamina (Valijent et al., 2005).

Le ERK risultano coinvolte anche nello sviluppo della tolleranza agli effetti ipolocomotori indotti dai cannabinoidi (Rubino et al., 2005). Nei topi è stato osservato infatti, che il pretrattamento per via sistemica con SL327 non previene lo sviluppo della ipolocomozione indotta dalla somministrazione acuta di THC, ma lo sviluppo della tolleranza agli effetti

ipolocomotori che compaiono come conseguenza di somministrazioni ripetute (Rubino et al., 2005).

Il coinvolgimento delle ERK nello sviluppo dei fenomeni di ricaduta è stato caratterizzato attraverso il modello sperimentale di auto-somministrazione (self-administration) seguita da una fase di astinenza; si è osservato infatti che la presentazione di stimoli precedentemente associati a sostanze quali cocaina (Lu et al., 2005) o etanolo (Radwanska et al., 2008) incrementa i livelli della forma fosforilata della ERK (pERK) nell'amigdala e che la somministrazione di antagonisti NMDA riduce i livelli di pERK e il comportamento di ricerca (drug-seeking), suggerendo dunque che la pERK sia in grado di facilitare il comportamento di ricerca della cocaina attraverso un meccanismo NMDA-dipendente (Lu et al., 2005; Lu et al., 2007).

L'incubazione del drug-craving è un fenomeno in cui si osserva un aumento, progressivo nel tempo, del drug-seeking indotto da stimoli, durante la fase di astinenza (Lu et al., 2005). In ratti sottoposti a sessioni ripetute di self-administration durante le quali la cocaina risultava associata a diversi stimoli, è stato osservato che la presentazione successiva di questi ultimi incrementa il comportamento di drug-seeking in maniera significativamente maggiore dopo 30 giorni di astinenza rispetto a quanto osservato a tempi più brevi (1-7 giorni di astinenza) (Lu et al., 2005); tale incremento tempo-dipendente sembra essere associato ad un aumento dei livelli della pERK nell'amigdala centrale, così come di quelli del BDNF nella VTA, nel Acb e nell'amigdala (Grimm et al., 2003). La rilevanza dell'attività delle ERK nell'amigdala centrale per lo sviluppo del drug-seeking indotto da stimoli condizionati è confermata dal fatto che la somministrazione locale dell'inibitore delle MEK, U0126, riduce in maniera significativa il comportamento di ricerca durante l'astinenza da cocaina (Lu et al., 2005); tuttavia è importante sottolineare che l'attività di tali chinasi è specificamente rilevante per lo sviluppo del drug-seeking ma non per le risposte rinforzate in cui il comportamento operante determina il raggiungimento dello stimolo non condizionato. Infatti, l'infusione locale dell'inibitore U0126 non riduce né la autosomministrazione di cocaina né, ad esempio, il consumo di cibo appetibile (Lu et al., 2005).

L'attivazione delle ERK è necessaria anche per lo sviluppo della CPP, una procedura di condizionamento impiegata allo scopo di valutare le proprietà gratificanti delle sostanze. Il pretrattamento per via sistemica con SL327, durante la fase di condizionamento (in cui gli

animali vengono somministrati o con il farmaco in studio o con il veicolo e successivamente posti in determinati contesti ambientali all'interno dell'apparato di condizionamento) previene lo sviluppo della CPP indotta da cocaina (Valijent et al., 2000), THC (Valijent et al., 2001) ed MDMA (Salzmann et al., 2003). Quest'ultima è prevenuta anche dal pretrattamento per via locale (iniezione diretta nel AcbC) con un altro inibitore, il PD98059 (Gerdjikov et al., 2004); inoltre gli aumenti dei livelli di fosforilazione di ERK, CREB ed Elk-1 nel Acb dei ratti che si osservano nella CPP da cocaina, risultano attenuati dalla somministrazione intra-VTA di U0126 (Miller & Marshall 2005). Il fatto che l'infusione dell'inibitore U0126 nel AcbC immediatamente dopo la fase di accertamento della preferenza spaziale spontanea (CPP testing , giorno 1) prevenga la successiva fase di espressione (in cui all'animale è consentito di scegliere tra i contesti farmaco- o veicolo-associato), suggerisce l'importanza dell'attività delle ERK anche nel riconsolidamento della memoria (memory reconsolidation) (Miller & Marshall 2005); l'inibizione delle MEK influisce sul riconsolidamento della memoria della CPP di diverse sostanze d'abuso, come osservato infatti nel caso dell'MDMA, la cui CPP è prevenuta dalla somministrazione intra-VTA del PD98059 (Mizoguchi et al., 2004), o nel caso della morfina, la riespressione della cui CPP risulta prevenuta dalla somministrazione sistemica di SL327 (Valijent et al., 2006). Oltre al riconsolidamento di questo tipo di memoria, l'attività delle ERK è importante anche per altri tipi di memoria quali la "reconsolidation of auditory fear conditioning" (Duvarci et al., 2005), e la "object recognition" (Kelly et al., 2003). Tali evidenze supportano dunque l'importanza del coinvolgimento di queste chinasi nella mediazione delle proprietà gratificanti di oppiacei psicostimolanti, e cannabinoidi.

ERK e morfina

Il sistema oppioide endogeno rappresenta una delle principali strutture neurochimiche coinvolte in differenti aspetti della drug addiction (Trigo et al., 2010).

I recettori oppioidi sono accoppiati a proteina G (GPCR) e i loro ligandi peptidici endogeni sono largamente distribuiti nel sistema nervoso centrale e nei tessuti periferici. Tale distribuzione è infatti correlata all'importante ruolo che il sistema oppioide riveste nella gestione di numerose risposte fisiologiche (Trigo et al., 2010) tra le quali la nocicezione, il comportamento emotivo e l'apprendimento; inoltre la distribuzione a livello della VTA, dell'Acb, della PFCx, dell'ipotalamo e dell'amigdala estesa (Mansour et al., 1995) ne garantisce il ruolo nei processi

di ricompensa e nella modulazione degli effetti comportamentali e neurochimici di molte sostanze d'abuso (Bodnar 2007). L'attivazione dei recettori oppioidergici modula inoltre molte vie di segnale tra cui diverse cascate chinasiche tra le quali quelle contenenti la proteina chinasi C (PKC), la CaMII, la Akt (conosciuta come PKB) e la MAPK.

Gli oppioidi esogeni, che vanno dai derivati oppioidi (es. morfina) agli analgesici oppiacei da prescrizione (es. ossicodone) sono capaci di interagire con i recettori oppioidi presenti nel corpo producendo effetti che vanno da quello terapeutico a quello patologico (Shurman et al., 2010). La morfina, agonista dei recettori μ , è un farmaco impiegato in qualità di potente analgesico nella terapia palliativa del dolore profondo, sebbene sia dotata di un forte potenziale tossicomano. È noto infatti che la sua somministrazione stimola la trasmissione DAergica mesolimbica (Pontieri et al., 1995). Infatti attraverso l'attivazione dei recettori μ della VTA, si osserva una inibizione dell'attività GABAergica sui neuroni DAergici, la rimozione di tale controllo risulta in un rilascio di DA nel Acb (Klitnick et al., 1992). È stato osservato che l'infusione di morfina intra-VTA induce una preferenza spaziale associata al farmaco e che il pretrattamento con il naloxone (2 mg/kg) è in grado di antagonizzare l'effetto di rinforzo della morfina nella VTA (Philips & LePiane 1980; Mamoon et al., 1995), supportando la teoria secondo cui tale regione cerebrale rappresenta il principale target della morfina e che le proiezioni DAergiche che originano nella VTA e che raggiungono l'Acb rappresentano il percorso di gratificazione comune (Nestler 2005).

Come menzionato precedentemente, l'attivazione dei recettori oppioidergici determina la fosforilazione (e dunque attivazione) delle MAPK, responsabili a loro volta dell'attivazione delle ERK (Yoon & Seger 2006). L'attivazione delle ERK indotta dagli oppioidi, è stata osservata per la prima volta in cellule trasfettate per l'espressione di recettori oppioidergici (Li & Chang 1996; Fukuda et al., 1996); così come in cellule SH-SY5Y di neuroblastoma umano, che esprimono spontaneamente recettori μ/δ , si è osservata una rapida e transitoria attivazione delle ERK indotta da oppioidi (Trapaidze et al., 2000). Tali studi in vitro hanno anche permesso di dimostrare che il principale meccanismo alla base dell'attivazione delle ERK mediata dagli oppioidi coinvolge l'attivazione della Ras (proteina ad attività GTPasica) attraverso il dimero $G\beta\gamma$ (Belcheva et al., 1998) associato all'attività di proteine $G_{i/o}$, sebbene anche altri meccanismi quali la modulazione dei sistemi di segnale della PKA e della PKC possano essere coinvolti (Luttrell & Luttrell 2003; Belcheva et al., 2005).

La rilevanza funzionale delle ERK nelle proprietà rinforzanti della morfina è stata messa in luce attraverso studi comportamentali di CPP; dal lavoro di Spina e colleghi (2010), in accordo con altri dati presenti in letteratura circa l'importanza delle MEK (chinasi responsabile della fosforilazione delle ERK) nello sviluppo della CPP indotta da sostanze (Gerdjikov et al., 2004; Salzman et al., 2003; Valjent et al., 2000,2001), è emerso che la somministrazione dell'inibitore delle MEK PD98059, previene l'acquisizione della CPP da morfina (1 mg/kg) nel ratto, in maniera tempo e dose dipendente (Spina et al., 2010).

Tuttavia, le discordanze rilevate da una attenta analisi della letteratura circa gli effetti acuti della morfina sull'attivazione delle ERK in diverse aree cerebrali, così come il ruolo dell'attivazione delle ERK nel Acb, sono, ad oggi, oggetto di studio e alla base di diverse reviews (Beninger & Gerdjikov, 2004; Zhai et al., 2008).

Sembra infatti che la somministrazione acuta di morfina possa indurre, nei ratti e nei topi, una opposta modulazione delle pERK sebbene le differenze della dose, del tempo trascorso tra la somministrazione e il sacrificio e del ceppo impiegato, suggeriscono grande attenzione nel confronto diretto di questi studi (Eitan et al., 2003; Liu et al., 2007; Valjent et al., 2004). È stato osservato che in topi C57BL/6J, la somministrazione di 10 mg/kg di morfina induce la fosforilazione della ERK a livello della corteccia anteriore cingolata, di quella somatosensoriale e del locus coeruleus (LC), parallelamente ad una osservata riduzione nel Acb e nel nucleo dell'amigdala centrale (Eitan et al., 2003); di contro, Valjent e colleghi hanno invece rilevato che in topi CD-1 la somministrazione di una dose di 5 mg/kg di morfina determina un incremento dei livelli fosforilati delle ERK preferenzialmente a livello dell'AcbSh, ma anche nel nucleo dell'amigdala centrale, nel BSTL così come negli strati profondi della PFCx (Valjent et al., 2004). Tuttavia come precisato in precedenza, la comparazione tra questi diversi studi non può considerarsi corretta, poiché la netta differenza di dose impiegata (10 mg/kg vs 5 mg/kg) potrebbe essere alla base delle differenze osservate, analogamente a quanto osservato anche per il THC (Valjent et al., 2004); è dunque possibile che la mancata fosforilazione della ERK nel Acb riscontrata da Eitan e colleghi, sia in qualche modo riconducibile ad un eventuale effetto inibitorio (diretto o indiretto) che elevate dosi di farmaco potrebbero esercitare sulle ERK, e correlabili alle loro proprietà sedative.

Da studi condotti su ratti Sprague-Dawley, emerge invece che la somministrazione acuta di morfina induce una riduzione dei livelli fosforilati di ERK a livello del Acb (Muller & Unterwald 2004) e che tale down-regulation può essere prevenuta dal pretrattamento con l'antagonista μ naltrexone, attribuendo così alla stimolazione di tali recettori il meccanismo primario attraverso il quale la morfina determina le riduzioni osservate.

È da sottolineare inoltre l'importanza dell'attivazione delle ERK NMDA-mediata a livello dell'amigdala centrale nelle proprietà gratificanti della morfina. È stato osservato infatti che in ratti che esprimevano preferenza spaziale condizionata per la morfina, la somministrazione di un inibitore delle MEK (U0126) parallelamente alla somministrazione di un antagonista dei recettori NMDA (MK-801) è in grado non solo di prevenire la fosforilazione delle ERK nell'amigdala centrale ma addirittura di annullare l'espressione della CPP (Li et al., 2011). È emerso, di recente, che anche la formazione della memoria correlata agli oppioidi richiede l'attivazione della ERK attraverso un processo D_1 -mediato a livello dell'amigdala basolaterale (Lyons et al., 2013). Ad oggi, il meccanismo attraverso il quale gli oppioidi modulano la fosforilazione delle ERK rimane da chiarire, così come rimane da definire il possibile coinvolgimento delle β -arrestine (Macey et al., 2006) e il differente ruolo delle due isoforme di ERK (Mazzucchelli et al., 2002). L'importante ruolo delle β -arrestine negli effetti di rinforzo della morfina è stato osservato attraverso studi di CPP (Bohn et al., 2003). In topi KO per la β -arrestina la morfina provoca maggior rinforzo ovvero una maggior sensibilità del sistema DAergico (aumento del rilascio di DA striatale) alla stimolazione del recettore μ (Bohn et al., 2003). Inoltre, è stato visto che la morfina acquisisce la capacità di evocare la fosforilazione delle ERK quando applicata a neuroni transfettati con una forma di arrestina che non richiede la fosforilazione recettoriale per l'attivazione (Macey et al., 2006). Tali studi suggeriscono dunque che la differente espressione delle β -arrestine così come il differente grado delle loro attività di base (Haberstock-Debic et al., 2005; Zheng et al., 2011) possano giocare un ruolo critico nella capacità della morfina (e di altri agonisti oppioidi) di modulare la fosforilazione delle ERK.

È altresì importante sottolineare che le due isoforme ERK₁ ed ERK₂ esercitano effetti opposti sulla plasticità sinaptica dello striato, così come emerso da studi di LTP striato-dipendente (Mazzucchelli et al., 2002). È stato osservato che in topi KO per l'ERK₁, la delezione di tale isoforma comporta un incremento del segnale D_1 -mediato, così come una

aumentata capacità della morfina di indurre CPP rispetto ai controlli, suggerendo così che l'aumentata plasticità sinaptica mediata dalle ERK₂ possa avere delle conseguenze critiche su quei comportamenti che richiedono un efficiente network neuronale striatale (Mazzucchelli et al., 2002; Ferguson et al., 2006).

ERK ed etanolo

L'etanolo, principale componente delle bevande alcoliche, è una piccola molecola idrosolubile e psicoattiva, la cui assunzione a dosi elevate e per periodi prolungati, determina l'insorgenza di patologie a carico di diversi organi vitali (principalmente il fegato) e sistemi tra i quali il sistema nervoso e quelli gastrointestinale e cardiovascolare, e risulta associata, in ultima analisi, ad un aumentato rischio di morte soprattutto per malattie epatiche, cardiovascolari e cancro (Møller & Anderson 2012).

L'assunzione compulsiva di etanolo (alcolismo), è una condizione neuroadattativa progressiva e complessa che vede il chiaro coinvolgimento di fattori genetici (alcol deidrogenasi 1B ADH1B ed aldeide deidrogenasi 2 ADH2 (Edenberg & Foroud 2013)) alla base del suo sviluppo, sebbene l'esposizione prolungata alla sostanza sia una pre-condizione necessaria per l'insorgenza del disturbo (Ciccocioppo 2013).

È stato osservato che alcuni degli effetti a rapida insorgenza dell'etanolo, risultano essere mediati dall'azione diretta sui canali ionici (Harris et al., 2008); evidenze sperimentali identificano i recettori canale ligando-dipendenti (LGICs) ($GABA_A$, recettori NMDA, recettore per la glicina, recettori colinergici nicotinici, recettori serotoninergici) come i principali responsabili degli effetti osservabili in condizioni di intossicazione da etanolo (concentrazione di etanolo 10-25 mM) ovvero euforia e disinibizione (Howard et al., 2014).

Tuttavia, per ciò che riguarda gli effetti comportamentali, probabilmente la più rilevante delle azioni neuronali dell'etanolo sui canali ionici riguarda l'inibizione dei recettori NMDA e la valorizzazione dell'attività inibitoria dei recettori $GABA_A$ e di quelli per la glicina (Harris et al., 2008). È noto inoltre che l'assunzione acuta di etanolo induce anche adattamenti a lenta insorgenza, i quali coinvolgono la fosforilazione delle LGICs, l'interazione tra proteine messaggere intracellulari, così come alterazioni a livello di proteine canale (Perkins et al., 2012; Ron & Messing 2013); l'assunzione cronica di etanolo è invece responsabile di

modificazioni a lungo termine nell'espressione genica cerebrale, le quali risultano organizzate in moduli definiti di geni correlati specifici sia per regione cerebrale che per tipo cellulare (Ponomarev et al., 2012). Tra i possibili meccanismi dell'etanolo si annovera anche la sua azione sul sistema oppioide endogeno. Gli oppioidi, attivano i neuroni DAergici della VTA tramite l'inibizione dell'attività degli interneuroni GABAergici con conseguente liberazione dei neuroni DAergici dal controllo inibitorio (Nicoll et al., 1980). L'etanolo aumenta il rilascio di peptidi oppioidi a livello cerebrale; il fatto che il potenziamento del firing dei neuroni DAergici della VTA indotto dall'etanolo possa essere bloccato dal naloxone (μ -antagonista), così come il silenziamento degli interneuroni GABA ottenuto dopo somministrazione di DAMGO (μ -agonista) esiti in un eccitamento del firing dei neuroni DAergici, offre una spiegazione al meccanismo tramite il quale l'etanolo induce l'attivazione del sistema DAergici mesolimbico, e chiarisce anche il fondamento sul quale si basa l'utilizzo degli antagonisti oppioidi nel trattamento dell'alcolismo (Weinrieb & O'Brien 1997).

Il consumo di etanolo induce molteplici effetti sia farmacologici che comportamentali proporzionalmente alla quantità assunta; è noto infatti che basse dosi inducono risposte gustative appetitive che migliorano il gusto delle sostanze (quali vino o birra) (Lemon et al., 2004), oltre a provocare un miglioramento dello stato d'animo e una riduzione dell'ansia. Il consumo di dosi più elevate in brevi periodi di tempo produce invece sedazione, incoordinazione motoria, ipotermia e confusione fino ad arrivare, con dosi ancor più elevate, a coma o morte per depressione respiratoria (Vonghia et al., 2008).

L'etanolo è in grado di modificare le concentrazioni dei neurotrasmettitori cerebrali. E' stato osservato infatti che variazioni dei livelli di DA, serotonina, GABA, peptidi oppioidi endogeni e noradrenalina risultano essere associati all'attivazione di aree appartenenti al circuito cerebrale di ricompensa, e si ritiene che proprio tale capacità sia alla base dell'effetto di rinforzo del consumo di etanolo nei ratti (De Witte 1996).

L'assunzione di etanolo incrementa la trasmissione DAergica nella AcbSh (Di Chiara 1997), attraverso un meccanismo di disinibizione del controllo GABAergico sui neuroni DAergici localizzati nella VTA (Brodie & Appel 1998), tuttavia, sono le azioni additive esercitate sull'integrazione del segnale glutammato-DA a livello dei MSNs (i quali alterano la sensibilità recettoriale inducendo desensitizzazione o dimerizzazione ad esempio) dell'Acb, i fattori responsabili della risposta individuale all'etanolo (Tabakoff & Hoffman 2013). La DA modula la

depressione a lungo termine e il potenziamento a livello delle sinapsi glutammatergiche corticostriatali: studi presenti in letteratura individuano nella regolazione della plasticità della trasmissione corticostriatale il meccanismo centrale dell'apprendimento regolato dalla DA (dopamine-controlled learning) (Reynolds & Wickens 2002). Tale meccanismo comporta alterazioni biochimiche nei neuroni in cui sia gli input di DA che quelli di glutammato risultano attivati (MSNs); in tal senso, l'attivazione della pathway delle ERK svolge un ruolo chiave poiché dipende sia dai recettori al glutammato che da quelli DAergici e costituisce uno dei punti focali della plasticità striatale e dei comportamenti adattativi in risposta alle sostanze d'abuso (Girault et al., 2007). È stato osservato, nei ratti, che 15 minuti dopo la somministrazione di una dose di 1 g/kg di etanolo per via intragastrica o intraperitoneale, la fosforilazione neuronale della ERK nei nuclei dell'amigdala estesa (Ibba et al., 2009; Thorsell et al., 2013) tra cui l'Acb, il BSTL e il nucleo dell'amigdala centrale risulta incrementata; tale attivazione inoltre è prevenuta dal pretrattamento con l'antagonista D₁ SCH39166 somministrato 10 minuti prima dell'etanolo. A questa stessa dose l'etanolo è inoltre in grado di indurre una significativa CPP per il compartimento associato al farmaco, prevenuta anche in questo caso dal pretrattamento con l'inibitore D₁ SCH39166 (Spina et al., 2010).

Il fatto che l'incremento dei livelli di ERK fosforilata dopo somministrazione di etanolo persiste per un lungo periodo (60-90') nell'amigdala rispetto al Acb, suggerisce l'importanza di tale chinasi anche nell'espressione delle proprietà ansiolitiche dell'etanolo (Pandey et al., 2008); è stato infatti osservato che la compromissione della funzione del CREB a livello dell'amigdala potrebbe essere responsabile della generazione di uno "stato d'ansia" tale da indurre il comportamento di bevuta (Pandey et al., 2003; 2006).

È inoltre interessante considerare che la somministrazione acuta di elevate dosi di etanolo (2.5-4.5 g/kg), diversamente da quanto osservato per le dosi gratificanti (1.0-1.5 g/kg), determina una riduzione della fosforilazione della ERK nei ratti (Sanna et al., 2002), evento che potrebbe essere correlato agli effetti avversi dell'etanolo in dosi elevate (Anderson et al., 2010), i quali limiterebbero il consumo di etanolo nei bevitori non dipendenti.

L'evoluzione dall'utilizzo ricreazionale dell'etanolo alla dipendenza è associata alla comparsa di condizioni motivazionali negative che promuovono l'assunzione eccessiva (Gilpin & Koob 2008). È stato osservato che l'esposizione cronica (14 giorni) a vapori di etanolo riduce i livelli di pERK valutati al termine del periodo di esposizione, in numerose regioni cerebrali incluso l'Acb

(Gilpin et al., 2008); di contro, si osserva un incremento dei livelli di pERK dopo 7-13h di astinenza da tale regime a livello dell'amigdala, parallelamente ad una riduzione dei livelli ematici di etanolo (Edwards et al., 2012). Questi neuroadattamenti suggeriscono l'importanza del segnale ERK nella mediazione della plasticità indotta dall'astinenza in aggiunta agli effetti prodotti dall'assunzione, inoltre, l'osservato aumento dei livelli di pERK indotto dall'astinenza risulta in accordo con le teorie sulla drug addiction (Koob & LeMoal 2008), per cui viene ipotizzato il coinvolgimento dei sistemi di stress cerebrali durante l'astinenza che fa seguito ad una eccessiva esposizione.

La fosforilazione delle ERK risulta inoltre attivata, a livello dell'amigdala basolaterale (Radwanska et al., 2008) e dell'AcbSh, anche a seguito del ripristino del comportamento di ricerca dell'etanolo (reinstatement of ethanol seeking) indotto da stimoli; è interessante notare che in entrambe le regioni cerebrali tale attivazione è dipendente dall'attivazione del recettore metabotropico per il glutammato mGLUR5 (Schroeder et al., 2008; Sinclair et al., 2012), suggerendo dunque che l'eccessiva attivazione delle ERK possa corrispondere ad una potenziata trasmissione glutammatergica sia in condizioni di dipendenza che di ricaduta (Ron et al., 2004; Chandler et al., 2006).

ERK e cocaina

La caratteristica comune ai farmaci psicostimolanti è quella di interagire con il trasportatore della DA (DAT), che si trova sulla membrana plasmatica dei neuroni DAergici, dove agisce interrompendo la trasmissione del segnale mediato dalla DA liberata per esocitosi, ricaptandola e riducendone dunque la concentrazione nello spazio extracellulare; l'aspetto principale di questi farmaci è infatti quello di indurre, nei roditori, un rilascio di DA nel sistema mesolimbico (Di Chiara & Imperato 1988; Pontieri et al., 1995; Di Chiara et al., 2004) e l'espressione genica in alcune strutture cerebrali (Hope et al., 1992). La cocaina agisce bloccando l'azione del DAT impedendo la ricaptazione del neurotrasmettitore dallo spazio sinaptico; i suoi effetti comportamentali sono principalmente mediati dall'interazione con le aree di proiezione del sistema mesolimbico che origina nella VTA, comprendendo la PFCx, il Acb, l'amigdala e il BSTL (Everitt & Wolf 2002; Wise 2004).

La dipendenza da cocaina è tipicamente caratterizzata da un comportamento d'assunzione compulsivo e da un elevato tasso di ricaduta (Kalivas & Volkow 2005). Numerosi studi presenti in letteratura supportano l'ipotesi secondo cui la dipendenza da cocaina abbia alla sua base adattamenti, indotti dal farmaco, dei meccanismi neuronali che sottendono ai normali processi di apprendimento e memoria, che causano ipersensibilità agli stimoli associati alla sostanza, decisioni impulsive e l'acquisizione di abitudini anormali che non tengono conto delle conseguenze avverse (Kalivas & Volkow 2005; Di Chiara 1998; Jentsch & Taylor 1999; Everitt & Wolf 2002; Hyman et al., 2006). Tale ipotesi ha condotto gli studiosi ad approfondire il ruolo delle molecole coinvolte nella plasticità sinaptica dei processi di apprendimento e memoria nella dipendenza da cocaina (Hyman et al., 2006), tra le quali le ERK (Berman & Dudai 2004).

I meccanismi a monte dell'attivazione delle ERK indotta dalla cocaina, vedono il coinvolgimento dei recettori NMDA e di quelli DAergici D₁ e potenzialmente la PKA (Protein kinase A) e la DARPP-32 (Dopamine-and-cAMP-regulated neuronal phosphoprotein); è stato osservato infatti che la somministrazione di antagonisti NMDA blocca la fosforilazione della ERK nel Acb e nello striato dorsale (Jenab et al., 2005; Valjent et al., 2005), così come la somministrazione di antagonisti D₁, dato quest'ultimo, confermato anche mediante l'utilizzo di topi KO per tali recettori (Zhang et al., 2004).

È stato inoltre osservato che in topi KO per la DARPP-32, l'attivazione della pERK nello striato dorsale e nell'accumbens risulta diminuita (Valjent 2005), e considerato che la DARPP-32 risulta attivata dalla PKA, è ragionevole ipotizzare che l'attivazione a monte della pathway della PKA D₁-mediata e indotta dalla cocaina, coinvolga l'attivazione della pERK indotta dalla cocaina.

A valle, la fosforilazione delle ERK indotta dalla cocaina, innesca l'attivazione della MSK1 nello striato dorsale e nel Acb, e dunque indirettamente il fattore CREB (direttamente attivato da MSK1), oltre all'attivazione del fattore Elk-1 e l'aumento dell'espressione di Fos e Zif268 (Valjent et al., 2000; Brami-Cherrier et al., 2005).

Evidenze sperimentali attribuiscono all'attivazione delle ERK nella VTA, un importante ruolo nello sviluppo della sensibilizzazione psicomotoria indotta dalla cocaina (Vanderschuren & Kalivas 2000; Vezina 2004). È stato osservato che la somministrazione intra-VTA del PD98059 prima della somministrazione giornaliera (durante la fase di sviluppo della

sensibilizzazione) è in grado di attenuare l'espressione della sensibilizzazione psicomotoria durante il test eseguito a 14 giorni dalla sospensione della somministrazione (Pierce et al., 1999); anche la somministrazione sistemica di SL327 prima dell'infusione giornaliera di cocaina (durante la fase di sviluppo) previene l'espressione della sensibilizzazione psicomotoria durante il test eseguito a 11-14 giorni di astinenza (Valjent et al., 2006; Ferguson et al., 2006). L'infusione di tale inibitore, inoltre, è in grado di prevenire anche la successiva espressione delle risposte locomotorie condizionate a contesti associati al farmaco (Valjent et al., 2000). Tuttavia, è stato osservato che in topi sensibilizzati alla cocaina, il pretrattamento acuto con SL327 non altera l'espressione della sensibilizzazione locomotoria, indicando dunque che gli effetti sedativi non specifici di tali inibitori non risultano essere alla base dei loro effetti sulla sensibilizzazione psicomotoria (Lu et al., 2006).

Il ruolo delle ERK nelle proprietà gratificanti della cocaina è stato valutato mediante l'utilizzo di procedure di CPP e l'attivazione delle ERK a livello del Acb sembra svolgere due distinti compiti. Infatti, durante la fase di training media il consolidamento dell'associazione tra gli effetti incondizionati del farmaco e il contesto ad esso associato, mentre durante la fase di test media l'espressione acuta delle risposte condizionate allo stimolo (Valjent et al., 2000). È stato osservato che la somministrazione di SL327 prima della fase di training della CPP da cocaina è in grado di prevenire l'espressione di tale preferenza spaziale, ma anche che la sola somministrazione di SL327 non induce avversione spaziale condizionata (CPA), suggerendo dunque che il blocco dell'espressione della preferenza non è dato dalla somma degli effetti indipendenti della cocaina (gratificazione) e dell' inibitore SL327 (avversione) (Valjent et al., 2000).

È stato osservato inoltre che l'esposizione ad un contesto associato al farmaco durante la fase di test, aumenta il livello della fosforilazione delle ERK nel AcbC ma non nel AcbSh, e che l'infusione intra-AcbC dell'inibitore UO126 è in grado di bloccare sia la fosforilazione delle ERK che l'espressione della CPP da cocaina nel ratto (Miller & Marshall 2005). A supporto di tali evidenze anche lo studio di Valjent et al., (2006), secondo cui l'espressione della CPP indotta da cocaina, nei topi, risulta correlata ad una aumentata fosforilazione delle ERK nel Acb e nello striato dorsale (Valjent et al., 2006).

È inoltre importante considerare che il ruolo delle ERK negli effetti comportamentali della cocaina, coinvolge due differenti meccanismi, distinti tra loro per il percorso temporale; uno,

infatti, implica alterazioni a lungo termine della plasticità sinaptica come risultato di una ripetuta esposizione al farmaco (probabilmente media la sensibilizzazione psicomotoria, il consolidamento e riconsolidamento della memoria associata a stimoli, così come l'incubazione del craving correlato al BDNF); l'altro invece risulta coinvolto nell'induzione dell'eccitabilità neuronale e della trasmissione sinaptica, responsabile degli effetti comportamentali acuti della cocaina nell'arco di breve tempo (minuti) (Lu et al., 2006).

Studi presenti in letteratura attribuiscono alle ERK la capacità di incrementare l'eccitabilità attraverso due differenti meccanismi, il primo che coinvolge l'inattivazione ERK-mediata dei canali al K^+ a voltaggio dipendente, e che esita in una depolarizzazione della membrana (Yuan et al., 2002), fenomeno quest'ultimo, che rende i neuroni maggiormente responsivi agli stimoli esterni (ad esempio la cocaina); il secondo prevede un potenziamento ERK-mediato della neurotrasmissione eccitatoria attraverso l'inserimento di recettori AMPA nella membrana (Quin et al., 2005), risultando dunque in un incremento acuto della trasmissione sinaptica.

Selezione genetica e drug addiction

La transizione dall'utilizzo occasionale di sostanze d'abuso a quello incontrollabile è una condizione strettamente dipendente dalla variabilità individuale, infatti solo il 15-20% dei soggetti esposti alle sostanze d'abuso ne diventa dipendente (Anthony et al., 1994). È noto infatti che tale variazione fenotipica risulta essere fortemente influenzata da differenze nei singoli genotipi e dalle interferenze tra questi e le diverse condizioni ambientali (Reich et al., 1999; Vanyukov & Tarter, 2000; Uhl et al., 2002). I tratti della personalità e del temperamento quali la disinibizione e l'impulsività così come la ricerca della novità, dipendono da fattori genetici, oltre ad essere stati identificati quali "fattori di vulnerabilità" nei disturbi da utilizzo di sostanze (Ebstein et al., 2000; Verheul & van den Brink, 2000; Helmus et al., 2001). Tali osservazioni hanno indirizzato gli studiosi verso l'impiego di una vasta gamma di ceppi inbred e di linee di roditori quali modelli validi per lo studio delle differenze, geneticamente determinate, negli aspetti neurochimici e comportamentali caratteristici della dipendenza (Kosten et al., 1997; Crabbe 2002; Fernández-Teruel et al., 2002; McClung & Nestler, 2003; Deiana et al., 2007).

Ratti Sardinian alcohol-preferring (sP) e -non-preferring (sNP)

I Sardinian alcohol-preferring (sP) e -non-preferring (sNP) rappresentano una delle coppie di ratti geneticamente selezionate per gli alti *vs* bassi livelli di preferenza e consumo di etanolo. I ratti sP infatti, soddisfano la maggior parte dei criteri fondamentali richiesti per un adeguato modello animale di alcolismo, poiché in grado di consumare volontariamente quantità di etanolo (assunzione quotidiana 6 g/kg) sufficienti da permettere il raggiungimento di significativi livelli ematici e produrre effetti psicofarmacologici tra cui ansiolisi e stimolazione motoria; sono inoltre disposti a svolgere un certo grado di "lavoro" (es. premere una leva o superare degli ostacoli) per ottenere l'accesso all'etanolo. Infine l'assunzione cronica nei ratti sP porta a uno sviluppo della tolleranza verso specifici effetti dell'etanolo (principalmente l'incordinazione motoria) e a un comportamento di ricaduta dopo deprivazione (alcohol deprivation effect). Di contro nei ratti sNP si osserva un quasi totale evitamento dell'etanolo (assunzione quotidiana 0.5 g/kg) che risulta resistente anche a manipolazioni ambientali quali l'esposizione a lungo termine ad una soluzione di etanolo addizionata a saccarosio (Brunetti et al., 2003).

Quando sottoposti ad un regime continuo (24h/giorno) di libera scelta tra una soluzione di etanolo (10% v/v) e una di acqua (two-bottle choice) i ratti sP assumono una elevata quantità di etanolo fin dai primi periodi dell'esposizione; già dal primo giorno infatti il consumo quotidiano ammonta a 3-4 g/kg (indicativo dell'immediata acquisizione degli effetti psicofarmacologici dell'etanolo e quindi di un aumento dei suoi livelli ematici (BELs)) fino ad arrivare in pochi giorni a 6-7 g/kg, valore quest'ultimo che rimane costante per lunghi periodi (Serra et al., 2003) conseguenza probabile di un consolidamento nella regolazione dell'assunzione (Colombo et al., 2006). È stato osservato che, coerentemente con le abitudini notturne dei roditori, circa l'80% dell'assunzione dei liquidi, incluso l'etanolo, si verifica nell'arco delle 12 ore notturne del ciclo luce/buio, e risulta ripartita in circa 3-4 episodi distinti (Agabio et al., 1996); tale distribuzione temporale potrebbe essere attribuibile alla capacità dei ratti sP di regolare la dose e il tempo di assunzione in funzione degli specifici effetti farmacologici percepiti (Colombo et al., 2006). È interessante notare che quando la concentrazione di etanolo viene aumentata dal 7% al 40% il consumo quotidiano crolla progressivamente, mantenendo però stabile e regolare l'assunzione di circa 6 g/kg (Lobina et al., 1997), suggerendo l'esistenza di un meccanismo centrale in grado di promuovere (effetti

psicofarmacologici positivi) ma di limitare (effetti avversivi associati ad elevate dosi) il comportamento di bevuta nei ratti sP.

La perdita di controllo nell'assunzione, e gli elevati tassi di ricaduta rivestono gli aspetti più rilevanti (Morse & Flavin 1992) nonché quelli più critici (McBride et al., 2002) nel trattamento dell'alcolismo; episodi di assunzione "controllata" alternati a periodi di grave abuso, rappresentano infatti il percorso comune alla gran parte degli alcolisti (Schuckit 1995). L'effetto di deprivazione da alcol (alcohol deprivation effect, ADE), ovvero l'incremento temporaneo nell'assunzione che fa seguito ad un periodo di astinenza, e che si osserva in molte specie animali, riproduce il comportamento di assunzione incontrollato e compulsivo caratteristico degli episodi di ricaduta nei soggetti alcolisti (McBride et al., 2002; Boening et al., 2001). È stato osservato che nei ratti sP l'effetto di deprivazione che si osserva dopo 3, 7, 15 e 30 giorni ma non dopo 1, 90 e 180 giorni (Agabio et al., 2000a) ha una durata limitata nel tempo alla prima ora di ri-esposizione e non risulta aumentato in seguito a deprivazioni ripetute (Serra et al., 2003). È anche interessante notare che quando posti davanti alla possibilità di scegliere tra tre differenti soluzioni di etanolo (10%, 20%, 30%), i ratti deprivati consumano maggiori quantità di soluzioni ad elevata concentrazione (20% e 30%) rispetto alla controparte non deprivata che invece le consuma tutte in egual misura (Serra et al., 2003). Un altro aspetto di grande rilevanza nello sviluppo dell'alcolismo è inoltre l'impiego dell'etanolo quale strategia di "auto-medicazione" per l'attenuazione dei sintomi dell'ansia (Goodwin et al., 2004). È stato osservato che quando testati attraverso l'elevated plus maze test (modello sperimentale di ansia basato sulla giustapposizione tra propensione dell'animale a esplorare un ambiente nuovo (braccio aperto) anche se scomodo, oppure soggiornare in un ambiente sicuro e protetto (braccio chiuso)), i ratti sP naive manifestano numerosi comportamenti associati all'ansia, che non si osservano né nella controparte sNP, né in ratti sP che hanno avuto accesso all'etanolo in regime di libera scelta (two-bottle choice per 14 giorni consecutivi) (Colombo et al., 1995), attribuendo così all'etanolo la capacità di esercitare un effetto ansiolitico tale da revertire il, geneticamente determinato, grado d'ansia innato caratteristico dei ratti sP (Colombo et al., 1995). I ratti sP precedentemente abituati al consumo di etanolo (alcohol experienced rats) mostrano inoltre un'intensa attività locomotoria rispetto agli sP naive (Colombo et al., 1998), indice questo che riflette le proprietà gratificanti e di rinforzo dell'etanolo (Wise & Bozarth 1987) e che si osserva anche in altre

linee geneticamente selezionate (AA (Päivärinta & Korpi 1993) e P (Bell et al. 2002)) per gli alti livelli di preferenza e consumo di etanolo. L'assunzione cronica nei ratti sP favorisce inoltre l'insorgenza di fenomeni di tolleranza a determinati effetti (quali l'incordinazione motoria) che si manifestano dopo 90 ma non dopo 30 giorni in regime di libero accesso all'etanolo.

Infine, il fatto che alcuni farmaci capaci di ridurre il consumo di bevande alcoliche nell'uomo siano risultati efficaci in tal senso anche nei ratti sP, fa di questi ultimi un modello animale dotato anche di validità predittiva per l'identificazione di nuovi potenziali terapie farmacologiche per il trattamento dell'alcolismo.

Ratti Roman High-(RHA) e Low-(RLA) avoidance

I Roman high- (RHA) e low-avoidance (RLA) costituiscono due linee di ratti selezionati per la rapida *vs* scarsa acquisizione dell'evitamento attivo valutato attraverso il paradigma della "two-way active avoidance" (Driscoll & Battig 1982). Tale modello impiegato quale indice di apprendimento e mantenimento della memoria, è basato su un processo di integrazione tra le informazioni cognitive già in possesso e quelle in entrata e che porta alla generazione di una adeguata risposta comportamentale, ovvero una strategia di "fronteggiamento" (coping strategy). Attraverso tale processo di selezione è stato possibile ottenere due fenotipi ben caratterizzati che differiscono drasticamente nella risposta a stimoli avversi e gratificanti (D'Angio et al., 1988; Ferre' et al., 1995; Fernandez-Teruel et al., 2002a, 2002b; Giorgi et al., 2003) nonché nella suscettibilità agli effetti acuti di sostanze d'abuso sul comportamento motorio e sulla trasmissione DAergica mesotelencefalica (Giorgi et al., 1997, 2005b; Lecca et al. 2004; Piras et al., 2003). È stato osservato infatti che quando testati con il suddetto paradigma, i ratti RHA mostrano nella prima sessione di 40 trial, una media di circa 25 evitamenti, contrariamente a quanto osservato nei ratti RLA che rispondono con una media di circa 1 evitamento (Giorgi et al., 2005b). Le ragioni della rapida acquisizione osservata negli RHA rispetto alla controparte sono strettamente dipendenti da fattori emotivi (Fernandez-Teruel et al., 1991; Escorihuela et al., 1995); la linea ad alto evitamento si mostra infatti emotivamente meno reattiva ed affronta attivamente il test rispetto alla linea RLA che affronta passivamente la sessione manifestando comportamenti di immobilità (freezing). Le

due linee differiscono non solo sotto il profilo comportamentale ma anche dal punto di vista neuroendocrino/neurochimico; quando esposti ad un nuovo ambiente (o ad altri fattori di stress) i ratti RLA esibiscono risposte emotivamente più marcate quali maggiore attività di defecazione, immobilità e "auto-toelettatura" (self-grooming) oltre ad una relativamente maggiore attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e soprattutto più elevati livelli di prolattina nel plasma rispetto alla controparte RHA (Driscoll et al., 1990; Gentsch et al., 1982; Ferrè et al., 1995). È stato osservato infatti che nei ratti RHA a cui viene data la possibilità di esplorare attivamente l'ambiente e dunque di "controllare" la risposta emotiva, i livelli di prolattina indotta da stress si riducono rapidamente, evento che, seppur nelle medesime condizioni, non si osserva nei ratti RLA (Driscoll et al., 1998). Evidenze sperimentali riconoscono nella linea RHA un valido modello per lo studio delle basi neurali che caratterizzano il comportamento di ricerca della sensazione/novità (novelty-seeking), aspetto quest'ultimo criticamente coinvolto anche nel rischio di sviluppo della dipendenza da sostanze. Quando testati mediante l'*hole board test*, i ratti RHA manifestano un comportamento esplorativo maggiore rispetto agli RLA (Escorihuela et al., 1999, Fernandez-Teruel et al., 2002), sebbene mostrino anche una maggiore impulsività, segno dell'incapacità di inibire i comportamenti irrilevanti (Zeier et al., 1978).

Le linee Roman si distinguono tra loro anche per le differenti reazioni comportamentali e neurochimiche in risposta a varie sostanze d'abuso. Studi di microdialisi cerebrale hanno dimostrato che la somministrazione acuta di morfina (0.5 mg/kg) (Lecca et al., 2004), cocaina (5 mg/kg) e amfetamina (0.15 mg/kg) (Lecca et al., 2004) determina un incremento della trasmissione DAergica preferenzialmente nel AcbSh, piuttosto che nel AcbC, dei ratti RHA, mentre nessuna differenza è stata osservata tra le subregioni dell'Acb dei ratti RLA, inoltre l'intensità del rilascio DAergico nel AcbC degli RHA non è risultata statisticamente differente da quella rilevata in entrambi i compartimenti dell'Acb della controparte RLA (Lecca et al., 2004; Giorgi et al., 2005b). Il fatto che l'AcbSh degli RHA si mostri maggiormente responsiva, rispetto all'AcbC, alla somministrazione acuta di morfina, cocaina ed amfetamina risulta inoltre in linea con lo studio di Pontieri e colleghi, secondo cui oppiacei e psicostimolanti, alla stessa dose alla quale viene mantenuto un regime di autosomministrazione, sarebbero in grado di determinare un maggiore rilascio di DA nell' AcbSh rispetto all'AcbC (Pontieri et al., 1995). Coerentemente con il ruolo critico svolto

dall'AcbSh nella stimolazione motoria indotta da sostanze d'abuso, è stato osservato che l'attivazione motoria promossa da basse dosi di morfina e di psicostimolanti nei ratti RHA è associata ad un rilascio di DA preferenziale nel AcbSh rispetto all'AcbC, contrariamente a quanto osservato nei ratti RLA, dove il mancato rilascio preferenziale nel AcbSh è associato ad una risposta motoria debole alla cocaina e ad un non significativo cambiamento nella attività motoria spontanea in risposta alla somministrazione sistemica di morfina e amfetamina (Lecca et al., 2004; Giorgi et al., 2005b).

Pertanto alla luce delle differenze riscontrate tra le due linee circa la responsività della trasmissione DAergica alle sostanze d'abuso, è plausibile pensare che i ratti Roman differiscano per le proprietà funzionali dei circuiti neuronali di reward. Quando testati mediante il paradigma del *two-bottle choice* (etanolo/acqua), i ratti RHA mostrano infatti una elevata preferenza per l'etanolo rispetto agli RLA (Fernandez-Teruel et al., 2002a), la cui scarsa preferenza è paragonabile a quella esibita da ratti non selezionati; inoltre un'intensa stimolazione DAergica preferenziale nel AcbSh si riscontra nei ratti RHA rispetto a quelli RLA esposti ad uno stimolo naturalmente gratificante quale un cibo appetibile (Giorgi et al., 1999). È stato osservato inoltre che i soggetti più sensibili agli effetti acuti di morfina, cocaina ed amfetamina, ovvero i ratti RHA, sono anche quelli più suscettibili di sviluppare sensibilizzazione comportamentale (behavioral sensitization) con l'esposizione ripetuta a tali farmaci (Giorgi et al. 2007). La sensibilizzazione agli oppiacei e agli psicostimolanti è una condizione caratterizzata da un aumento dell'attività di deambulazione e che rifletterebbe gli adattamenti a lungo termine che hanno luogo nei circuiti neuronali coinvolti nei processi di motivazione e gratificazione (Li et al., 2004; Nestler, 2001; Robinson and Berridge, 2001; Everitt and Wolf, 2002); è stato osservato infatti che l'esposizione ripetuta a psicostimolanti è in grado sia di facilitare l'autosomministrazione (Horger et al., 1990; Piazza et al., 1990) sia di potenziare le risposte condizionate a stimoli gratificanti (Shippenberg & Heidbreder, 1995; Taylor & Horger 1999), attribuendo al processo di sensibilizzazione la capacità di incentivare le proprietà motivazionali proprie delle sostanze d'abuso.

Alla luce di tali evidenze sperimentali è dunque ragionevole e giustificato considerare le due linee di ratti Roman quali validi strumenti sperimentali per la valutazione dell'influenza che il genotipo esercita sui tratti comportamentali e neuronali coinvolti nelle principali caratteristiche della vulnerabilità individuale alla dipendenza, tra le quali l'elevata sensibilità

alla prima esposizione a sostanze d'abuso così come lo sviluppo di una sensibilizzazione comportamentale dopo esposizioni ripetute.

SCOPO DELLO STUDIO

L'instaurarsi della dipendenza da farmaci d'abuso (drug-addiction) implica l'insorgenza di cambiamenti patologici a livello dei meccanismi molecolari e cellulari che sottendono ai normali processi di apprendimento e memoria.

L'incremento della trasmissione DAergica nel sistema limbico, preferenzialmente nel AcbSh, rappresenta una conseguenza neurochimica comune alla somministrazione acuta di farmaci d'abuso (Acquas et al., 2007; Cadoni & Di Chiara, 1999; Di Chiara et al., 2004; Giorgi et al., 2007; Howard et al., 2008; Pontieri et al., 1995; Zocchi et al., 2003), oltre ad essere una condizione essenziale per la cascata di eventi che può portare al risultato dello sviluppo di dipendenza, in accordo con la teoria dell'apprendimento associativo (Di Chiara 2002), secondo cui la stimolazione DAergica dell'AcbSh sarebbe in grado di produrre effetti a lungo termine conseguenti a un processo di acquisizione associativa dello stimolo gratificante. Tuttavia, mentre l'aumento della trasmissione DAergica riflette i cambiamenti pre-sinaptici in risposta ai farmaci, altri markers biochimici possono essere impiegati al fine di caratterizzare, anche a livello post-sinaptico, le conseguenze dei suddetti cambiamenti neurochimici. È noto infatti che le sostanze d'abuso, alla stregua di altri psicofarmaci, hanno la capacità di stimolare vie di segnale capaci di attivare protein-chinasi. Tale stimolazione porta ad alterazioni della trascrizione genica e sintesi proteica, eventi che contribuiscono alla comparsa di modificazioni a lungo termine a livello di funzionalità sinaptica e circuiti neuronali. Le ERK sono, tra le protein-chinasi meglio studiate, quelle che si ritiene svolgano un ruolo cruciale nei processi di plasticità sinaptica coinvolti nei meccanismi di apprendimento e memoria e risultano ampiamente espresse nelle regioni cerebrali correlate ai meccanismi di ricompensa e modulazione dei comportamenti motivati (Acb e amigdala estesa). La loro attivazione ha luogo sia dopo somministrazione acuta (Acquas et al., 2007; Brami-Cherrier et al., 2005; Ibba et al., 2009; Salzman et al., 2003; Valjent et al., 2000; 2001; 2004; Zhang et al., 2004) che cronica (Berhow et al., 1996; Muller & Unterwald, 2004) di farmaci d'abuso.

Il ruolo di tali chinasi è stato inoltre correlato alle proprietà motivazionali dei farmaci, valutate attraverso procedure di CPP (Gerdjikov et al., 2004; Lu et al., 2006; Salzman et al., 2003; Spina et al., 2010; Valjent et al., 2000; 2001; 2006) ma anche alla capacità di stimoli contestuali di evocare l'espressione della CPP acquisita (Miller & Marshall, 2005) e di stimoli condizionati di rievocare la ricerca del farmaco in esperimenti di self-administration (Radwanska et al., 2008; Schroeder et al., 2008).

L'esistenza di un legame diretto tra la trasmissione DAergica e l'attivazione delle pERK, così come la possibilità di considerare la pERK quale marker post-sinaptico di attivazione DAergica (Acquas et al., 2007; Ibba et al., 2009), sono degli assunti supportati da studi presenti in letteratura. È stato osservato, mediante uno studio comparato di microdialisi ed immunohistochimica, che la stimolazione preferenziale della trasmissione DAergica nella shell, indotta dall'ecstasy, si accompagna parallelamente a livello post-sinaptico, anche ad una preferenziale fosforilazione delle ERK nel AcbSh confrontata con il AcbC (Acquas et al., 2007), così come è stato osservato che il blocco dei recettori D₁ determina una netta riduzione della fosforilazione della pERK attivata sia dall'ecstasy che dall'etanolo a livello del Acb e dell'amigdala estesa (Acquas et al., 2007; Ibba et al., 2009). Tali evidenze sperimentali sembrano essere in linea con l'attenzione volta dalla ricerca pre-clinica a comprendere se la via delle ERK possa effettivamente rappresentare un target per interventi farmacologici mirati contro lo sviluppo della dipendenza da sostanze (Shiflett & Balleine 2011).

Pertanto, sebbene l'importanza dell'attivazione di questa chinasi nelle azioni dei farmaci d'abuso sia associata, risultati controversi permangono circa gli effetti esercitati dalla morfina sulla fosforilazione delle ERK nel Acb. Infatti, da una attenta analisi della letteratura, sembra che la morfina possa indurre una opposta modulazione della chinasi determinando un aumento o una diminuzione della sua fosforilazione. Tali divergenze potrebbero dipendere da numerose variabili tra le quali le dosi utilizzate (5, 10, 50 e 100 mg/kg), il tempo intercorso tra il trattamento con il farmaco e il sacrificio (20, 30, 40, 60 e 240 minuti) così come le specie impiegate (topi e ratti). Il chiarimento di queste discrepanze potrebbe contribuire a importanti progressi nella conoscenza del meccanismo molecolare della morfina in relazione alla sua capacità di esercitare proprietà motivazionali.

È noto che la variabilità individuale può giocare un ruolo di rilievo nello sviluppo di dipendenza. La variazione fenotipica risulta infatti fortemente influenzata dalle differenze nei singoli genotipi e dalle interazioni tra questi e le diverse condizioni ambientali per cui alcuni tratti della personalità e del temperamento che dipendono da fattori genetici sono stati identificati quali "fattori di vulnerabilità" nei disturbi da utilizzo di sostanze. Alla luce di tali considerazioni, nella prima parte della ricerca, il lavoro sarà volto i) a verificare se gli effetti della morfina sulla fosforilazione della ERK nel AcbSh e nel AcbC di diversi ceppi di ratti (Sprague-Dawley e Wistar) e di diversi ceppi di topi (CD-1 e C57BL/6J) possano essere

paragonabili ai noti aumenti preferenziali della trasmissione DAergica (Cadoni & Di Chiara 1999; Zocchi et al., 2003), ma anche ii) a caratterizzare il ruolo dei recettori DAergici D_1 e di quelli oppioidergici μ nella capacità della morfina di modulare la pERK nel Acb di questi animali, ed infine iii) a valutare l'effetto della somministrazione acuta della morfina sulla fosforilazione delle ERK nei ratti delle due linee psicogeneticamente selezionate RHA e RLA (Roman high avoidance e Roman low avoidance) al fine di chiarire se alla capacità della morfina di stimolare la trasmissione DAergica preferenzialmente nel AcbSh dei ratti RHA corrisponde un effetto preferenziale in termini di fosforilazione delle ERK e anche al fine di poter individuare nelle pERK un potenziale indicatore biochimico della predisposizione determinata geneticamente allo sviluppo di dipendenza da sostanze.

Nella seconda parte della ricerca, l'indagine sarà indirizzata verso la valutazione dei possibili effetti differenziali della somministrazione acuta di etanolo sulla fosforilazione delle ERK nel circuito mesocorticolimbico di ratti etanolo-*naive* appartenenti alle due linee geneticamente selezionate sP e sNP (Sardinian alcohol-preferring e Sardinian alcohol non-preferring) partendo dall'ipotesi che la valutazione degli effetti indotti dall'etanolo sull'espressione delle ERK in queste regioni cerebrali potrebbe sia contribuire a caratterizzare le basi molecolari che sottendono alla opposta sensibilità verso gli effetti acuti dell'etanolo (Agabio et al., 2001; Colombo et al., 2000) che a porre le basi per indagini future volte a meglio chiarire il ruolo di questa chinasi tanto nel comportamento di assunzione eccessiva di etanolo nei ratti sP quanto nel comportamento di evitamento dell'etanolo nei ratti sNP.

Infine, la terza parte della ricerca è originata dalla osservazione che sia la somministrazione acuta che quella cronica di cocaina inducono un'attivazione delle ERK in diverse aree del sistema mesocorticolimbico coinvolte nei processi cognitivi alla base della dipendenza da sostanze e che i ratti RHA e RLA mostrano una significativa differenza di vulnerabilità allo sviluppo di dipendenza da sostanze, riscontrabile sia a livello comportamentale che, indirettamente, a livello neurochimico. Pertanto, quest'ultima parte della ricerca sarà volta a studiare comparativamente gli effetti della somministrazione acuta di cocaina sull'attivazione della pathway delle ERK nei ratti delle due linee, RHA e RLA (Roman high- and low- avoidance), in alcune delle regioni cerebrali maggiormente implicate negli effetti comportamentali della cocaina.

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti del presente lavoro di ricerca sono stati condotti nel rispetto della legge italiana (D.L. 116/1992), che richiede l'approvazione, per lo svolgimento di esperimenti su animali da laboratorio, di un progetto di ricerca da parte delle autorità competenti e in stretto accordo con la "Raccomandazione della Commissione dell'Unione Europea" (n° 2007/526/CE). Ogni possibile sforzo è stato fatto per minimizzare il dolore e il disagio degli animali e per ridurre il numero dei soggetti sottoposti all'esperimento.

Animali e trattamenti

- ✓ **Per gli esperimenti con la morfina** sono stati impiegati ratti maschi delle due linee psicogeneticamente selezionate Roman high- e low-avoidance, ratti maschi Sprague-Dawley e Wistar, del peso di 250-275 g, e topi maschi CD-1 e C57BL/6J del peso di 22-25 g (Harlan, Udine). Gli animali sono stati alloggiati in gruppi di 4 per gabbia, per almeno 5 giorni prima dell'esperimento, con ciclo artificiale luce/buio di 12 ore ciascuno (accensione luci 8:00 AM) con acqua e cibo standard (Global diet 2018-Mucedola, Italy) ad libitum, e in condizioni standard di temperatura (23°) e umidità (60%). Gli esperimenti sono stati condotti tra le 10:00 del mattino e le 5:00 del pomeriggio. La morfina HCl (Franchini Prodotti Chimici Srl, Mozzate, Como) (0,5 1 e 5 mg/kg), il composto SCH 39166 (Schering-Plough, Milano) (50 µg/kg) e il naltrexone HCl (Sigma Aldrich, Milano) (1.5 mg/kg) sono stati dissolti in soluzione salina (NaCl 0,9%, p/v) e somministrati sottocute (1 ml/kg) ai ratti o per via intraperitoneale (10 ml/kg) ai topi. Il cloralio idrato (450 mg/kg) (Carlo Erba, Milano) e il pentobarbital sodico (Carlo Sessa Spa, Sesto San Giovanni, Milano) (50 mg/kg, volume di iniezione 10 ml/kg) sono stati dissolti in soluzione salina e somministrati per via intraperitoneale.
- ✓ **Per gli esperimenti con l'etanolo** sono stati impiegati ratti maschi delle due linee sP e sNP della 75a e 80a generazione, rispettivamente, a 70 giorni di età e di peso compreso tra 300 e 325 g. I ratti sono stati alloggiati in gruppi di 4 per gabbia. con ciclo artificiale luce/buio di 12 ore ciascuno, invertito (accensione delle luci alle 7:00 PM), e mantenuti ad una temperatura costante di 22±2 C e relativa umidità di circa il 60%. Al fine di evitare possibili interferenze dello stress dovuto alla procedura di somministrazione intragastrica, i ratti sono stati manipolati una volta al giorno per almeno 5 giorni prima dell'esperimento e abituati alle somministrazioni intragastriche e intraperitoneali. Acqua e

cibo standard (Global diet 2018-Mucedola, Italy) ad libitum ad eccezione del giorno dell'esperimento in cui nelle cinque ore precedenti alla somministrazione di etanolo i ratti sono stati privati del cibo per garantire lo stomaco vuoto al momento dell'infusione del farmaco; quindici minuti dopo la somministrazione di etanolo, i ratti sono stati anestetizzati con la ketamina HCl. Gli esperimenti sono stati condotti tra le 10:00 del mattino e le 5:00 del pomeriggio. Le soluzioni di etanolo (20%) sono state ottenute attraverso diluizioni a partire da una soluzione di etanolo al 96% (Medicamenta, 1991 e 1992) e somministrate per via intragastrica mediante l'utilizzo di un ago da alimentazione in acciaio inox. La ketamina HCl (100 mg/Kg Ketavet 50, Gellini International, Aprilia, Italia) è stata somministrata ai ratti per via intraperitoneale.

- ✓ **Per gli esperimenti con la cocaina** sono stati impiegati ratti maschi delle due linee RHA e RLA del peso compreso tra 300-380 g. I ratti sono stati alloggiati in gruppi di 4 per gabbia, con ciclo artificiale luce/buio di 12 ore ciascuno (accensione luci 8:00 AM) con acqua e cibo standard (Global diet 2018-Mucedola, Italy) ad libitum, in condizioni standard di temperatura (23°) e umidità (60%). Al fine di evitare possibili interferenze dello stress dovuto alla procedura di somministrazione, i ratti sono stati manipolati per 1-2 minuti ogni giorno per almeno 3 giorni prima dell'esperimento. Gli esperimenti sono stati condotti tra le 10:00 del mattino e le 5:00 del pomeriggio. La cocaina HCl (Mcfarlan-Smith Ltd, Edimburgo, Regno Unito) e il cloralio idrato (450 mg/kg) (Carlo Erba, Milano, Italia) sono stati dissolti in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%, p/v) e somministrati per via intraperitoneale (i.p.).

Immunoistochimica: neuroni pERK

Neuroni pERK positivi

Dopo essere stati profondamente anestetizzati, gli animali sono stati sottoposti ad una perfusione transcardiaca effettuata con PBS (phosphate buffered saline; 137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) ghiacciato, e paraformaldeide (PFA) al 4%. In accordo con precedenti studi (Acquas et al., 2007; Ibba et al., 2009), l'intervallo di tempo interscorso tra il trattamento con il farmaco e l'anestesia per la perfusione è stato scelto sulla base del tempo necessario per raggiungere il picco di DA extracellulare nel Acb (Cadoni & Di Chiara, 1999; Zocchi et al., 2003; Lecca et al., 2004; Giorgi et al., 2003; Giorgi et

al., 2007). Dopo la perfusione, i cervelli sono stati prelevati e posti all'interno di contenitori per la post fissazione (overnight) in PFA 4% a 4°C. In accordo con gli atlanti di Paxinos and Watson (1998) e Paxinos and Franklin (2001), mediante vibratomo (Leica VT1000-Leyca, Germany) sono state ottenute delle sezioni di cervello spesse 40 micrometri relative alle regioni di interesse in questo lavoro di ricerca (PFCx, Acb, BSTL, CeA e BLA). Le fettine ottenute sono state conservate a -20°C in una soluzione crioprotettiva prima di procedere con il dosaggio immunostochimico secondo il protocollo per fettine flottanti. Tale protocollo si è svolto in due giorni consecutivi; durante il primo giorno le sezioni sono state lavate una volta in TBS (Trizma buffered Saline) e due volte in TBS-TX (TBS contenente lo 0.1% di Triton X-100) e poi incubate per 30 minuti in H₂O₂ all'1% in TBS. Le sezioni sono state poi incubate per un'ora in una soluzione di BSA (Bovine Serum Albumine) al 3%. L'incubazione con anticorpo primario (anti pERK, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) (1:300) è stata condotta overnight a 4°C e sotto continua agitazione (opportuni controlli negativi sono ottenuti incubando alcune fette in una soluzione di TBS-BSA 3% senza anticorpo primario). Il giorno seguente, dopo opportuno risciacquo con TBS-TX, le sezioni sono state incubate prima con l'anticorpo secondario biotinilato (1:800) (Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA, USA) e poi col complesso ABC (Avidin Biotin peroxidase Complex) preparato secondo quanto suggerito dal produttore (Vecstain ABC kit, Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA, USA). Dopo ulteriori lavaggi con TBS-TX è stata aggiunta una soluzione di 3-3'-diaminobenzidina (10 mg/ml) e lasciata agire fino allo sviluppo di una colorazione bruna. Le sezioni sono state poi ripetutamente sciacquate e montate sui vetrini porta-oggetto rivestiti di gelatina e successivamente disidratati attraverso una scala alcolica a gradazione crescente e infine sottoposti a due passaggi in xilene. Le analisi quantitative sono state effettuate utilizzando un microscopio Zeiss Axioskop 40 (Zeiss, Germany) dotato di obiettivi PL Floutar 10X, 40X e 100X oil e collegato con una fotocamera digitale (Nikon D-5000). L'analisi delle immagini e le quantificazioni sono state condotte in blind rispetto ai trattamenti farmacologici e ai gruppi sperimentali. A tal fine è stato usato il software Bioscan Optimas, versione 6.5.1. Le immagini ottenute ad opportuno ingrandimento (10X) sono state usate per contare automaticamente il numero di neuroni pERK-positivi/area mediante l'uso del software ImageJ, attraverso la sottrazione automatica del background, per evitare errori dello sperimentatore (Kapur et al., 1985).

Analisi statistica

Esperimenti con la morfina su ratti e topi: I risultati immunostochimici espressi come valore medio % del numero di neuroni pERK positivi/area \pm SEM sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il software di analisi Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Più specificamente:

- a) nei ratti Sprague-Dawley è stata condotta una two-way ANOVA considerando l'area cerebrale e il trattamento quali variabili indipendenti e una three-way ANOVA considerando l'area cerebrale, il trattamento e il pretrattamento quali variabili indipendenti;
- a) nei ratti Wistar è stata condotta una one-way ANOVA considerando il trattamento quale variabile indipendente ;
- b) nei ratti delle linee RHA ed RLA è stata condotta una two-way ANOVA considerando il trattamento e la linea quali variabili indipendenti;
- c) nei topi CD-1 è stata condotta una two-way ANOVA considerando l'area cerebrale e il trattamento quali variabili indipendenti e una three-way ANOVA considerando l'area cerebrale, il trattamento e il pre-trattamento quali variabili indipendenti;
- d) nei topi C57BL/6J è stata condotta una one-way ANOVA considerando il trattamento quale variabile indipendente.

Quando consentito dalla presenza di significativi effetti e interazioni, è stato eseguito il Fisher post-hoc test per permettere confronti multipli, con significatività statistica stabilita per $p < 0.05$.

Esperimenti con l'etanolo su ratti sP-sNP: I risultati immunostochimici espressi come valore medio % del numero di neuroni pERK positivi/area \pm SEM sono stati analizzati mediante una two-way ANOVA considerando la media % dei neuroni pERK-positivi/area quale variabile dipendente e le linee dei ratti (n 2 = sP e sNP) e le dosi di etanolo (n = 4 0, 0.5, 1 e 2 g/kg) quali variabili indipendenti. Quando consentito dalla presenza di significativi effetti e interazioni, è stato eseguito LSD post-hoc test per permettere confronti multipli, con significatività statistica stabilita per $p < 0.05$.

Esperimenti con la cocaina su ratti RHA-RLA: I risultati immunostochimici espressi come valore medio \pm SEM del numero di neuroni pERK positivi/area stati analizzati mediante una one-way ANOVA considerando la linea quale variabile indipendente, e una two-way ANOVA

considerando la linea e il trattamento quali variabili indipendenti. Quando consentito dalla presenza di significativi effetti e interazioni, è stato eseguito LSD post-hoc test per permettere confronti multipli, con significatività statistica stabilita per $p < 0.05$.

RISULTATI

Esperimenti con la morfina

Effetti della morfina dose- e tempo-dipendenti sull'immunoreattività della pERK nel AcbSh e nel AcbC dei ratti Sprague-Dawley e Wistar

Le figure 1A e 1B mostrano l'effetto della dose (0, 1 e 5 mg/kg a 20 minuti) e del tempo (20 e 40 minuti dopo la somministrazione di 0 e 5 mg/kg), rispettivamente, sugli effetti della morfina sulla % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC. L'ANOVA, applicata all'analisi degli effetti delle variabili indipendenti dose e area cerebrale ai risultati della somministrazione di morfina (figura 1B), ha rivelato un significativo effetto del trattamento [$F_{2,273}=78.07$, $p<0.0001$] e delle aree cerebrali [$F_{1,273}=55.31$, $p<0.0001$] e una significativa interazione trattamento-area [$F_{2,273}=18.78$, $p<0.0001$]. Inoltre, l'ANOVA, applicata all'analisi degli effetti delle variabili indipendenti tempo, trattamento e area cerebrale ai risultati della somministrazione di morfina sulla % di neuroni pERK-positivi/area (figura 2B) ha rivelato significativi effetti della dose [$F_{1,102}=27.44$, $p<0.0001$] ma non dell'area cerebrale [$F_{1,102}=0.52$, $p<0.46$] né del tempo [$F_{1,102}=1.83$, $p<0.18$]. L'analisi post hoc di Fisher ha rivelato che la morfina ha ridotto, significativamente, la % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC (1 e 5 mg/kg a 20 minuti, figura 1B). Inoltre, la stessa analisi ha rivelato che la morfina (5 mg/kg, a 20 e 40 minuti, figura 2B) ha ridotto significativamente la % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC sebbene queste riduzioni non siano risultate statisticamente differenti dalle altre.

La figura 2 mostra l'effetto della somministrazione di morfina alle dosi di 0 e 5 mg/kg sulla % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC dei ratti Wistar. L'ANOVA a una via dei dati raccolti nel AcbSh ha rivelato un significativo effetto del trattamento [$F_{1,18}=4,55$, $p<0.05$]. L'analisi post hoc di Fisher ha rivelato che la somministrazione di 5 mg/kg di morfina riduce la % dei neuroni pERK-positivi/area rispetto al gruppo di controllo (0 g/kg morfina) nel AcbSh dei ratti Wistar.

Effetto del pre-trattamento con SCH 39166 o naltrexone sull'immunoreattività modulata dalla morfina delle pERK nel AcbSh e nel AcbC dei ratti Sprague-Dawley

La Figura 3 mostra gli effetti della somministrazione di morfina (0 e 5 mg/kg, a 40 minuti) sulla % di neuroni pERK-positivi/area e gli effetti del pre-trattamento con SCH 39166 (50 μ g/kg) o naltrexone (1.5 mg/kg). L'ANOVA a tre vie dei risultati della somministrazione di morfina e del pre-trattamento con SCH 39166 sulla % di neuroni pERK-positivi/area ha rivelato un effetto del trattamento [$F_{1,88}=18.72$, $p<0.0001$] e un'interazione significativa tra

pre-trattamento e trattamento [$F_{1,88}=11.06$, $p<0.001$]. In maniera simile, l'ANOVA a tre vie dei risultati della somministrazione di morfina e del pre-trattamento con naltrexone sulla % di neuroni pERK-positivi/area ha rivelato un'interazione significativa tra pre-trattamento e trattamento [$F_{1,80}=7.37$, $p<0.008$]. L'analisi post hoc di Fisher ha rivelato che la morfina riduce la % di neuroni pERK-positivi/area rispetto alla salina nel AcbSh e AcbC e che il pre-trattamento con SCH 39166, di per sé, riduce significativamente la % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC. Inoltre, l'analisi post hoc di Fisher ha rivelato che il pre-trattamento con naltrexone, ma non con SCH 39166, ha inibito la riduzione della % di neuroni pERK-positivi/area indotta dalla morfina nel AcbSh e nel AcbC.

Effetto della morfina sull'immunoreattività delle pERK nel AcbSh e nel AcbC dei ratti RHA e RLA

La Figura 4 mostra l'effetto della somministrazione di morfina alle dosi di 0 e 0.5 mg/kg (le medesime impiegate in Lecca et al., 2004) sulla % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh (pannello superiore) e nel AcbC (pannello inferiore). L'ANOVA a due vie dei dati raccolti nel AcbSh ha rivelato un significativo effetto della linea [$F_{1,51}=11,107$ $p<0.016$], del trattamento [$F_{1,51}=5.65$, $p<0.021$] ed una significativa interazione linea-trattamento [$F_{1,51}=11,107$, $p<0.016$]. L'applicazione del post hoc test secondo Fisher ha rivelato che la somministrazione di 0.5 mg/kg di morfina riduce la % dei neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh dei ratti RLA ma non RHA e che l'effetto della morfina nel AcbSh degli RLA è significativamente diverso da quello negli RHA.

Effetti della morfina dose- e tempo-dipendenti sull'immunoreattività delle pERK nel AcbSh e nel AcbC dei topi CD-1 e C57BL/6J

La figura 5 mostra l'effetto della dose (0, 1 e 5 mg/kg a 20 minuti) e del tempo (20 e 40 minuti dopo la somministrazione di 0 e 5 mg/kg), rispettivamente, sugli effetti della morfina sulla % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC. L'ANOVA, applicata all'analisi degli effetti delle variabili indipendenti dose e area cerebrale ai risultati della somministrazione di morfina (figura 5A), non ha rivelato un significativo effetto del trattamento [$F_{2,53}=1.24$, NS] né delle aree cerebrali [$F_{1,53}=3.43$, NS] ma una significativa interazione trattamento-area [$F_{2,53}=4.36$, $p<0.017$]. Inoltre, l'ANOVA applicata all'analisi degli effetti delle variabili indipendenti tempo, dose e area cerebrale ai risultati della somministrazione di morfina sulla % di neuroni pERK-positivi/area (figura 5B) non ha rivelato

significativi effetti della dose [$F_{1,84}=1.75$, NS] dell'area cerebrale [$F_{1,84}=2.40$, NS], del tempo [$F_{1,84}=2.35$, NS] nè una significativa interazione dose-tempo [$F_{1,84}=2.34$, NS]. L'analisi post hoc di Fisher ha rivelato che la morfina incrementa, significativamente, la % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh (5 mg/kg a 20 minuti).

La figura 6 mostra l'effetto della somministrazione di morfina (0 e 5 mg/kg a 20 minuti) sulla % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e AcbC di topi C57BL/6J. L'ANOVA ad una via dei dati raccolti nel AcbSh ha rivelato un significativo effetto del trattamento [$F_{1,8}=8.28$, $p<0.020$]. L'applicazione del LSD post hoc test ha rivelato che la somministrazione di 5 mg/kg di morfina incrementa la % dei neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh rispetto al gruppo di controllo (0 mg/kg morfina).

Effetti del pre-trattamento con SCH 39166 o naltrexone sull'immunoreattività delle pERK modulata dalla morfina nel AcbSh e nel AcbC dei topi CD-1

La Figura 7 mostra gli effetti della somministrazione di morfina (0 e 5 mg/kg, a 20 minuti) sulla % di neuroni pERK positivi/area e gli effetti del pre-trattamento con SCH 39166 (50 μ g/kg) o naltrexone (1.5 mg/kg). L'ANOVA a tre vie dei risultati della somministrazione di morfina e del pre-trattamento con SCH 39166 sulla % di neuroni pERK-positivi/area ha rivelato effetti significativi del pre-trattamento [$F_{1,69}=15.75$, $p<0.001$] e dell'area cerebrale [$F_{1,69}=4.07$, $p<0.047$]. L'ANOVA a tre vie dei risultati della somministrazione di morfina e del pre-trattamento con naltrexone sulla % di neuroni pERK-positivi/area ha rivelato un effetto dell'area cerebrale [$F_{1,69}=4.43$, $p<0.038$] e un'interazione significativa tra trattamento e area cerebrale [$F_{1,69}=4.12$, $p<0.04$]. L'analisi post hoc secondo Fisher ha rivelato che la morfina aumenta la % di neuroni pERK-positivi/area rispetto alla salina nel AcbSh ma non nel AcbC e che il pre-trattamento con SCH 39166 e naltrexone inibisce gli aumenti indotti dalla morfina.

Esperimenti con l'etanolo

Effetti dell'etanolo sull'immunoreattività delle pERK nel AcbSh e nel AcbC dei ratti sP e sNP

La figura 8 mostra l'effetto della somministrazione di etanolo (0, 0.5, 1 e 2 g/kg) ai ratti sP e sNP sulla % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh (pannello superiore) e nel AcbC (pannello inferiore). L'ANOVA a due vie dei dati raccolti nel AcbSh rivela un significativo effetto della dose [$F_{3,40}=2.92$, $p<0.045$] e della linea [$F_{1,40}=4.25$, $p<0.045$] ma non una significativa interazione dose-linea [$F_{3,40}=0.88$, NS]. L'applicazione del LSD post hoc test ha rivelato che

la somministrazione di 1 g/kg di etanolo incrementa la % di neuroni pERK-positivi/area rispetto al gruppo di controllo (0 g/kg etanolo) nel AcbSh dei ratti sP; di contro, la medesima analisi post hoc ha rivelato che la somministrazione di etanolo non influisce sull'espressione della % di neuroni pERK-positivi/area nei ratti sNP. L'ANOVA a due vie dei dati misurati nel AcbC rivela un significativo effetto della dose [$F_{3,40}=3.21$, $p<0.03$] e della linea [$F_{1,40}=7.17$, $p<0.01$] ed una significativa interazione dose per linea [$F_{3,40}=3.43$, $p<0.026$]. L'applicazione del LSD post hoc test ha rivelato che la somministrazione di 1 g/kg di etanolo incrementa la % di neuroni pERK-positivi/area rispetto al gruppo di controllo (0 g/kg etanolo) nel AcbC dei ratti sP; di contro, l'analisi post hoc ha rivelato che la somministrazione di etanolo non influisce sull'espressione della % di neuroni pERK-positivi/area nei ratti sNP.

Effetti dell'etanolo sull'immunoreattività delle pERK nella PFCx PrL e nella PFCx IL dei ratti sP e sNP

La figura 9 mostra l'effetto della somministrazione di etanolo (0, 0.5, 1 e 2 g/kg) ai ratti sP e sNP sulla % di neuroni pERK-positivi/area nella PFCx PrL (pannello superiore) e nella PFCx IL (pannello inferiore). L'ANOVA a due vie dei dati raccolti in PFCx PrL rivela un significativo effetto della linea [$F_{1,40}=4.17$, $p<0.047$] ma non della dose [$F_{3,40}=1.095$, NS], né una significativa interazione linea-dose [$F_{3,40}=0.85$, NS]. Inoltre l'ANOVA a due vie dei dati raccolti in PFCx IL non rivela un effetto significativo della dose [$F_{3,40}=0.49$, NS] né della linea [$F_{1,40}=3.33$, NS], così come non rivela una interazione dose-linea [$F_{3,40}=0.574$, NS].

Effetti dell'etanolo sull'immunoreattività delle pERK nel BSTL e nella CeA dei ratti sP e sNP

La figura 10 mostra l'effetto della somministrazione di etanolo (0, 0.5, 1 e 2 g/kg) ai ratti sP e sNP sulla % di neuroni pERK-positivi/area nel BSTL (pannello superiore) e nella CeA (pannello inferiore). L'ANOVA a due vie dei dati raccolti nel BSTL ha rivelato un significativo effetto della linea [$F_{1,40}=6.28$, $p<0.016$] ma non della dose [$F_{3,40}=0.58$ NS] né una significativa interazione linea-dose [$F_{3,40}=1.28$, NS]. Analogamente l'ANOVA a due vie dei dati raccolti nella CeA non ha rivelato nessun effetto significativo né della linea [$F_{1,40}=0.03$, NS] né della dose [$F_{3,40}=1.94$ NS], né una significativa interazione linea-dose [$F_{3,40}=0.85$, NS].

Esperimenti con la cocaina

Effetti della cocaina sull'immunoreattività delle pERK nel AcbSh e nel AcbC dei ratti RHA e RLA

La figura 11 mostra gli effetti della somministrazione di cocaina (5 mg/kg) sul valore medio di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh (pannello superiore) e nel AcbC (pannello inferiore) dei ratti RHA e RLA. L'ANOVA a due vie dei dati raccolti nel AcbSh rivela un significativo effetto della linea [$F_{1,16}=510.97$, $p<0.005$] e del trattamento [$F_{1,16}=54.92$, $p<0.05$] ma non un'interazione linea-trattamento [$F_{1,16}=52.80$, NS]. L'applicazione del LSD post hoc test ha rivelato che la cocaina incrementa significativamente il numero di neuroni pERK-positivi/area nei ratti RHA ma non in quelli RLA. Di contro, nessun effetto significativo della linea [$F_{1,16}=54.41$, NS], del trattamento [$F_{1,16}=50.88$, NS] né un'interazione linea-trattamento sono stati riscontrati nel AcbC di entrambe le linee.

Effetti della cocaina sull'immunoreattività delle pERK nella PFCx PrL e nella PFCx IL dei ratti RHA e RLA

La figura 12 mostra gli effetti della somministrazione di cocaina (5 mg/kg) sul valore medio di neuroni pERK-positivi/area nella PFCx IL (pannello superiore) e nella PFCxPrL (pannello inferiore) dei ratti RHA e RLA.

L'ANOVA a due vie dei dati raccolti in PFCx IL rivela un significativo effetto della linea [$F_{1,16}=515.06$, $p<0.01$] e del trattamento [$F_{1,16}=55.36$, $p<0.05$] ma non una interazione linea-trattamento [$F_{1,16}=50.24$, NS]. L'applicazione del LSD post hoc test ha rivelato che la cocaina incrementa significativamente il numero di neuroni pERK-positivi/area nei ratti RHA ma non in quelli RLA. Di contro nessuna variazione significativa si è osservata nella PFCx PrL di entrambe le linee; tuttavia, l'ANOVA a due vie dei dati raccolti in PFCx PrL ha rivelato un significativo effetto della linea [$F_{1,16}=515.51$, $p<0.002$] e un marginale effetto del trattamento [$F_{1,16}=54.79$, $p<0.05$] ma non una interazione linea-trattamento [$F_{1,16}=50.11$, NS], indicando che, indipendentemente dal trattamento, l'immunomarcatura della pERK è maggiore nella PFCx PrL degli RHA rispetto alla controparte RLA.

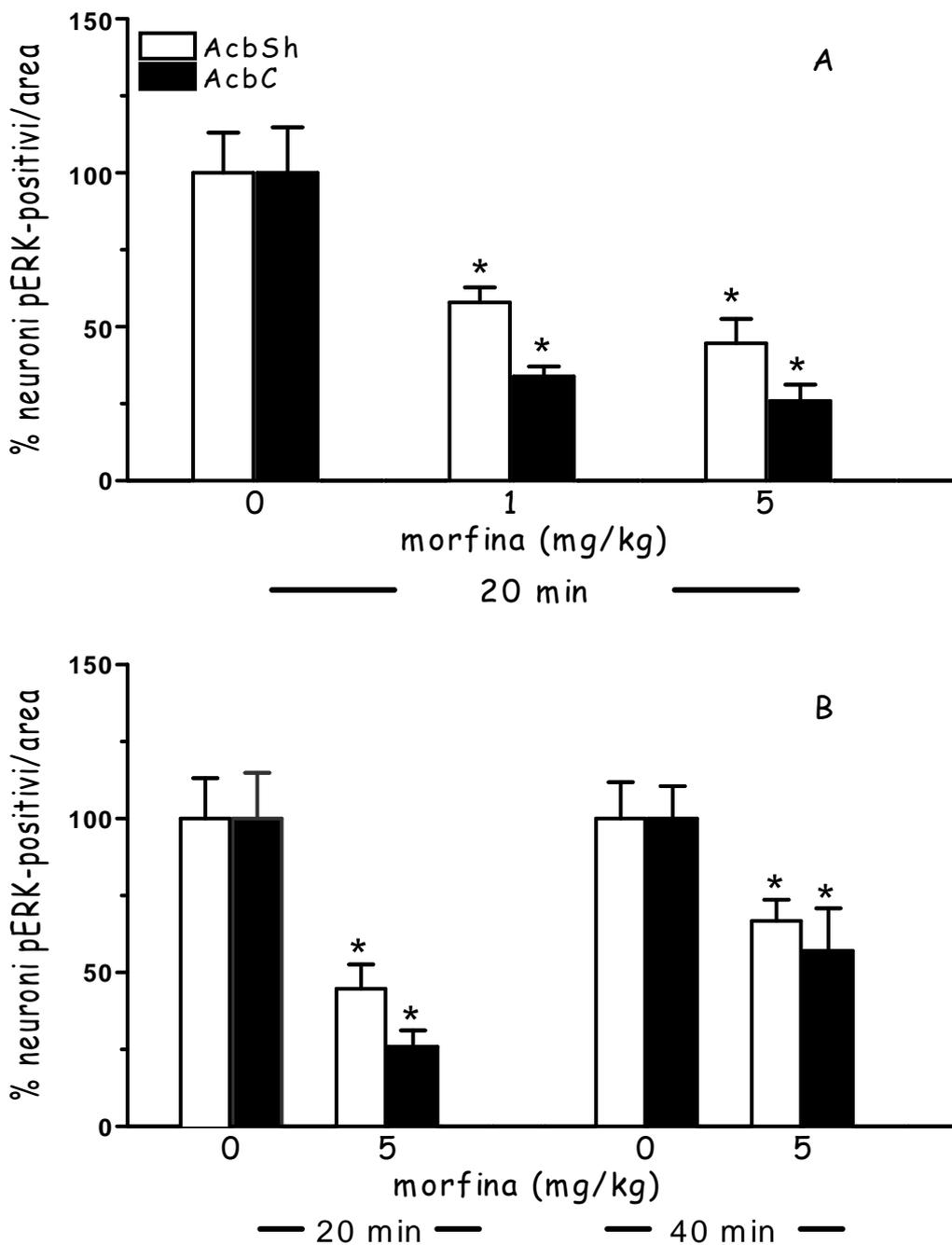
Effetti della cocaina sull'immunoreattività delle pERK nel BSTL, nella CeA e nella BLA dei ratti RHA e RLA

Le figure 13 14 mostrano gli effetti della somministrazione di cocaina (5 mg/kg) sul valore medio di neuroni pERK-positivi/area nel BSTL (Figura 13 pannello superiore) e nella CeA

(Figura 13 pannello inferiore) e nella BLA (Figura 14). L'ANOVA a due vie dei dati raccolti nel BSTL non ha rivelato un significativo effetto né della linea [$F_{1,14}=0.05$, NS] né del trattamento [$F_{1,40}=2.7$ NS]. Analogamente l'ANOVA a due vie dei dati raccolti nella CeA non ha rivelato nessun effetto significativo né della linea [$F_{1,16}=0.34$, NS] né del trattamento [$F_{1,16}=1.11$ NS]. L'ANOVA a due vie dei dati raccolti nella BLA ha rivelato un significativo effetto della linea [$F_{1,16}=4.69$, $p<0.05$] non del trattamento [$F_{1,16}=0.29$, NS] ma una significativa interazione linea-trattamento [$F_{1,16}=8.4$, $p<0.01$]. L'applicazione del LSD post hoc test ha rivelato che la cocaina incrementa significativamente il numero di neuroni pERK-positivi/area nella BLA dei ratti RLA ma non in quelli RHA.

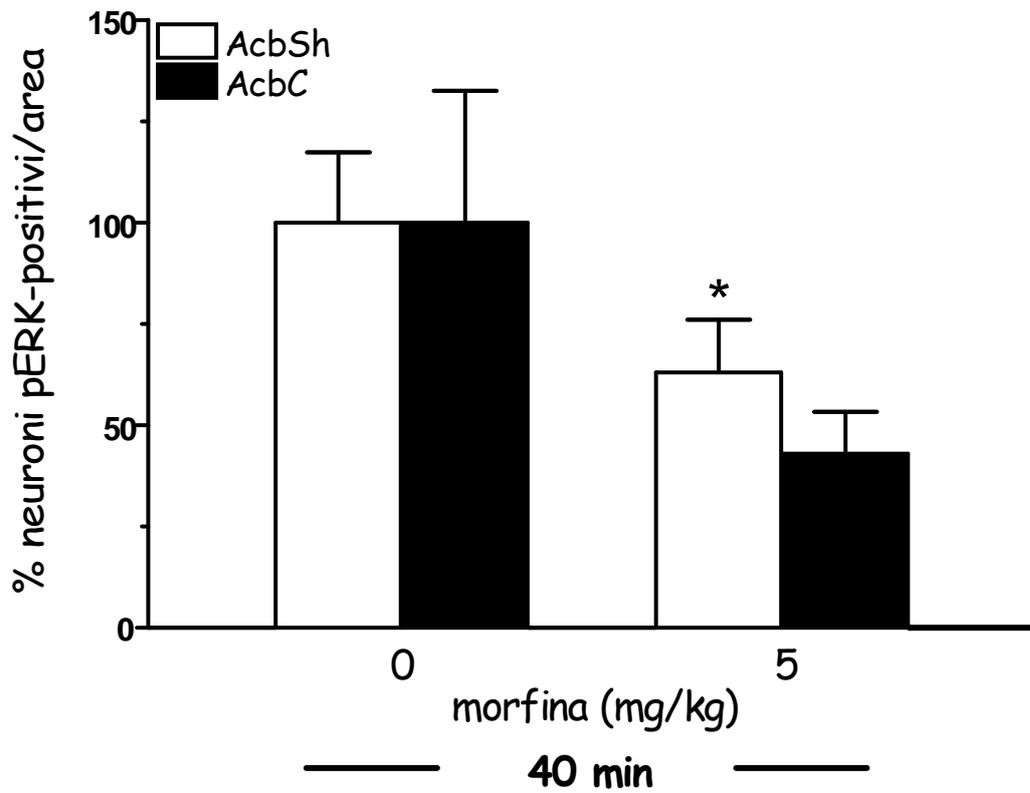
FIGURE

Figura 1



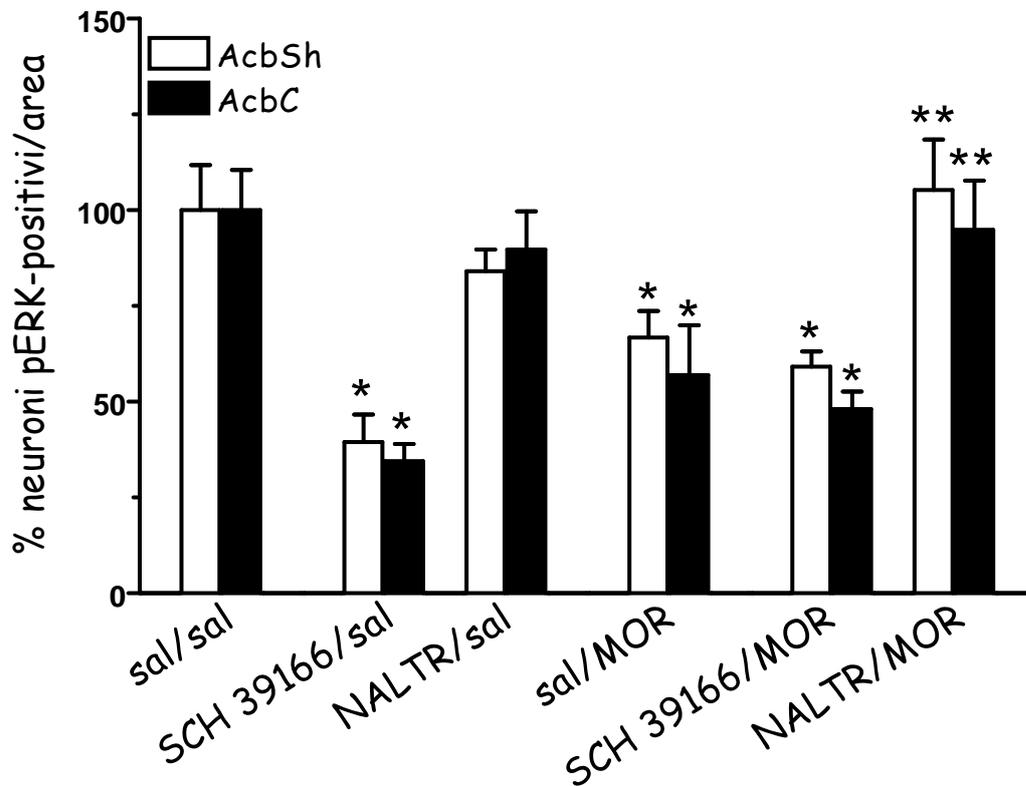
Effetti della somministrazione di morfina (0, 1 e 5 mg/kg, s.c. a 20 e 40 minuti) sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC dei ratti Sprague-Dawley. Gli istogrammi rappresentano la % della media \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto a 0 mg/kg di morfina (stessa area; stesso tempo).

Figura 2



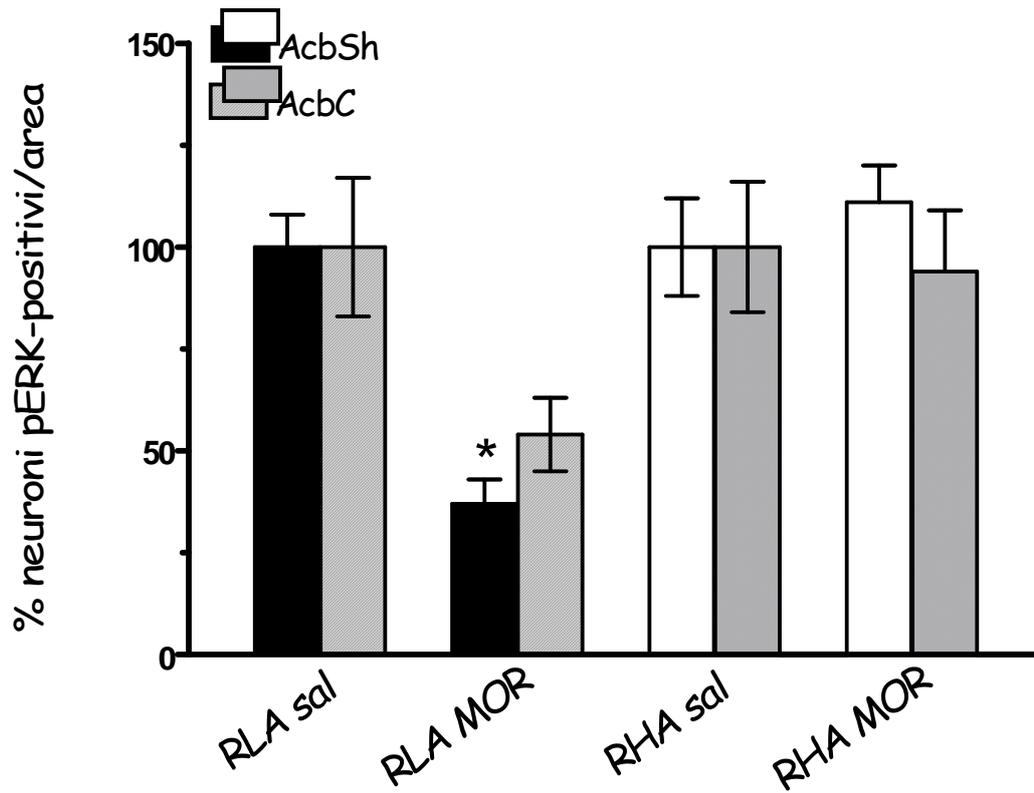
Effetto della somministrazione di morfina (5 mg/kg, s.c. a 40 minuti) sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC dei ratti Wistar. Gli istogrammi rappresentano il valore medio % \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto a 0 mg/kg di morfina (stessa area).

Figura 3



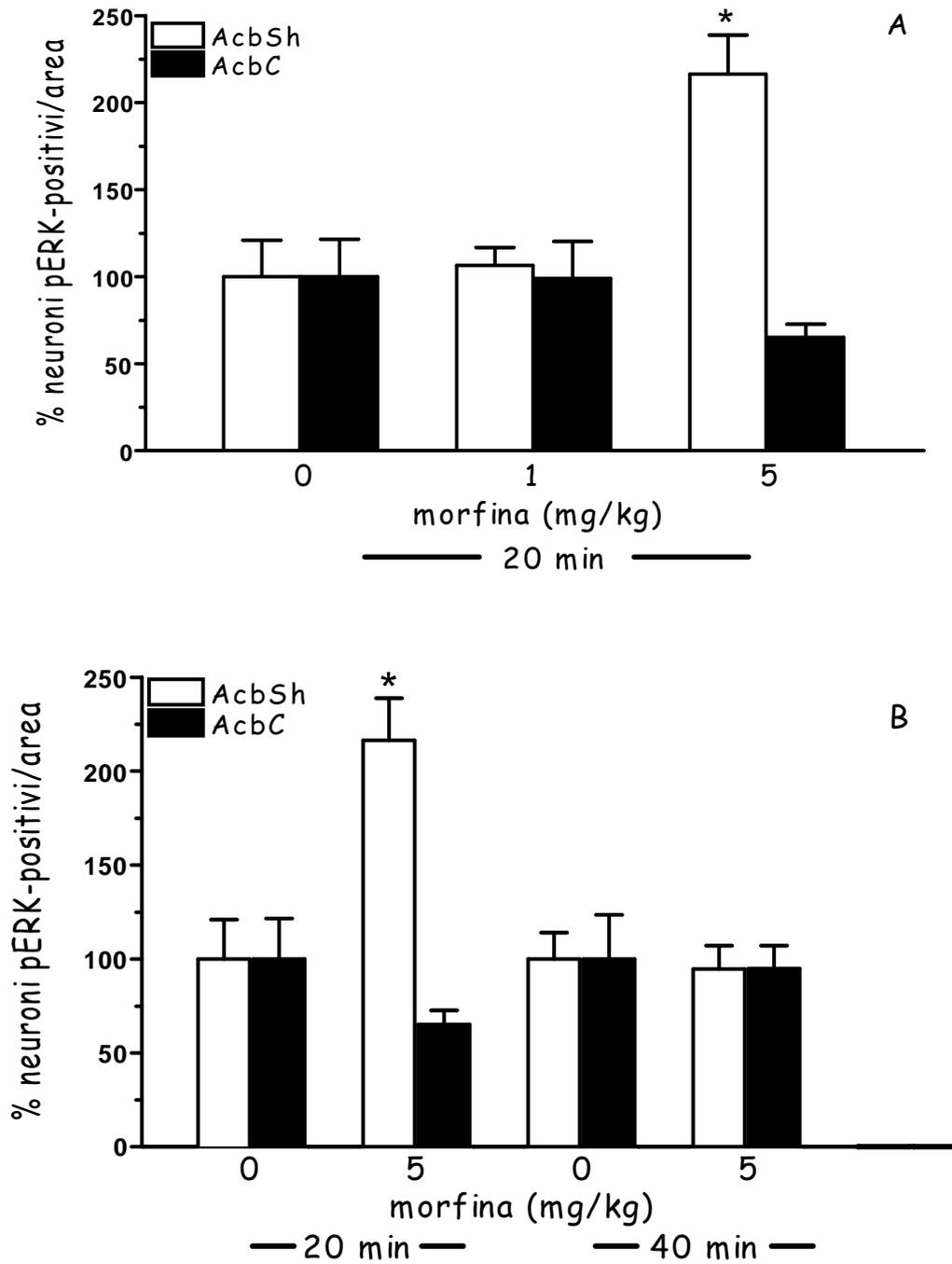
Effetti della somministrazione di morfina (0 e 5 mg/kg, s.c. a 40 minuti) e del pre-trattamento con SCH 39166 (50 μ g/kg s.c.) o naltrexone (1.5 mg/kg, s.c.) prima della salina o della morfina sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC dei ratti Sprague-Dawley. Gli istogrammi rappresentano il valore medio % \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto a sal/sal (stessa area); ** $p < 0.05$ rispetto a sal/MOR (stessa area).

Figura 4



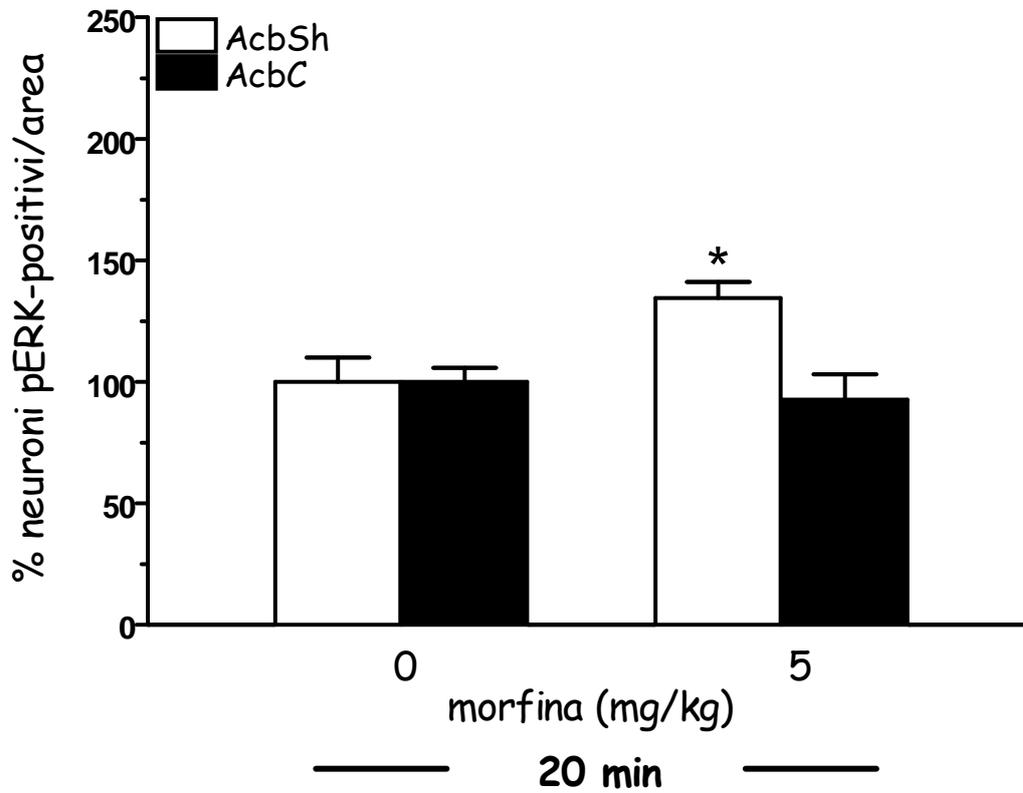
Effetto della somministrazione di morfina (0.5 mg/kg, s.c.) sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC dei ratti RHA ed RLA. Gli istogrammi rappresentano il valore medio % \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto a 0 mg/kg di morfina (stessa area).

Figura 5



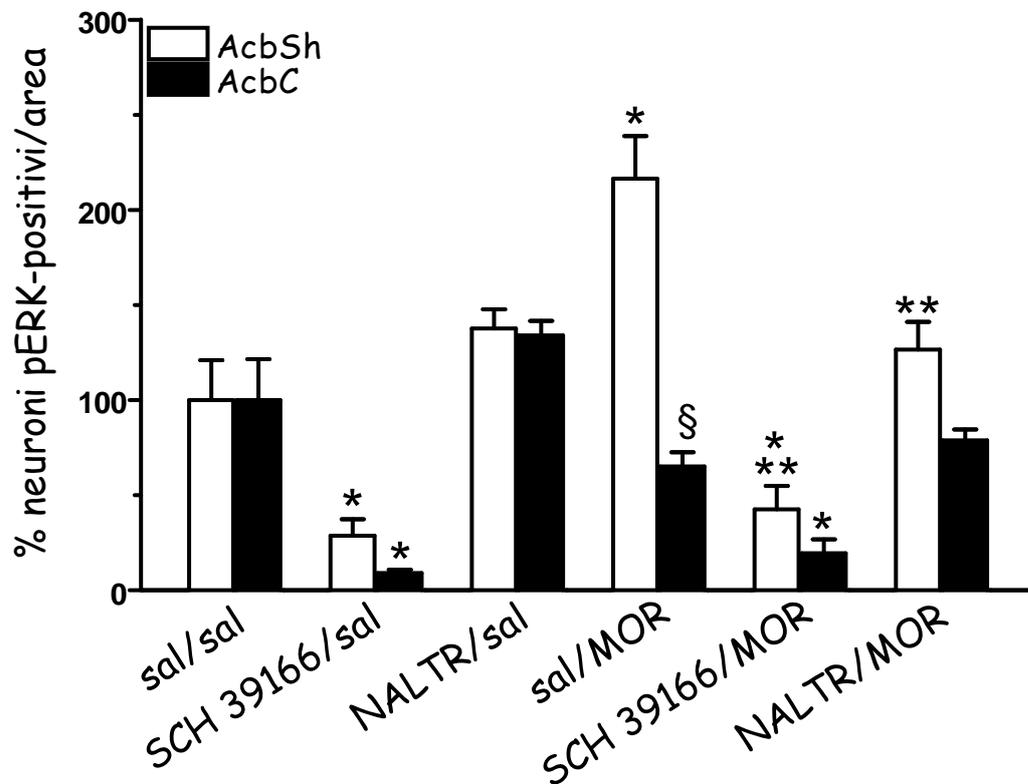
Effetti della somministrazione di morfina (0, 1 e 5 mg/kg, i.p. a 20 e 40 minuti) sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC dei topi CD-1. Gli istogrammi rappresentano il valore medio % \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto alla morfina 0 mg/kg (stessa area, stesso tempo).

Figura 6



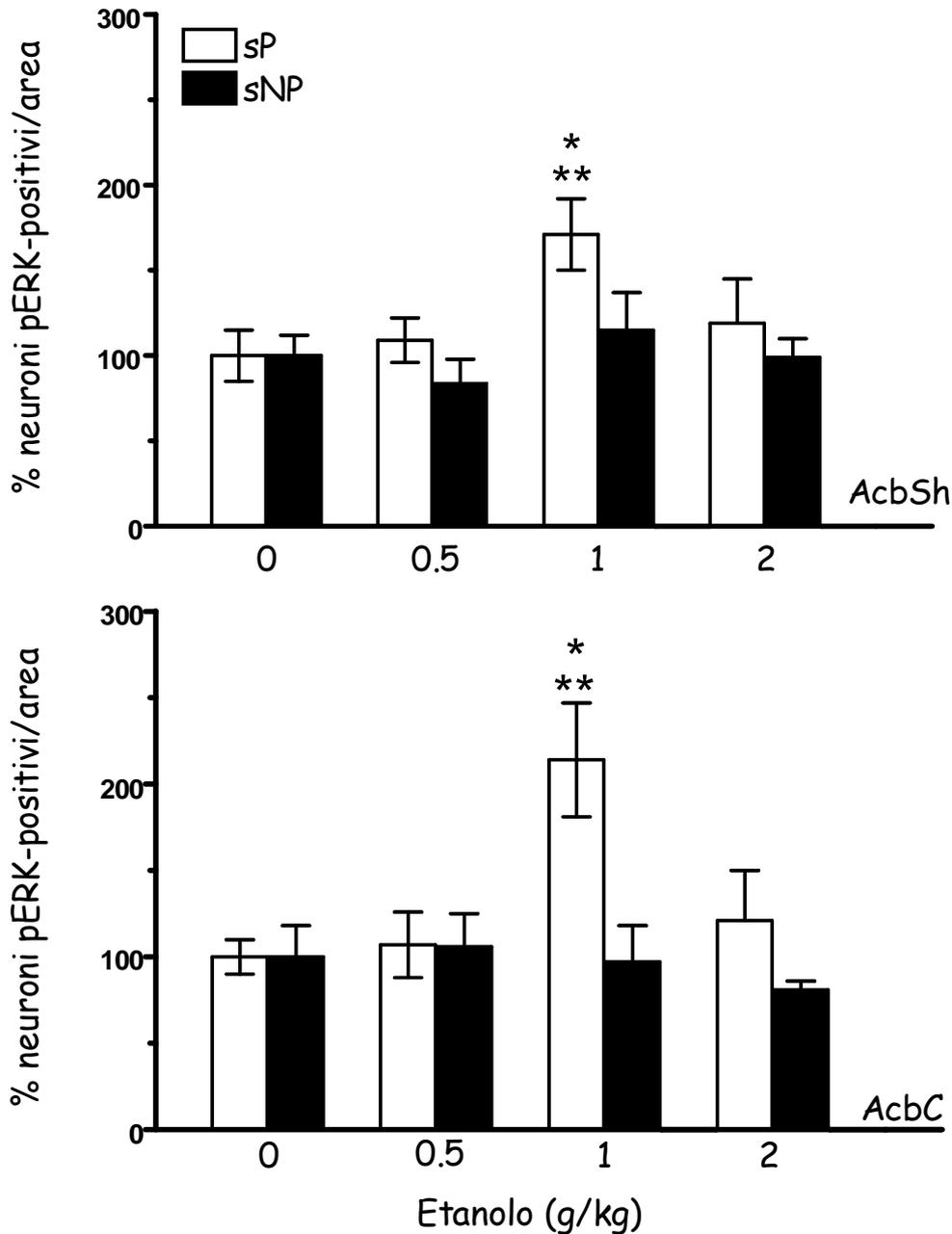
Effetto della somministrazione di morfina (5 mg/kg, i.p. a 20 minuti) sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC dei topi C57BL/6J. Gli istogrammi rappresentano il valore medio % \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto a 0 mg/kg di morfina (stessa area).

Figura 7



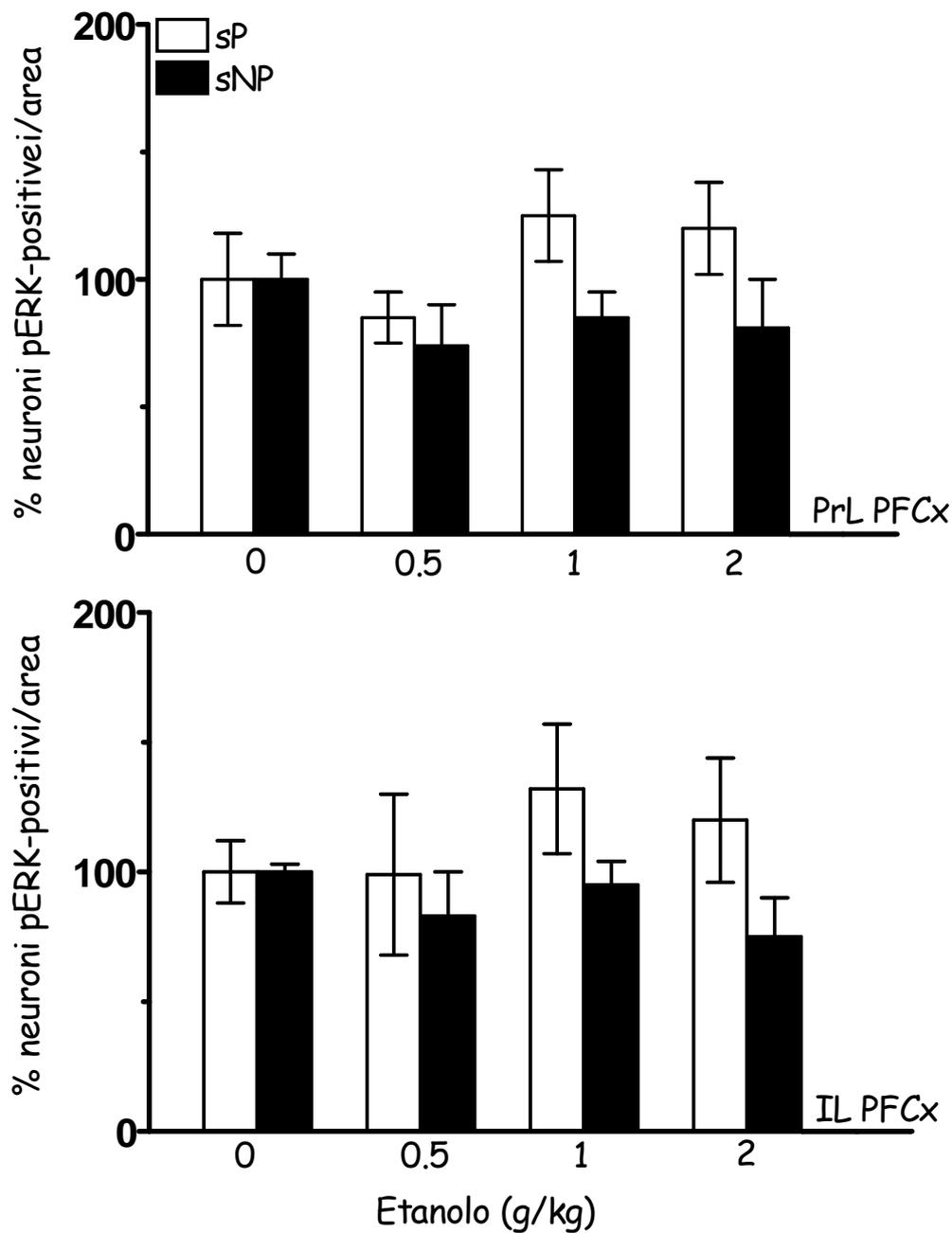
Effetti della somministrazione di morfina (0 e 5 mg/kg, i.p. a 20 minuti) e del pre-trattamento con SCH 39166 (50 μ g/kg, i.p.) o naltrexone (1.5 mg/kg, i.p.) prima della salina o di morfina sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC dei topi CD-1. Gli istogrammi rappresentano il valore medio % \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto a sal/sal (stessa area); § $p < 0.05$ tra AcbSh e AcbC (stesso trattamento); ** $p < 0.05$ rispetto a sal/MOR (stessa area).

Figura 8



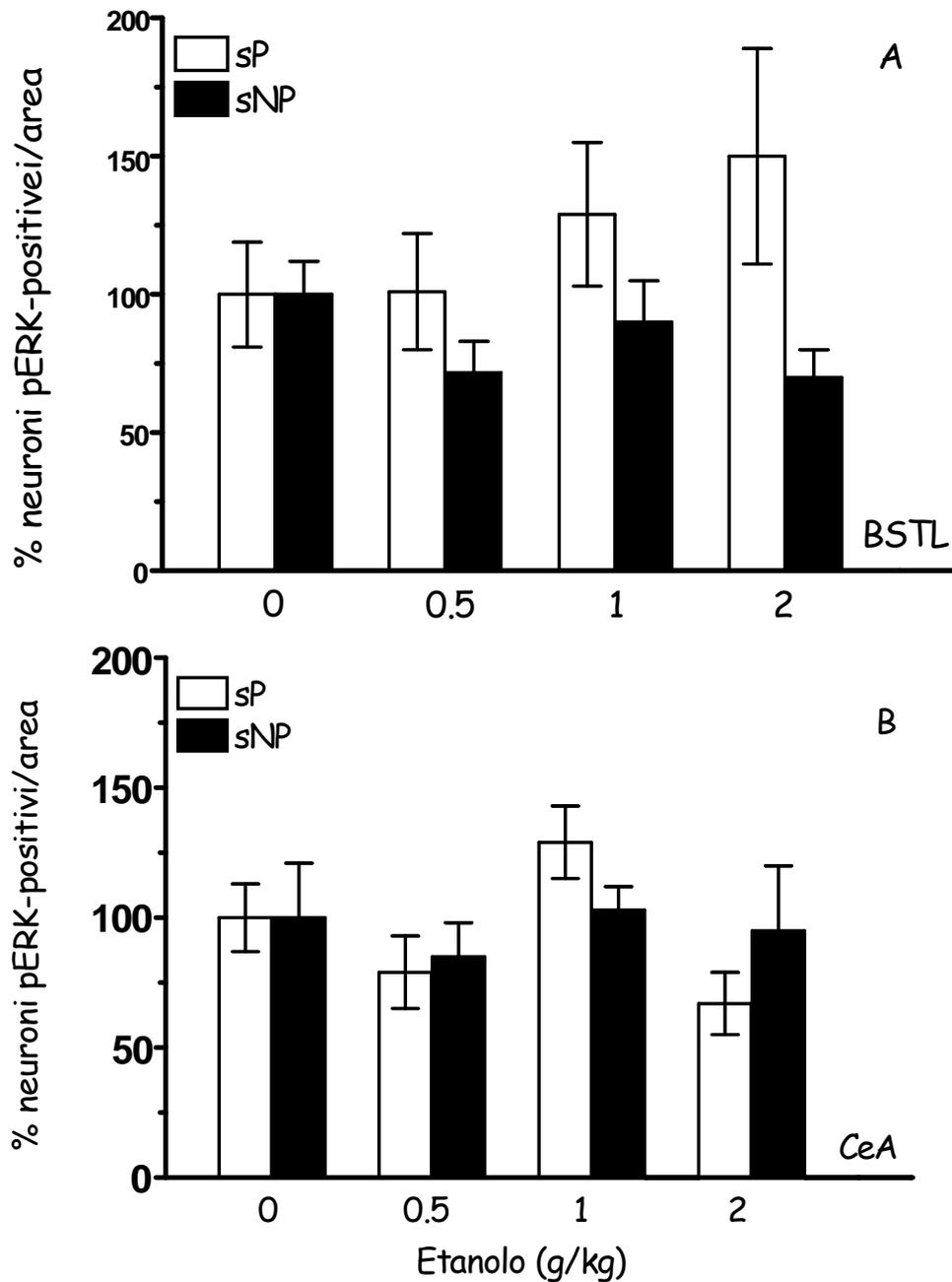
Effetti della somministrazione di etanolo (0, 0.5, 1 e 2 g/kg, i.g.) sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh (Pannello superiore) e nel AcbC dei ratti sP ed sNP (Pannello inferiore) dei ratti sP ed sNP. Gli istogrammi rappresentano il valore medio % \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto a 0 mg/kg di etanolo (stessa area e stessa linea); ** $p < 0.05$ rispetto alla dose 1 g/kg di etanolo dei ratti sNP.

Figura 9



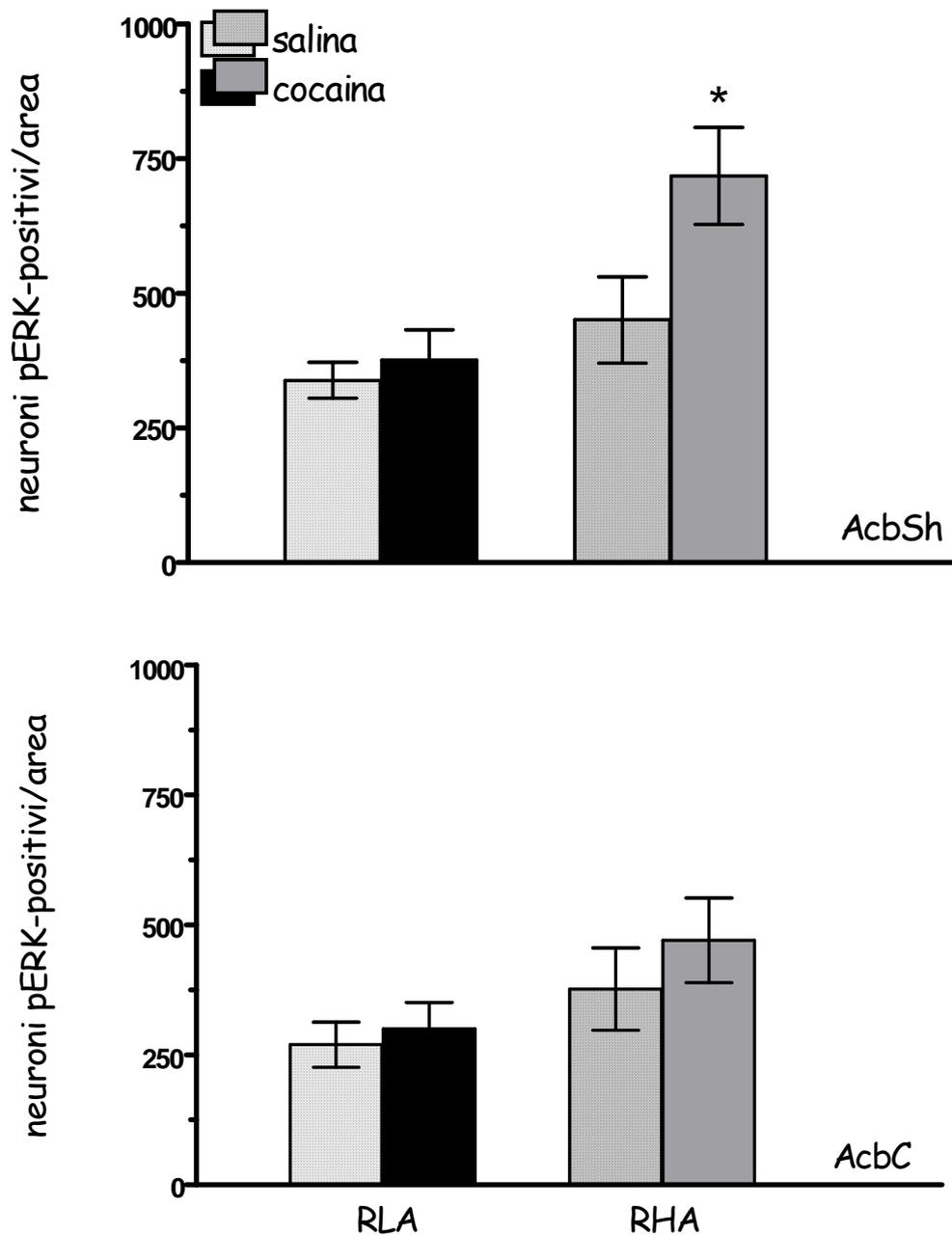
Effetti della somministrazione di etanolo (0, 0.5, 1 e 2 g/kg, i.g.) sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nella PFCx PrL (Pannello superiore) e nella PFCx IL (Pannello inferiore) dei ratti sP ed sNP. Gli istogrammi rappresentano il valore medio % \pm SEM.

Figura 10



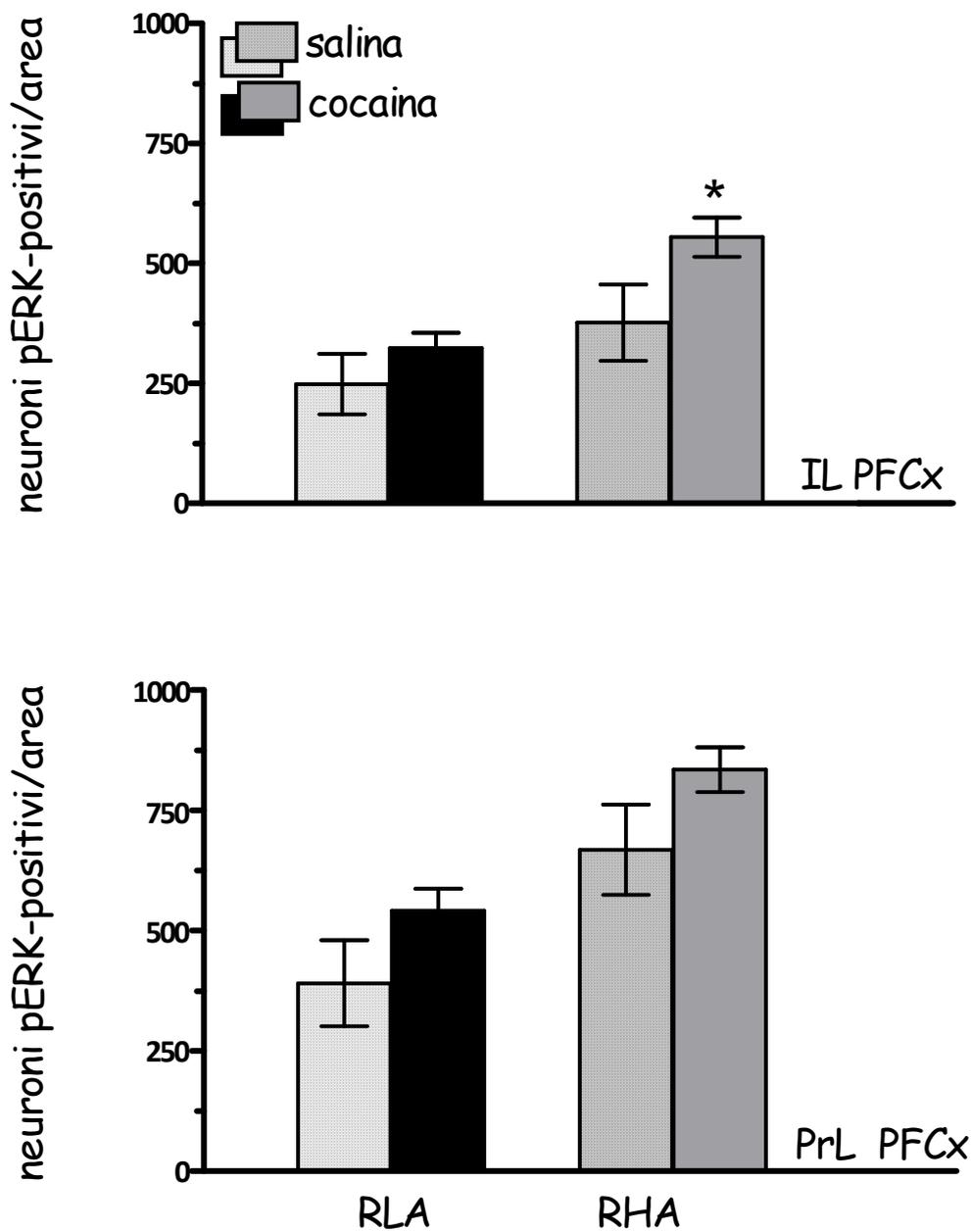
Effetti della somministrazione di etanolo (0, 0.5, 1 e 2 g/kg, i.g.) sul valore medio % di neuroni pERK-positivi/area nel BSTL (Pannello superiore 10A) e nella CeA (Pannello inferiore 10B) dei ratti sP ed sNP. Gli istogrammi rappresentano il valore medio % \pm SEM.

Figura 11



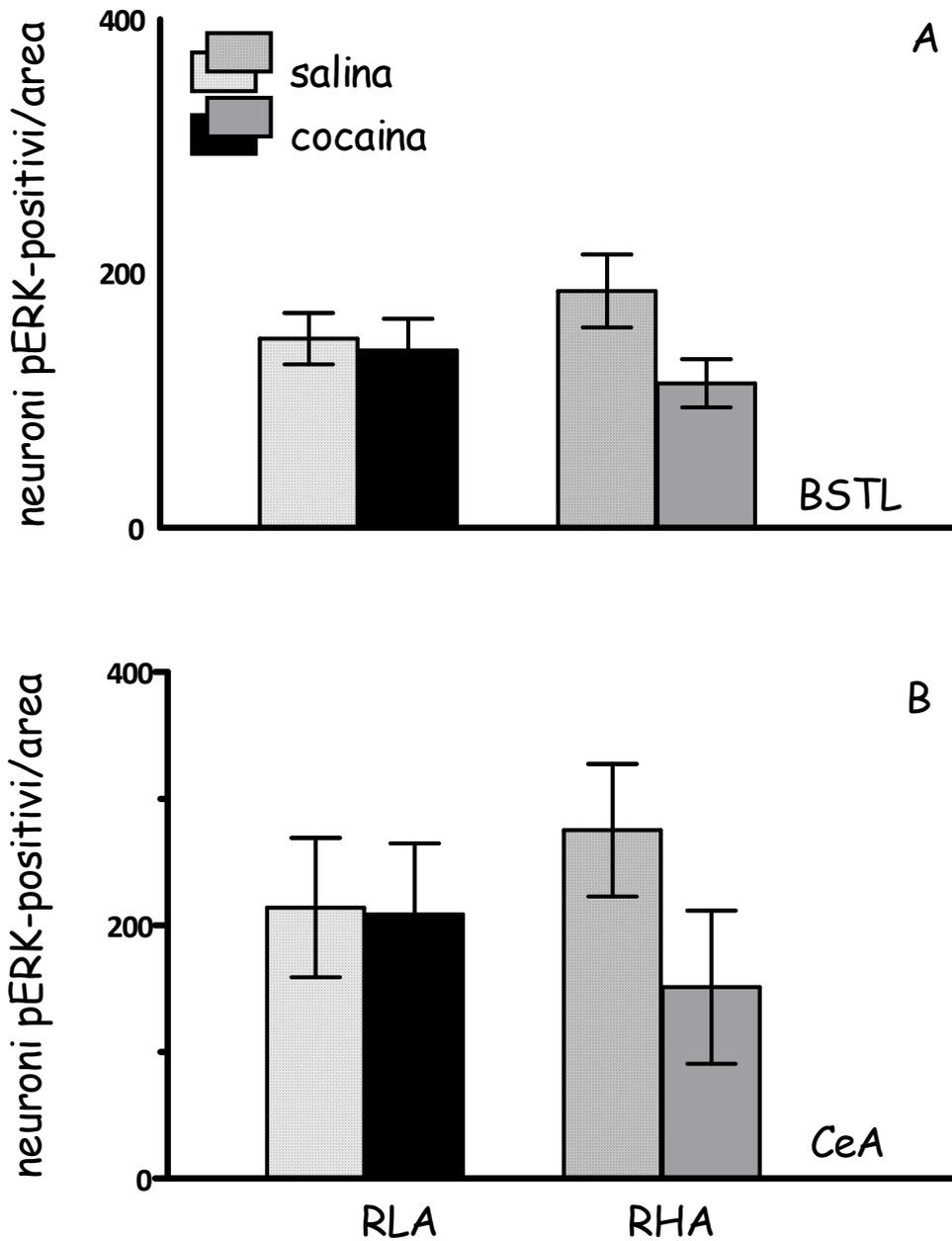
Effetti della somministrazione di cocaina (5 mg/kg, i.p.) sull'espressione dei neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh (Pannello superiore) e nel AcbC dei ratti RHA ed RLA (Pannello inferiore). Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto a 0 mg/kg di cocaina (stessa area e stessa linea).

Figura 12



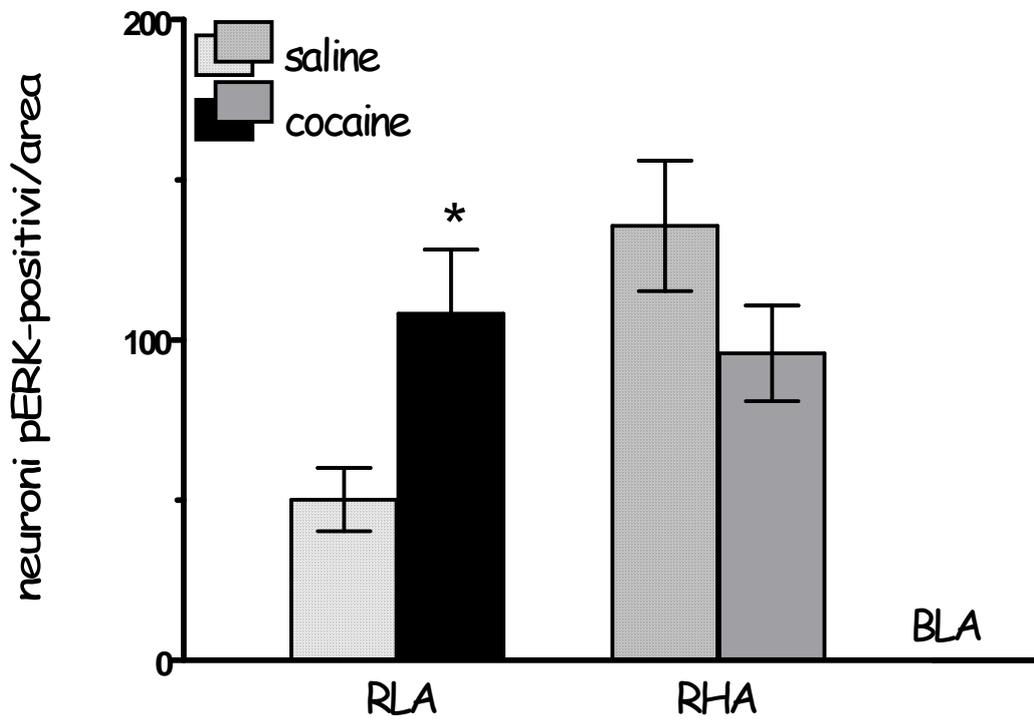
Effetti della somministrazione di cocaina (5 mg/kg, i.p.) sull'espressione dei neuroni pERK-positivi/area nella PFCx PrL (Pannello superiore) e nella PFCx IL dei ratti RHA ed RLA (Pannello inferiore). Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM. * $p < 0.05$ rispetto a 0 mg/kg di cocaina (stessa area e stessa linea).

Figura 13



Effetti della somministrazione di cocaina (5 mg/kg, i.p.) sull'espressione dei neuroni pERK-positivi/area nel BSTL (Pannello superiore 13A) e nella CeA (Pannello inferiore 13B) dei ratti RHA ed RLA. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM.

Figura 14



Effetto della somministrazione di cocaina (5 mg/kg, i.p.) sull'espressione dei neuroni pERK-positivi/area nella BLA dei ratti RHA ed RLA. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM.

* $p < 0.05$ rispetto a 0 mg/kg di cocaina (stessa area e stessa linea);

DISCUSSIONE

La fosforilazione delle ERK costituisce un importante processo biochimico comune a numerose funzioni cellulari quali la differenziazione e l'apoptosi (Zhang & Liu 2002) che si estendono, a livello neuronale, a rilevanti meccanismi alla base della plasticità sinaptica quali il controllo dell'espressione genica (Girault et al., 2007) e della long-term potentiation (Atkins et al., 1998; Thiels & Klann, 2001). L'abbondante espressione delle ERK nelle aree cerebrali del sistema mesocorticolimbico, inoltre, sottolinea la rilevanza di queste chinasi nella modulazione delle funzioni comportamentali mediate dal circuito DAergico della ricompensa (Girault et al., 2007; Gerdjikov & Beninger 2004). Conseguentemente, gli studi per la comprensione del ruolo delle ERK nei processi legati all'insorgenza di fenomeni di dipendenza (Valjent et al., 2004) hanno condotto allo sviluppo di un importante filone di ricerca volto a caratterizzarne il ruolo in vari aspetti della tossicodipendenza quali il consumo della sostanza, la sensibilizzazione e l'incubazione del craving (Lu et al., 2006; Girault et al., 2007), sino al loro coinvolgimento negli aspetti cognitivi (Shifflet & Balleine 2011).

È noto dalla letteratura che l'attivazione delle ERK ha luogo sia dopo somministrazione acuta (Acquas et al., 2007; Brami-Cherrier et al., 2005; Ibba et al., 2009; Salzmann et al., 2003; Valjent et al., 2000; 2001; 2004; Zhang et al., 2004) che cronica (Berhow et al., 1996; Muller & Unterwald 2004) di farmaci d'abuso, e che lo sviluppo della preferenza spaziale condizionata al farmaco, che si accompagna parallelamente all'attivazione delle ERK, è prevenuta dalla somministrazione di inibitori delle MEK (Valjent et al., 2000; 2001; Beninger & Gerdjikov, 2004; Salzmann et al., 2003). Tuttavia, sebbene un ruolo critico delle ERK nelle proprietà motivazionali dei farmaci d'abuso sia acclarato, ancora molti aspetti rimangono da approfondire. Tra questi, molte discrepanze rimangono circa la relazione tra l'espressione della pERK nell'Acb, in risposta alla somministrazione acuta di morfina, e la capacità di quest'ultima di esercitare i suoi effetti motivazionali rilevabili col metodo della CPP. Un altro aspetto che nello studio del ruolo delle ERK nelle basi neurobiologiche della dipendenza da sostanze non ha trovato ancora una sufficiente attenzione riguarda la componente della variabilità individuale e, in particolare, l'influenza che il genotipo esercita sui tratti comportamentali e neuronali potenzialmente responsabile di una responsività differenziale ai farmaci d'abuso. Nell'impostazione del presente lavoro queste osservazioni hanno stimolato il ricorso a diversi ceppi e linee di roditori selezionati, quali modelli utili ad investigare la relazione tra alcune classiche sostanze d'abuso e l'attivazione delle ERK nel contesto di

differenze geneticamente determinate di tratti comportamentali e neurochimici (Flagel et al., 2010; Crabbe et al., 1994). In tal senso, in particolare, i ratti psicogeneticamente selezionati delle linee Roman high- e low-avoidance (Giorgi et al., 2007) e quelli delle linee Sardinian alcohol preferring e Sardinian non-preferring (Colombo et al., 2006) rappresentano dei validi strumenti di ricerca poiché caratterizzati da drastiche differenze nel comportamento spontaneo e delle proprietà funzionali del circuito DAergico (Lecca et al., 2004; Giorgi et al., 2005; Melis et al., 2009) e da consistenti diversità neurobiologiche e comportamentali in risposta ai farmaci d'abuso (Colombo et al., 2006; Lecca et al., 2004).

Sulla base di queste premesse e tenendo conto delle evidenze sperimentali e delle discrepanze presenti in letteratura, il presente lavoro di ricerca si è sviluppato nel tentativo di fornire nuovi elementi alla comprensione del ruolo delle ERK negli effetti della morfina e al fine di comprendere se e in che modo la selezione genetica possa risultare anche in una responsività differenziale alle sostanze d'abuso (morfina, etanolo e cocaina) in termini di attivazione delle ERK.

La prima parte della presente ricerca ha documentato le complesse conseguenze della somministrazione acuta di morfina sulla fosforilazione delle ERK nel Acb, valutata attraverso un approccio immunostochimico e tenendo conto di vari fattori quali la diversa specie impiegata (ratti vs topi), il diverso ceppo (ratti: Sprague-Dawley vs Wistar vs Roman RHA vs Roman RLA; topi: CD-1 vs C57BL/6J), il tempo intercorso tra la somministrazione del farmaco e il sacrificio (20 e 40 minuti) nonché il coinvolgimento dei recettori DAergici D_1 e di quelli oppioidergici μ . I risultati di questo lavoro hanno rivelato che il numero dei neuroni pERK-positivi/area in seguito alla somministrazione acuta di morfina è stato significativamente ridotto nei ratti Sprague-Dawley, Wistar e in quelli appartenenti alla linea RLA, e incrementato -preferenzialmente nel AcbSh- nei topi CD-1 e C57BL/6J. Inoltre, la riduzione del numero dei neuroni pERK-positivi/area evocata dalla morfina nei ratti Sprague-Dawley è risultata prevenuta dal naltrexone, ma non dall'antagonista D_1 SCH 39166. Di contro, l'incremento del numero dei neuroni pERK-positivi/area è stato prevenuto, nei topi CD-1, dal pre-trattamento con entrambi gli antagonisti. Il fatto che SCH 39166, di per se, abbia ridotto, sia nei ratti Sprague-Dawley sia nei topi CD-1 la % dei neuroni pERK-positivi/area suggerisce l'esistenza di un antagonismo funzionale sull'espressione della pERK indotta dalla morfina nel Acb di entrambe le specie. L'osservazione che l'antagonista D_1 non abbia prevenuto

la riduzione della fosforilazione indotta dalla morfina, nei ratti, non appare tuttavia inaspettata e supporta la teoria secondo la quale i recettori D_1 giocano un ruolo chiave nel meccanismo dell'attivazione delle ERK nelle aree mesolimbiche (Girault et al., 2007). Infine, in accordo con quanto osservato anche da Muller & Unterwald (2004), la scoperta che la riduzione della % dei neuroni pERK-positivi/area riscontrata nei ratti Sprague-Dawley, sia stata prevenuta solo dall'antagonista oppioidergico, suggerisce dunque la stimolazione dei recettori μ quale meccanismo primario alla base del rilevato decremento nei ratti.

Gli esperimenti condotti riproducendo le medesime condizioni dello studio di Valjent et al., (2004) sui topi CD-1 hanno permesso di confermare: i) che la morfina (5 mg/kg a 20') incrementa la % dei neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e ii) che, sebbene con l'uso di un più specifico antagonista, SCH 39166 (McQuade et al., 1988), il blocco dei recettori D_1 riduce l'incremento del numero dei neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh.

L'incrementata fosforilazione delle ERK indotta dalla morfina nel AcbSh dei topi CD-1 e C57BL/6J è risultata apparentemente in contrasto con i dati riportati da Eitan et al. (2003) in topi C57BL/6J ottenuti mediante lo stesso approccio analitico e che documentano un decremento dell'espressione della pERK in risposta alla somministrazione acuta di morfina. Tuttavia la comparazione diretta con tali osservazioni è inesatta poiché le dosi impiegate nello studio di Eitan et al. (2003) sono da 10 a 20 volte maggiori rispetto a quelle utilizzate nel presente studio e in quello di Valjent et al. (2004).

Tuttavia considerando il fatto che il meccanismo di attivazione delle ERK da parte degli oppioidi non risulta ancora pienamente chiarito, altri fattori critici quali il differente ruolo svolto dalle due isoforme ERK₁ ed ERK₂ (Mazzucchelli et al., 2002) così come il coinvolgimento delle β -arrestine (Macey et al., 2006; Bohn et al., 2003) potrebbero dover essere tenuti in considerazione. Come già precedentemente descritto, sono conosciute almeno 8 isoforme di ERK (Cargnello & Roux, 2011), sebbene il significato funzionale sia parzialmente compreso solo per ERK₁, ERK₂ ed ERK₅ (Nishimoto & Nishida, 2006). È stato dimostrato che ERK₁ ed ERK₂ esercitano un controllo opposto sulla plasticità sinaptica nello striato così come suggerito da esperimenti di potenziamento a lungo termine (Mazzucchelli et al., 2002). Più specificamente, inoltre, la perdita dell'isoforma ERK₁ determina un incremento dell'attività dell'isoforma ERK₂, e questo risulta in un aumentato consolidamento della memoria valutata mediante semplici test di apprendimento (learning tasks), nonché in un'aumentata induzione del potenziamento a lungo

termine nel Acb. Inoltre, nei topi KO per l'isoforma ERK₁, la capacità della morfina di indurre CPP è significativamente più marcata rispetto al gruppo di controllo, suggerendo che l'aumentata plasticità sinaptica ERK₂-correlata potrebbe portare a conseguenze critiche sui comportamenti che necessitano di un efficiente network neuronale striatale (Mazzucchelli et al., 2002; Ferguson et al., 2006). Un'importante limitazione al presente lavoro è tuttavia rappresentata dall'utilizzo di un anticorpo capace di rilevare entrambe le isoforme ERK₁ ed ERK₂ (p44 e p42, rispettivamente, quando doppiamente fosforilate nella Thr202 e Tyr204 per ERK₁ e Thr185 e Tyr 187 per ERK₂)

Tuttavia alla luce dei risultati del presente studio si potrebbe supporre che la morfina agisca in maniera differenziale sulla fosforilazione delle due isoforme nel Acb e che la riduzione della % dei neuroni pERK-positivi/area sia correlata ad una riduzione del segnale ERK₁. Questa ipotesi potrebbe apparentemente contrastare con l'osservazione fatta da Muller & Unterwald (2004), che hanno riscontrato una riduzione significativa dei livelli di pERK₂, ed inalterati livelli di pERK₁ dopo 240 minuti dall'iniezione di morfina. Tuttavia, nel citato studio la morfina è stata somministrata a dosi da 10 a 50 volte maggiori e i ratti sono stati sacrificati a tempi 6 volte più lunghi rispetto a quelli seguiti nel presente studio, rendendo, pertanto, anche queste due serie di risultati non direttamente comparabili.

È inoltre importante sottolineare che il ruolo dei recettori oppioidi μ nell'attivazione delle ERK nel Acb dipende anche dall'agonista oppioidergico impiegato; il fentanil, ma non la morfina, provoca l'attivazione delle ERK in colture di neuroni striatali, effetto che risulta prevenuto dal pre-trattamento con naltrexone o dall'applicazione di fentanil in neuroni derivanti da topi KO per i recettori μ (Macey et al., 2006). È interessante notare inoltre che la capacità del fentanil di stimolare la fosforilazione delle ERK è basata sull'interazione con il segnale delle β -arrestine dato che in neuroni pre-trattati con siRNA per l'arrestina 3 il fentanil non è in grado di evocare l'attivazione di tale segnale (Macey et al., 2006). D'altra parte, la morfina acquisisce la capacità di indurre la fosforilazione delle ERK quando applicata a neuroni transfettati con una forma dominante positiva di arrestina che non richiede la fosforilazione recettoriale per la sua attivazione (Macey et al., 2006). Inoltre, un ruolo critico delle β -arrestine è stato dimostrato negli effetti di rinforzo della morfina valutati attraverso esperimenti di CPP (Bohn et al., 2003), durante i quali, nei topi KO per la β -arrestina, la morfina ha provocato maggior rinforzo ovvero una maggior sensibilità del sistema DAergico

(aumento del rilascio di DA striato-ventrale ?) in risposta alla stimolazione del recettore μ (Bohn et al., 2003). Pertanto, l'espressione differenziale delle β -arrestine così come il diverso grado della loro attività basale (Haberstock-Debic et al., 2005; Zheng et al., 2011) potrebbero giocare un ruolo critico nella capacità della morfina (e di altri agonisti oppioidi) di modulare la fosforilazione delle ERK, suggerendo che vi possa essere una complessa interazione tra la morfina, le β -arrestine e i recettori accoppiati a proteina G (GPCR). Tale interpretazione suggerisce anche che i meccanismi di fosforilazione potrebbero essere alla base della capacità della morfina di determinare in maniera differenziale la fosforilazione delle ERK₁ e ERK₂ nel Acb come in altre regioni cerebrali (Zhai et al., 2008; Eitan et al., 2003).

Alla luce del ruolo attribuito all'attivazione delle ERK nel Acb nelle proprietà motivazionali delle sostanze (Beninger & Gerdjikov, 2004; Girault et al., 2007; Lu et al., 2006; Zhai et al., 2008) appare particolarmente rilevante la scoperta che la somministrazione di morfina, a dosi (1 e 5 mg/kg) e intervalli di tempo (20 e 40 minuti) differenti, causa una significativa riduzione della % di neuroni pERK positivi/area nel AcbSh e nel AcbC dei ratti Sprague-Dawley e Wistar (Figure 1 e 2) (oltre che dei ratti RLA, si veda sotto per la relativa discussione). Infatti, mentre gli effetti sulla fosforilazione delle ERK evocati da sostanze come cocaina (Valjent et al., 2000), THC (Valjent et al., 2001), amfetamina (Gerdjikov et al., 2004) e ecstasy (Salzmann et al., 2003) sono stati presentati in parallelo con studi di CPP, dimostrando che il blocco delle MEK nel Acb può esitare in un blocco della preferenza spaziale, studi di questo tipo non sono reperibili nella letteratura relativamente alla morfina, né nei ratti né nei topi.

Tuttavia, un recente studio ha dimostrato che il blocco delle MEK mediante la somministrazione intracerebroventricolare di PD98059 (un inibitore delle MEK incapace di superare la BEE) previene la capacità della morfina (1 mg/kg) di indurre l'acquisizione di CPP in ratti Sprague-Dawley (Spina et al., 2010). Questa evidenza appare critica per due ragioni: i) indica che la somministrazione di morfina e, sulla base dei presenti dati, la riduzione della % di neuroni pERK-positivi/area nel AcbSh e nel AcbC si accompagnano alla sua capacità di indurre CPP (Acquas & Di Chiara, 1994; Spina et al., 2011); ii) sostiene, contrariamente a quanto suggerito dalla letteratura (Beninger & Gerdjikov, 2004; Girault et al., 2007; Lu et al., 2006; Zhai et al., 2008) che la capacità di farmaci d'abuso di indurre CPP si basa sull'attivazione

delle ERK nel Acb. Inoltre, la possibilità che la morfina, alle dosi alle quali riduce l'espressione dei neuroni pERK-positivi/area nel Acb, sia anche incapace di esercitare i suoi effetti motivazionali positivi, sembra insostenibile. Infatti, comparando il dosaggio e i tempi impiegati nel presente studio con quelli utilizzati in precedenti studi sulla CPP indotta dalla morfina (Acquas & Di Chiara, 1994; Spina et al., 2010), appare difficile concludere che le condizioni alle quali la morfina induce CPP siano sostanzialmente differenti da quelle alle quali riduce la % di neuroni pERK-positivi/area. Al contrario, nei topi CD-1 e C57BL/6J, l'incremento della % dei neuroni pERK-positivi/area rappresenterebbe una correlazione positiva della capacità della morfina di indurre CPP. Tuttavia, l'attivazione delle ERK evocata dalla morfina in altre regioni cerebrali come la VTA incoraggia a suggerire che la fosforilazione delle ERK indotta dalla morfina nel Acb, sia nei ratti che nei topi, possa non essere unicamente responsabile delle sue proprietà motivazionali. A supporto di questa possibilità è la dimostrazione fornita dallo studio di Lin et al., (2010) secondo cui la somministrazione nella VTA di U0126, un altro inibitore delle MEK, previene l'acquisizione della CPP indotta dalla morfina.

Nell'impostazione della ricerca si era ipotizzato che la selezione genetica dei ratti RHA e RLA potesse determinare una responsività differenziale alla morfina in termini di attivazione delle ERK nel Acb. In particolare, sulla scorta dei dati di Lecca et al. (2004) secondo cui nei ratti RHA la morfina determina una stimolazione preferenziale della trasmissione DAergica nel AcbSh a una dose 10 volte inferiore che nei ratti Sprague-Dawley e Wistar, è stato ipotizzato che la morfina potesse far diminuire il segnale pERK nel Acb dei ratti RLA e aumentarlo in quello degli RHA. I risultati della presente ricerca hanno dimostrato che la somministrazione acuta della morfina ai ratti delle due linee (alla stessa dose impiegata nello studio di Lecca e Colleghi del 2004) ha determinato effetti differenziali sulla fosforilazione delle ERK. In particolare, la morfina, come atteso, ha indotto una significativa riduzione dell'espressione della pERK nel AcbSh dei ratti RLA, mentre si è mostrata inefficace nell'evocare qualunque tipo di effetto sulla fosforilazione delle ERK nel Acb dei ratti RHA. Questi risultati pertanto supportano solo parzialmente l'ipotesi interpretativa proposta poiché se da un lato i ratti RLA hanno effettivamente risposto in modo analogo ai ratti Sprague-Dawley (Figura 1) e Wistar (Figura 2), nei ratti RHA (Figura 4) non si è osservata né una diminuzione né una stimolazione. Così, sebbene la mancanza di effetto osservata nei ratti RHA appaia comunque di notevole importanza e significatività alla luce della maggiore

responsività di questi animali agli effetti comportamentali e neurochimici della morfina (Piras et al., 2003; Lecca et al., 2004; Giorgi et al., 2007), la mancata stimolazione, ovvero la mancata analogia con gli effetti evocati dalle altre sostanze (Valjent et al., 2000 e 2001; Salzman et al., 2003; Gerdjikov et al., 2004) indica che altri meccanismi devono essere vagliati per meglio caratterizzare questo dato. Inoltre, poiché nei ratti RLA la morfina determina degli effetti differenti rispetto ai ratti RHA una spiegazione, potrebbe essere quella suggerita dallo studio di Mazzucchelli et al. (2002) secondo la quale la selezione genetica potrebbe aver determinato una differente espressione delle isoforme ERK₁ e ERK₂ tale da poter giustificare questi risultati.

L'impiego di linee di ratti geneticamente selezionati per la loro preferenza o avversione all'etanolo ha contribuito significativamente anche allo studio delle basi neurobiologiche dell'alcolismo. Pertanto, pur considerando la grande difficoltà nel riprodurre in laboratorio tutte le caratteristiche di un fenomeno "umano", tali modelli animali hanno permesso di controllare le caratteristiche genetiche, così come le conseguenze dell'esposizione all'etanolo e all'ambiente, permettendo inoltre manipolazioni farmacologiche e comportamentali, nonché determinazioni neurochimiche altrimenti impossibili.

È alla luce di questa premessa che la seconda parte dello studio è stata volta ad investigare se, e in quale modo, la somministrazione acuta di etanolo potesse influenzare l'espressione della pERK in particolare in ratti appartenenti alle due linee geneticamente selezionate per i diversi livelli di preferenza e consumo di etanolo quando sottoposti ad un regime di libera scelta tra etanolo ed acqua (2- bottle choice), i Sardinian Alcohol Preferring e Sardinian non Preferring, sP e sNP. Più specificamente, questa fase dello studio era indirizzata a verificare se la somministrazione acuta di etanolo in ratti etanolo-naive, sP ed sNP, potesse risultare in una espressione differenziale della forma fosforilata della ERK nel Acb e nella PFCx, due regioni cerebrali coinvolte nella modulazione dei comportamenti motivati e nella flessibilità comportamentale e impulsività, rispettivamente. Tale indagine è stata allargata anche ad altri due nuclei dell'amigdala estesa (Heimer et al., 1991) ovvero il nucleo del letto della stria terminale (BNST o BSTL) e il nucleo centrale dell'amigdala (CeA), entrambi coinvolti nei meccanismi alla base dell'assunzione eccessiva di etanolo (Koob, 2003).

I risultati di questi esperimenti hanno dimostrato che la somministrazione acuta di etanolo modula l'espressione della pERK in maniera linea- e regione cerebrale-dipendente. In

particolare, l'etanolo alla dose di 1 g/kg ha incrementato l'espressione della pERK nel AcbSh e AcbC dei ratti appartenenti alla linea sP, contrariamente ai ratti sNP nei quali non ha determinato nessuna variazione (Figura 8). Inoltre a livello di entrambe le sub-regioni della PFCx (Figura 9) così come nel BSTL (Figura 10A) e nella CeA (Figura 10B) non si sono osservate variazioni significative in nessuna delle due linee. Quanto osservato nel Acb dei ratti sP è in accordo con i dati di precedenti studi effettuati con ratti Sprague-Dawley (Ibba et al., 2009), sebbene nel presente studio l'incremento della pERK si sia osservato solo alla dose di 1 g/kg. Al contrario, i risultati appaiono in contrasto con altri dati presenti in letteratura (Davis et al., (1999) in PN5 pups; Sanna et al., (2002) in ratti Wistar, Neznanova et al. (2009) in ratti AA, e Neasta et al., (2011) in topi C57BL6J) che riportano una riduzione dell'espressione della ERK fosforilata come conseguenza della somministrazione acuta di etanolo. Tali discrepanze potrebbero essere correlate a differenze nelle condizioni sperimentali (via di somministrazione, dosi somministrate, specie animale, linea/ceppo); tuttavia per quel che riguarda la discordanza tra i presenti dati e quelli ottenuti su ratti selezionati per la preferenza e avversione all'etanolo appartenenti alle linee AA/ANA (Neznanova et al., 2009), è bene precisare che nonostante questi ultimi provengano da un programma selettivo per molti aspetti simile a quello seguito per l'ottenimento delle linee oggetto di questo studio, differenze comportamentali etanolo-correlate erano state già riscontrate e pertanto è ragionevole pensare che la selezione abbia portato anche ad una differente sensibilità all'etanolo in termini di fosforilazione della ERK.

È interessante notare inoltre che la dose di etanolo che ha determinato un significativo incremento dell'espressione della pERK (1 g/kg) sia nel AcbSh che nel AcbC dei ratti sP, corrisponde anche al quantitativo di etanolo usualmente consumato dai ratti di questa linea quando sottoposti al regime del "2-bottle choice", con accesso all'etanolo per 24h/giorno; più specificamente, la dose di 1 g/kg rappresenta la quantità di etanolo che i ratti sP consumano volontariamente ogni qualvolta abbiano accesso alla bottiglia contenente etanolo e che produce nei ratti sP effetti psicofarmacologici misurabili, comprese ansiolisi e stimolazione locomotoria. Inoltre i livelli ematici di etanolo (BELs) valutati 15' (tempo del sacrificio in questo studio) dopo la somministrazione di 1 g/kg corrispondono a quelli raggiunti dopo assunzione volontaria durante le sessioni di bevuta (Colombo et al., 2006).

Gli effetti osservati nel Acb dei ratti sP appaiono inoltre a supporto della teoria secondo cui le ERK attivate a livello del AcbSh possano rappresentare dei potenziali markers neurochimici post-sinaptici degli effetti acuti dell'etanolo sulla trasmissione DAergica a livello pre-sinaptico (Ibba et al., 2009), ma più generalmente delle sostanze d'abuso incluse l'ecstasy, l'amfetamina, la nicotina e la cocaina (Acquas et al., 2007; Beninger & Gerdjikov, 2004; Girault et al., 2007; Valjent et al., 2004). Il fatto che l'etanolo sia capace di indurre un significativo incremento dell'espressione della pERK nel Acb dei ratti sP così come di quelli Sprague-Dawley e Wistar, mentre si mostra inefficace nel produrre tale attivazione nei ratti sNP, mette in luce come quest'ultima linea si presenti meno sensibile, anche in termini di espressione della pERK, agli effetti della somministrazione acuta di etanolo.

Infine, considerando la teoria secondo cui l'espressione della pERK nel Acb, indotta dalle sostanze d'abuso, possa rappresentare un indice post-sinaptico di attivazione DAergica in tale area, i presenti dati appaiono anche in accordo con l'elevata attività DAergica neuronale spontanea associata alla preferenza e all'aumentata vulnerabilità allo sviluppo di un comportamento di assunzione eccessiva di etanolo nella linea sP (Melis et al., 2009).

A livello della PFCx così come nel BSTL e nella CeA l'etanolo si è mostrato inefficace nel modulare l'espressione della pERK in entrambe le linee di ratti. Gli effetti osservati in PFCx sono risultati parzialmente in accordo con altri dati presenti in letteratura (Nuutinen et al., 2011), ma in contrasto con quanto osservato da Neznanova et al., (2009), sebbene anche in questo caso, analogamente a quanto detto per il Acb tali divergenze sarebbero da ricercarsi in una diversa sensibilità conservata durante la selezione genetica. Analoghe considerazioni possono essere estese anche all'interpretazione dei risultati relativi al BSTL e alla CeA che appaiono in contrasto con i dati ottenuti da Ibba et al., (2009) in ratti Sprague-Dawley.

Alla luce dei presenti risultati, sebbene il meccanismo alla base dell'attivazione delle ERK nel Acb dei ratti sP sia ancora da chiarire, è ragionevole ipotizzare che l'etanolo alla dose di 1 g/kg possa influenzare l'espressione della pERK in due modi: i) agendo in maniera differenziale su meccanismi comuni che determinano una espressione della pERK linea- e regione cerebrale-dipendente oppure ii) agendo su diversi meccanismi capaci di influenzare l'espressione della pERK in maniera differenziale.

Come già puntualizzato, in questo studio l'etanolo è stato somministrato per via intragastrica. Tale approccio, se da un lato ha impedito di indagare l'effetto del consumo volontario di

etanolo sull'espressione delle pERK, dall'altro ha permesso l'inclusione dei ratti della linea sNP nel disegno sperimentale portando ad identificare nell'attivazione della cascata di MAPK-ERK nel Acb, un percorso che può contribuire a differenziare anche biochimicamente i ratti della linea sP da quelli della linea sNP.

In sommario, sulla base di quanto riscontrato due sono le principali conclusioni che possono essere tratte da questo studio. La prima è che i ratti della linea sP mostrano una maggiore sensibilità agli effetti dell'etanolo in termini di attivazione della pERK nel Acb; la seconda è che i ratti della linea sNP si mostrano insensibili agli effetti acuti dell'etanolo nella stessa area. È infine importante sottolineare che la variazione fenotipica è il risultato di differenze nei singoli genotipi e delle interferenze tra questi e le diverse condizioni ambientali; pertanto l'identificazione del genotipo è un passaggio di grande rilevanza sia per la caratterizzazione dei profili comportamentali che per l'identificazione dei meccanismi neurogenetici e neurochimici alla base della preferenza o dell'evitamento dell'etanolo. Il presente studio ha in tal senso contribuito, aggiungendo la fosforilazione delle ERK nel Acb, alla lista dei bersagli dei geni implicati nell'espressione dei fenotipi preferenza/avversione all'etanolo.

Nell'ottica di approfondire ulteriormente il ruolo della selezione genetica sulla differente sensibilità agli effetti acuti delle sostanze d'abuso in termini di fosforilazione delle ERK nelle aree mesolimbiche, la terza parte di questo lavoro di ricerca è stata indirizzata allo caratterizzazione degli effetti della somministrazione acuta di cocaina sull'espressione della pERK in ratti appartenenti alle due linee psicogeneticamente selezionate, i ratti RHA e i ratti RLA, nelle regioni cerebrali coinvolte negli effetti comportamentali della cocaina tra cui AcbSh, AcbC, PFCx IL e PFCx PrL nonché a livello di BSTL, CeA e BLA. Dai risultati ottenuti è emerso che la somministrazione acuta di cocaina modula l'espressione della pERK in maniera linea- e regione cerebrale-dipendente. E' stato infatti osservato che la cocaina, alla dose di 5 mg/kg, ha incrementato in maniera significativa l'espressione della pERK nel AcbSh e nella PFCx IL dei ratti RHA, e nella BLA dei ratti RLA, mentre non ha determinato alcuna variazione nelle altre regioni cerebrali di entrambe le linee.

Il fatto che la cocaina abbia incrementato l'immunoreattività della pERK nel AcbSh degli RHA ma non degli RLA e l'assenza di cambiamenti significativi dei livelli di pERK nel AcbC di entrambe le linee, risulta in accordo con precedenti studi di microdialisi cerebrale dai quali è emerso che negli RHA la somministrazione della dose di 5 mg/kg induce un cospicuo rilascio di

DA rispetto ai valori basali nel AcbSh (~120% a 20') rispetto al AcbC (~60% a 20') mentre nessuna differenza significativa è stata osservata nei ratti della linea RLA (AcbSh ~60% a 20', AcbC ~50% a 20') (Lecca et al., 2004; Giorgi et al., 2007). Considerando l'importanza dell'espressione della pERK quale indice post-sinaptico di attivazione DAergica (Acquas et al., 2007; Ibba et al., 2009), i presenti risultati suggeriscono anche che le proiezioni DAergiche che dalla VTA raggiungono il AcbSh nei ratti RHA siano maggiormente sensibili agli effetti acuti della cocaina rispetto a quelle dei ratti RLA. Inoltre tenendo presente che la somministrazione della dose di 5 mg/kg di cocaina si è mostrata capace di indurre un consistente incremento della locomozione negli RHA (Lecca et al., 2004), i quali imparano anche ad autosomministrarsi la cocaina più velocemente e in maggiore quantità (Fattore et al., 2009) rispetto ai ratti RLA, i presenti dati contribuiscono a supportare l'ipotesi secondo cui i ratti RHA risultano maggiormente sensibili sia agli effetti comportamentali che a quelli neurochimici delle sostanze d'abuso (Giorgi et al., 2007).

Non sorprende inoltre che l'immunoreattività della pERK sia stata incrementata nel AcbSh e nella PFCx IL dei ratti RHA, le due regioni cerebrali appartenenti al subcircuito limbico e criticamente coinvolte nella risposta all'esposizione iniziale alla cocaina (Valjent et al., 2000), mentre non sia stata modificata nel AcbC e nella PFCx PrL di entrambe le linee, due aree cerebrali facenti parte del subcircuito motorio e strettamente implicate nelle risposte strumentali all'esposizione cronica alla cocaina (Ito et al., 2004).

Il fatto che l'esposizione acuta alla cocaina non abbia influenzato l'espressione della pERK nel BSTL e nella CeA di entrambe le linee è risultato in qualche modo inaspettato ed in contrasto con altri dati già presenti in letteratura (Valjent et al., 2004), sebbene la comparazione con i precedenti studi non sia del tutto corretta dato che l'incremento della pERK in altri studi (Valjent et al., 2000; 2004) è stato osservato in topi i cui livelli basali di pERK risultano essere molto bassi rispetto a quelli descritti nei ratti (Radwanska et al., 2006) e a seguito di dosi molto più alte di quella impiegata nel presente studio.

L'immunoreattività della pERK è stata incrementata nella BLA dei ratti RLA ma non di quelli RHA. Tale risultato appare di rilevante interesse principalmente per due ragioni: i) perché sottolinea come la specificità della dose di cocaina impiegata in questo studio sia stata capace di influenzare l'espressione della pERK nei ratti RLA e ii) perché permette una ulteriore

differenziazione tra le due linee sulla base della differente sensibilità regionale agli effetti della cocaina.

L'ipotesi di una possibile differenziazione tra le due linee di ratti Roman a livello della BLA può essere estesa, nei ratti trattati con salina, anche all'espressione delle pERK che si è mostrata significativamente maggiore negli RHA piuttosto che negli RLA. Tuttavia, non avendo verificato, in questo studio, gli effettivi livelli basali di pERK in animali Roman naive (sia RHA che RLA), si potrebbe pensare che la somministrazione della soluzione salina possa essere stata responsabile o della riduzione dei livelli di pERK nella BLA dei ratti RLA o dell'incremento di tali livelli nella BLA dei ratti RHA. Si potrebbe ipotizzare, inoltre, che il significato funzionale dell'incremento della pERK osservato nella BLA dei ratti RLA sia correlabile al ruolo che tale subregione dell'amigdala riveste nelle risposte comportamentali e neurochimiche allo stress (McReynolds & McIntyre 2012). In alternativa, un'altra ipotesi potrebbe suggerire che il selettivo incremento della pERK nella BLA dei ratti RLA indotto dalla cocaina rappresenti un correlato neurochimico sia dell'effetto ansiogenico della stessa cocaina (Wenzel et al., 2014) sia del fenotipo comportamentale della linea RLA, caratterizzato da un elevato grado d'ansia e da un atteggiamento passivo nell'affrontare le situazioni (coping style). Tale ipotesi risulterebbe supportata anche dal fatto che, in ratti Sprague-Dawley, l'habituation a situazioni stressanti appare associata ad una ridotta attivazione della pERK nella BLA (Grissom & Bhatnagar et al., 2011).

Infine, la capacità delle pERK di attivare fattori di trascrizione (Davis et al., 2000; Valjent et al., 2000; Mattson et al., 2005; Radwanska et al., 2006) responsabili di modificazioni epigenetiche e di variazioni nell'espressione genica, ne suggerisce anche un ruolo critico nei processi di plasticità sinaptica a lungo termine che sottendono all'abuso di cocaina (Lu et al., 2006); per tale ragione studi futuri saranno rivolti a verificare e caratterizzare il coinvolgimento della pathway delle ERK nel critico passaggio dall'uso occasionale di cocaina a quello incontrollato (dipendenza).

Sulla base di quanto finora discusso, i presenti dati dimostrano che la morfina agisce in maniera differenziale sull'espressione della pERK nel ratto e nel topo, inducendo un significativo decremento nel ratto (con l'eccezione dei ratti RHA), e un incremento nel topo. I presenti dati suggeriscono inoltre che nel ratto la stimolazione dei recettori μ rappresenta il meccanismo primario alla base di tale decremento, e che i recettori D_1 svolgono un ruolo

cruciale nel meccanismo di attivazione delle ERK nell'Acb, sia nei ratti che nei topi. Inoltre, il fatto che la morfina abbia agito in maniera differenziale anche sull'espressione delle ERK nell'Acb dei ratti delle linee Roman, riducendone l'attivazione nell'AcbSh degli RLA e non interferendo in alcun modo su quello degli RHA, suggerisce che anche altri meccanismi debbano essere tenuti in considerazione per spiegare i complessi effetti esercitati dalla morfina sull'espressione della pERK nell'Acb.

I risultati osservati nelle due linee geneticamente selezionate sP e sNP dimostrano che la somministrazione acuta di etanolo modula l'espressione della pERK in maniera linea- e regione cerebrale- dipendente. Il significativo incremento riscontrato nell'AcbSh dei ratti sP mette in risalto come tale linea si presenti più sensibile, anche in termini di espressione della pERK, agli effetti acuti dell'etanolo, mentre la mancata influenza sull'espressione della chinasi nei ratti sNP suggerisce una minore sensibilità di questa linea verso tali effetti.

Infine, dai risultati ottenuti nelle linee geneticamente selezionate RHA e RLA emerge che anche la somministrazione acuta di cocaina modula l'espressione della pERK in maniera linea- e regione cerebrale-dipendente. Il significativo incremento dell'espressione nel AcbSh dei ratti RHA e il mancato effetto su quello dei ratti RLA appare in perfetto accordo con i precedenti studi di microdialisi cerebrale effettuati in questi animali (Lecca et al., 2004), suggerendo una maggiore sensibilità della linea RHA verso gli effetti comportamentali e neurochimici delle sostanze d'abuso (Giorgi et al., 2007) e più specificamente della cocaina. Inoltre, il fatto che l'incremento della pERK si sia osservato nel AcbSh e nella PFCx IL collima con il ruolo che tali aree rivestono nella risposta all'esposizione iniziale alla cocaina; inoltre, l'incrementata immunoreattività della pERK rilevata nella BLA dei ratti RLA suggerisce una ulteriore differenziazione a livello di sensibilità regionale alla cocaina tra le due linee.

In conclusione, benché non sia ancora possibile proporre una spiegazione esaustiva che tenga conto sia dei presenti risultati che delle discrepanze della letteratura circa gli effetti esercitati dalla morfina sulla fosforilazione delle ERK nell'Acb, questi dati rappresentano un ulteriore e approccio alla comprensione del meccanismo attraverso il quale la pERK nell'Acb sostiene le proprietà rinforzanti e motivazionali della morfina (Bohn et al., 2003; Lin et al., 2010; Mazzucchelli et al., 2002; Spina et al., 2010).

Infine, i presenti dati forniscono ulteriori evidenze sperimentali a sostegno dell'importanza dell'utilizzo delle linee di ratti geneticamente selezionati, quali validi modelli per lo studio

dell'influenza che il genotipo esercita sui tratti comportamentali e neuronali coinvolti nelle principali caratteristiche della vulnerabilità individuale alla dipendenza da sostanze.

BIBLIOGRAFIA

1. Acquas E, Di Chiara G (1994) D₁ receptor blockade stereospecifically impairs the acquisition of drug-conditioned place preference and place aversion. *Behav Pharmacol* 5(6):555-569
2. Acquas E, Pisanu A, Spiga S, Plumitallo A, Zernig G, Di Chiara G (2007) Differential effects of intravenous R,S-(±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) and its S(+)- and R(-)-enantiomers on dopamine transmission and extracellular signal regulated kinase phosphorylation (pERK) in the rat nucleus accumbens shell and core. *J Neurochem* 102(1):121-132
3. Adachi M, Fukuda M, Nishida E (1999) Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J.* 18(19):5347-58
4. Agabio R, Carai MAM, Lobina C, Pani M, Reali R, Bourov I, Gessa GL, Colombo G (2000b) Dissociation of alcohol and saccharin preference in sP and sNP rats. *Alcohol Clin Exp Res* 24:24-29
5. Agabio R, Carai MAM, Lobina C, Pani M, Reali R, Vacca G, Gessa GL, Colombo G (2001) Alcohol stimulates motor activity in selectively bred Sardinian alcohol-preferring (sP), but not in Sardinian alcohol-nonpreferring (sNP), rats. *Alcohol* 23:123-126
6. Agabio R, Carai MAM, Lobina C, Pani M, Reali R, Vacca G, Gessa GL, Colombo G (2000a) Development of short-lasting alcohol deprivation effect (ADE) in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol* 21:59-62
7. Agabio R, Cortis G, Fadda F, Gessa GL, Lobina C, Reali R, Colombo G (1996) Circadian drinking pattern of Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol* 31:385-388
8. Alheid GF, Heimer L (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*. Oct;27(1):1-39. Review
9. Allen RM, Everett CV, Nelson AM, Gulley JM, Zahniser NR (2007) Low and high locomotor responsiveness to cocaine predicts intravenous cocaine conditioned place preference in male Sprague-Dawley rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86(1):37-44
10. Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58(4):315-48. Review
11. Anderson RI, Varlinskaya EI, and Spear LP (2010) Ethanol-induced conditioned taste aversion in male sprague-dawley rats: impact of age and stress. *Alcohol Clin Exp Res.* 34:2106-2115
12. Anthony JC, Warner LA, Kessler RC (1994) Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants : Basic findings from the National Comorbidity Survey. *Exp Clin Psychopharmacol* 2:244-268
13. Atkins CM, Selcher JP, Petraits JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1(7):602-609
14. Bechara A (2005) Decision making, impulse control and loss of willpower to resist drugs: a neurocognitive perspective *Nat Neurosci* 8:1458-1463
15. Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat *Brain Research* 175:191-217
16. Belcheva MM, Clark AL, Haas PD, Serna JS, Hahn JW, Kiss A, Coscia CJ (2005) Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAP kinase via different PKC isoforms and secondary messengers in astrocytes. *J Biol Chem* 280: 27662-27669
17. Belcheva MM, Vogel Z, Ignatova E, Avidor-Reiss T, Zippel R, Levy R, Young EC, Barg J, Coscia CJ, (1998) Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is Ras-dependent and involves G $\beta\gamma$ subunits. *J Neurochem* 70: 635-645
18. Bell RL, Rodd-Henricks ZA, Webster AA, Lumeng L, Li TK, McBride WJ, Murphy JM (2002) Heart rate and motoractivating effects of orally self-administered alcohol in alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1162-1170
19. Beninger RJ, Gerdjikov T (2004) The role of signaling molecules in reward-related incentive learning. *Neurotoxicity Res* 61(4):91-104
20. Bennett BD, Bolam JP (1994) Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat *Neuroscience* 62:707-719

21. Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ (1996) Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J Neurosci* 16(15):4707-15
22. Berke JD & Hyman SE (2000) Addiction, dopamine and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:512-532
23. Berman DE, Dudai Y (2004) MAPK cascades in the brain: lessons from learning *Methods Mol Biol* 250: 315-322
24. Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamalas M, Hervé D, Valjent E, Girault JA (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 28: 5671-5685
25. Bierut LJ (2011) Genetic vulnerability and susceptibility to substance dependence. *Neuron* 69:618-627
26. Bodnar RJ (2008) Endogenous opiates and behavior: 2007 *Peptides* 29:2292-2375
27. Boening JA, Lesch OM, Spanagel R, Wolffgramm J, Narita M, Sinclair D, Mason BJ, Wiesbeck GA (2001) Pharmacological relapse prevention in alcohol dependence: from animal models to clinical trials. *Alcohol Clin Exp Res* (5 Suppl ISBRA):127S-131S. Review
28. Bohn LM, Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Medvedev IO, Lefkowitz RJ, Dykstra LA, Caron MG (2003) Enhanced rewarding properties of morphine, but not cocaine, in beta(arrestin)-2 knock-out mice. *J Neurosci* 23(32):10265-10273
29. Boileau I, Assaad JM, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M, Diksic M, Tremblay RE, Dagher A. (2003) Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse* 49(4):226-31
30. Bossong MG, van Berckel BN, Boellaard R, Zuurman L, Schuit RC, Windhorst AD, van Gerven JM, Ramsey NF, Lammertsma AA, Kahn RS (2009) Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. *Neuropsychopharmacology* 34(3):759-6
31. Botelho MF, Relvas JS, Abrantes M, Cunha MJ, Marques TR, Rovira E, Fontes Ribeiro CA, Macedo T (2006) Brain blood flow SPET imaging in heroin abusers, *Ann N Y Acad Sci* 1074:466-477
32. Bradshaw JL (2001) *Developmental Disorders of the Frontostriatal System: Neuropsychological, Neuropsychiatric, and Evolutionary Perspectives* East Sussex Psychology Press, Hove
33. Brami-Cherrier K, Valjent E, Hervé D, Darragh J, Corvol JC, Pages C, Arthur SJ, Girault JA, Caboche J (2005) Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J Neurosci* 25(49):11444-54
34. Brodie MS, Appel SB (1998) The effects of ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area studied with intracellular recording in brain slices. *Alcohol Clin Exp Res* 22(1):236-44
35. Brody AL, Mandelkern MA, Olmstead RE, Allen-Martinez Z, Scheibal D, Abrams AL, Costello MR, Farahi J, Saxena S, Monterosso J, London ED (2009) Ventral striatal dopamine release in response to smoking a regular vs a denicotinized cigarette. *Neuropsychopharmacology* 34(2):282-9
36. Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold *Journal of Comparative Neurology* 338:255-278
37. Brunetti G, Serra S, Vacca G, Lobina C, Curreli T, Carai MAM, Colombo G, Gessa GL (2003) Long-term exposure to a sweetened alcoholic solution does not alter genetic aversion to ethanol in Sardinian alcohol-non preferring (sNP) rats. *Alcohol* 30:29-34.
38. Burruss JW, Hurley RA, Taber KH, Rauch RA, Norton RE, Hayman LA (2000) Functional neuroanatomy of the frontal lobe circuits *Radiology* 214 (1):227-230
39. Cadoni C, Di Chiara G (1999) Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. *Neuroscience* 90(2):447-55
40. Cahill E, Salery M, Vanhoutte P, Caboche J (2014) Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Front Pharmacol* 4:172 Review.

41. Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(1):50-83
42. Cassaday HJ, Horsley RR, Norman C (2005) Electrolytic lesions to nucleus accumbens core and shell have dissociable effects on conditioning to discrete and contextual cues in aversive and appetitive procedures respectively. *Behav Brain Res* 160(2):222-35
43. Cepeda C, Levine MS (1998) Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci* 20(1):1-18. Review
44. Chandler LJ, Carpenter-Hyland E, Hendricson AW, Maldve RE, Morrisett RA, Zhou FC, Sari Y, Bell R, Szumlinski KK (2006) Structural and functional modifications in glutamateric synapses following prolonged ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 30:368-376
45. Chang HT, Kitai ST (1985) Projection neurons of the nucleus accumbens: an intracellular study. *Brain Res* 347:112-6
46. Chen JP, Paredes W, Li J, Smith D, Lowinson J, Gardner EL (1990) Delta 9-tetrahydrocannabinol produces naloxone-blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology* 102:156-162
47. Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, O'Brien CP (1999) Limbic activation during cue-induced cocaine craving *Am J Psychiatry* 156:11-18
48. Ciccocioppo R (2013) Genetically selected alcohol preferring rats to model human alcoholism. *Curr Top Behav Neurosci* 13:251-269
49. Colombo G, Lobina C, Carai MA, Gessa GL (2006) Phenotypic characterization of genetically selected Sardinian alcohol-preferring (sP) and -non-preferring (sNP) rats. *Addict Biol* 11(3-4):324-38
50. Colombo G, Agabio R, Carai MAM, Lobina C, Pani M, Reali R, Vacca G, Gessa GL (2000) Different sensitivity to ethanol in ethanol-preferring sP and -non preferring sNP rats. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1603-1608
51. Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R, Vacca G, Gessa GL (1998) Stimulation of locomotor activity by voluntarily consumed alcohol in Sardinian alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol* 357:109-113.
52. Colombo G, Agabio R, Diaz G, Fà M, Lobina C, Reali R, Gessa GL (1997) Sardinian alcohol-preferring rats prefer chocolate and sucrose over ethanol. *Alcohol* 14:611-615
53. Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R, Zocchi A, Fadda F, Gessa GL (1995) Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. *Physiol Behav* 57:1181-1185
54. Cooper ZD, Haney M (2009) Actions of delta-9-tetrahydrocannabinol/cannabis: relation to use, abuse, dependence. *Int Rev Psychiatry* 21:104-12
55. Corbit LH, Muir JL, Balleine BW (2001) The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J Neurosci* 21(9):3251-3260
56. Crabbe JC (2002) Genetic contributions to addiction. *Annu Rev Psychol* 53:435-462
57. Crabbe JC, Belknap JK, Buck KJ (1994) Genetic animal models of alcohol and drug abuse. *Science* 264:1715-1723
58. D'Angio M, Serrano A, Driscoll P, Scatton B (1988) Stressful environmental stimuli increase extracellular DOPAC levels in the prefrontal cortex of hypoemotional (Roman high-avoidance) but not hyperemotional (Roman low-avoidance) rats. An in vivo voltammetric study. *Brain Research* 451:237-247
59. Dalley JW, Everitt BJ, Robbins TW (2011) Impulsivity, compulsivity, and top-down cognitive control. *Neuron* 69:680-694
60. Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28(7):771-784 Review
61. Davis MI, Szarowski D, Turner JN, Morrisett RA, Shain W (1999) In vivo activation and in situ BDNF-stimulated nuclear translocation of mitogen-activated/extracellular signal-regulated

- protein kinase is inhibited by ethanol in the developing rat hippocampus. *Neurosci Lett* 272(2):95-98
62. De Vries TJ, Schoffeleers AN, Binnekade R, Mulder AH, Vanderschuren LJ (1998) Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *Eur J Neurosci* 10(11):3565-3571
 63. De Witte P (1996) The role of neurotransmitters in alcohol dependence: animal research. *Alcohol Alcohol* 31 Suppl 1:13-6
 64. Deiana S, Fattore L, Spano MS, Cossu G, Porcu E, Fadda P, Fratta W (2007) Strain and schedule-dependent differences in the acquisition, maintenance and extinction of intravenous cannabinoid self-administration in rats. *Neuropharmacology* 52:646-654
 65. Derkinderen P, Enslin H, Girault JA (1999) The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* 10(5):R24-34 Review
 66. Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:227-241 Review
 67. Di Chiara G (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 137:75-114
 68. Di Chiara G (1998) A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use *J Psychopharmacol* 12:54-67
 69. Di Chiara G (1997) Alcohol and dopamine *Alcohol Health Res World* 21(2):108-14
 70. Di Chiara G, Imperato A (1988a) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85:5274-5278
 71. Driscoll P, Baettig K (1982) Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected for extreme differences in active, two-way avoidance performance. In *Genetics of the Brain. I.* Lieblisch, Ed.: 95-123. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
 72. Driscoll P, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Giorgi O, Schwegler H, Steimer T, Wiersma A, Corda MG, Flint J, Koolhaas JM, Langhans W, Schulz PE, Siegel J, Toben A (1998) Genetic selection and differential stress responses: the Roman lines/strains of rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851:501-510
 73. Driscoll P, Dedek J, D'Angio M, Claustre Y, Scatton B (1990) A genetically based model for divergent stress responses: Behavioral, neurochemical and hormonal aspects. *Adv Anim Breed Genet* 5:97-107
 74. Duvarci S, Nader K, LeDoux JE (2005) Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci* 21:283-289
 75. Ebstein RP, Benjamin J, Belmaker RH (2000) Personality and polymorphisms of genes involved in aminergic neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 410:205-214
 76. Edenberg HJ, Foroud T (2013) Genetics and alcoholism. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10(8):487-94
 77. Edwards S, Vendruscolo LF, Schlosburg JE, Misra KK, Wee S, Park PE, Schulteis G, Koob GF (2012) Development of mechanical hypersensitivity in rats during heroin and ethanol dependence: alleviation by CRF receptor antagonism. *Neuropharmacology* 62(2):1142-51
 78. Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G (2003) The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation *J Neurosci* 23(19):7311-7316
 79. Eitan S, Bryant CD, Saliminejad N, Yang YC, Vojdani E, Keith D Jr, Polakiewicz R, Evans CJ (2003) Brain region-specific mechanisms for acute morphine-induced mitogen-activated protein kinase modulation and distinct patterns of activation during analgesic tolerance and locomotor sensitization. *J Neurosci* 23:8360-8369

80. Ersche KD, Simon Jones P, Williams GB, Smith DG, Bullmore ET, Robbins TW (2013) Distinctive personality traits and neural correlates associated with stimulant drug use versus familial risk of stimulant dependence. *Biol Psychiatry* 74:137-144
81. Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Toben~a A, Driscoll P, (1999) Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiology & Behavior* 67:19-26
82. Escorihuela RM, Tobeña A, Driscoll P, Fernández-Teruel A (1995) Effects of training, early handling, and perinatal flumazenil on shuttle box acquisition in Roman low-avoidance rats: Toward overcoming a genetic deficit. *Neurosci Biobehav Rev* 19:353-367
83. Everitt BJ, TW Robbins (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481-1489
84. Everitt BJ, Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective *J Neurosci* 22:3312-3320
85. Everitt BJ (1990) Sexual motivation: a neural and behavioral analysis of the mechanisms underlying appetitive copulatory responses of male rats. *Neurosci Biobehav Rev* 14:217-232
86. Fallon JH, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum *Journal of Comparative Neurology* 180:545-580
87. Fattore L, Piras G, Corda MG, Giorgi O (2009) The Roman high- and low-avoidance rat lines differ in the acquisition, maintenance, extinction, and reinstatement of intravenous cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 34:1091-1101
88. Feil J, Zangen A (2010) Brain stimulation in the study and treatment of addiction *Neurosci. Biobehav. Rev* 34(4):559-574
89. Ferguson SM, Fasano S, Yang P, Brambilla R, Robinson TE (2006) Knockout of ERK1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology* 31:2660-2668
90. Fernández-Teruel A, Driscoll P, Gil L, Aguilar R, Toben~a A, Escorihuela RM (2002a) Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 73:225-231
91. Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Núñez JF, Zapata A, Boix F, Salazar W, Tobeña A (1991) The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: Psychopharmacological validation. *Brain Res Bull* 26:173-176
92. Ferré P, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Corda MG, Giorgi O, Toben~a A (1995) Behavior of the Roman/Verh high- and low-avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiology & Behavior* 58:1209-1213
93. Fiore RS, Bayer VE, Pelech SL, Posada J, Cooper JA, Baraban JM (1993) p42 mitogen-activated protein kinase in brain: prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites. *Neuroscience* 55(2):463-72
94. Flagel SB, Robinson TE, Clark JJ, Clinton SM, Watson SJ, Seeman P, Phillips PE, Akil H (2010) An animal model of genetic vulnerability to behavioral disinhibition and responsiveness to reward-related cues: implications for addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:388-400
95. Flood DG, Finn JP, Walton KM, Dionne CA, Contreras PC, Miller MS, Bhat RV (1998) Immunolocalization of the mitogen-activated protein kinases p42MAPK and JNK1, and their regulatory kinases MEK1 and MEK4, in adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* 398(3):373-92
96. Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T, Mori K (1996) Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 67:1309-1316

97. Garavan H, Pankiewicz J, Bloom A, Cho JK, Sperry L, Ross TJ, Salmeron BJ, Risinger R, Kelley D, Stein EA (2000) Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli *Am J Psychiatry* 157:1789-1798
98. Gentsch C, Lichtsteiner M, Driscoll P, Feer H (1982) Differential hormonal and physiological responses to stress in Roman high- and low-avoidance rats. *Physiol Behav* 28:259-263
99. Gerdjikov TV, Ross GM, Beninger RJ (2004) Place preference induced by nucleus accumbens amphetamine is impaired by antagonists of ERK or p38 MAP kinases in rats. *Behav Neurosci* 118(4):740-50
100. Gilpin NW, Koob GF (2008) Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. *Alcohol Res Health* 31:185-195
101. Gilpin NW, Richardson HN, Cole M, Koob GF (2008) Vapor inhalation of alcohol in rats. *Curr Protoc. Neurosci* Chapter 9, Unit 9.29
102. Giorgi O, Piras G, Corda MG. (2007) The psychogenetically selected Roman high- and low-avoidance rat lines: a model to study the individual vulnerability to drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 31:148-163
103. Giorgi O, Piras G, Lecca D, Corda MG (2005a) Behavioural effects of acute and repeated cocaine treatments: a comparative study in sensitisation-prone RHA rats and their sensitisation-resistant RLA counterparts. *Psychopharmacology* 180:530-538
104. Giorgi O, Piras G, Lecca D, Corda MG (2005b) Differential activation of dopamine release in the nucleus accumbens core and shell after acute or repeated amphetamine injections: a comparative study in the Roman high- and low-avoidance rat lines. *Neuroscience* 135:987-998
105. Giorgi O, Lecca D, Piras G, Driscoll P, Corda MG (2003) Dissociation between mesocortical dopamine release and fear-related behaviors in two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *European Journal of Neuroscience* 17:2716-2726
106. Giorgi O, Valentini V, Piras G, Di Chiara G, Corda MG (1999). Palatable food differentially activates dopaminergic function in the CNS of Roman/Verh lines and strains of rats. *Society of Neuroscience Meeting Abstract Book* 25, 2152.
107. Giorgi O, Corda MG, Carboni G, Frau V, Valentini V, Di Chiara G (1997) Effects of cocaine and morphine in rats from two psychogenetically selected lines: a behavioral and brain dialysis study. *Behavior Genetics* 27:537-546
108. Giorgi O, Orlandi M, Escorihuela RM, Driscoll P, Lecca D, Corda MG (1994) GABAergic and dopaminergic transmission in the brain of Roman high-avoidance and Roman low-avoidance rats. *Brain Research* 638:133-138
109. Girault JA, Valjent E, Cabche J, Herve D (2007) ERK2: a logical and gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 7(1):77-85
110. Goeders NE, Guerin GF (1994) Non-contingent electric footshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 114:63-70
111. Goldin M, Segal M (2003) Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 17(12):2529-2539
112. Goldstein RZ, Volkow ND (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex, *Am J Psychiatry* 159: 1642-1652
113. Goodwin RD, Fergusson DM, Horwood LJ (2004) Association between anxiety disorders and substance use disorders among young persons: results of a 21-year longitudinal study. *Psychiatry Res* 38:295-304
114. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30(5):220-7 Review
115. Gresack JE, Schafe GE, Orr PT, Frick KM (2009) Sex differences in contextual fear conditioning are associated with differential ventral hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation. *Neuroscience* 159(2):451-67

116. Grewal SS, York RD, Stork PJS (1999) Extracellular signal-regulated kinase signalling in neurons *Curr Opin Neurobiol* 9:544-553
117. Grissom NM, Bhatnagar S (2011) The basolateral amygdala regulates adaptation to stress via b-adrenergic receptor-mediated reductions in phosphorylated extracellular signal-regulated kinase. *Neuroscience* 178:108-122
118. Groenewegen HJ, Russchen FT (1984) Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic structures: A tracing and immunohistochemical study in the cat. *J Comp Neurol* 223:347-67
119. Haberstock-Debic H, Kim KA, Yu YJ, von Zastrow M (2005) Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J Neurosci* 25(34):7847-7857
120. Harris RA, Trudell JR, Mihic SJ (2008) Ethanol's molecular targets. *Sci Signa* 1(28):re7 Review
121. Howard RJ, Trudell JR, Harris RA (2014) Seeking structural specificity: direct modulation of pentameric ligand-gated ion channels by alcohols and general anesthetics. *Pharmacol Rev* 66(2):396-412
122. Heimer L, Zahm DS, Alheid GF (1995): Basal ganglia. In Paxinos G (ed): "The Rat Nervous System." San Diego: Academic Press, pp 579-628.
123. Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991) The ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. III. Compartmentation of ventral striatal efferents. *Neuroscience* 34:707-731
124. Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991b) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41(1):89-125
125. Helmus TC, Downey KK, Arfken CL, Henderson MJ, Schuster CR (2001) Novelty seeking as a predictor of treatment retention for heroin dependent cocaine users. *Drug Alcohol Dependence* 61: 287-295
126. Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(13):5764-8
127. Horger BA, Shelton K, Schenk S (1990) Preexposure sensitizes rats to the rewarding effects of cocaine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 37:707-711
128. Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565-598
129. Hyman SE (2005) Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* 162:1414-1422
130. Ibba F, Vinci S, Spiga S, Peana AT, Assaretti AR, Spina L, Longoni R, Acquas E (2009) Ethanol-Induced Extracellular Signal Regulated Kinase: Role of Dopamine D Receptors. *Alcohol Clin Exp Res* 33(5):858-867
131. Ito R, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Differential control over cocaine seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat Neurosci* 7:389-397
132. Jenab S, Festa ED, Nazarian A, Wu HB, Sun WL, Hazim R, Russo SJ, Quinones Jenab V (2005) Cocaine induction of ERK proteins in dorsal striatum of Fischer rats. *Brain Res Mol Brain Res* 142(2):134-8
133. Jentsch JD, Taylor JR (1999) Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology* 146:373-390
134. Jongen-Relo AL, Voorn P, Groenewegwn HJ (1994) Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat. *Eur J Neurosci* 6(8):1255-1264
135. Kalivas PW, Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice *Am J Psychiatry* 162:1403-1413
136. Kalivas PW (2000) A role for glutamate transmission in addiction to psychostimulants. *Addict Biol* 5(3):325-9
137. Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA (1993) GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area *Neuroscience* 57:1047-1060

138. Kapur JN, Sahoo PK, Wong KC (1985) A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics and Image Processing*, 29:273-285
139. Kelleher RJ 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116(3):467-79
140. Kelley AE (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44:161-179
141. Kelly AE, Laroche S, Davis S (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23:5354-5360
142. Kim SY, Chudapongse N, Lee SM, Levin MC, Oh JT, Park HJ, Ho IK (2005) Proteomic analysis of phosphotyrosyl proteins in morphine-dependent rat brains. *Brain Res Mol Brain Res* 133:58-70
143. Klitenick MA, DeWitte P, Kalivas PW (1992) Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an in vivo microdialysis study *J Neurosci* 12(7):2623-32
144. Kolch W (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(11):827-37 Review
145. Koob GF, Le Moal M (2008) Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* 59:29-53.
146. Koob GF (2003) Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala. *Eur Neuropsychopharmacol* 13(6):442-52 Review
147. Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97-129
148. Koob GF (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci.* 654:171-91 Review
149. Kosten TA, Miserendino MJ, Haile CN, DeCaprio JL, Jatlow PI, Nestler EJ (1997) Acquisition and maintenance of intravenous cocaine self-administration in Lewis and Fischer inbred rat strains. *Brain Res* 778:418-429
150. Lecca D, Piras G, Driscoll P, Giorgi O, Corda MG (2004) A differential activation of dopamine output in the shell and core of the nucleus accumbens is associated with the motor responses to addictive drugs: a brain dialysis study in Roman high- and low-avoidance rats. *Neuropharmacology* 46:688-699
151. LeDoux JE (1987) "Emotion," in *Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System. Vol. V. Higher Functions of the Brain*, F. Plum, Ed., American Physiological Society, Bethesda, Md, USA,.
152. Lee AM, Messing RO (2008) Protein kinases and addiction *Ann N Y Acad Sci.* 1141:22-57
153. Lemon CH, Brassler SM, Smith DV (2004) Alcohol activates a sucrose-responsive gustatory neural pathway. *J Neurophysiol* 92(1):536-44
154. Lenormand P, Pagès G, Sardet C, L'Allemain G, Meloche S, Pouyssegur J (1993) MAP kinases: activation, subcellular localization and role in the control of cell proliferation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 28:237-44
155. Levitt P, Rakic P, Goldman-Rakic P (1984) Region-specific distribution of catecholamine afferents in primate cerebral cortex: a fluorescence histochemical analysis. *J Comp Neurol* 227(1):23-36
156. Li F, Wang XS, Dai RP, Zhang JY, Zhou XF, Hao W, Li CQ (2011) The activation of NMDA receptor-ERK pathway in the central amygdala is required for the expression of morphine-conditioned place preference in the rat. *Neurotox Res* 20:362-371
157. Li CY, Mao X, Wei L (2008) Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS Comput Biol* 4(1):e2
158. Li Y, Acerbo MJ, Robinson TE (2004) The induction of behavioural sensitization is associated with cocaine-induced structural plasticity in the core (but not shell) of the nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience* 20:1647-1654
159. Li LY, Chang KJ (1996) The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 50(3):599-602

160. Lin X, Wang Q, Ji J, Yu LC (2010) Role of MEK-ERK pathway in morphine-induced conditioned place preference in ventral tegmental area of rats. *J Neurosci Res* 88(7):1595-604
161. Lobina C, Agabio R, Diaz G, Fà M, Fadda F, Gessa GL, Reali R, Colombo G (1997) Constant absolute alcohol intake by alcohol-preferring sP rats independent of alcohol concentrations. *Alcohol* 32:19-22
162. Lu L, Uejima JL, Gray SM, Bossert JM, Shaham Y (2007) Systemic and central amygdala injections of the mGluR(2/3) agonist LY379268 attenuate the expression of incubation of cocaine craving. *Biol Psychiatry* 61:591-598
163. Lu L, Hope BT, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, Shaham Y (2005) Central amygdala ERK signaling pathway is critical to incubation of cocaine craving. *Nat Neurosci* 8:212-219
164. Luttrell DK, Luttrell LM (2003) Signaling in time and space: G proteincoupled receptors and mitogen-activated protein kinases. *Assay Drug Dev Technol.* 1:327-338
165. Lyons D, De Jaeger X, Rosen LG, Ahmad T, Lauzon NM, Zunder J, Coolen LM, Rushlow W, Laviolette SR (2013) Opiate exposure and withdrawal induces a molecular memory switch in the basolateral amygdala between ERK1/2 and CaMKIIalpha-dependent signaling substrates. *J Neurosci* 33(37):14693-14704
166. Macey TA, Lowe JD, Chavkin C (2006) Mu opioid receptor activation of ERK1/2 is GRK3 and arrestin dependent in striatal neurons. *J Biol Chem* 281:34515-34524
167. Maclean PD (1990) The triune brain in evolution: Role in paleocerebral functions. Plenum Press: New York.
168. Mamoon AM, Barnes AM, Ho IK, Hoskins B (1995) Comparative rewarding properties of morphine and butorphanol. *Brain Res Bull* 38:507-511
169. Mansour CA, Fox H, Akil SJ, Watson (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications *Trends Neurosci* 18: 22-29
170. Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Wetz H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, et al. (2002). Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34:807-820
171. McBride WJ, Le AD, Noronha A (2002) Central nervous system mechanisms in alcohol relapse. *Alcohol Clin Exp Res* 26(2):280-6
172. McClung CA, Nestler EJ (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB *Nat Neurosci* 6:1208-1215
173. McFarland K, Kalivas PW (2001) The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 21:8655-8663
174. McGeorge AJ, Faull RLM (1989): The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503-537
175. McQuade RD, Duffy RA, Anderson CC, Crosby G, Coffin VL, Chipkin RE, Barnett A (1991) [3H]SCH 39166, a new D1-selective radioligand: in vitro and in vivo binding analyses. *J Neurochem* 57(6):2001-2010
176. McReynolds JR, McIntyre CK (2012) Emotional modulation of the synapse. *Rev Neurosci* 23:449-461
177. Melis M, Pillolla G, Perra S, Colombo G, Muntoni AL, Pistis M (2009) Electrophysiological properties of dopamine neurons in the ventral tegmental area of Sardinian alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology* 201(4):471-481
178. Melis M, Enrico P, Peana AT, Diana M (2007) Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *Eur J Neurosci* 26:2824-2833
179. Mesulam M (2000) Brain, mind, and the evolution of connectivity. *Brain Cogn* 42(1):4-6
180. Miller CA, Marshall JF (2005) Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 47:873-884
181. Miller EK, Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function *Annu Rev Neurosci* 24:167-202 Review

182. Mizoguchi H, Yamada K, Mizuno M, Mizuno T, Nitta A, Noda Y, Nabeshima T (2004) Regulations of methamphetamine reward by extracellular signal-regulated kinase 1/2/ets-like gene-1 signaling pathway via the activation of dopamine receptors. *Mol Pharmacol* 65:1293-1301
183. Mogenson GJ, Yang CR (1991) The contribution of basal forebrain to limbic-motor integration and the mediation of motivation to action. *Adv Exp Med Biol* 295:267-290 Review
184. Mogenson GJ (1987) Limbic-motor integration. In "Progress in Psychobiology and Physiological Psychology" edited by A.N. Epstein and J Sprague. New York: Academic Press.
185. Mogenson GJ, Swanson LW, Wu M (1983) Neural projections from the nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological study in the rat. *J Neurosci* 3:189-202
186. Møller L, Anderson P (2012) Alcohol in the European Union Consumption, harm and policy approaches. (WHO 2012 Regional office for Europe)
187. Morse RM, Flavin DK (1992) The definition of alcoholism. *JAMA* 268:1012-1014
188. Muller DL, Unterwald EM (2004) In vivo regulation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and protein kinase B (Akt) phosphorylation by acute and chronic morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 310:774-782
189. Nakano I (1998) The limbic system: An outline and brief history of the concept. *Neuropathology* 18:211-4
190. Neasta J, Ben Hamida S, Yowell QV, Carnicella S, Ron D (2011) AKT signaling pathway in the nucleus accumbens mediates excessive alcohol drinking behaviors. *Biol Psychiatry* 70(6):575-582
191. Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8(11):1445-9 Review
192. Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Rev Neurosci* 2:119-128
193. Neznanova O, Björk K, Rimondini R, Hansson AC, Hyytiä P, Heilig M, Sommer WH (2009) Acute ethanol challenge inhibits glycogen synthase kinase-3beta in the rat prefrontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol* 12(2):275-80
194. Nicoll RA, Alger BE, Jahr CE (1980) Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS. *Nature* 287:22-25
195. Nishimoto S, Nishida E (2006) MAPK signaling. ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 7:782-786
196. Nuutinen S, Kiiänmaa K, Panula P (2011) DARPP-32 and Akt regulation in ethanol-preferring AA and ethanol-avoiding ANA rats. *Neurosci Lett* 503(1):31-6.
197. Öngür D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral Cortex* 10 (3):206-219
198. Pagès G, Guèrin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (ERK) knockout mice. *Science* 286(5443):1347-7
199. Päivärinta P, Korpi ER (1993) Voluntary ethanol drinking increases locomotor activity in alcohol-preferring AA rats. *Pharmacol Biochem Behav* 44(1):127-32
200. Pandey SC, Zhang H, Ugale R, Prakash A, Xu T, Misra K (2008) Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *J Neurosci* 28:2589-2600
201. Pandey SC, Zhang H, Roy A, Misra K (2006) Central and medial amygdaloid brain-derived neurotrophic factor signaling plays a critical role in alcohol-drinking and anxiety-like behaviors. *J Neurosci* 26:8320-8331
202. Pandey SC, Roy A, Zhang H (2003) The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 27:396-409
203. Papez JW (1937) A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry* 38:725-743
204. Parent A (1996) "Carpenter's Human Neuroanatomy" Baltimore: Williams & Wilkins

205. Paxinos G, & Franklin (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney (2nd ed) Academic Press
206. Paxinos G, & Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney (3rd ed.) Academic Press.
207. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183
208. Perkins DI, Trudell JR, Asatryan L, Davies DL, Alkana RL (2012) Charge and geometry of residues in the loop 2 b hairpin differentially affect agonist and ethanol sensitivity in glycine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 341:543-551
209. Peters J, Kalivas PW, GJ (2009) Quirk Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex *Learning Memory* 16 (5):279-288
210. Phillips AG, LePiane FG (1980) Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. *Pharmacol Biochem Behav* 12:965-968
211. Piazza PV, Deminiere JM, le Moal M, Simon H (1990) Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. *Brain Research* 514:22-26
212. Pierce RC, Pierce-Bancroft AF, Prasad BM (1999) Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/ Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *J Neurosci* 19:8685-8695
213. Piras G, Lecca D, Corda MG, Giorgi O (2003) Repeated morphine injections induce behavioural sensitization in Roman high- but not in Roman low-avoidance rats. *Neuroreport* 14:2433-2438
214. Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA, Mayfield RD (2012) Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J Neurosci* 32:1884-1897
215. Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (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 U S A* 92(26):12304-12308
216. Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P (2002) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64(5-6):755-763 Review
217. Quertemont E, Green HL, Grant KA (2003) Brain ethanol concentrations and ethanol discrimination in rats: effects of dose and time. *Psychopharmacology (Berl)* 168:262-270
218. Quin Y, Zhu Y, Baumgart JP, Stornetta RL, Seidenman K, Mack V, van Aelst L, Zhu JJ (2005) State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes Dev.* 19:2000-2015
219. Radwanska K, Wrobel E, Korkosz A, Rogowski A, Kostowski W, Bienkowski P, Kaczmarek L (2008) Alcohol relapse induced by discrete cues activates components of AP-1 transcription factor and ERK pathway in the rat basolateral and central amygdala. *Neuropsychopharmacology* 33:1835-1846
220. Radwanska K, Valjent E, Trzaskos J, Caboche J, Kaczmarek L (2006) Regulation of cocaine-induced activator protein 1 transcription factors by the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Neuroscience* 137:253-264
221. Rebec GV, Grabner CP, Johnson M, Pierce RC, Bardo MT (1997) Transient increase in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience* 76:707-714
222. Reich T, Hinrichs A, Culverhouse R, Bierut L (1999) Genetic studies of alcoholism and substance dependence. *Am J Hum Genet* 65:599-605
223. Reynolds JN, Wickens JR (2002) Dopamine-dependent plasticity of corticostriatal synapses. *Neural Netw* 15(4-6):507-21
224. Risinger FO, Malott DH, Prather LK, Niehus DR, Cunningham CL (1994) Motivational properties of ethanol in mice selectively bred for ethanol-induced locomotor differences. *Psychopharmacology (Berl.)* 116:207-216
225. Robbins TW (2000) From arousal to cognition: the integrative position of the prefrontal cortex *Prog Brain Res* 126:469-83

226. Robbins TW, Everitt BJ (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 6(2):228-36 Review
227. Robinson TE, Berridge KC (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96:103-114
228. Rolls ET (2001) "The neural basis of emotion," in *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Science*, pp. 4444-4449, Elsevier Science
229. Ron D (2004) Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. *Neuroscientist* 10:325-336
230. Ron D, Messing RO (2013) Signaling pathways mediating alcohol effects. *Curr Top Behav Neurosci* 13:87-126
231. Rubino T, Forlani G, Viganò D, Zippel R, Parolaro D (2005) Ras/ERK signalling in cannabinoid tolerance: from behaviour to cellular aspects. *J Neurochem* 93:984-991
232. Salamone J (1994) The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behav Brain Res* 61:117-133
233. Salzmann J, Marie-Claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F (2003) Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br J Pharmacol* 140(5):831-828
234. Sanna PP, Simpson C, Lutjens R, Koob G (2002) ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal. *Brain Res* 948(1-2):186-91
235. Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE (1999) Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* 6(2):97-110
236. Schroeder JP, Spanos M, Stevenson JR, Besheer J, Salling M, Hodge CW (2008) Cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior is associated with increased ERK1/2 phosphorylation in specific limbic brain regions: blockade by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology* 55:546-554
237. Schuckit MA (1995) *Drug and Alcohol Abuse: a Clinical Guide to Diagnosis and Treatment*, 4th edn, New York: Plenum Publishing Corporation.
238. Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R, Sweatt J, David A (1999) Necessity for MAP Kinase Activation in Mammalian Spatial Learning. *Learning & Memory* 6:478-490
239. Serra S, Brunetti G, Vacca G, Lobina C, Carai MAM, Gessa GL, Colombo G (2003) Stable preference for high alcohol concentrations after alcohol deprivation in Sardinian alcoholpreferring (sP) rats. *Alcohol* 29:101-108
240. Sesack SR, Grace AA (2010) Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry *Neuropsychopharmacology* 35: 27-47
241. Shiflett MW, Balleine BW (2011) Contributions of ERK signaling in the striatum to instrumental learning and performance. *Behav Brain Res* 218(1):240-7 Review
242. Shippenberg TS, Heidbreder C (1995) Sensitization to the conditioned rewarding effects of cocaine: pharmacological and temporal characteristics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 273:808-815
243. Shurman J, Koob GF, Gutstein HB (2010) Opioids, pain, the brain and hyperkatifeia: a framework for the rational use of opioids for pain. *Pain Med.* 11:1092-1098
244. Sinclair CM, Cleva RM, Hood LE, Olive MF, Gass JT (2012). mGluR5 receptors in the basolateral amygdala and nucleus accumbens regulate cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 101:329-335
245. Spina L, Longoni R, Vinci S, Ibba F, Peana AT, Muggironi G, Spiga S, Acquas E (2010) Role of dopamine D1 receptors and extracellular signal regulated kinase in the motivational properties of acetaldehyde as assessed by place preference conditioning. *Alcohol Clin Exp Res* 34(4):607-616
246. Stolerman I (1992) Drugs of abuse: behavioural principles, methods and terms. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):170-176
247. Swank MW (2000) Pharmacological antagonism of tyrosine kinases and MAP kinase in brainstem blocks taste aversion learning in mice. *Physiol & Behav* 69:499-503

248. Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14(3):311-317
249. Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76(1):1-10
250. Tabakoff B, Hoffman PL (2013) The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: an integrative history. *Pharmacol Biochem Behav* 113:20-37
251. Tanoue T, Maeda R, Adachi M, Nishida E (2001) Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J* 20(3):466-479
252. Taverna S, van Dongen YC, Groenewegen HJ, Pennartz CM (2004) Direct physiological evidence for synaptic connectivity between medium-sized spiny neurons in rat nucleus accumbens in situ *Journal of Neurophysiology* 91:1111-1121
253. Taylor JR, Horger BA (1999) Enhanced responding for conditioned reward produced by intra-accumbens amphetamine is potentiated after cocaine sensitization. *Psychopharmacology* 142, 31-40.
254. Thiels E, Klann E (2001) Extracellular signal-regulated kinase, synaptic plasticity, and memory. *Rev Neurosci* 12(4):327-345
255. Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signaling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 5:173-183.
256. Thorsell A, Tapocik JD, Liu K, Zook M, Bell L, Flanigan M, et al. (2013). A novel brain penetrant NPS receptor antagonist, NCGC00185684, blocks alcohol-induced ERK-phosphorylation in the central amygdala and decreases operant alcohol self-administration in rats. *J Neurosci* 33:10132-10142
257. Trapaidze N, Gomes I, Cvejic S, Bansinath M, Devi LA (2000) Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 76: 220-228
258. Trigo JM, Martin-Garcia E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R (2010) The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend* 108:183-194
259. Tzschentke TM (2000) The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system *Amino Acids* 19:211-219
260. Uhl GR, Liu QR, Naiman D (2002) Substance abuse vulnerability loci: converging genome scanning data. *Trends in Genetics* 18:420-425
261. Valjent E, Corvol JC, Trzaskos JM, Girault JA, Hervé D (2006a) Role of ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci* 7:20
262. Valjent E, Corbillé AG, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Girault JA (2006b) Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103:2932-2937
263. Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci* 19:1826-1836
264. Valjent E, Pagès C, Rogard M, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2001) Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur J Neurosci* 14:342-352
265. Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* 20(23):8701-8709
266. van Bockstaele EJ, Pickel VM (1995) GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain *Brain Research* 682:215-221
267. Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl.)* 151:99-120
268. Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R (2006) ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol* 5:14.

269. Vanyukov MM, Tarter RE (2000) Genetic studies of substance abuse. *Drug and Alcohol Dependence* 59:101-123
270. Verheul R, van den Brink W (2000) The role of personality pathology in the aetiology and treatment of substance use disorders. *Curr Opin Psychiatry* 13:163-169
271. Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat *Synapse* 51(1):32-58
272. Vezina P (2004) Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychostimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev* 27:827-839
273. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2002) Role of dopamine in drug reinforcement and addiction in humans: results from imaging studies. *Behav Pharmacol* 13:355-366
274. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (1999) Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J Psychopharmacol* 13(4):337-45 Review
275. Vonghia L, Leggio L, Ferrulli A, Bertini M, Gasbarrini G, Addolorato G (2008) Acute alcohol intoxication Alcoholism Treatment Study Group *Eur J Intern Med* 19(8):561-567
276. Weinrieb RM, O'Brien CP (1997) Naltrexone in the treatment of alcoholism. *Annu Rev Med* 48:477-487
277. Wenzel JM, Cotten SW, Dominguez HM, Lane JE, Shelton K, Su ZI, Ettenberg A (2014) Noradrenergic b-receptor antagonism within the central nucleus of the amygdala or bed nucleus of the stria terminalis attenuates the negative/anxiogenic effects of cocaine. *J Neurosci* 34:3467-3474
278. Wightman RM, Robinson DL (2002) Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with 'reward'. *J Neurochem* 82:721-735
279. Wise RA (2009) Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci* 32(10):517-24
280. Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5(6):483-94 Review
281. Wise RA, Bozarth MA (1981) Brain substrates for reinforcement and drug self-administration. *Prog Neuropsychopharmacol* 5(5-6):467-474 Review
282. Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW (2001) Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat. Neurosci* 4:151-158
283. Yakovlev PI (1948) Motility, behavior and the brain: Stereodynamical organization and the neural coordinates of behavior. *J Nerv Ment Dis* 107:313-35
284. Yoon S, Seger R, (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24:21-44
285. Yuan LL, Adams JP, Swank M, Sweatt JD, Johnston D (2002) Protein kinase modulation of dendritic K⁺ channels in hippocampus involves a mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 22:4860-4868
286. Zahm DS (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24:85-105.
287. Zahm DS, Brog JS (1992) On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* 50(4):751-67 Review
288. Zahm DS, Heimer L. (1990) Two transpallidal pathways originating in rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol*:302:437-46
289. Zeier H, Baettig K, Driscoll P, (1978) Acquisition of DRL-20 behavior in male and female Roman high- and low-avoidance rats. *Physiology & Behavior* 20:791-793
290. Zhai H, Li Y, Wang X, Lu L (2008) Drug-induced Alterations in the Extracellular Signal regulated Kinase (ERK) Signalling Pathway: Implications for Reinforcement and Reinstatement. *Cell Mol Neurobiol* 28:157-172
291. Zhang L, Lou D, Jiao H, Zhang D, Wang X, Xia Y, Zhang J, Xu M (2004) Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D1 and D3 receptors. *J Neurosci* 24(13):3344-54

292. Zhang W, Liu HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12(1):9-18 Review
293. Zheng H, Chu J, Zhang Y, Loh HH, Law PY (2011) Modulating μ -opioid receptor phosphorylation switches agonist-dependent signaling as reflected in PKC activation and dendritic spine stability. *J Biol Chem* 286(14):12724-12733.
294. Zhou FM, Wilson CJ, Dani JA (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum *Journal of Neurobiology* 53:590-605
295. Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA (2002) The role of mitogen-activated protein kinase pathway in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11(5):270-81
296. Zocchi A, Girlanda E, Varnier G, Sartori I, Zanetti L, Wildish GA, Lennon M, Mugnaini M, Heidbreder CA (2003) Dopamine responsiveness to drugs of abuse: A shell-core investigation in the nucleus accumbens of the mouse. *Synapse* 50(4):293-302
297. Zuckerman M (1996) The psychobiological model for impulsive unsocialized sensation seeking: a comparative approach. *Neuropsychobiology* 34:125-129

"La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze e Tecnologie Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2011/2012 XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".