



Unione europea  
Fondo sociale europeo



REGIONE AUTONOMA  
DELLA SARDEGNA



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE, SCUOLA DI  
DOTTORATO IN NEUROSCIENZE E SCIENZE MORFOLOGICHE**

Ciclo XXVIII

**MODIFICAZIONI NEURONALI NELLA VIA ABENULO-  
MESENCEFALICA DURANTE L'ASTINENZA DA  
 $\Delta^9$ -TETRAIDROCANNABINOLO**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

BIO/14 - Farmacologia

Presentata da:	Sonia Aroni
Coordinatore Dottorato	Prof. Walter Fratta
Tutor/Relatore	Prof. Marco Pistis
Co-Relatore	Dott.ssa Anna Lisa Muntoni

Esame finale Anno Accademico 2014 – 2015

# SOMMARIO

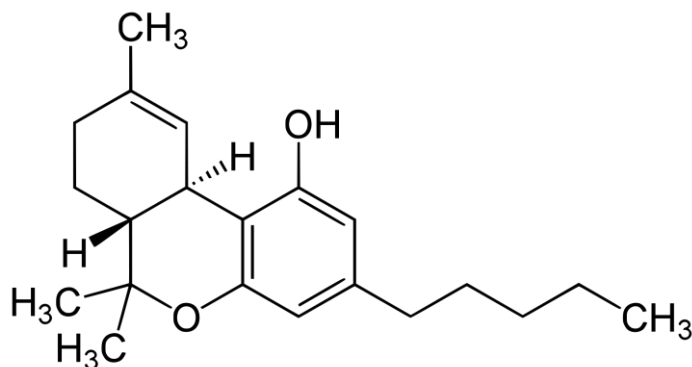
<b>1. Introduzione</b>	1
1.1. La <i>Cannabis sativa</i>	1
1.1.1. <i>Epidemiologia dell'uso di sostanze contenenti il <math>\Delta^9</math>-THC</i>	2
1.1.2. <i>Gli effetti psicotropi del <math>\Delta^9</math>-THC</i>	3
1.1.3. <i>Il sistema endocannabinoide</i>	5
1.2. La dipendenza da sostanze psicoattive	9
1.3. Il sistema della gratificazione	10
1.4. Astinenza da $\Delta^9$ -THC e ipodopaminergia	14
1.5. Il circuito dell'avversione	17
1.6. La via Lhb-RMTg controlla l'attività DAergica mesocorticolimbica ed è un target per i cannabinoidi	23
<b>2. Obiettivo della tesi</b>	27
<b>3. Materiali e Metodi</b>	28
3.1. Soggetti e procedure	28
3.2. Trattamento cronico	28
3.3. Farmaci	29
3.4. Comportamento	29
3.5. Registrazioni elettrofisiologiche <i>in vivo</i>	30
3.5.1. <i>Esperimenti nella VTA</i>	30
3.5.2. <i>Esperimenti nel RMTg</i>	33
3.5.3. <i>Esperimenti nella Lhb</i>	35
3.6. Istologia	37
3.7. Analisi statistica	37

<b>4. Risultati</b>	38
4.1. Effetti comportamentali dell'astinenza da $\Delta^9$ -THC	38
4.2. Effetti dell'astinenza da $\Delta^9$ -THC sull'attività spontanea dei neuroni DAergici della VTA e sulla durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg	39
4.3. L'attività spontanea dei neuroni GABAergici del RMTg è ridotta durante l'astinenza da $\Delta^9$ -THC	44
4.4. L'attività spontanea dei neuroni della LHb è ridotta durante l'astinenza da $\Delta^9$ -THC	46
<b>5. Discussione</b>	50
<b>Ringraziamenti</b>	56
<b>Bibliografia</b>	57

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. La *Cannabis sativa*

La *Cannabis sativa* e i suoi derivati vantano una lunga storia di uso ed abuso, per scopi ricreativi, religiosi e terapeutici. Il principale componente psicoattivo della cannabis è il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC).



**Figura 1.** Struttura chimica del  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC).

I cannabinoidi sono la classe di sostanze d'abuso maggiormente utilizzata nel nostro continente, con un consumo circa 5 volte superiore a quello di altre sostanze (EMCDDA, 2015). Nel mercato europeo della droga si trovano solitamente due diversi prodotti contenenti cannabinoidi, le infiorescenze di cannabis (“*marijuana*”) e la resina di cannabis (“*hashish*”). La potenza, espressa in percentuale di principio attivo rispetto al peso, varia dal 3 al 20% per quanto riguarda la marijuana (con una media compresa tra il 5 e il 10%). La potenza delle resine può essere maggiore, spingendosi sino al 39% del peso nelle qualità legali olandesi, ma normalmente nel mercato illegale non supera il 18% (Pijlman *et al.*, 2005).

La via di assunzione più utilizzata è mediante il fumo di sigaretta, dove alla sostanza viene addizionato il tabacco. L'assunzione tramite prodotti ingeribili è molto meno frequente e comporta un'insorgenza più lenta ed una durata maggiore degli effetti per motivi farmacocinetici. Negli ultimi anni si sono affacciati sul mercato dei dispositivi atti a vaporizzare la sostanza ed ottenere così maggiori effetti a parità di dose rispetto alla via classica, senza esporre il consumatore ai prodotti nocivi della combustione (Malouff *et al.*, 2014).

In seguito ad assunzione per via polmonare la concentrazione plasmatica massima di  $\Delta^9$ -THC si raggiunge nell'arco di pochi minuti e i primi effetti psicotropi si avvertono già nell'ordine dei secondi, per poi giungere all'acme entro 30 minuti e svanire dopo circa 3 ore. L'ingestione di prodotti contenenti  $\Delta^9$ -THC provoca invece le prime manifestazioni dopo 20-30 minuti, raggiungono l'apice in 2-3 ore e durano per altre 4-12 ore in base alla dose assunta (Grotenhermen, 2003). Essendo il  $\Delta^9$ -THC una molecola altamente lipofila, ha un volume di distribuzione molto ampio e una lenta eliminazione. Passa facilmente la placenta e viene concentrato nel latte materno, raggiungendo livelli 8 volte maggiori rispetto al plasma. A livello epatico, il  $\Delta^9$ -THC, come gli altri cannabinoidi, è processato dal citocromo P450 (CYP 2C9-2C19) che trasforma il  $\Delta^9$ -THC in 11-idrossi-tetraidrocannabinolo (11-OH-THC). L'inattivazione farmacologica avviene in un secondo momento tramite l'ossidazione del 11-OH-THC a 11-nor-9-carbossi-tetraidrocannabinolo (11-COOH-THC) che dopo essere stato coniugato all'acido glucuronico viene escreto per via renale, ed è il principale target dei test tossicologici. La presenza del 11-COOH-THC può essere riscontrata nelle urine anche 100 ore dopo l'assunzione di una singola sigaretta di marijuana (Bland *et al.*, 2005; Huestis, 2007).

### ***1.1.1. Epidemiologia dell'uso di sostanze contenenti il $\Delta^9$ -THC***

Secondo le stime dell'European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), il consumo annuale di prodotti contenenti  $\Delta^9$ -THC si aggira intorno alle 2000 tonnellate. Oltre l'80% dei sequestri di sostanze stupefacenti in Europa riguarda la cannabis, a dimostrazione della sua elevata prevalenza in termini di consumo (EMCDDA, 2015). L'EMCDDA fornisce i seguenti dati sul consumo di cannabis:

- 78.9 milioni (23.3%) di adulti (15-64 anni) hanno consumato cannabis nella loro vita;
- 19.3 milioni (5.7%) di adulti (15-64 anni) hanno consumato cannabis nell'ultimo anno;
- 14.6 milioni (11.7%) di giovani adulti (15-34 anni) hanno consumato cannabis nell'ultimo anno.

Si stima che poco meno dell'1% degli adulti europei siano consumatori quotidiani o quasi di cannabis. Circa il 75% sono di età compresa fra i 15 e i 34 anni e in questa fascia di età più di tre quarti sono di sesso maschile. Inoltre la cannabis è la droga segnalata più

frequentemente come motivo principale per sottoporsi per la prima volta al trattamento della tossicodipendenza in Europa (EMCDDA, 2015).

### ***1.1.2. Gli effetti psicotropi del $\Delta^9$ -THC***

Gli effetti del  $\Delta^9$ -THC sull'uomo sono molteplici e variano in base all'ambiente, alla dose e alla componente soggettiva. Le modificazioni comportamentali che più spesso si osservano sono l'euforia con aumento della loquacità e forte senso di felicità associata a riso, a cui si alternano periodi di introspezione seguiti da forte sonnolenza (Hall and Solowij, 1998; Perez-Reyes *et al.*, 1991; Thomas, 1993). Inoltre gli utilizzatori riportano una diminuzione dell'ansia e della vigilanza e un'aumentata sociabilità in ambienti amichevoli. Sotto l'effetto del  $\Delta^9$ -THC gli stimoli esterni vengono elaborati dal cervello in maniera differente, infatti i colori risultano più vividi, la musica più coinvolgente, le emozioni diventano più intense e significative e la percezione spazio-temporale risulta distorta. Tuttavia, non vengono segnalati solo effetti ricercati e piacevoli. In letteratura vengono attribuite al consumo di  $\Delta^9$ -THC reazioni avverse quali disforia, ansia, panico, paranoia e psicosi. Questi effetti sono correlati alla dose assunta e sono più comuni in utilizzatori naïve o psicologicamente vulnerabili. E' stato riportato un peggioramento delle allucinazioni e dei deliri in soggetti schizofrenici (Johns, 2001).

Il Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali 5<sup>a</sup> edizione (DSM-5) ha definito l'intossicazione acuta da cannabis in base ai seguenti criteri:

- recente uso di cannabis;
- cambiamenti clinicamente significativi nell'umore e nella percezione (compromissione della coordinazione motoria, euforia, ansia, sensazione di tempo rallentato, ridotta capacità di giudizio, ritiro sociale) che si presentano durante o subito dopo l'utilizzo di cannabis;
- almeno 2 dei seguenti segni e sintomi entro 2 ore dall'assunzione: iperemia congiuntivale, aumento dell'appetito, xerostomia, tachicardia;
- i sintomi manifestati non sono dovuti a una differente condizione medica sistemica e non meglio spiegati da un'altra patologia mentale, compresa l'intossicazione da altre sostanze.

Per lungo tempo la cannabis è stata considerata una “droga leggera”, incapace di indurre dipendenza e sintomi di astinenza (Solomon and Corbit, 1974). Tuttavia diverse ricerche

cliniche hanno dimostrato che i consumatori assidui di derivati della cannabis manifestano chiari segni di astinenza dopo averne interrotto l'assunzione, come ansia, umore depresso, perdita di peso, irrequietezza, malessere generale, insonnia, tremori, sudorazione (Budney and Hughes, 2006; Haney *et al.*, 2004; Haney *et al.*, 1999). Oltretutto, queste osservazioni trovano riscontro anche in studi funzionali di *neuroimaging* condotti su soggetti dipendenti dalla cannabis (Iversen, 2003; Quickfall and Crockford, 2006). La sindrome d'astinenza da cannabinoidi risulta quindi essere clinicamente significativa (Cooper and Haney, 2008) e sono stati proposti dei veri e propri criteri diagnostici (Haney *et al.*, 2004; Haney *et al.*, 1999; DSM-5; Tab.1).

Criteri diagnostici per l'astinenza da cannabinoidi (DSM-5)	
A.	Cessazione di un uso pesante e prolungato della cannabis (uso giornaliero o quasi giornaliero, per un periodo non inferiore ad alcuni mesi).
B.	Tre (o più) dei seguenti segni e sintomi si presentano approssimativamente una settimana dopo il criterio A: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Irritabilità, ira o aggressività;</li><li>2. Nervosismo o ansia;</li><li>3. Disturbi del sonno (insonnia, incubi);</li><li>4. Riduzione appetito o perdita di peso;</li><li>5. Irrequietezza;</li><li>6. Umore depresso;</li><li>7. Almeno uno dei seguenti sintomi fisici deve causare un disagio significativo: dolore addominale, tremori, sudorazione, febbre, brividi, o mal di testa.</li></ol>
C.	I sintomi del criterio B provocano un disagio clinicamente significativo o la compromissione delle attività sociali e professionali.
D.	I sintomi non sono attribuibili ad altre condizioni mediche e non sono giustificati meglio da un altro disturbo mentale, incluse l'intossicazione e l'astinenza da un'altra sostanza d'abuso.

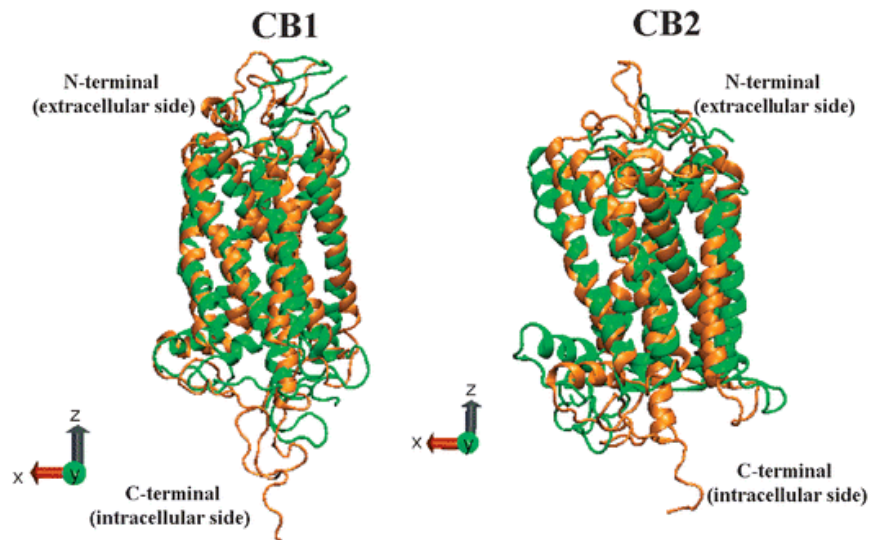
**Tabella 1.** Criteri diagnostici dell'astinenza da cannabis (DSM-5).

Analogamente, segni evidenti di un'astinenza fisica (es. *wet dog shakes* o scuotimenti, tremori delle zampe, grattamento) possono essere riprodotti nei modelli sperimentali di dipendenza dai cannabinoidi mediante la somministrazione di antagonisti dei recettori per i cannabinoidi CB<sub>1</sub> come l'SR 141716A (SR o rimonabant; Aceto *et al.*, 1996; Diana *et al.*, 1998b; Gonzalez *et al.*, 2004; Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994).

### ***1.1.3. Il sistema endocannabinoide***

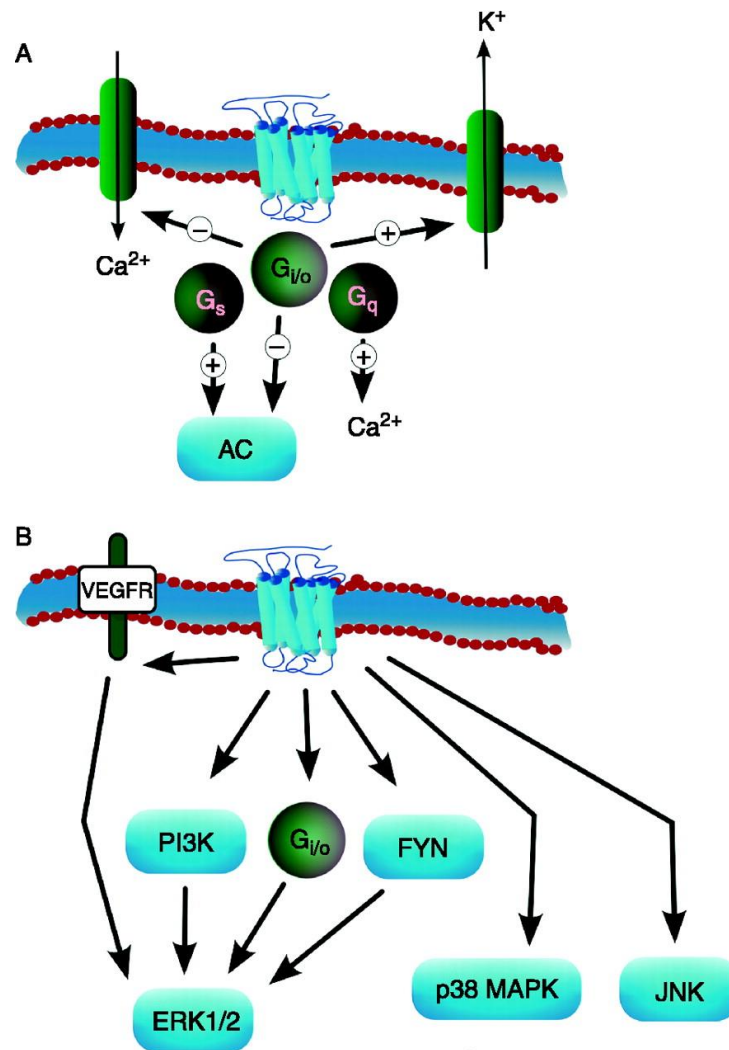
L'identificazione da parte di Gaoni e Mechoulam (1964) della struttura chimica del  $\Delta^9$ -THC diede inizio alla ricerca farmacologica sulla cannabis. Successivamente gli stessi autori hanno dimostrato che la bioattività di questo composto risiede nel suo stereoisomero levogiro (Mechoulam and Gaoni, 1967), che rappresenta uno dei circa 60 cannabinoidi presenti nella pianta (Dewey, 1986). Questa scoperta portò alla produzione di una serie di analoghi sintetici che includevano non solo composti strutturalmente simili ai fitocannabinoidi, ma anche analoghi con differenti strutture chimiche (Howlett *et al.*, 2002). Gli studi sugli effetti farmacologici del  $\Delta^9$ -THC, e dei suoi analoghi sintetici, hanno rivelato un'elevata selettività strutturale (Hollister, 1974) ed una stereoselettività (Jones *et al.*, 1974), segni indicativi di un'interazione recettoriale. L'evidenza definitiva dell'esistenza di recettori specifici per i cannabinoidi fu seguita presto dalla dimostrazione dell'alta affinità, saturabilità e stereospecificità del sito di legame per l'agonista cannabinoide sintetico  $^3\text{[H]CP-55,940}$ , nelle membrane plasmatiche del cervello del topo, che correlava sia con l'inibizione *in vitro* dell'adenilato ciclasi che con l'effetto analgesico *in vivo* di questo composto (Devane *et al.*, 1988). La disponibilità di un radioligando portò inoltre alla mappatura del recettore per i cannabinoidi nel cervello, mediante autoradiografia (Herkenham *et al.*, 1991). Tale mappatura risultò fondamentale per la successiva identificazione di un recettore orfano accoppiato a proteina G (GPCR), come il recettore cerebrale per i cannabinoidi (Matsuda *et al.*, 1990), denominato successivamente recettore CB<sub>1</sub>. I recettori CB<sub>1</sub> sono tra i più abbondanti recettori presenti a livello cerebrale nei mammiferi. Un secondo GPCR per i cannabinoidi invece, il CB<sub>2</sub>, è espresso prevalentemente nelle cellule dei sistemi immunitario ed ematopoietico (Munro *et al.*, 1993), ma è presente anche a livello cerebrale (Gong *et al.*, 2006; Van Sickle *et al.*, 2005). Entrambi i recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> sono dei recettori a 7 domini transmembrana, accoppiati a proteine G, e mostrano un'omologia a livello proteico di circa il 44%, mentre per quanto riguarda i domini transmembrana, dove è situato il sito di legame per i cannabinoidi, del 68% (Lutz, 2002). Nonostante ciò, il  $\Delta^9$ -THC e molti cannabinoidi sintetici possiedono un'affinità simile per entrambi i recettori.





**Figura 2.** Rappresentazione della struttura tridimensionale dei recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (tratta da Ramos *et al.*, 2011).

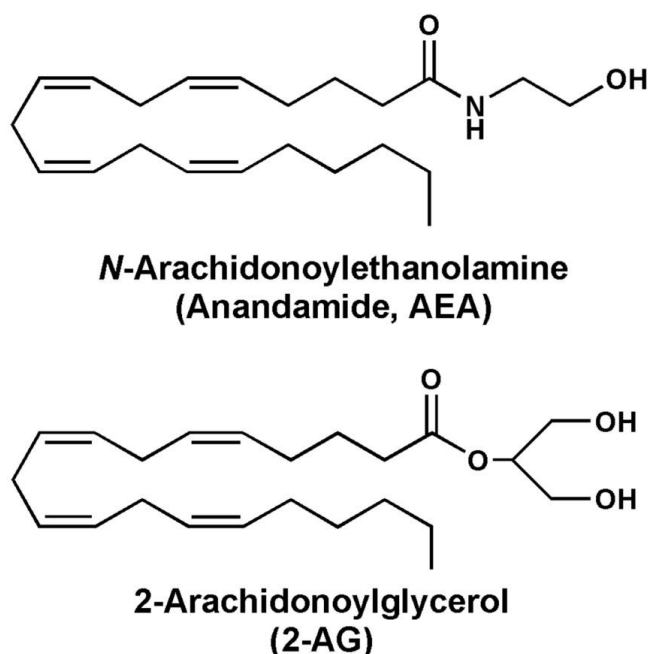
I recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> sono accoppiati principalmente ai sottotipi di proteine G di tipo inibitorio (G<sub>i/o</sub>) ed il loro meccanismo di trasduzione risulta particolarmente complesso. Infatti sebbene siano accoppiati negativamente all'adenilato ciclasi, con conseguente rilascio dell'isoforma G<sub>ia</sub> e riduzione dei livelli di cAMP, i cannabinoidi possono anche stimolare le isoforme 2, 4 e 7 dell'adenilato ciclasi mediante il rilascio della subunità βγ (Rhee *et al.*, 1998). I cannabinoidi possono anche inibire differenti tipi di canali al Ca<sup>2+</sup> (Gebremedhin *et al.*, 1999; Mackie and Hille, 1992) e attivare alcuni canali al K<sup>+</sup> (Mackie *et al.*, 1995) attraverso le subunità βγ della proteina G (Ikeda, 1996). Essi possono poi attivare proteine chinasi multifunzionali, quali la MAP chinasi p44/42 (Davis *et al.*, 2003; Wartmann *et al.*, 1995), la chinasi p38 (Derkinderen *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2000), e la JUN chinasi (Liu *et al.*, 2000; Rueda *et al.*, 2000), oltre che attivare la via della fosfatidilinositolo-3-chinasi (Gomez Del Pulgar *et al.*, 2002). Un'altra via di trasduzione attivata dai cannabinoidi coinvolge i recettori per la chinasi-3 e la β-arrestina-2, accoppiati a proteine G, che sono fondamentali per la desensitizzazione, ma non per l'internalizzazione, dei recettori CB<sub>1</sub>, ed il susseguente sviluppo della tolleranza (Jin *et al.*, 1999).



**Figura 3.** Schema illustrativo della trasduzione del segnale del recettore  $CB_1$ : (A) attivazione della proteina-G e modulazione dei canali ionici; (B) attivazione delle MAP chinasi (tratta da Turu and Hunyady, 2010).

L'esistenza nelle cellule dei mammiferi di un recettore in grado di riconoscere una sostanza derivata da una pianta, portò a chiedersi se esistesse un ligando endogeno e condusse alla successiva scoperta di molecole endogene con la medesima attività biologica del  $\Delta^9$ -THC, che sono dei derivati dell'acido arachidonico e sono stati chiamati *endocannabinoidi*. Devane e collaboratori (1992) isolarono dal cervello suino un lipide, l'arachidonoil-etanolamide, denominato anandamide (AEA), che era in grado di legarsi ai recettori cerebrali per i cannabinoidi con un'alta affinità, mimando gli effetti comportamentali del  $\Delta^9$ -THC quando veniva somministrato ai roditori. La sua biosintesi comincia con l'idrolisi enzimatica catalizzata dalla fosfolipasi di tipo D del precursore lipidico di membrana l'*N*-arachidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE; Schmid *et al.*, 1983).

Tre anni più tardi venne scoperto, indipendentemente da due gruppi diversi, un altro endocannabinoide, il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG; Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995). Il 2-AG deriva dal diacilglicerolo (DAG) mediante l'azione di una DAG-lipasi selettiva per la posizione *sn*-1 (Bisogno *et al.*, 2005).



**Figura 4.** Struttura degli endocannabinoidi anandamide (AEA) e 2-arachidonoilglicerolo (2-AG).

Gli endocannabinoidi non vengono immagazzinati in vescicole come avviene per i neurotrasmettitori classici, ma vengono prodotti “*on demand*” (cioè su richiesta), in seguito o ad una depolarizzazione che induce un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, oppure in risposta all'attivazione di alcuni recettori metabotropici oppure ancora successivamente ad entrambi gli eventi (Di *et al.*, 2005a; Di *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2002; Varma *et al.*, 2001; Witting *et al.*, 2004). Questi lipidi ad attività cannabinoide agiscono come messaggeri retrogradi, che una volta rilasciati dall'elemento postsinaptico vanno a legarsi sui propri recettori posti a livello presinaptico, la cui attivazione induce un'inibizione del rilascio di neurotrasmettitore. Il segnale degli endocannabinoidi viene interrotto mediante degradazione enzimatica: l'AEA viene degradata a livello intracellulare nel neurone presinaptico da un'amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH; Glaser *et al.*, 2003); il 2-AG viene invece idrolizzato da una monoacilglicerolo lipasi (MGL), anch'esso a livello presinaptico (Dinh *et al.*, 2002a; Dinh *et al.*, 2002b; Saario *et al.*, 2004).

Sicuramente l'assunzione di cannabinoidi interferisce primariamente con il normale funzionamento del sistema endocannabinoide. Di fatto i cannabinoidi, così come tutte le sostanze d'abuso, inducono tolleranza e dipendenza fisica, e sono in grado di attivare il sistema dopaminergico (DAergico) della gratificazione (Fattore *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005; Parolaro *et al.*, 2005). I recettori CB<sub>1</sub> sono abbondantemente espressi nel circuito cerebrale della gratificazione, e i neuroni DAergici mesocorticolimbici vengono regolati da input eccitatori ed inibitori influenzati dall'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> (Gardner, 2005). Gli endocannabinoidi, rilasciati in seguito a depolarizzazione dai *medium spiny neurons* (MSN) nel *nucleus accumbens* (NAcc) e dai neuroni DAergici nell'area ventrale del tegmento (VTA; Melis *et al.*, 2004a; Melis *et al.*, 2004b), modulano le afferenze GABAergiche e glutammatergiche, agendo come messaggeri retrogradi sui recettori CB<sub>1</sub>. Queste evidenze suggeriscono che il sistema endocannabinoide possa influenzare direttamente i meccanismi DAergici della gratificazione (Parolaro *et al.*, 2007).

## **1.2. La dipendenza da sostanze psicoattive**

L'uso occasionale, ma limitato, di una sostanza psicoattiva viene clinicamente distinto dall'utilizzo ricorrente. Quest'ultimo è associato ad una perdita di controllo nell'assunzione e all'emergere di una ricerca cronica e compulsiva della sostanza, che avviene indipendentemente dalla consapevolezza delle conseguenze negative associate al consumo ed è tipica della dipendenza patologica (Koob and Volkow, 2010; DSM-5; Volkow *et al.*, 2016).

La dipendenza da sostanze psicotrope viene definita come una malattia cronica, recidivante, caratterizzata da:

1. compulsione nella ricerca e nell'assunzione della sostanza;
2. perdita di controllo nel limitarne l'assunzione;
3. comparsa di uno stato emozionale negativo (caratterizzato da disforia, ansia, irritabilità), sintomo di una crisi d'astinenza, quando l'accesso alla sostanza viene precluso (Koob and Le Moal, 1997).

La sindrome di astinenza rappresenta la massima espressione dell'adattamento dell'organismo alla sostanza, la quale ha indotto nel tempo delle modificazioni dell'omeostasi a vari livelli che si manifestano nel momento in cui si interrompe

l'assunzione. Questo stato di omeostasi alterata (allostasi) che si esplicita nella sindrome d'astinenza, rappresenta un importante rinforzo negativo, cioè una condizione/stimolo avversivo per il cui evitamento l'individuo si adopera attivamente. Da ciò deriva la ricerca compulsiva della sostanza nel tentativo di riportare la pseudo-normalità dell'allostasi, ossia porre fine allo stato di malessere causato dall'assenza della sostanza stessa. Infatti, la manifestazione di una sindrome d'astinenza è caratterizzata dall'emergere di uno stato emozionale negativo (Koob and Le Moal, 2001), che può persistere a lungo, accompagnato o meno da segni fisici di una dipendenza, spesso molto intensi ma che tendono invece ad essere di durata relativamente breve. Alcuni soggetti descrivono l'astinenza come "fame" o esigenza primaria e gli effetti della sostanza come "sazietà" o soddisfazione del bisogno primario (Wikler, 1952).

Nella dipendenza da sostanze si verifica nel tempo, quindi, uno spostamento dal rinforzo positivo (effetti gratificanti indotti dalla droga) al rinforzo negativo (evitamento della sindrome d'astinenza) e questo spostamento condiziona gli automatismi nel controllo del comportamento motivato (Koob, 2004).

Nel sistema nervoso centrale, la transizione dall'uso occasionale di una sostanza alla dipendenza è caratterizzata dall'instaurarsi di fenomeni di neuroplasticità che possono iniziare già con il primo utilizzo della sostanza soprattutto in individui vulnerabili o in persone che attraversano fasi della crescita particolarmente sensibili, come l'adolescenza, a causa della maggiore vulnerabilità dei circuiti neurali ancora in fase di sviluppo (Koob and Volkow, 2010).

### **1.3. Il sistema della gratificazione**

E' ampiamente riconosciuto che i circuiti cerebrali che mediano le gratificazioni naturali (es. cibo, sesso, cura della progenie, ecc.) e non (es. droghe, *gambling*, ecc.) coinvolgono principalmente aree del sistema limbico tra loro interconnesse (come amigdala estesa, striato dorsale e ventrale, ippocampo e corteccia limbica) e convergono nel sistema DAergico. I neuroni DAergici integrano gli input provenienti dalle diverse regioni e rappresentano la via centrale e comune di tutto il sistema della ricompensa, essenziale nella selezione degli stimoli gratificanti, nell'apprendimento e l'ottimizzazione dei comportamenti motivanti.

I neuroni DAergici sono localizzati nel mesencefalo ventrale, dove costituiscono due principali aree: la *substantia nigra pars compacta* (SNc, A9) e l'area ventrale del tegmento (VTA, A10). I neuroni DAergici della SNc e della VTA presentano numerose peculiarità correlate ai rispettivi target, input, caratteristiche molecolari ed elettrofisiologiche, che ne consentono una suddivisione in due differenti sistemi: il nigrostriatale ed il mesolimbico (Ungerstedt, 1971). Questi sistemi sono associati, tradizionalmente, a differenti funzioni: la via nigrostriatale alle funzioni motorie, quella mesolimbica alla motivazione e alla gratificazione. Oggi, tuttavia, si è superata questa dicotomia e si ritiene che anche i neuroni nigrostriatali siano coinvolti nei sistemi della gratificazione (Wise, 2009).

I neuroni DAergici della VTA risultano fondamentali nei meccanismi della dipendenza patologica e nei comportamenti motivati (Melis and Pistis, 2012).

A livello della VTA i neuroni DAergici costituiscono approssimativamente il 65% della popolazione neuronale totale (Margolis *et al.*, 2006b; Yamaguchi *et al.*, 2011). Il resto delle cellule sono GABAergiche ed una minoranza (~5%) glutammatergiche (Yamaguchi *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2011).

I neuroni DAergici della VTA proiettano massivamente allo striato ventrale (VS), oltre che più moderatamente ad altre aree del sistema limbico come la corteccia prefrontale (PFC), l'amigdala, l'ippocampo e il tubercolo olfattivo (Bjorklund and Dunnett, 2007). La porzione mediale-posteriore della VTA proietta prevalentemente verso la zona mediale del VS (la *shell* del NAcc), mentre la porzione laterale-posteriore innerva il VS laterale (il *core* del NAcc; Ikemoto, 2010). L'autostimolazione elettrica e l'autosomministrazione di sostanze d'abuso nella VTA posteriore sono in grado di aumentare in maniera più efficace il rilascio di dopamina (DA) nella *shell* del NAcc, che risulta coinvolta primariamente nei meccanismi della gratificazione.

I neuroni DAergici della VTA possono essere considerati come un punto nodale tra le regioni cerebrali che codificano per le informazioni sensoriali e cognitive e quelle che controllano il movimento, come ad esempio i gangli della base. La loro frequenza di scarica e il loro pattern dipendono da un equilibrio tra gli input inibitori ed eccitatori, che interagiscono con le proprietà intrinseche della membrana. Queste ultime sono responsabili dell'attività di pacemaker che si osserva *in vitro* (Lobb *et al.*, 2010; Morikawa and Paladini, 2011).

La PFC e il nucleo della stria terminale costituiscono un'importante fonte di proiezioni glutammatergiche alla VTA; altri input glutammatergici-colinergici originano dai nuclei peduncolopontino e laterodorsale del tegmento (Marinelli *et al.*, 2006). Le afferenze inibitorie provengono invece dagli interneuroni (Bayer and Pickel, 1991; Grace and Onn, 1989; Omelchenko and Sesack, 2009), dai gangli della base (Marinelli *et al.*, 2006; Morikawa and Paladini, 2011; Sesack and Grace, 2010) e dal nucleo rostromediale del tegmento (RMTg; Jhou *et al.*, 2009a; Kaufling *et al.*, 2009; Lecca *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2012).

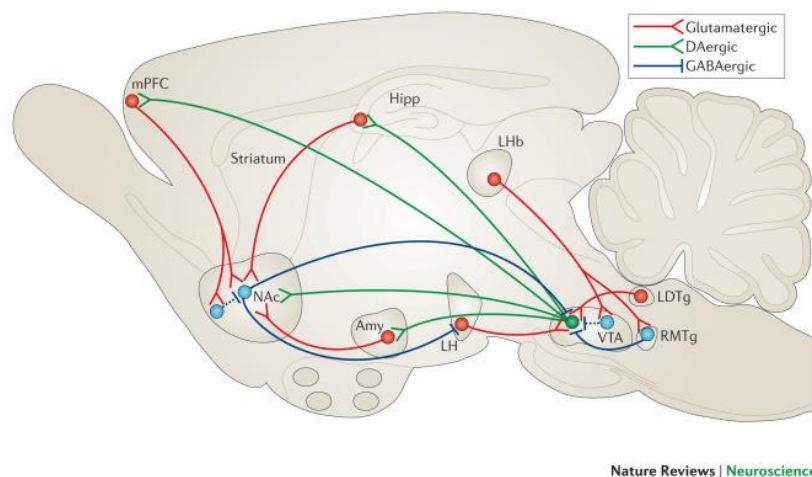
I neuroni DAergici mesencefalici esibiscono differenti pattern di scarica: regolare, irregolare (entrambi caratterizzati da potenziali d'azione singoli spazati temporalmente in modo regolare o irregolare) e *bursting* (potenziali d'azione organizzati in treni). Il passaggio da un pattern all'altro induce un differente output DAergico nelle aree terminali; in particolare i potenziali d'azione singoli sono responsabili dei livelli tonici di DA, mentre i treni di potenziali dei livelli fasici di DA (vedi review Grace *et al.*, 2007). Specificamente, il rilascio fasico di DA segnala stimoli correlati alla gratificazione e promuove così le azioni finalizzate all'obiettivo (vedi review Grace *et al.*, 2007).

Il pattern di scarica dei neuroni DAergici è correlato a specifici stimoli: ad esempio queste cellule presentano un'attività in *bursts*, e quindi inducono un rilascio massivo di DA, quando una ricompensa è inaspettata o maggiore rispetto all'aspettativa (Schultz, 1998, 2002, 2006; Schultz and Dickinson, 2000). In seguito ad un *training* durante il quale la ricompensa è associata ad uno stimolo sensoriale, i neuroni DAergici scaricano in *bursts* in risposta allo stimolo condizionato. D'altra parte queste cellule silenziano la loro attività di scarica in assenza di una ricompensa prevista o davanti ad una punizione (Schultz, 1998).

Da questo punto di vista si può dire che i neuroni DAergici codificano per l'errore nella predizione di una ricompensa (Bayer and Glimcher, 2005; Schultz, 2006) e che la DA rappresenta un potente segnale di apprendimento, che è andato incontro ad un adattamento evolutivo allo scopo di motivare gli organismi verso i rinforzi naturali. L'inibizione fasica dei neuroni DAergici, d'altro canto, può essere interpretata come un segnale di apprendimento inverso (Kehagia *et al.*, 2010; Robbins and Arnsten, 2009; Schultz, 1998), essenziale per il raggiungimento di un livello di plasticità comportamentale necessaria in un ambiente in continuo cambiamento. Deficit nell'apprendimento inverso compromettono la capacità dell'animale di svalutare gli stimoli precedentemente associati ad una

ricompensa quando essi non predicono una gratificazione e di evitare la futile perseverazione in comportamenti infruttuosi (Kehagia *et al.*, 2010). Questi meccanismi neurali vengono usurpati dalle sostanze d'abuso, che rappresentano dei rinforzi positivi più efficaci di quelli naturali. Inoltre queste sostanze compromettono l'apprendimento inverso e portano all'instaurarsi di un comportamento perseverante nella ricerca della sostanza nonostante le conseguenze negative associate al suo utilizzo (Dagher and Robbins, 2009).

Il circuito della gratificazione è implicato profondamente nei processi neuronali che sottendono la dipendenza da sostanze d'abuso. L'attivazione di questo circuito, infatti, è correlata ai comportamenti di ricerca e assunzione delle sostanze psicoattive. La sua inibizione, invece, è connessa alla disforia associata all'astinenza e al *drug-craving* (ovvero il desiderio irrefrenabile di assumere una sostanza; Gardner, 2005).



**Figura 5.** Sistema mesocorticolimbico. Rappresentazione schematica delle principali afferenze ed efferenze DAergiche, GABAergiche e glutamatergiche dell'area ventrale del tegmento (VTA) e del *nucleus accumbens* (NAc) (DAergiche=verdi; glutamatergiche=rosse; GABAergiche=blu), nel cervello dei roditori. Il NAc riceve una densa innervazione glutamatergica da: corteccia prefrontale mediale (mPFC), ippocampo (Hipp), e amigdala (Amy). La VTA riceve input da: amigdala, nucleo laterodorsale del tegmento (LDTg), abnula laterale (LHb) e ipotalamo laterale (LH; tratta da Russo and Nestler, 2013).

Le sostanze d'abuso stimolano primariamente il sistema DAergico mesolimbico, inducendo gli effetti piacevoli/euforizzanti ricercati dagli utilizzatori. Anche i cannabinoidi, al pari delle altre droghe, potenziano l'attività del sistema DAergico. Infatti, è stato dimostrato che il  $\Delta^9$ -THC, ed i cannabinoidi sintetici WIN 55,212-2 (WIN) e CP 55,940, sono in grado di aumentare l'attività neuronale DAergica della VTA (Diana *et al.*, 1998a; French, 1997; French *et al.*, 1997; Gessa *et al.*, 1998; Scherma *et al.*, 2015). La stimolazione della frequenza di scarica delle cellule DAergiche mesolimbiche è mediata dall'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> poiché viene bloccata dall'antagonista CB<sub>1</sub> SR 141617A



(SR o rimonabant; Gessa *et al.*, 1998), ma non da quello oppioide naloxone (French, 1997). Oltretutto, i cannabinoidi incrementano anche l'attività in *burst* dei neuroni DAergici (Diana *et al.*, 1998a), un pattern di scarica che induce un rilascio fasico, quindi più consistente, di DA a livello delle terminazioni assoniche (Overton and Clark, 1997).

In accordo con gli studi elettrofisiologici, diversi studi di microdialisi cerebrale *in vivo* hanno dimostrato che la somministrazione di  $\Delta^9$ -THC aumenta il rilascio di DA a livello del NAcc (Ng Cheong Ton *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1991; Oleson and Cheer 2012; Tanda *et al.*, 1997), effetto che viene bloccato dall'antagonista CB<sub>1</sub> SR e riprodotto dall'agonista CB<sub>1</sub> WIN (Tanda *et al.*, 1997; Scherma *et al.*, 2015). Questo aumentato output di DA risulta inoltre essere selettivo per la sub-regione del NAcc denominata *shell* (Tanda *et al.*, 1997), che è responsabile dell'aumentata gratificazione cerebrale associata alle sostanze d'abuso (Carlezon and Wise, 1996; Johnson *et al.*, 1995; McBride *et al.*, 1999; Pontieri *et al.*, 1995). In linea con questi risultati, anche l'autosomministrazione endovenosa di cannabinoidi nei roditori induce un incrementato rilascio di DA nella *shell* del NAcc, supportando l'ipotesi che la stimolazione del sistema DAergico mesolimbico sottenda il comportamento di ricerca e abuso (Fadda *et al.*, 2006; Lecca *et al.*, 2006; Justinova *et al.*, 2013).

#### **1.4. Astinenza da $\Delta^9$ -THC e ipodopaminergia**

Come discusso nel paragrafo precedente, la stimolazione della trasmissione DAergica a livello del circuito della gratificazione è un effetto caratteristico dell'esposizione acuta alle sostanze d'abuso e rappresenta il correlato dell'euforia e del cosiddetto rinforzo positivo. Al contrario, l'astinenza che sopraggiunge in seguito all'interruzione dell'utilizzo cronico delle droghe è invece associata ad uno stato di severa ipofunzionalità del sistema DAergico mesolimbico (Melis *et al.*, 2005). Questa condizione di "ipodopaminergia", che si pensa sia alla base del *craving* e della anedonia/disforia che possono condurre alla ricerca compulsiva della sostanza e alle ricadute, è caratterizzata da fenomeni di adattamento funzionale e morfologico sia nell'uomo che nell'animale da esperimento. Ad esempio, nei roditori sono stati riscontrati una ridotta attività elettrica dei neuroni DAergici della VTA (Diana *et al.*, 1998b; Diana *et al.*, 1993; Diana *et al.*, 1995) ridotti livelli extracellulari di DA a livello del NAcc (Rossetti *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1996) e

restringimento dei corpi cellulari in VTA (Spiga *et al.*, 2003; Diana *et al.*, 2003; Sklair-Tavron *et al.*, 1996). A livello post-sinaptico si verificano modificazioni simili; in particolare è stata osservata una riduzione della densità delle spine dendritiche in seguito all'utilizzo di amfetamina (Robinson and Kolb, 1997, 2004), nella dipendenza da alcool (Spiga *et al.*, 2014), durante l'astinenza da morfina (Spiga *et al.*, 2005) e nei roditori resi dipendenti da cannabinoidi (Spiga *et al.*, 2010). È importante sottolineare che l'ipofunzionalità e le alterazioni morfologiche a livello del sistema DAergico mesolimbico mostrano un'evoluzione temporale diversa rispetto alle manifestazioni somatiche dell'astinenza, perdurando oltre la risoluzione di queste ultime (Diana *et al.*, 1996; Diana *et al.*, 2003; Diana *et al.*, 1999; Diana *et al.*, 2006; Kenny *et al.*, 2006). Quest'ultima osservazione suggerisce che la DA possa giocare un ruolo importante nelle conseguenze a lungo termine della dipendenza (stato emozionale negativo, *craving*, ricadute nell'abuso), mentre sembra escludere l'ipotesi che sia coinvolta nella sintomatologia fisica dell'astinenza (Melis *et al.*, 2005; Diana, 2011).

Gli studi clinici (fondamentali per poter validare i modelli animali) sono altrettanto informativi e supportano anch'essi la compromissione della trasmissione DAergica negli individui tossicodipendenti. Per esempio, mentre l'alcool è in grado di aumentare il rilascio di DA nello striato ventrale nei soggetti sani (Boileau *et al.*, 2003), negli alcolisti è stata invece riscontrata una riduzione del numero di recettori DAergici striatali (Martinez *et al.*, 2005; Volkow *et al.*, 1996) accompagnata da un ridotto rilascio di DA nelle aree di proiezione (Martinez *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2007; Volkow *et al.*, 2007). Di particolare rilevanza per il presente progetto, studi di *imaging* dimostrano che l'esposizione acuta al  $\Delta^9$ -THC induce la liberazione di DA nello striato (Bossong *et al.*, 2009), mentre l'utilizzo cronico della cannabis è capace di compromettere sia la capacità di sintesi che quella di rilascio del neurotrasmettitore (vedi Sami *et al.*, 2015 per una revisione della letteratura). In linea con questi risultati, Leroy *et al.* (2012) hanno rilevato, mediante la tecnica della Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) ad alta risoluzione, l'esistenza di una ridotta disponibilità del trasportatore della DA (DAT) a livello dei circuiti DAergici (es. VS, mesencefalo) in soggetti dipendenti da cannabis e tabacco.

Entrando nello specifico delle alterazioni della trasmissione DAergica nei modelli sperimentali di dipendenza da cannabinoidi, è stato dimostrato che l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC, sia spontanea che precipitata, si accompagna ad un'imponente inibizione della frequenza di

scarica e dell'attività in *burst* dei neuroni DAergici della VTA (Diana *et al.*, 1998b) e ad una forte diminuzione nelle concentrazioni extracellulari di DA nella *shell* del NAcc (Tanda *et al.*, 1999). Il fatto che anche dopo l'astinenza spontanea, caratterizzata da segni obiettivamente piuttosto sfumati, sia presente uno stato di profonda ipodopaminergia, conferma l'ipotesi che la ridotta trasmissione DAergica sia slegata dalle manifestazioni somatiche dell'astinenza (Diana *et al.*, 1998b). Uno studio successivo condotto da Spiga e collaboratori (2010) ha inoltre riportato che l'astinenza, insorta a seguito dell'interruzione di una somministrazione cronica di cannabinoidi, provoca un restringimento della regione somatica dei neuroni DAergici della VTA e riduce la densità delle spine dendritiche nella *shell* del NAcc. La specificità di tali cambiamenti può essere ragionevolmente attribuita alla rimozione del  $\Delta^9$ -THC dato che le modificazioni morfologiche si sono presentate in maniera del tutto simile quando l'astinenza è stata indotta farmacologicamente mediante la somministrazione dell'antagonista SR (Spiga *et al.*, 2010). Al contrario la somministrazione cronica del  $\Delta^9$ -THC di per se non ha indotto modificazioni morfologiche a livello della VTA e del NAcc, designando così l'astinenza da cannabinoidi come responsabile del restringimento dei neuroni mesencefalici della VTA e della perdita delle spine dendritiche nel NAcc.

La perdita delle spine descritta nello studio di Spiga e coautori (2010) rafforza l'ipotesi secondo cui l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC è in grado di indurre notevoli cambiamenti a breve e a lungo termine in strutture cerebrali che giocano un ruolo chiave nella dipendenza da sostanze d'abuso (Melis *et al.*, 2005; Diana, 2011). In particolare, la perdita di spine dendritiche, oltre che contribuire all'ulteriore riduzione di una già compromessa trasmissione DAergica, può essere d'aiuto nella comprensione dei meccanismi di *down-regulation* dei recettori CB<sub>1</sub> che segue l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC (Breivogel *et al.*, 2003; Dudok *et al.*, 2015).

Il restringimento dei neuroni DAergici e la riduzione della densità delle spine dendritiche a livello dei terminali post-sinaptici con cui essi comunicano nel NAcc, osservate durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC, rappresentano il correlato morfologico dei deficit funzionali rilevati mediante analisi elettrofisiologiche (Diana *et al.*, 1998b) e neurochimiche (Tanda *et al.*, 1999). E' opinione comune che questi fenomeni di plasticità neuronale a carico del sistema DAergico mesolimbico contribuiscano alle proprietà negative motivazionali

dell'astinenza da diverse sostanze d'abuso, compresi i derivati della cannabis (Di Chiara, 2002; Koob and Le Moal, 2001; Melis *et al.*, 2005; Diana 2011; Volkow *et al.*, 2016).

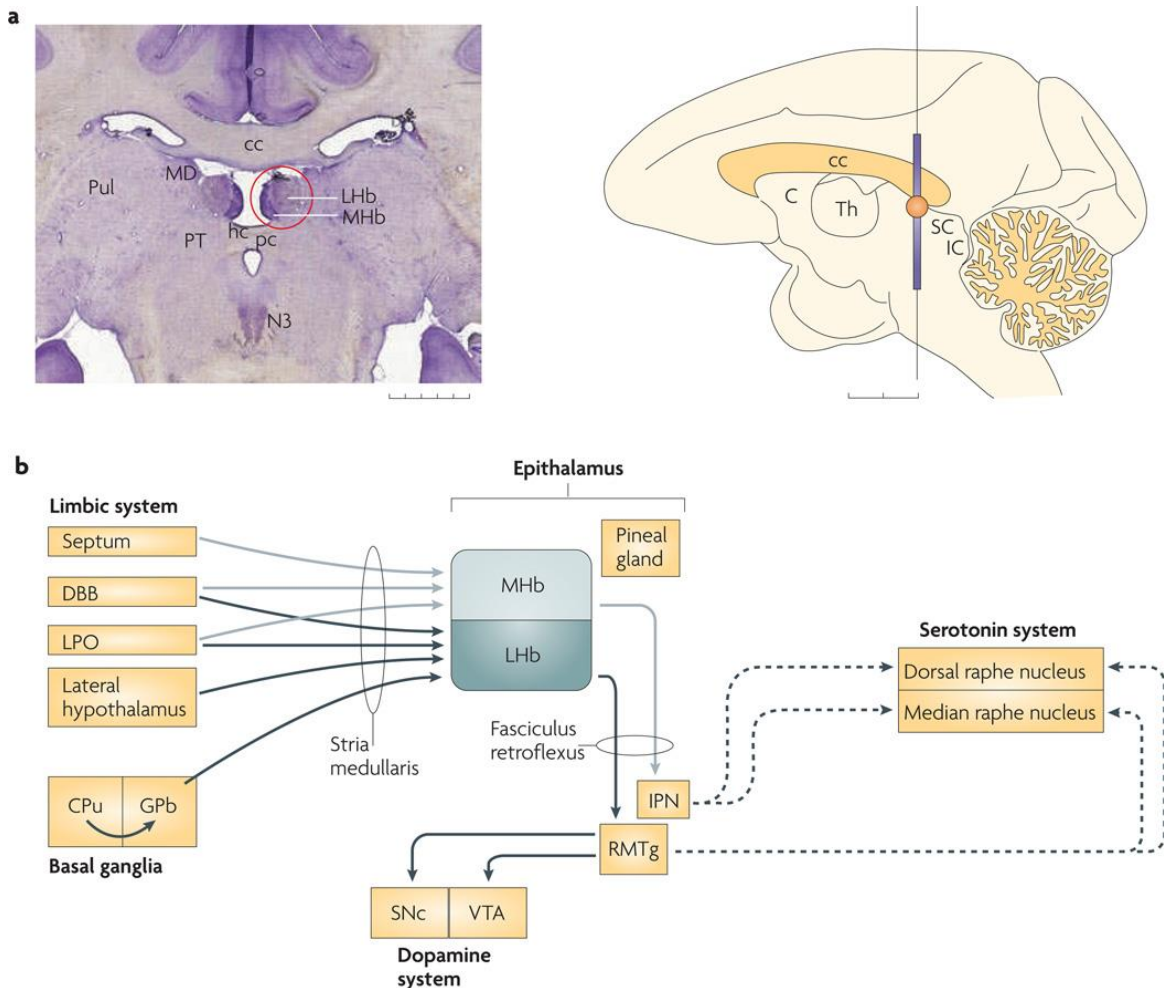
### **1.5. Il circuito dell'avversione**

Un importante concetto proposto nel campo della dipendenza è quello secondo cui le sostanze d'abuso possiedono sia una componente gratificante che una avversiva, e che entrambe giochino un ruolo fondamentale nel promuovere la dipendenza (Koob, 2013). Questo principio è ben rappresentato dall'assunzione degli psicostimolanti, che risulta in un'iniziale fase gratificante associata ad euforia ed iperattività, seguita poi da uno stato negativo caratterizzato da ansia e *drug-craving* (Knackstedt *et al.*, 2002). Inoltre, è verosimile che l'esposizione acuta alle sostanze d'abuso non solo attivi i circuiti neurali della gratificazione, ma sia in grado di sopprimere l'attività dei circuiti dell'avversione (Lecca *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2012; Barrot *et al.*, 2012). Allo stesso modo è ipotizzabile che in una condizione come l'astinenza si verifichi l'esatto contrario, e cioè che l'ipofunzionalità del sistema mesolimbico della ricompensa si accompagni ad un'aumentata attività neuronale nelle aree deputate alla mediazione degli stati avversivi (Maroteaux and Mameli 2012; Lammel *et al.*, 2012; Rothwell and Lammel 2013; Meye *et al.* 2015; Dani and De Biasi, 2013)

Considerato il ruolo dell'abenula laterale nei processi di gratificazione e avversione, insieme al fatto che entrambi questi aspetti intervengono nella stessa fase o in fasi diverse dell'assunzione di sostanze, questa struttura potrebbe rappresentare un'interessante punto di convergenza per la gratificazione indotta dalle sostanze e l'opposta componente avversiva (Lammel *et al.*, 2012; Jhou *et al.* 2013; Rothwell and Lammel 2013).

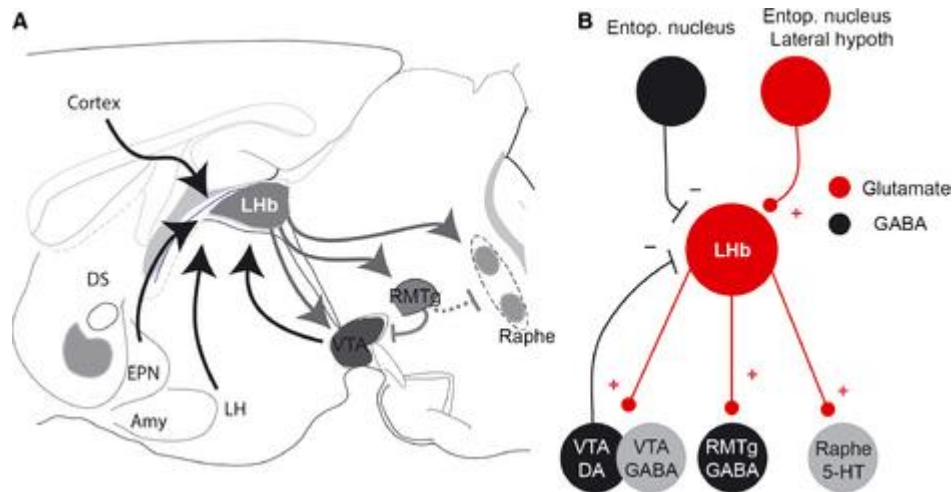
L'abenula è un nucleo epitalamico composto da due sottodivisioni: l'abenula mediale e l'abenula laterale (LHb). La LHb consta di diversi sottonuclei che ne consentono un'ulteriore suddivisione in due principali porzioni, porzione mediale (mLHb) e porzione laterale (lLHb; Andres *et al.*, 1999; Geisler *et al.*, 2003; Hikosaka, 2010). La LHb è costituita da neuroni di proiezione, prevalentemente glutammatergici, in accordo con l'elevata espressione in quest'area del trasportatore vescicolare per il glutammato (Aizawa *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011; Stamatakis and Stuber, 2012).

Attraverso la stria midollare la LHB riceve un'imponente innervazione dai gangli della base, così come dalle regioni limbiche del prosencefalo. Attraverso il fascicolo retroflesso, invece, le efferenze della LHB convogliano le informazioni verso i nuclei monoaminergici mesencefalici come, per esempio, i DAergici della VTA e della *substantia nigra pars compacta* (SNc) ed i serotoninergici del rafe (Hikosaka, 2010).



**Figura 6.** Anatomia e connessioni dell'abenula. **(a)** Una sezione istologica coronale mostra l'abenula (indicata con un cerchio rosso), nel cervello di una scimmia. La porzione mediale più scura corrisponde all'abenula mediale (MHb), mentre la regione laterale costituisce l'abenula laterale (LHb). La localizzazione dell'abenula viene indicata inoltre, nel disegno sulla destra, da un cerchio arancione. C, nucleo caudato; cc, corpo calloso; hc, commessura abenulare; IC, collicolo inferiore; MD, nucleo mediodorsale del talamo; N3, nucleo oculomotore; SC, collicolo superiore; pc, commessura posteriore; PT, pretetto; Pul, *pulvinar*; Th, talamo. **(b)** Afferenze ed efferenze dell'abenula. La MHb, la LHb e la ghiandola pineale costituiscono l'epitalamo. La MHb riceve input principalmente dal sistema limbico e invia output al nucleo interpeduncolare (IPN), che a sua volta proietta verso i nuclei del rafe. La LHb riceve input primariamente dai gangli della base e manda output a strutture cerebrali, contenenti neuroni DAergici e serotoninergici, attraverso il RMTg. Le connessioni dirette ai neuroni DAergici e serotoninergici non sono mostrate. Le linee grigio chiaro e scuro indicano le connessioni della MHb e della LHb rispettivamente. CPu, *caudato e putamen*; DBB, banda diagonale di Broca; GPb, globo pallido; LPO, area preottica laterale; SNc, *substantia nigra pars compacta* (tratta da Hikosaka, 2010).

L'attività neuronale della Lhb esercita un'inibizione sui neuroni DAergici del mesencefalo sia nei ratti che nelle scimmie (Hikosaka, 2010; Ji and Shepard, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007). Infatti la stimolazione elettrica della Lhb è in grado di inibire l'attività di scarica del ~90% dei neuroni DAergici della VTA e della SNc (Christoph *et al.*, 1986; Matsumoto and Hikosaka, 2007).



**Figura 7.** Proprietà anatomiche e funzionali della Lhb. (A) La Lhb è circondata dal talamo e contiene prevalentemente neuroni glutammatergici. I neuroni della Lhb ricevono sia input glutammatergici che GABAergici da differenti strutture. (B) Il nucleo entopeduncolare (EPN) invia input GABAergici e glutammatergici ai neuroni della Lhb. Una popolazione di neuroni non DAergici della VTA manda input GABAergici alla Lhb. Mentre l'ipotalamo laterale (LH) e la corteccia, così come i neuroni glutammatergici della VTA, forniscono input eccitatori alla Lhb (tratta da Lecca *et al.*, 2014).

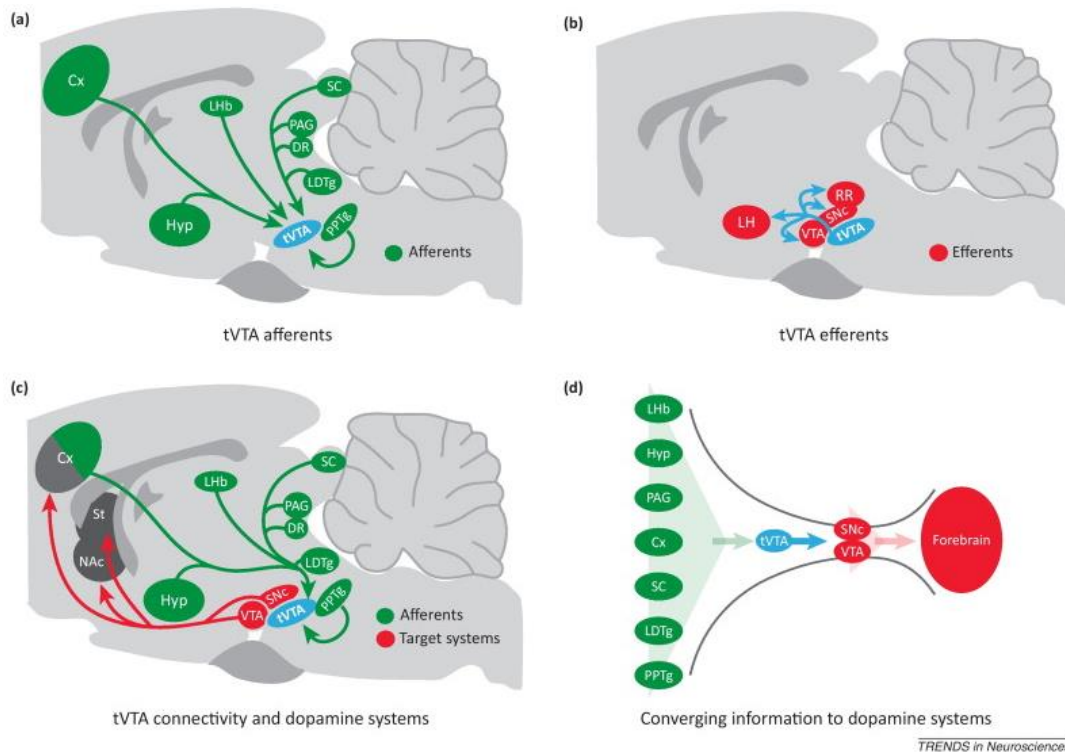
Una delle funzioni preponderanti della Lhb è la codifica degli stati avversivi (Hikosaka, 2010). Infatti, registrazioni elettrofisiologiche *in vivo* effettuate nelle scimmie hanno rivelato che un inaspettato flusso d'aria nell'occhio, o uno stimolo che predice tale evento avversivo, causano una forte eccitazione dei neuroni della Lhb (Matsumoto and Hikosaka, 2009). Uno stimolo non deve però essere necessariamente avversivo per portare ad un'attivazione dei neuroni della Lhb; infatti, anche l'omissione di una gratificazione attesa è in grado di aumentare l'attività neuronale della Lhb, suggerendo un coinvolgimento di questo nucleo nella codifica del "disappunto" (Matsumoto and Hikosaka, 2009). D'altro canto una gratificazione inaspettata, o gli stimoli ad essa associati, inducono un'inibizione dell'attività dei neuroni della Lhb (Jhou *et al.*, 2013; Matsumoto and Hikosaka, 2007).

Hikosaka e colleghi hanno quindi dimostrato che i neuroni della Lhb, la cui stimolazione induce un'inibizione dei neuroni DAergici (Christoph *et al.*, 1986; Ji and Shepard, 2007), vengono attivati dagli stimoli avversivi o dall'omissione di una ricompensa, e inibiti dagli stimoli che predicono una gratificazione o da una ricompensa inaspettata (Geisler and

Trimble, 2008; Matsumoto and Hikosaka, 2007). Oltretutto l'attivazione della LHb indotta dall'omissione della ricompensa precede temporalmente la riduzione della frequenza di scarica dei neuroni DAergici (Matsumoto and Hikosaka, 2007). Inoltre, la stimolazione della LHb inibisce pressoché tutti i neuroni DAergici del mesencefalo con una breve latenza e con un meccanismo GABA<sub>A</sub>-mediato (Christoph *et al.*, 1986; Ji and Shepard, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007), indicando una forte influenza inibitoria indiretta della LHb sui neuroni DAergici.

Infatti, sebbene sia stata dimostrata l'esistenza di una connessione glutammatergica monosinaptica, poco densa, tra la LHb e una sottopopolazione di neuroni DAergici della VTA (Lammel *et al.*, 2012), le efferenze della LHb sulla VTA sono prevalentemente di tipo glutammatergico (Hikosaka *et al.*, 2008).

Considerata dunque la natura eccitatoria dell'output della LHb, l'effetto inibitorio netto di questo nucleo sulla VTA non può che dipendere da un relè inibitorio (Christoph *et al.*, 1986; Ji and Shepard, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007). Ed effettivamente è stata identificata una struttura cerebrale GABAergica, il nucleo rostromediale del tegmento (RMTg), che media gli effetti inibitori della LHb sui neuroni DAergici del mesencefalo, oltre che integrare informazioni provenienti dall'amigdala e da altre strutture strettamente connesse (Jhou, 2005; Jhou *et al.*, 2009b). Questa regione è stata denominata da Barrot e colleghi "coda della VTA" (Kaufling *et al.*, 2009). Tale area occupa una colonna di tessuto che si estende dal margine caudale della VTA fino al margine rostrale del nucleo peduncolopontino (PPTg), contenente neuroni colinergici. Il RMTg, oltre a considerevoli afferenze dalla LHb, riceve ulteriori input dall'amigdala e da regioni target dell'amigdala, quali per esempio la sostanza grigia periacqueduttale ventrale (PAG; Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2009). A loro volta le efferenze del RMTg proiettano densamente verso il mesencefalo, dove contraggono sinapsi con i neuroni DAergici della VTA (Jhou *et al.*, 2009b) e della SNc (Bourdy *et al.*, 2014).



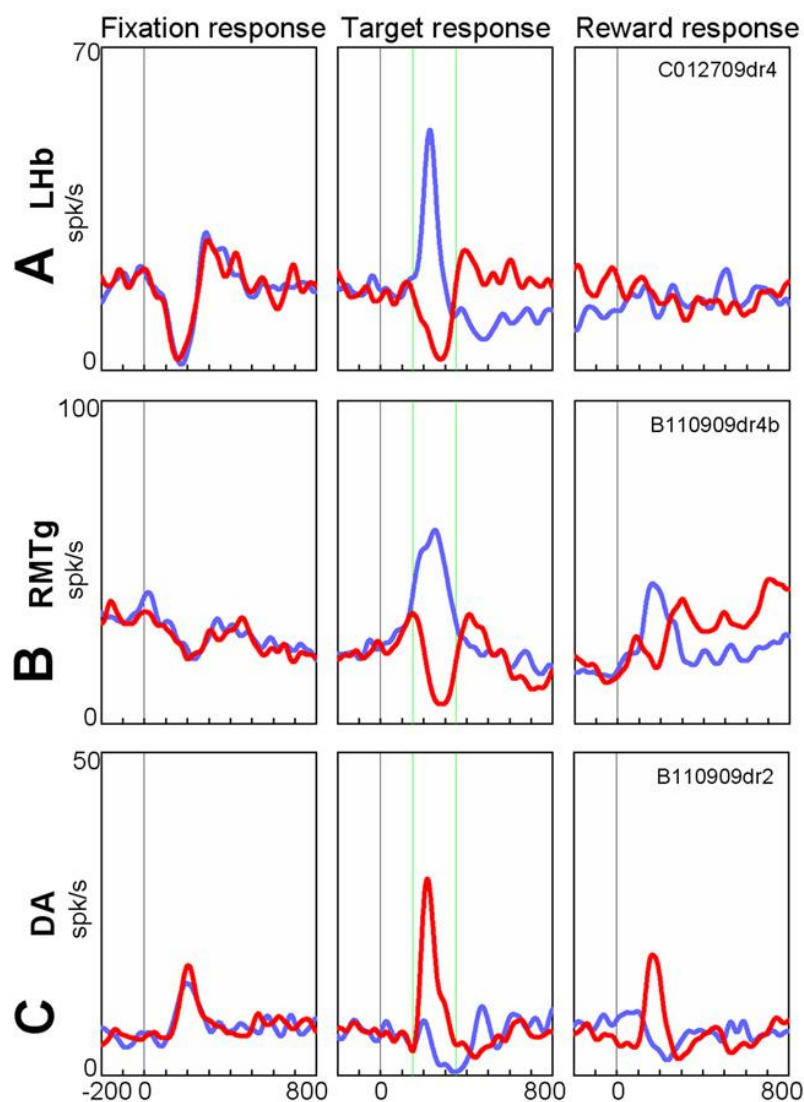
**Figura 8.** Connessioni del nucleo rostromediale del tegmento (o coda della VTA, tVTA). **(a)** La tVTA (o RMTg) riceve afferenze (in verde) da numerose strutture cerebrali. Le principali originano dalla corteccia frontale (Cx), l'abenua laterale (LHb), l'ipotalamo (Hyp), il collicolo superiore (SC), il grigio periacqueduttale (PAG), il rafe dorsale (DR), il nucleo laterodorsale del tegmento (LDTg) e il nucleo pedunculopontino del tegmento (PPTg). **(b)** Le efferenze della tVTA (in rosso) proiettano prevalentemente ai nuclei DAergici mesencefalici quali la VTA e la SNc, inoltre si estendono all'area retrobulbare (RR). Oltretutto la tVTA invia input all'ipotalamo laterale (LH). **(c)** La tVTA controlla sia il sistema mesocorticolimbico che quello nigrostriatale. **(d)** La tVTA integra i segnali provenienti da differenti strutture e li invia attraverso i sistemi DAergici alle strutture target localizzate nel prosencefalo. Inoltre le afferenze della tVTA proiettano anche in maniera diretta alla VTA. NAc, *nucleus accumbens*; St, striato dorsale (tratta da Bourdy and Barrot, 2012).

Questi risultati si inseriscono nel contesto di studi anatomici che descrivono un enigmatico nucleo nella VTA posteriore che esprime Fos in seguito all'esposizione a psicostimolanti (Perrotti *et al.*, 2005; Scammell *et al.*, 2000), presenta elevati livelli di GAD67 (Olson and Nestler, 2007) e proietta verso i neuroni DAergici (Ferreira *et al.*, 2008). In questi lavori la suddetta area è stata denominata in svariati modi: "retro-VTA", "coda posteriore" della VTA, o "polo caudale" della VTA. Questa regione è stata poi identificata come l'estremità rostrale di una struttura più ampia, il RMTg (Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2009).

Gli studi anatomici hanno rivelato come questo nucleo GABAergico, facente parte della formazione reticolare del mesencefalo, integri segnali provenienti dalla LHb, riceva afferenze provenienti dall'amigdala e da altre regioni correlate ad essa, e sia in grado di inviare output consistenti diretti verso le strutture DAergiche, con ulteriori proiezioni verso i target del tronco encefalico inclusi i principali sistemi ascendenti dell'*arousal* (Jhou,



2005; Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2009). Evidenze anatomiche, fisiologiche e comportamentali indicano i neuroni del RMTg come capaci di codificare gli stimoli avversivi e promuovere le risposte aversive passive (Jhou *et al.*, 2009a). In particolare, attraverso l'utilizzo di tecniche di registrazione elettrofisiologica in animali *freely moving*, si è osservato che i neuroni del RMTg vengono attivati in modo fasico da stimoli avversivi condizionati e non, così come dall'omissione di una gratificazione, mentre vengono inibiti da stimoli appetitivi condizionati e non (Jhou *et al.*, 2009a). Questo pattern di risposte riflette quindi il comportamento di una delle sue più importanti afferenze, la LHb (Matsumoto and Hikosaka, 2007) ed è inverso a quello dei neuroni DAergici della VTA.



**Figura 9.** (A-C) Risposte medie dell'attività elettrica dei neuroni della LHb (A), del RMTg (B) e della VTA (C) a stimoli che predicono una ricompensa (in rosso) e a stimoli associati ad una punizione (in blu). I neuroni del RMTg e quelli della LHb codificano positivamente gli stimoli avversivi, in maniera opposta ai neuroni DAergici (tratta da Hong *et al.*, 2011).

Inoltre mediante esperimenti di doppia marcatura in cui è stata utilizzata l'espressione di Fos come indicatore dell'attività neuronale, è stato dimostrato che i neuroni del RMTg che rispondono con un'eccitazione agli stimoli avversivi sono prevalentemente GABAergici e proiettano alla VTA (Jhou *et al.*, 2009a).

I neuroni del RMTg mostrano quindi preferenzialmente un'eccitazione in seguito a stimoli avversivi o omissione della gratificazione, mentre i neuroni DAergici rispondono ai medesimi stimoli prevalentemente (ma non esclusivamente) con un'inibizione (Jhou *et al.*, 2009a). Nonostante la stretta relazione anatomica e funzionale tra il RMTg e i neuroni DAergici mesencefalici, bisogna però ricordare che nessuna popolazione neuronale è omogenea. Ogni singolo neurone DAergico della VTA proietta verso un target specifico (Ikemoto, 2007; Lammel *et al.*, 2012), i neuroni DAergici con target differenti mostrano diverse proprietà fisiologiche (Ford *et al.*, 2006; Lammel *et al.*, 2012; Margolis *et al.*, 2006a; Margolis *et al.*, 2008) e possono essere attivati a tempi differenti da stimoli diversi (Schultz, 2007), inclusi quelli avversivi (Feenstra *et al.*, 2001).

## **1.6. La via LHb-RMTg controlla l'attività DAergica mesocorticolimbica ed è un target per i cannabinoidi**

L'attività elettrica dei neuroni DAergici, ed il risultante output nelle aree terminali, dipendono in maniera cruciale dall'equilibrio tra gli input eccitatori ed inibitori (Marinelli *et al.*, 2006). Quindi, anche la caratterizzazione del circuito LHb-RMTg risulta determinante per capire come i neuroni DAergici rispondono agli stimoli ambientali e farmacologici.

Infatti, come già anticipato, dato che il potenziale d'abuso delle sostanze può essere inteso come un equilibrio tra gli effetti gratificanti e avversivi (Hutchison and Riley, 2008; Simpson and Riley, 2005), si può ipotizzare che le componenti delle proprietà appetitive delle droghe dipendano sia dall'attivazione dei circuiti della gratificazione naturale che dalla soppressione della risposta da parte dei circuiti neurali che mediano l'avversione (Lecca *et al.*, 2011). D'altra parte, uno dei punti chiave della dipendenza da sostanze è proprio la perseveranza nell'assunzione di sostanze malgrado gli effetti negativi e le conseguenze spiacevoli del loro uso. Considerata la stretta interconnessione anatomico-funzionale esistente tra le regioni che codificano per gli stimoli avversivi e per quelli

gratificanti (Jhou *et al.*, 2009a; Lammel *et al.*, 2014), quali la VTA, la Lhb e il RMTg, non sorprende il fatto che questo circuito sia di fondamentale importanza anche per quanto concerne gli effetti delle sostanze d'abuso.

Diversi studi indicano che le droghe hanno un effetto sui neuroni GABAergici del RMTg, in particolare su quelli che proiettano alla VTA. Su questi ultimi, ad esempio, l'esposizione cronica alla cocaina induce l'espressione di DFosB (Kaufling *et al.*, 2009; Perrotti *et al.*, 2005) e c-Fos (Geisler *et al.*, 2008), mentre la somministrazione acuta ne inibisce l'attività neuronale (Lecca *et al.*, 2011). Ancora, i neuroni del RMTg esprimono i recettori per gli oppioidi di tipo  $\mu$  anche a livello delle terminazioni in VTA (Jhou *et al.*, 2009b; Jalabert *et al.*, 2011) e, coerentemente con ciò, vengono inibiti dalla morfina contribuendo alla contemporanea eccitazione dei neuroni DAergici (Lecca *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2012; Jalabert *et al.*, 2011). Con un meccanismo analogo, anche i cannabinoidi deprimono l'attività neuronale del RMTg e sopprimono l'inibizione dei neuroni DAergici della VTA evocata dalla stimolazione del nucleo GABAergico (Lecca *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2012; vedi sotto). Nell'insieme questi risultati sono coerenti con le risposte del circuito Lhb-RMTg-VTA agli stimoli gratificanti naturali come il cibo (vedi **1.5**). D'altro canto, come ampiamente discusso sempre nella sezione precedente (**1.5**), Jhou e collaboratori (2009a) hanno dimostrato che gli stimoli avversivi sono in grado di indurre l'espressione di Fos nei neuroni del RMTg che proiettano alla VTA, e di stimolare in modo fasico la loro attività elettrica. In particolare, un numero considerevole di neuroni del RMTg che proiettano alla VTA, riceve rilevanti afferenze dalla Lhb (Jhou *et al.*, 2009b), avvalorando l'idea che la via Lhb-RMTg possa segnalare gli eventi avversivi inibendo i neuroni DAergici del mesencefalo.

Le ricerche condotte nel nostro laboratorio da Lecca e collaboratori (2011, 2012) sul circuito Lhb-RMTg-VTA hanno fornito parte delle premesse al presente studio. Questi autori hanno infatti caratterizzato le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni GABAergici del RMTg e rilevato che la maggior parte di essi vengono significativamente eccitati da uno stimolo nocicettivo, rappresentato dal pinzettamento di una zampa (Lecca *et al.*, 2011). Hanno esaminato anche la risposta dei neuroni del RMTg alla stimolazione elettrica della Lhb, dimostrando che la maggioranza dei neuroni che rispondono con un'eccitazione alla stimolazione della Lhb sono anche eccitati dal pinzettamento (stimolo avversivo nocicettivo; Lecca *et al.*, 2011). Queste osservazioni nei ratti anestetizzati concordano con

quanto riportato nei roditori *freely moving*, nei quali la frequenza di scarica dei neuroni GABAergici del RMTg viene inibita dagli stimoli gratificanti naturali, come il cibo, o da stimoli che predicono una ricompensa, mentre viene eccitata dagli stimoli avversivi (Jhou *et al.*, 2009a). Successivamente, nel 2012, Lecca e collaboratori hanno evidenziato la rilevanza fisiologica del RMTg come fonte primaria degli input inibitori verso i neuroni DAergici, osservando che la stimolazione elettrica del RMTg induce una temporanea soppressione dell'attività di scarica di circa la metà dei neuroni DAergici della VTA, con una latenza compatibile ad una via monosinaptica (Lecca *et al.*, 2012). Questo risultato è in linea con gli studi anatomici che mostrano come circa il 60% dei neuroni DAergici della VTA siano direttamente innervati dalle proiezioni GABAergiche del RMTg (Jhou *et al.*, 2009a; Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2010). Inoltre, la caratterizzazione dell'inibizione RMTg-indotta dei neuroni DAergici ha evidenziato una correlazione negativa tra l'attività spontanea dei neuroni DAergici e la durata della soppressione della stessa: a frequenze spontanee più alte corrispondono tempi più brevi della cessazione completa dell'attività di scarica indotta dalla stimolazione del RMTg. Questo risultato suggerisce che le afferenze del RMTg verso i neuroni DAergici della VTA possano essere uno dei principali input regolatori della loro attività spontanea e del loro pattern di scarica. Infatti, le cellule regolari e in *burst* vengono silenziate dalla stimolazione del RMTg per una durata minore rispetto alle cellule irregolari, suggerendo che quest'ultima sottopopolazione di neuroni DAergici sia soggetta ad un maggiore controllo da parte del RMTg (Lecca *et al.*, 2012).

Come già accennato, il ruolo del RMTg nei processi avversivi e le sue connessioni anatomo-funzionali con la VTA hanno condotto Lecca *et al.* (2011, 2012) ad investigare anche l'effetto acuto dei cannabinoidi su questo circuito. L'ipotesi era che i neuroni GABAergici del RMTg potessero essere implicati nella stimolazione dei neuroni DAergici ad opera di queste sostanze (Diana *et al.*, 1998a; French *et al.*, 1997; Gessa *et al.*, 1998) attraverso un meccanismo di tipo disinibitorio. A questo scopo hanno esaminato l'effetto dell'esposizione acuta all'agonista per i recettori CB<sub>1</sub> WIN su: i) l'attività spontanea dei neuroni del RMTg identificati in base alla loro risposta eccitatoria, sia alla stimolazione della LHb che al pinzettamento della zampa (Lecca *et al.*, 2011); ii) la risposta inibitoria dei neuroni DAergici della VTA evocata dalla stimolazione elettrica del RMTg (Lecca *et al.*, 2012). Questi studi hanno dimostrato che il WIN è in grado non solo di inibire il *firing* spontaneo del RMTg (Lecca *et al.*, 2011), ma anche di ridurre significativamente la durata

dell'inibizione dei neuroni DAergici della VTA indotta dalla stimolazione del RMTg *in vivo*, così come la depressione delle correnti post sinaptiche inibitorie (IPSC) evocate dalle afferenze caudali nelle cellule DAergiche *in vitro* (Lecca *et al.*, 2012). Hanno così fornito un plausibile meccanismo d'azione mediante il quale i cannabinoidi eccitano i neuroni DAergici, ossia l'inibizione delle afferenze estrinseche GABAergiche che originano nel RMTg e che esprimono peraltro i recettori CB<sub>1</sub> (Melis *et al.*, 2014).

Questi risultati in definitiva suggeriscono che i cannabinoidi sono capaci di influenzare profondamente sia l'attività dei neuroni GABAergici che le risposte dei neuroni DAergici evocate dall'attivazione del RMTg. Per cui tali neuroni che si trovano in opposizione funzionale alle cellule DAergiche, giocano un ruolo di primo piano nei complessi circuiti neurali che mediano avversione e ricompensa e, di conseguenza, anche nella dipendenza da sostanze (Lecca *et al.*, 2012).

## 2. OBIETTIVO DELLA TESI

Partendo da tali presupposti lo scopo del nostro lavoro è stato quello di analizzare le modificazioni funzionali a livello del circuito abenulo-mesencefalico (LHb-RMTg-VTA) durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC. In particolare abbiamo cercato di individuare gli input responsabili della ridotta trasmissione DAergica mesolimbica (ipodopaminergia) che caratterizza l'astinenza da cannabinoidi così come quella da altre sostanze d'abuso. Infatti, nonostante l'ipofunzionalità DAergica sia riconosciuta come responsabile dello stato emozionale negativo che conduce alla ricaduta nei comportamenti d'abuso, i meccanismi neuronali che la sottendono non sono ancora chiari.

Nello specifico abbiamo esaminato, mediante registrazioni elettrofisiologiche extracellulari *in vivo* condotte su ratti resi dipendenti da  $\Delta^9$ -THC, gli effetti dell'astinenza spontanea e precipitata su:

- 1) le afferenze inibitorie monosinaptiche RMTg-VTA;
- 2) l'attività elettrica spontanea del RMTg;
- 3) l'attività elettrica spontanea della LHb.

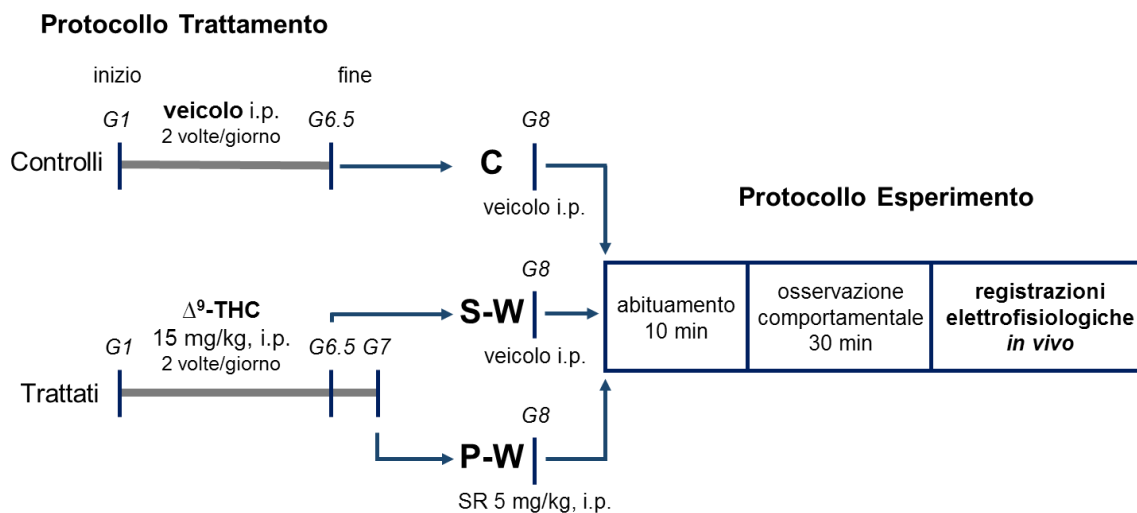
### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1. Soggetti e procedure**

Per il presente studio abbiamo utilizzato ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley (Harlan Nossan, Italia) del peso di 250-350 g. Gli animali sono stati stabulati in numero da 3 a 6 per gabbia e mantenuti ad un regolare ciclo giorno/notte di 12 h in condizioni ambientali standard (T 21±1 °C, umidità 60%), con cibo ed acqua *ad libitum*. I protocolli sperimentali sono stati approvati dal Comitato etico dell'Università degli Studi di Cagliari, e condotti secondo la normativa CEE per l'uso degli animali da esperimento (CEE N°86/609). Sono state adottate tutte le misure necessarie per ridurre al minimo dolore, sofferenza e numero di animali utilizzati. I ratti, anestetizzati con uretano (1.3 g/kg) per via intraperitoneale (i.p.), sono stati posizionati su uno strumento stereotassico (Kopf, Tujunga CA, USA) per la localizzazione delle aree cerebrali di registrazione e stimolazione. La temperatura dei ratti è stata mantenuta costante a 37±1 °C tramite l'ausilio di un tappetino riscaldante.

#### **3.2. Trattamento cronico**

Gli animali sono stati assegnati in maniera casuale ai diversi gruppi sperimentali: i ratti appartenenti ai gruppi dell'astinenza sono stati trattati cronicamente con  $\Delta^9$ -THC (15 mg/kg, i.p.), due volte al giorno, per 6.5 giorni (astinenza spontanea, S-W) o per 7 giorni (astinenza precipitata, P-W). I controlli (C) hanno ricevuto un'iniezione intraperitoneale di veicolo (soluzione salina con 1% di Tween 80) per 7 giorni due volte al giorno (Fig.10).



**Figura 10.** Protocollo sperimentale.

### 3.3. Farmaci

Il  $\Delta^9$ -THC è stato acquistato dalla THC PHARM GmbH (Francoforte, Germania), disciolto al 20% in etanolo e conservato a  $-20^\circ\text{C}$ . Per la somministrazione cronica il  $\Delta^9$ -THC è stato portato in soluzione con 1% di Tween 80 e diluito in soluzione fisiologica. Per l'induzione dell'astinenza precipitata l'SR 141716A (gentilmente donato dalla Sanofi Aventis, Parigi, Francia) è stato portato in soluzione con 1% di Tween 80 e diluito in soluzione fisiologica. Il volume di iniezione utilizzato per le somministrazioni i.p. è stato pari a 3 ml/kg di peso corporeo.

### 3.4. Comportamento

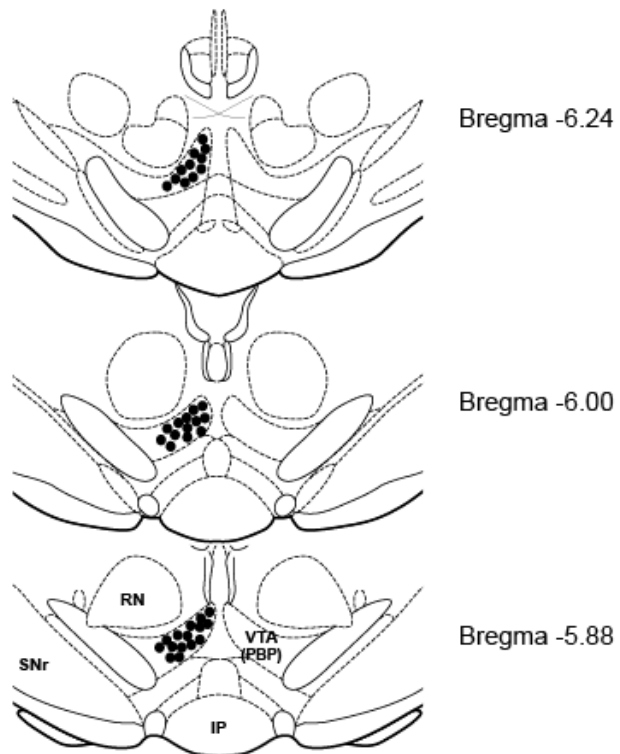
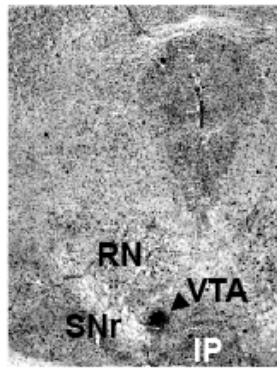
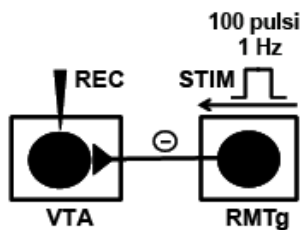
Il giorno 8, prima di procedere con le analisi elettrofisiologiche, i ratti sono stati osservati per 30 minuti, annotando ogni 2 minuti l'eventuale presenza e frequenza di comportamenti indicativi dell'astinenza da  $\Delta^9$ -THC, quali: *scratching*, *facial rubbing*, *licking* e *wet dog shakes*. I ratti del gruppo P-W sono stati trattati con una dose di 5 mg/kg di SR 141716A, 10 min prima dell'osservazione, al fine di precipitare farmacologicamente l'astinenza (Aceto *et al.*, 1996; Diana *et al.*, 1998b; Tanda *et al.*, 1999; Tsou *et al.*, 1995).



### **3.5. Registrazioni elettrofisiologiche *in vivo***

#### **3.5.1. Esperimenti nella VTA**

Al fine di valutare l'influenza delle proiezioni inibitorie del RMTg sui neuroni DAergici, sono state condotte sessioni sperimentali di registrazione nella VTA. Abbiamo effettuato una mappatura (*sampling*) della VTA, allo scopo di monitorare l'attività spontanea dei neuroni DAergici presenti nell'area. Il *sampling* consiste nell'affondare l'elettrodo per 4-6 volte (con una distanza di 200  $\mu\text{m}$  l'una dall'altra) all'interno dell'area prescelta. Il numero totale delle cellule spontaneamente attive registrate viene diviso per il numero totale di affondate effettuate (cellule/affondata). Le strutture cerebrali in questione sono state identificate utilizzando le coordinate fornite dall'atlante cerebrale per ratto (Paxinos and Watson, 2007). In particolare, l'elettrodo registrante è stato inserito alle coordinate relative alla parte latero-posteriore della VTA, nel nucleo parabrachiale (PBP), contenente la maggiore densità di neuroni DAergici rispetto ai nuclei più mediali della VTA (Lammel *et al.*, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2011; 5.8-6.2 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.4-0.6 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 7.0-8.0 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebrale; Fig.11). Al fine di testare le risposte dei neuroni DAergici all'attivazione del RMTg, un elettrodo bipolare stimolante ( $\emptyset$  della punta 250  $\mu\text{m}$ ) è stato posizionato nel RMTg (9.6 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.8 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 7.0 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebellare, con un'inclinazione anteroposteriore rispetto al piano coronale di 20°; Fig.11).

**A****B**

**Figura 11.** Localizzazione dei siti di registrazione e stimolazione. **(A)** Sulla sinistra ubicazione del sito di registrazione di un neurone DAergico della VTA, il triangolo indica il Pontamine Sky Blue (PsB). Le tavole a destra mostrano un campione della localizzazione dei siti di registrazione (pallini neri), verificati mediante sezioni istologiche. Abbreviazioni: RN, nucleo rosso; IP, nucleo interpeduncolare; SNr, *substantia nigra pars reticulata*; PBP, nucleo parabrachiale pigmentato. **(B)** Lo schema a sinistra riassume il protocollo di stimolazione utilizzato (1 Hz, 0.5 ms, 0.5 mA). A destra la figura indica la localizzazione della punta dell'elettrodo stimolante (\*). Abbreviazioni: xscp, decussazione del peduncolo cerebellare superiore; cp, peduncolo cerebrale; ml, lemisco mediale; tth, tratto trigeminotalamico; Pn, nucleo pontino.

L'attività delle cellule è stata registrata extracellularmente mediante una micropipetta in vetro riempita con 2% di Pontamine Sky Blue (PsB) disciolto in 0.5 M di Acetato di Sodio (con impedenza stimata tra i 2.5-5 M $\Omega$ ). I neuroni della VTA, virtualmente contenenti DA, sono stati isolati ed identificati in accordo con le caratteristiche elettrofisiologiche descritte in letteratura (Grace and Bunney, 1983, 1984a, b; Lecca *et al.*, 2012): frequenza di scarica  $\leq 10$  Hz e durata del potenziale d'azione  $\geq 2.5$  ms. Solo quando la cellula rispondeva a questi criteri, veniva registrata. Una volta selezionata una cellula, si procedeva alla verifica

della risposta ortodromica alla stimolazione elettrica del RMTg. Brevemente, lo stimolo consisteva in un pulso singolo monofasico e rettangolare con durata di 0.5 ms e intensità pari a 0.5 mA. La frequenza dello stimolo è stata fissata ad 1 Hz. Per ogni neurone è stata valutata la risposta alla stimolazione grazie all'ausilio dell'oscilloscopio e mediante l'elaborazione on-line (Spike2 software, CED, Cambridge, UK) del *peri-stimulus time histogram* (PSTH).

La frequenza di scarica spontanea dei neuroni della VTA è stata registrata per 2-3 minuti al fine di poter stabilire una frequenza media basale. Oltre alla frequenza è stato considerato anche un parametro qualitativo della modalità di scarica: la percentuale di potenziali in treni (% di *spikes in bursts*). Inoltre per ogni neurone è stata analizzata la modalità di scarica tramite l'analisi degli autocorrelogrammi (con un bin pari a 10 ms su intervalli di analisi di 2 s) al fine di classificare i neuroni in tre distinte categorie: regolari, irregolari e *bursting* (Fabricius *et al.*, 2010; Hyland *et al.*, 2002). Un autocorrelogramma con tre o più picchi ad intervalli regolari è distintivo dei neuroni regolari. Un picco immediato che scema nel tempo per poi risalire è tipico dei neuroni in *bursts*. Le cellule classificate come irregolari invece mostrano caratteristiche diverse dalle classificazioni precedenti (Fig.17 C).

Dopo i 2-3 minuti di registrazione dell'attività spontanea della cellula, è stato applicato un breve pinzettamento meccanico (~2 secondi) alla zampa posteriore dell'animale, ipsilateralmente all'emisfero di registrazione. La risposta del neurone è stata analizzata nei 5 secondi successivi alla stimolazione nocicettiva.

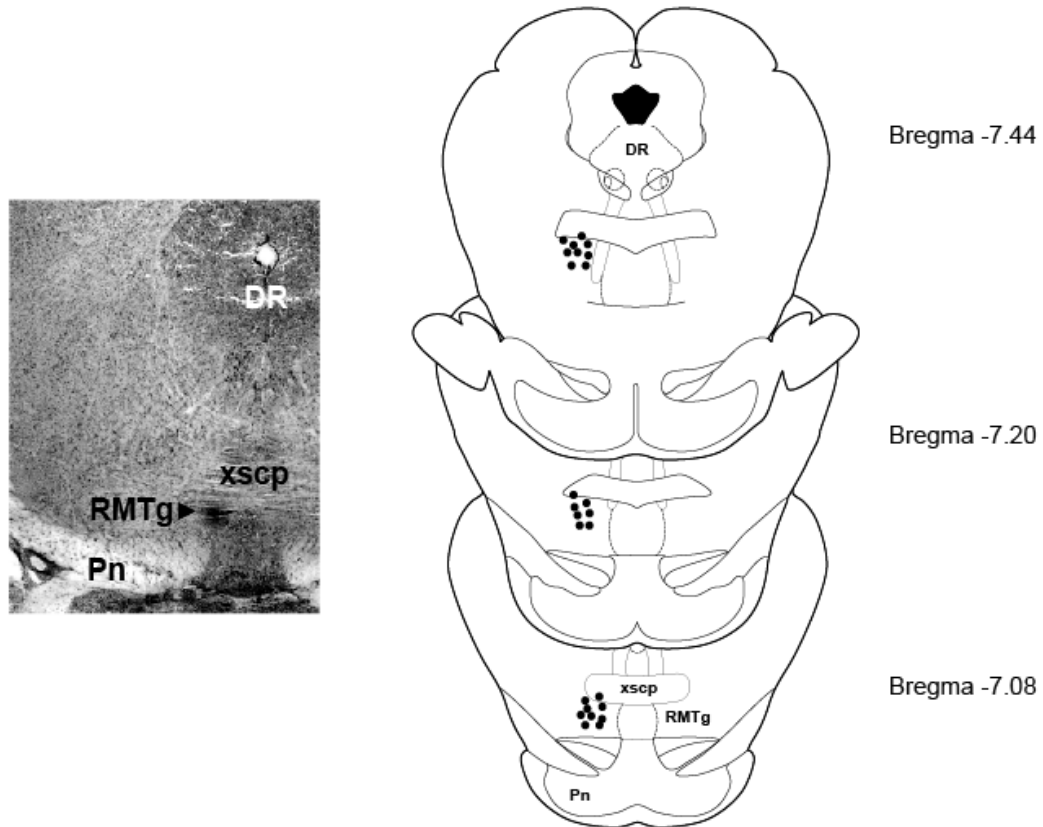
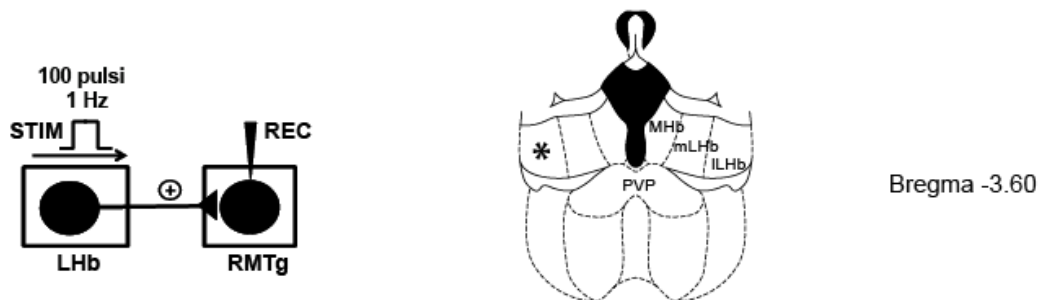
Successivamente, è stata testata la sua risposta alla stimolazione del RMTg. I PSTH sono stati costruiti ogni 100 pulsii (coincidenti con 100 s di registrazione, considerato che lo stimolo aveva frequenza pari ad 1 Hz) e visualizzati usando un bin pari a 1 ms. Una cellula è stata considerata inibita o eccitata quando il numero di potenziali d'azione/bin nei 50 ms successivi allo stimolo è stato rispettivamente inferiore o superiore ai 50 ms precedenti ad esso (ANOVA ad una via per misure ripetute). La durata dell'inibizione evocata dallo stimolo è stata definita come tempo di completa cessazione dell'attività di scarica immediatamente successivo allo stimolo.

Il segnale neuronale, registrato extracellularmente, è stato filtrato (passa-banda: 0.1-10000 Hz), amplificato (Neurolog System, Digitimer, Hertfordshire, UK), visualizzato su un

oscilloscopio digitale (TDS 3012, Tektronix, Marlow, UK) ed infine acquisito tramite computer connesso ad un interfaccia di conversione analogico-digitale CED 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) e visualizzato per mezzo del software Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

### ***3.5.2. Esperimenti nel RMTg***

Il *sampling* è stato effettuato per mezzo di un elettrodo registrante, inserito nella parte centrale (*core*) del RMTg (7.0-7.4 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.7-0.8 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 6.5-7.5 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebrale; Fig.12). In tutti gli esperimenti è stato inserito un elettrodo bipolare stimolante ( $\varnothing$  della punta: 250  $\mu$ m) nella LHb (1.9 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.7 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 4.7 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebrale, con un'inclinazione anteroposteriore rispetto al piano coronale di 20°; Fig.12).

**A****B**

**Figura 12.** Localizzazione dei siti di registrazione e stimolazione. **(A)** Sulla sinistra ubicazione del sito di registrazione di un neurone GABAergico del RMTg, il triangolo indica il Pontamine Sky Blue (PsB). Le tavole a destra mostrano un campione della localizzazione dei siti di registrazione (pallini neri), verificati mediante sezioni istologiche. Abbreviazioni: xscp, decussazione del peduncolo cerebellare superiore; Pn, nucleo pontino; DR, nucleo del rafe dorsale. **(B)** Lo schema a sinistra riassume il protocollo di stimolazione utilizzato (1 Hz, 0.5 ms, 0.5 mA). A destra la figura indica la localizzazione della punta dell'elettrodo stimolante (\*). Abbreviazioni: MHb, abenula mediale; mLHb, porzione mediale dell'abenula laterale; ILHb, porzione laterale dell'abenula laterale; PVP, nucleo talamico paraventricolare posteriore.

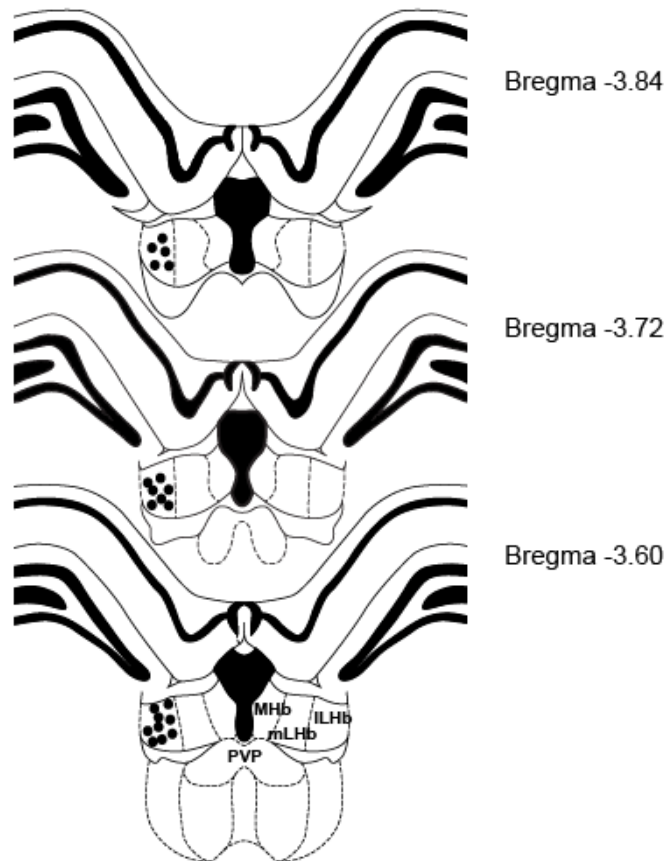
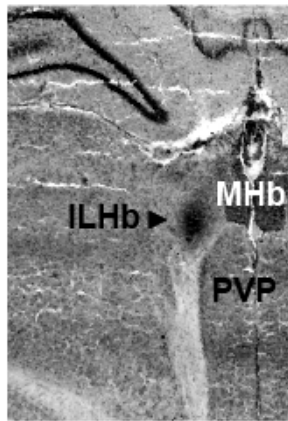
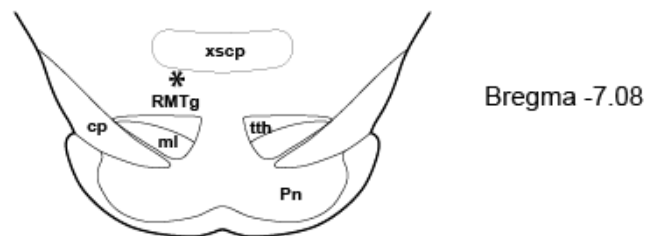
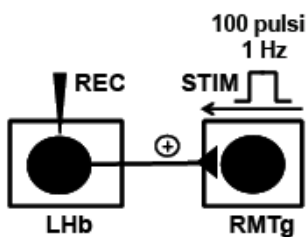
L'attività dei neuroni del RMTg è stata acquisita utilizzando gli stessi strumenti descritti precedentemente eccezion fatta per i filtri (passa-banda: 1-3000 Hz) e per l'impedenza degli elettrodi (stimata tra i 5-10 MΩ). I neuroni del RMTg, virtualmente contenenti GABA, sono stati isolati ed identificati in accordo con le caratteristiche elettrofisiologiche descritte in letteratura (Jhou *et al.*, 2009a; Lecca *et al.*, 2011): frequenza di scarica

spontanea superiore ai 10 Hz ed un potenziale d'azione bifasico ad insorgenza negativa e di breve durata ( $\leq 1.5$  ms). Una volta selezionata una cellula, è stata testata la risposta ad uno stimolo nocicettivo, dopodiché si procedeva alla verifica della risposta ortodromica alla stimolazione elettrica della LHb (0.5 mA, 0.5 ms, 1 Hz). Per ogni neurone è stata valutata la risposta alla stimolazione elettrica della LHb, grazie all'ausilio dell'oscilloscopio e mediante l'elaborazione immediata del PSTH. Un neurone veniva considerato eccitato dalla stimolazione della LHb quando il numero di potenziali d'azione/bin nei 20 ms successivi allo stimolo era significativamente maggiore (ANOVA ad una via per misure ripetute) rispetto ai 20 ms antecedenti lo stesso (basale).

La frequenza di scarica spontanea dei neuroni del RMTg è stata registrata per 2-3 minuti al fine di poter stabilire una frequenza media basale.

### **3.5.3. Esperimenti nella LHb**

Per effettuare il *sampling* l'elettrodo registrante è stato inserito nella porzione laterale della LHb (3.6-3.8 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.7-0.8 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 4.5-6.0 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebrale; Fig.13). In tutti gli esperimenti è stato inserito un elettrodo bipolare stimolante ( $\emptyset$  della punta: 250  $\mu$ m) nel RMTg (9.6 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.8 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 7.0 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebellare, con un'inclinazione anteroposteriore rispetto al piano coronale di 20°; Fig.13).

**A****B**

**Figura 13.** Localizzazione dei siti di registrazione e stimolazione. **(A)** Sulla sinistra ubicazione del sito di registrazione di un neurone glutamatergico della LHb, il triangolo indica il Pontamine Sky Blue (PsB). Le tavole a destra mostrano un campione della localizzazione dei siti di registrazione (pallini neri), verificati mediante sezioni istologiche. Abbreviazioni: MHb, abenua mediale; mLHb, porzione mediale dell'abenua laterale; ILHb, porzione laterale dell'abenua laterale; PVP, nucleo talamico paraventricolare posteriore. **(B)** Lo schema a sinistra riassume il protocollo di stimolazione utilizzato (1 Hz, 0.5 ms, 0.5 mA). A destra la figura indica la localizzazione della punta dell'elettrodo stimolante (\*). Abbreviazioni: xscp, decussazione del peduncolo cerebellare superiore; cp, peduncolo cerebrale; ml, lemnisco mediale; tth, tratto trigeminotalamico; Pn, nucleo pontino.

L'attività dei neuroni della LHb è stata acquisita utilizzando gli stessi strumenti e parametri utilizzati per le registrazioni nel RMTg. I neuroni della LHb, virtualmente contenenti glutammato, sono stati isolati ed identificati in accordo con le caratteristiche elettrofisiologiche descritte in letteratura: potenziale d'azione trifasico e ampio ( $\geq 3$  ms;

Kowski *et al.*, 2009). Una volta selezionata una cellula, è stata testata la risposta ad uno stimolo nocicettivo, dopodiché si procedeva alla verifica della risposta alla stimolazione elettrica del RMTg (0.5 mA, 0.5 ms, 1 Hz). Per ogni neurone è stata valutata la risposta alla stimolazione antidromica del RMTg, grazie all'ausilio dell'oscilloscopio e mediante l'elaborazione immediata del PSTH. La risposta antidromica alla stimolazione elettrica del RMTg, è stata valutata sulla base del fatto che il potenziale antidromico avesse una latenza di durata fissa e collidesse con i potenziali spontanei.

La frequenza di scarica spontanea dei neuroni della LHB è stata registrata per 2-3 minuti al fine di poter stabilire una frequenza media basale.

### **3.6. Istologia**

Al termine della sessione sperimentale il sito di registrazione è stato marcato con Pontamine Sky Blue (PsB) iniettato elettroforeticamente dall'elettrodo registrante mediante il passaggio di corrente continua (15 mA) per ~15 minuti. La marcatura del sito di stimolazione è stata effettuata tramite il passaggio di corrente continua (1 mA) per 1 minuto attraverso l'elettrodo stimolante. Il cervello è stato quindi rimosso e congelato in isopentano a -40 °C. La posizione degli elettrodi è stata identificata microscopicamente in sezioni seriali-coronali del cervello (60 µm) colorate con Rosso Neutro.

### **3.7. Analisi statistica**

I dati, una volta raccolti ed elaborati (Spike2), sono stati sottoposti ad analisi statistica. A seconda dei casi sono stati utilizzati differenti test statistici. L'ANOVA a una via, al fine di analizzare le differenze tra 3 gruppi. Il test di Dunnett è stato utilizzato come *post hoc*. L'analisi correlazionale è stata elaborata mediante il test di Pearson. Tutte le analisi in questione sono state sviluppate mediante il software Graphpad Prism (La Jolla, CA). Il livello di significatività è stato fissato a  $P < 0.05$ .

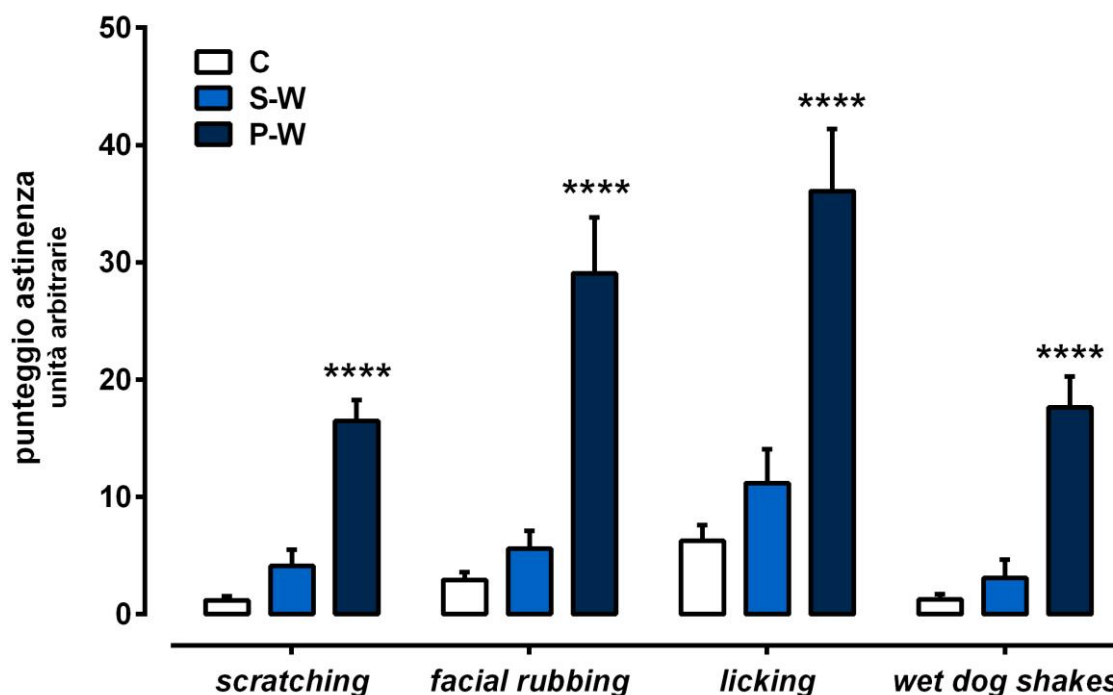


## 4. RISULTATI

### 4.1. Effetti comportamentali dell'astinenza da $\Delta^9$ -THC

Prima di effettuare le registrazioni elettrofisiologiche, gli animali trattati due volte al giorno per 6.5 o 7 giorni con il  $\Delta^9$ -THC (15 mg/kg, i.p., gruppi S-W e P-W rispettivamente), oppure con il veicolo (gruppo C), l'8° giorno sono stati valutati da un punto di vista comportamentale. Per quanto riguarda gli animali dei gruppi C e S-W il trattamento è stato interrotto la mattina del 7° giorno e le osservazioni comportamentali sono state effettuate 24 ore dopo; invece gli animali del gruppo P-W hanno terminato il 7° giorno di trattamento e sono stati osservati dopo 12 ore dall'ultima somministrazione, 10 minuti dopo aver ricevuto l'SR (5 mg/kg, i.p.).

Abbiamo valutato e quantificato i segni più tipici dell'astinenza da cannabinoidi durante sessioni di 30 minuti (Diana *et al.*, 1998b). I segni osservati sono stati: *scratching*, *facial rubbing*, *licking* e *wet dog shakes* (Fig.14).



**Figura 14.** L'astinenza precipitata induce intense manifestazioni comportamentali. Il grafico mostra la media  $\pm$  SEM dei punteggi comportamentali associati all'astinenza da cannabinoidi, osservati per un periodo di 30 minuti, prima delle registrazioni elettrofisiologiche. Gruppi C (n=16), S-W (n=17), e P-W (n=16). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \*\*\*\*P<0.0001; ANOVA a una due vie e test di Sidak.

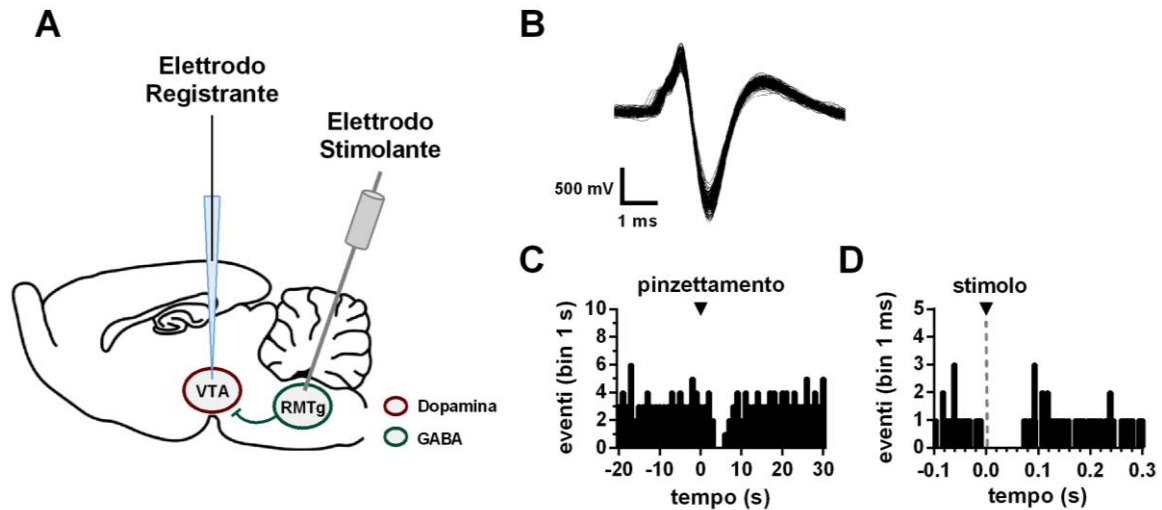
In accordo con la letteratura (Aceto *et al.*, 1995; Diana *et al.*, 1998b; Tsou *et al.*, 1995), abbiamo rilevato che, mentre l'astinenza precipitata farmacologicamente dalla somministrazione di SR (gruppo P-W) ha indotto un significativo aumento dei segni considerati, la sospensione della somministrazione di  $\Delta^9$ -THC (gruppo S-W) ha indotto solo blandi segni di astinenza (ANOVA a due vie e test di Sidak,  $F_{2,184}=86.01$ ,  $P<0.0001$ ).

#### **4.2. Effetti dell'astinenza da $\Delta^9$ -THC sull'attività spontanea dei neuroni DAergici della VTA e sulla durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg**

Come ampiamente discusso nell'introduzione, ricerche condotte precedentemente hanno dimostrato che i) l'attività elettrica dei neuroni DAergici della VTA è profondamente ridotta durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC (Diana *et al.*, 1998b); e ii) la loro frequenza di scarica è correlata negativamente con la durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg in animali drug-naïve (Lecca *et al.* 2012). Scopo della prima serie di esperimenti è stato pertanto quello di caratterizzare, attraverso uno studio della popolazione neuronale della VTA, l'attività spontanea dei neuroni DAergici e la loro risposta alla stimolazione elettrica del RMTg nei ratti appartenenti ai tre gruppi sperimentali: controlli (C), astinenza spontanea (S-W) e astinenza precipitata (P-W).

Tutte le cellule registrate erano localizzate all'interno della porzione laterale del nucleo pigmentato parabrachiale della VTA posteriore. Nonostante i neuroni della VTA presentino un'elevata eterogeneità (Ford *et al.*, 2006; Lammel *et al.*, 2008; Margolis *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2011), la regione in cui erano localizzati tutti i siti di registrazione contiene la maggiore densità di neuroni DAergici, in confronto alle porzioni più mediali della VTA (Lammel *et al.*, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2011).

I neuroni sono stati selezionati in base alle loro caratteristiche (Fig.15) e distinti in funzione del loro pattern di scarica (Fig.17 C).

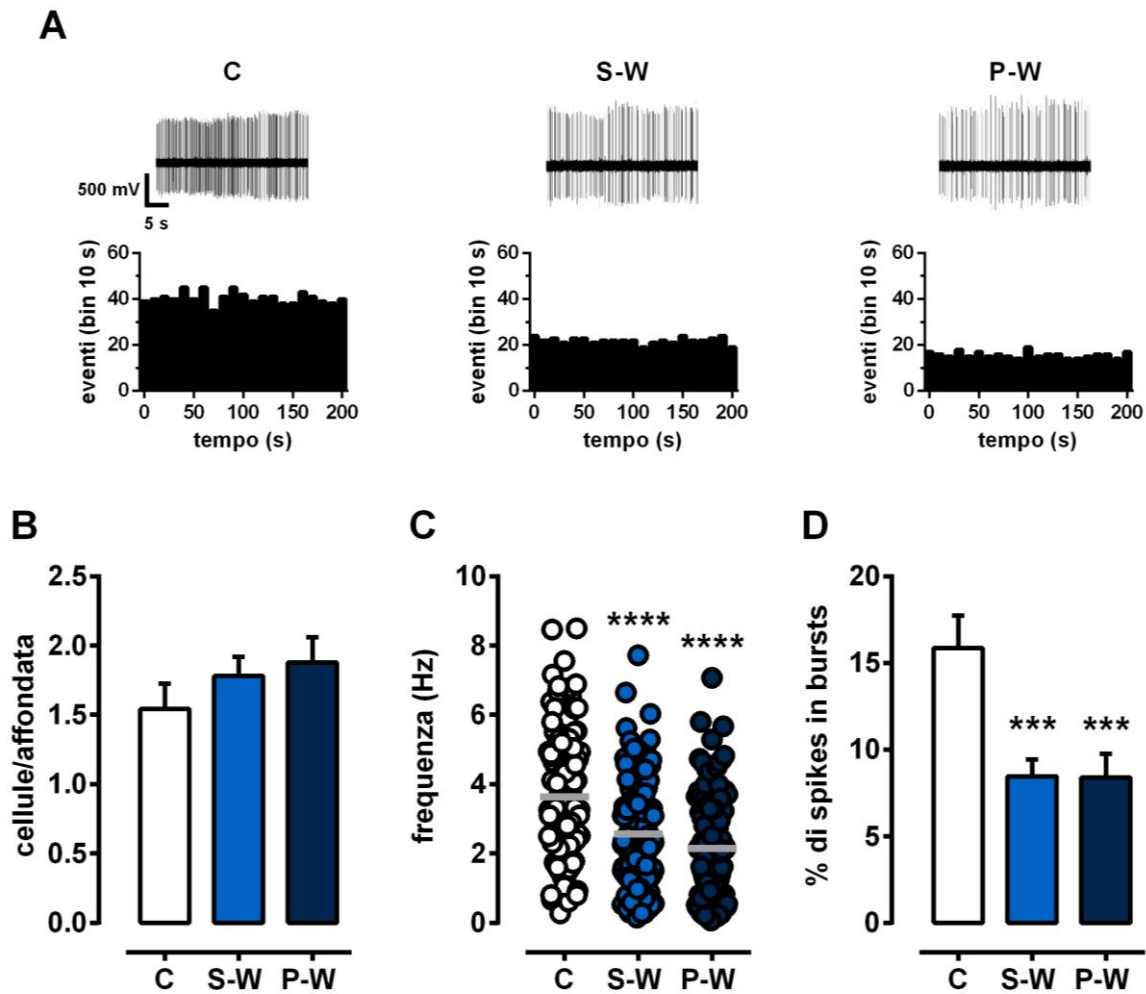


**Figura 15.** Protocollo di registrazione in VTA. **(A)** Lo schema mostra la localizzazione dei siti di registrazione (VTA) e di stimolazione (RMTg). **(B)** La traccia illustra i tipici potenziali d'azione sovrapposti di un neurone DAergico della VTA, registrato nell'animale anestetizzato. La forma trifasica del potenziale è caratterizzata da una prima fase positiva, con il *notch*, seguita da una seconda fase negativa e da una terza fase positiva meno marcata. **(C)** I neuroni DAergici della VTA esibiscono prevalentemente una risposta inibitoria con latenza breve ad uno stimolo nocicettivo. L'istogramma di frequenza evidenzia la riduzione della frequenza di scarica di un neurone DAergico a seguito del pinzettamento di una zampa dell'animale. **(D)** Il PSTH di una cellula DAergica inibita mostra che la stimolazione del RMTg elicitava una cessazione completa nell'attività di scarica che perdura per circa 60 ms. La risposta inibitoria avviene immediatamente dopo lo stimolo.

Non abbiamo osservato differenze significative nel numero di neuroni DAergici spontaneamente attivi tra gli animali in astinenza da  $\Delta^9$ -THC ( $1.78 \pm 0.14$ ,  $n=15$ ,  $1.88 \pm 0.18$ ,  $n=11$ , rispettivamente S-W e P-W) e i controlli ( $1.54 \pm 0.18$ ,  $n=13$ , gruppo C; ANOVA a una via,  $P>0.05$ ; Fig.16 B).

L'analisi dell'attività basale dei neuroni DAergici ha invece confermato che la frequenza di scarica media risulta essere notevolmente ridotta negli animali in astinenza rispetto ai controlli ( $2.56 \pm 0.11$ ,  $n=167$ ,  $2.15 \pm 0.15$ ,  $n=109$ ,  $3.63 \pm 0.16$ ,  $n=125$ , nei gruppi S-W, P-W e C; ANOVA a una via e test di Dunnett,  $F_{2,398}=27.84$ ,  $P<0.0001$ ; Fig.16 C), così come la percentuale di *spikes in bursts* ( $8.45 \pm 0.98$ ,  $n=167$ ,  $8.39 \pm 1.35$ ,  $n=109$ ,  $15.86 \pm 1.88$ ,  $n=125$  nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; ANOVA a una via e test di Dunnett,  $F_{2,398}=9.204$ ,  $P<0.001$ ; Fig.16 D). I nostri risultati avvalorano dunque lo stato di ipodopaminergia associato alle fasi acute dell'astinenza da  $\Delta^9$ -THC, come dimostrato precedentemente mediante registrazioni elettrofisiologiche effettuate in ratti non anestetizzati (Diana *et al.*, 1998b).

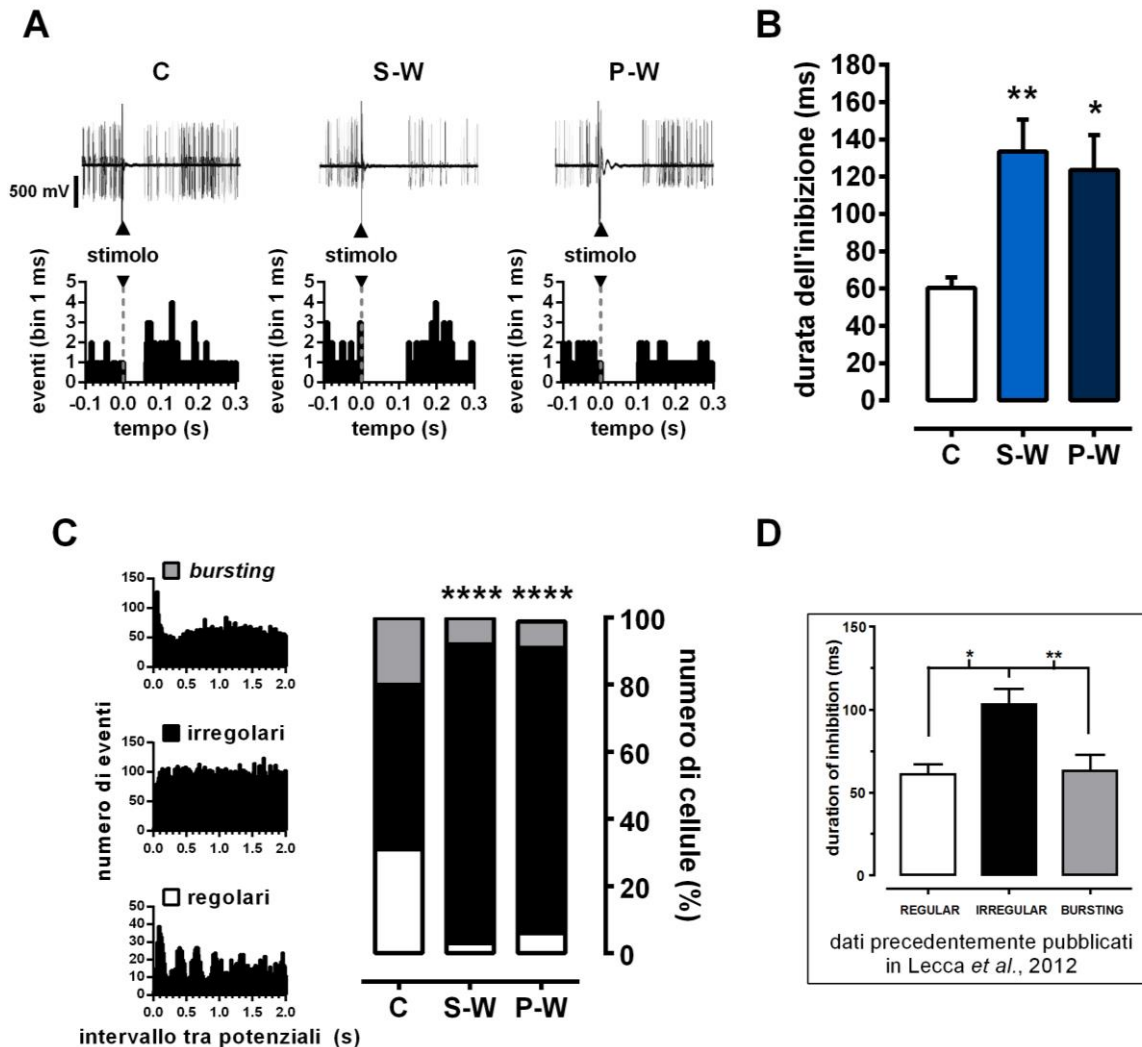
Dopo circa 2 minuti di registrazione dell'attività spontanea abbiamo testato la risposta dei neuroni DAergici ad uno stimolo nocicettivo di tipo meccanico, il pinzettamento di una zampa posteriore dell'animale, in quanto è noto che circa la metà dei neuroni DAergici rispondono ad uno stimolo avverso con un'inibizione. Analizzando tale parametro non abbiamo rilevato differenze significative nella percentuale di neuroni DAergici inibiti dal pinzettamento tra i gruppi sperimentali (47.02%, 42.99% e 41.82% nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; dati non mostrati).



**Figura 16.** I neuroni DAergici della VTA mostrano una ridotta attività elettrica ed una diminuzione degli *spikes in bursts* (%) durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC. (A) Ogni istogramma di frequenza (in basso) e il corrispondente tracciato di registrazione (in alto) rappresentano l'attività elettrica di un singolo neurone DAergico della VTA nei ratti appartenenti ai gruppi di: controllo (C; sinistra), astinenza spontanea (S-W; centro) e astinenza precipitata (P-W; destra) rispettivamente. È evidente la differente attività spontanea tra i tre gruppi. I grafici mostrano il numero di cellule DAergiche spontaneamente attive (B), la loro frequenza di scarica media (C) e l'attività in *bursts* (D). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; ANOVA a una via e test di Dunnett.

Come già premesso, l'attività spontanea dei neuroni DAergici della VTA viene modulata dalle afferenze inibitorie GABAergiche provenienti dal RMTg ed è soggetta ad una temporanea, ma completa, soppressione in seguito alla stimolazione elettrica del RMTg (Lecca *et al.*, 2012; Barrot *et al.*, 2012). Dopo aver registrato l'attività basale dei neuroni DAergici della VTA e verificato la risposta ad uno stimolo nocicettivo, abbiamo quindi valutato l'effetto della stimolazione elettrica del RMTg (1 Hz, 0.5 ms, 0.5 mA). Non abbiamo riscontrato differenze significative tra i gruppi sperimentali nella percentuale di cellule DAergiche inibite dal RMTg (38.51%, 45.71% e 41.88% nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; dati non mostrati). Tuttavia abbiamo rilevato un'aumentata durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg, negli animali in astinenza ( $133.50 \pm 16.98$ , n=62,  $123.60 \pm 18.73$ , n=48,  $60.55 \pm 5.59$ , n=49, nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; ANOVA a una via e test di Dunnett,  $F_{2,156}=6.480$ ,  $P<0.01$ ; Fig.17 A,B). Questo risultato è in linea con la nota correlazione negativa esistente tra la durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg e la frequenza di scarica e la percentuale di *spikes in bursts* dei neuroni DAergici della VTA (Lecca *et al.*, 2012) e potrebbe contribuire a spiegare la condizione di ipodopaminergia che caratterizza l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC.

Inoltre, mediante la costruzione di autocorrelogrammi, per ogni neurone inibito dal RMTg siamo stati in grado di classificare le cellule in base al loro pattern di scarica: *bursting*, irregolari e regolari (Fig.17 C). L'analisi della distribuzione delle cellule inibite in base al loro pattern di scarica ha rivelato che il numero di cellule irregolari è aumentato significativamente durante l'astinenza (S-W: 5 *bursting*, 55 irregolari e 2 regolari, 8%, 89% e 3% rispettivamente; P-W: 4 *bursting*, 41 irregolari e 3 regolari, 8%, 85% e 6% rispettivamente; C: 10 *bursting*, 24 irregolari e 15 regolari, 20%, 49% e 31% rispettivamente; test del chi-quadro, \*\*\*\* $P<0.0001$ ; Fig.17 C). Questo dato è in accordo con l'osservazione di Lecca e collaboratori (2012) che le cellule DAergiche della VTA con un pattern di tipo irregolare hanno una maggiore durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione dell'RMTg rispetto a quelle regolari o *bursting* (Lecca *et al.*, 2012; Fig.17 D).



**Figura 17.** L'inibizione dell'attività di scarica spontanea dei neuroni DAergici della VTA indotta dalla stimolazione del RMTg risulta più marcata durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC. **(A)** Le tracce (in alto) mostrano esempi di cellule inibite dalla stimolazione del RMTg nei ratti appartenenti ai gruppi C (sinistra), S-W (centro) e P-W (destra) rispettivamente. I corrispondenti PSTH degli stessi neuroni DAergici (in basso) indicano che la cessazione completa nella loro attività di scarica, indotta dalla stimolazione del RMTg, perdura più a lungo durante l'astinenza. **(B)** L'istogramma a barre mostra la media della risposta inibitoria dei neuroni DAergici della VTA alla stimolazione del RMTg, negli animali appartenenti ai gruppi C, S-W e P-W. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ; ANOVA a una via e test di Dunnett. **(C)** Gli autocorrelogrammi (a sinistra) dei neuroni DAergici inibiti dalla stimolazione del RMTg hanno permesso la classificazione del loro pattern di scarica in *bursting*, irregolare e regolare. Il grafico a barre (a destra) indica la percentuale delle cellule DAergiche *bursting*, irregolari e regolari nei gruppi C, S-W e P-W. Il numero di cellule che presentano un pattern di tipo irregolare è aumentato negli animali appartenenti ai gruppi S-W e P-W. I dati sono espressi come percentuale \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; test del chi-quadrato. **(D)** L'istogramma a barre, precedentemente pubblicato dal nostro laboratorio (Lecca et al., 2012), indica che i neuroni irregolari esibiscono una risposta inibitoria più duratura rispetto ai neuroni regolari o *bursting*.

### **4.3. L'attività spontanea dei neuroni GABAergici del RMTg è ridotta durante l'astinenza da $\Delta^9$ -THC**

I neuroni GABAergici del RMTg regolano l'attività delle cellule DAergiche della VTA (Hong *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2012). Inoltre i cannabinoidi sono in grado di diminuire la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg, disinibendo così i neuroni DAergici della VTA con un meccanismo simile a quello degli oppioidi (Jalabert *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2012; Matsui and Williams, 2011). Per di più recenti evidenze hanno dimostrato che i neuroni GABAergici del RMTg esprimono i recettori CB<sub>1</sub> nei propri terminali assonici posti in stretto contatto con i neuroni DAergici della VTA (Melis *et al.*, 2014).

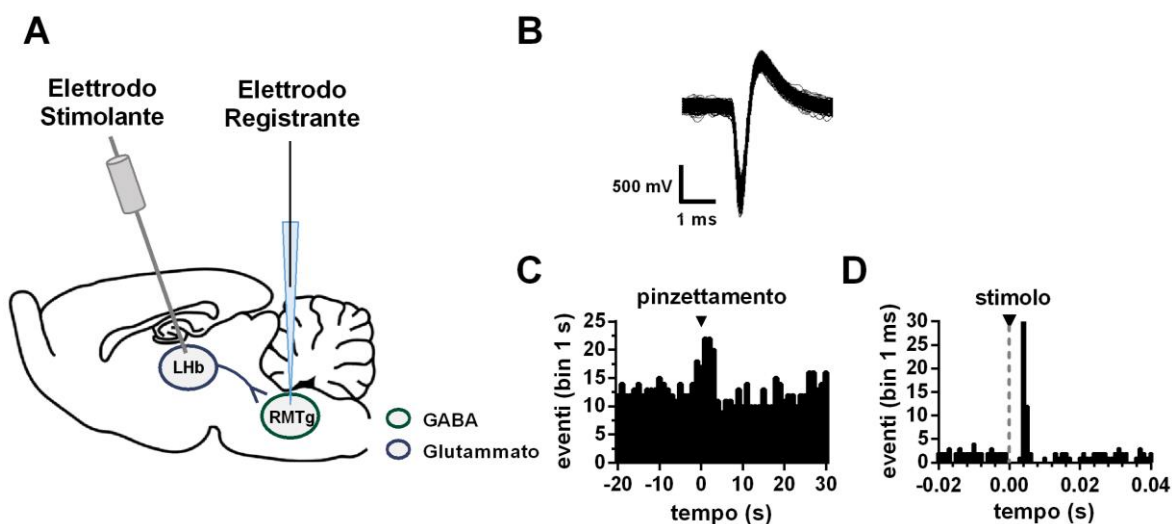
In considerazione di ciò, l'aver trovato un'augmentata durata dell'inibizione dei neuroni DAergici della VTA evocata dalla stimolazione del RMTg negli animali in astinenza, ci ha indotto ad investigare circa l'eventualità che vi potesse essere un'alterazione anche a livello dell'attività basale dei neuroni GABAergici del RMTg. A tale scopo abbiamo effettuato un *sampling* del RMTg nei tre gruppi sperimentali: controlli (C), astinenza spontanea (S-W) e astinenza precipitata (P-W).

Tutte le cellule registrate erano localizzate nel RMTg e sono state selezionate in base alle loro note caratteristiche elettrofisiologiche (Fig.18).

Dopo circa 2-3 minuti di registrazione dell'attività spontanea abbiamo testato la risposta dei neuroni del RMTg ad uno stimolo nocicettivo di tipo meccanico, il pinzettamento della zampa posteriore dell'animale, in quanto è noto che la gran parte dei neuroni del RMTg rispondono ad uno stimolo avversivo con un'eccitazione fasica (Lecca *et al.*, 2011). Analizzando tale parametro non abbiamo rilevato differenze significative nella percentuale di neuroni eccitati dal pinzettamento tra i gruppi sperimentali (46.08%, 57.97% e 62.20% nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; dati non mostrati).

Date le evidenze (Lecca *et al.*, 2011) secondo cui buona parte dei neuroni del RMTg rispondono con un'eccitazione alla stimolazione elettrica della LHb, abbiamo deciso di inserire un elettrodo stimolante nella LHb in modo da poter testare durante il *sampling* la risposta dei singoli neuroni a tale stimolazione e identificare, con il minor margine di errore possibile, i neuroni del RMTg. Per cui dopo 2-3 minuti di registrazione dell'attività basale della cellula ed in seguito alla verifica della risposta ad uno stimolo nocicettivo, abbiamo atteso che l'attività dei neuroni tornasse a livello basale per poi testare la risposta

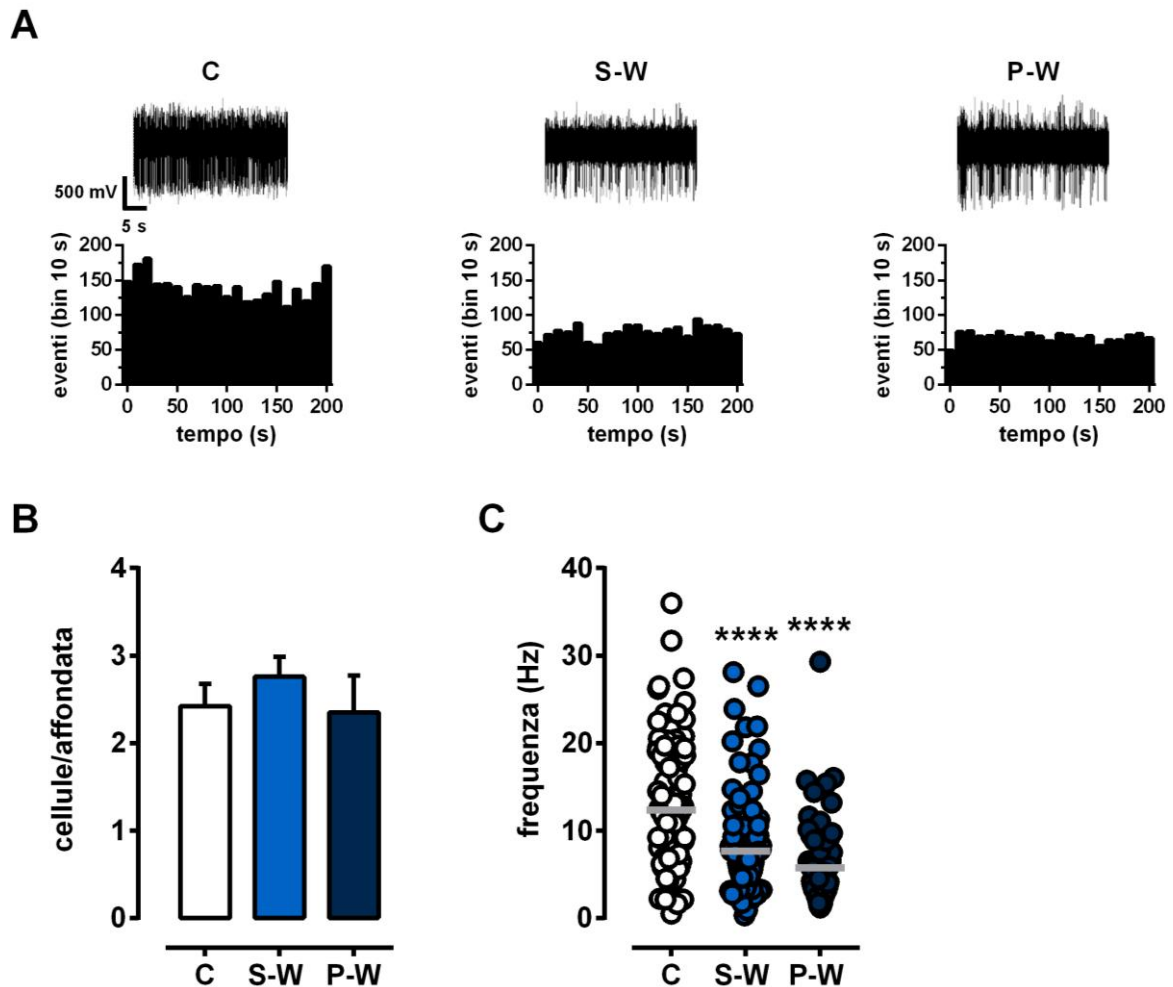
alla stimolazione elettrica della LHb (0.5 mA, 0.5 ms, 1 Hz). Non abbiamo riscontrato differenze significative tra i gruppi nella percentuale di cellule del RMTg eccitate dalla stimolazione della LHb (37.35%, 50.00% e 54.10% nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; dati non mostrati).



**Figura 18.** Protocollo di registrazione in RMTg. (A) Lo schema mostra la localizzazione dei siti di registrazione (RMTg) e di stimolazione (LHb). (B) La traccia illustra i caratteristici potenziali d'azione sovrapposti di un neurone GABAergico del RMTg, registrato nell'animale anestetizzato. La forma del potenziale mostra una iniziale fase negativa a rapida insorgenza, seguita da una fase positiva meno marcata. (C) I neuroni del RMTg esibiscono una risposta eccitatoria fasica con latenza breve ad uno stimolo nocicettivo. L'istogramma di frequenza evidenzia l'aumento della frequenza di scarica di un neurone GABAergico a seguito del pinzettamento di una zampa dell'animale. (D) Il PSTH di una cellula del RMTg mostra la risposta ortodromica alla stimolazione della LHb. La risposta positiva è indicata dall'accumulo di eventi immediatamente dopo lo stimolo.

Per quanto riguarda l'attività basale dei neuroni del RMTg, non abbiamo rilevato differenze significative nel numero di neuroni spontaneamente attivi negli animali in astinenza da  $\Delta^9$ -THC ( $2.76 \pm 0.23$ ,  $n=9$ ,  $2.35 \pm 0.42$ ,  $n=7$ , rispettivamente nei gruppi S-W e P-W) rispetto al gruppo dei controlli ( $2.42 \pm 0.25$ ,  $n=9$ , gruppo C; ANOVA a una via,  $P>0.05$ ; Fig.19 B). Invece, contrariamente alle aspettative, abbiamo riscontrato una drammatica riduzione della frequenza di scarica di questi neuroni durante l'astinenza ( $7.56 \pm 0.54$ ,  $n=104$ ,  $5.72 \pm 0.57$ ,  $n=69$ ,  $12.36 \pm 0.80$ ,  $n=87$ , nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; ANOVA a una via e test di Dunnett,  $F_{2,257}=25.67$ ,  $P<0.0001$ ; Fig.19 C).





**Figura 19.** I neuroni GABAergici del RMTg mostrano una ridotta attività elettrica durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC. (A) Ogni istogramma di frequenza (in basso) e il corrispondente tracciato di registrazione (in alto) rappresentano l'attività elettrica di un singolo neurone GABAergico del RMTg nei ratti appartenenti, rispettivamente, ai gruppi di: controllo (C; sinistra), astinenza spontanea (S-W; centro) e astinenza precipitata (P-W; destra). È evidente la differente attività spontanea tra i tre gruppi. I grafici mostrano il numero di cellule del RMTg spontaneamente attive (B) e la loro frequenza di scarica media (C). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ANOVA a una via e test di Dunnett.

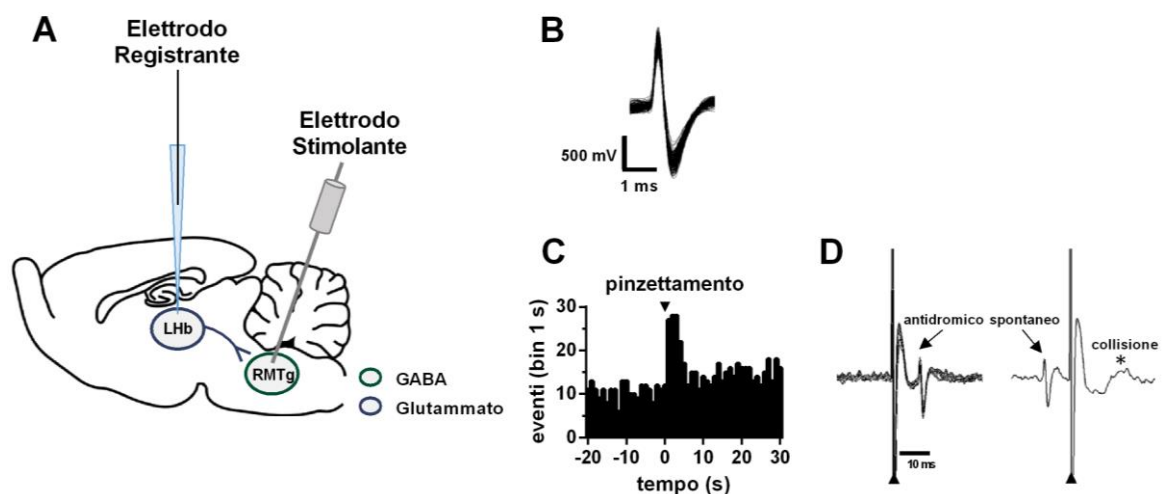
#### 4.4. L'attività spontanea dei neuroni della LHb è ridotta durante l'astinenza da $\Delta^9$ -THC

È noto che la LHb possiede un ruolo fondamentale nella regolazione dei sistemi mesencefalici monoaminergici e nelle patologie neuropsichiatriche, inclusa la dipendenza da sostanze (Lecca *et al.*, 2012; Velasquez *et al.*, 2014). In particolare, la LHb, che contiene prevalentemente neuroni glutammatergici, esercita un potente controllo inibitorio indiretto sui neuroni DAergici attraverso un relè GABAergico nel RMTg (Lecca *et al.*, 2014).

Partendo da tali presupposti, l'obiettivo della nostra terza sessione sperimentale è stato quello di analizzare l'attività spontanea dei neuroni della LHb per verificare un suo possibile ruolo causale nell'ipofunzionalità del RMTg durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC. Ci siamo concentrati soprattutto sulla sua porzione laterale (lLHb), che invia proiezioni dirette al RMTg (Benarroch, 2015). A tal fine abbiamo inserito un elettrodo stimolante nel RMTg per identificare antidromicamente i neuroni LHb $\rightarrow$ RMTg (Fig.20 A,D).

Tutte le cellule registrate erano localizzate nella lLHb e sono state selezionate in base alle loro caratteristiche (Fig.20).

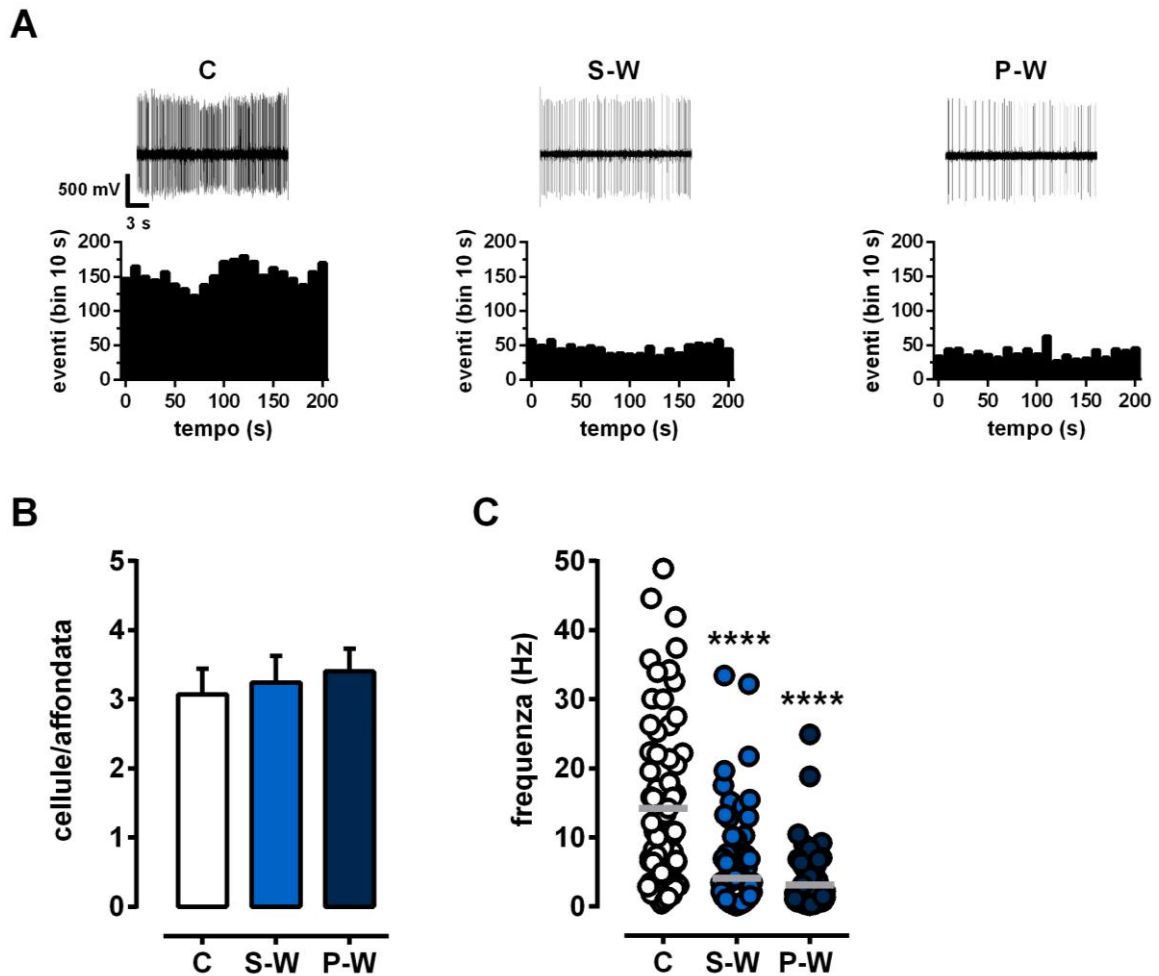
Dopo circa 2-3 minuti di registrazione dell'attività spontanea abbiamo testato la risposta dei neuroni della LHb ad uno stimolo nocicettivo di tipo meccanico, il pinzettamento della zampa posteriore dell'animale, in quanto è noto che i neuroni della LHb, come quelli del RMTg, rispondono ad uno stimolo avversivo con un'eccitazione fasica. Analizzando tale parametro non abbiamo rilevato differenze rilevanti nella percentuale di neuroni eccitati dal pinzettamento tra i gruppi sperimentali (56.60%, 63.16% e 63.89% nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; dati non mostrati).



**Figura 20.** Protocollo di registrazione nella LHb. (A) Lo schema mostra la localizzazione dei siti di registrazione (LHb) e di stimolazione (RMTg). (B) La traccia illustra i caratteristici potenziali d'azione sovrapposti di un neurone della LHb, registrato nell'animale anestetizzato. La forma del potenziale mostra una iniziale fase positiva, seguita da una fase negativa. (C) I neuroni della LHb esibiscono una risposta eccitatoria fasica con latenza breve ad uno stimolo nocicettivo. L'istogramma di frequenza evidenzia l'aumento della frequenza di scarica del neurone della LHb a seguito del pinzettamento della zampa dell'animale. (D) Le tracce sovrapposte mostrano l'identificazione della risposta antidromica di una cellula della LHb, indotta dalla stimolazione elettrica del RMTg. Si possono notare la latenza fissa della risposta antidromica (sinistra) e la collisione (destra \*) del potenziale antidromico con il potenziale spontaneo.

Dopo 2-3 minuti di registrazione dell'attività basale della cellula ed in seguito all'analisi della risposta ad uno stimolo nocicettivo, abbiamo atteso che l'attività dei neuroni tornasse a livello basale per poi testare la risposta alla stimolazione elettrica del RMTg (0.5 mA, 0.5 ms, 1 Hz). Non abbiamo riscontrato differenze significative tra i gruppi nella percentuale di cellule della LHb con una risposta antidromica alla stimolazione del RMTg (25.96%, 23.21% e 23.19% nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; dati non mostrati).

Per quanto riguarda l'attività basale dei neuroni della LHb, anche in questo caso non abbiamo rilevato differenze significative nel numero di neuroni spontaneamente attivi negli animali in astinenza da  $\Delta^9$ -THC ( $3.24 \pm 0.39$ , n=9,  $3.41 \pm 0.66$ , n=4, rispettivamente S-W e P-W) rispetto al gruppo dei controlli ( $3.07 \pm 0.37$ , n=8, gruppo C; ANOVA a una via,  $P > 0.05$ ; Fig.21 B). Invece in accordo con i risultati ottenuti in RMTg, abbiamo riscontrato una pesante riduzione della frequenza di scarica dei neuroni della LHb durante l'astinenza, rispetto ai controlli ( $4.05 \pm 0.58$ , n=109,  $3.12 \pm 0.60$ , n=58,  $14.21 \pm 1.37$ , n=72, nei gruppi S-W, P-W e C, rispettivamente; ANOVA a una via e test di Dunnett,  $F_{2,236}=44.41$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig.21 C).



**Figura 21.** I neuroni della LHb mostrano una ridotta attività elettrica durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC. (A) Ogni istogramma di frequenza (in basso) e il corrispondente tracciato di registrazione (in alto) rappresentano l'attività elettrica di un singolo neurone della LHb nei ratti appartenenti ai gruppi di: controllo (C; sinistra), astinenza spontanea (S-W; centro) e astinenza precipitata (P-W; destra) rispettivamente. È evidente la differente attività spontanea tra i tre gruppi. I grafici mostrano il numero di cellule della LHb spontaneamente attive (B) e la loro frequenza di scarica media (C). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ANOVA a una via e test di Dunnett.

## 5. DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo analizzato l'attività elettrofisiologica di alcune aree cerebrali che giocano un ruolo di primo piano nei processi di gratificazione e avversione, in un modello animale di astinenza da  $\Delta^9$ -THC. Ci siamo concentrati inizialmente sulla diminuita attività dei neuroni DAergici della VTA riportata precedentemente in letteratura da Diana e collaboratori (Diana *et al.*, 1998b) e sull'eventuale influenza e ruolo che il RMTg, una delle maggiori proiezioni GABAergiche alla VTA, potesse avere nell'instaurarsi della ridotta attività del sistema DAergico mesolimbico che caratterizza l'astinenza. Infatti, il circuito RMTg-VTA è coinvolto negli effetti acuti dei cannabinoidi, dato che la somministrazione dell'agonista CB<sub>1</sub> WIN produce una diminuzione della frequenza di scarica dei neuroni GABAergici del RMTg e una diminuzione della durata dell'inibizione rilevata in VTA (Lecca *et al.*, 2012). A questi effetti è stata attribuita la disinibizione dei neuroni DAergici correlata agli effetti acuti gratificanti dei cannabinoidi. A supporto di questo meccanismo, studi recenti condotti nei nostri laboratori hanno rilevato la presenza dei recettori CB<sub>1</sub> sui terminali del RMTg in VTA (Melis *et al.*, 2014), fornendo quindi un correlato anatomico delle evidenze funzionali (Lecca *et al.*, 2012).

Durante la nostra analisi elettrofisiologica, condotta su ratti anestetizzati, abbiamo rilevato che il trattamento cronico e la successiva astinenza non hanno influito sul numero dei neuroni DAergici della VTA spontaneamente attivi, come già osservato da Diana *et al.*, (1998b). Inoltre, abbiamo confermato che durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC (sia spontanea, S-W, che precipitata farmacologicamente con SR, P-W) è presente una profonda depressione dell'attività elettrica dei neuroni DAergici della VTA, che si manifesta sia in termini di ridotta frequenza di scarica che di ridotta percentuale di *spikes in bursts*. Per inciso, ricordiamo che quando un neurone DAergico invia i suoi potenziali d'azione in modalità *bursting*, la quantità di DA liberata nello spazio sinaptico aumenta in maniera fasica (Lodge and Grace, 2006). Questo fatto porta a pensare che durante l'astinenza la quantità di DA rilasciata nelle aree di proiezione della VTA sia diminuita, come è stato peraltro rilevato precedentemente mediante esperimenti di microdialisi *in vivo* (Tanda *et al.*, 1999). Con le nostre osservazioni comportamentali abbiamo anche comprovato che l'ipodopaminergia non è legata alle manifestazioni somatiche dell'astinenza da  $\Delta^9$ -THC. Infatti, la ridotta attività neuronale DAergica è presente sia negli animali P-W, che mostrano marcati segni di astinenza, sia in quelli S-W, quasi indistinguibili dai controlli

(Diana *et al.*, 1998b). Nella fase sperimentale successiva abbiamo verificato la possibilità che lo stato di ipodopaminergia fosse indotto da alterazioni delle afferenze inibitorie alla VTA provenienti dal RMTg. Questa ipotesi è stata supportata dall'osservazione che la stimolazione elettrica di quest'area ha indotto un'inibizione di maggiore durata dei neuroni DAergici negli animali in astinenza da  $\Delta^9$ -THC rispetto agli animali di controllo. Questi risultati confermano che l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC potenzia l'inibizione GABA-mediata dei neuroni DAergici, suggerendo quindi che le afferenze dal RMTg contribuiscono allo stato di diminuita attività elettrica DAergica nella VTA. Questo effetto è accompagnato da un incremento del numero di cellule DAergiche con un pattern irregolare, in linea con lo studio di Lecca e collaboratori (2012) che hanno dimostrato come un'aumentata durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg sia correlata con un pattern di scarica di tipo irregolare.

L'aumentata durata dell'inibizione rilevata durante l'astinenza è in accordo con uno studio effettuato da Bonci e Williams (1997), i quali hanno osservato che durante le fasi acute dell'astinenza da morfina si verifica una *up-regulation* della cascata dell'adenilato ciclasi, con conseguente aumento della probabilità di rilascio di GABA dai terminali che mediano le IPSCs GABA<sub>A</sub>-indotte in VTA (Bonci and Williams, 1997). A questo proposito è utile rammentare che gli oppioidi condividono con i cannabinoidi sia la capacità di stimolare acutamente l'attività dei neuroni DAergici della VTA con un meccanismo disinibitorio mediato anche attraverso l'RMTg (Lecca *et al.*, 2011, 2012; Jalabert *et al.*, 2011; Matsui and Williams, 2011), sia lo stato di ipodopaminergia durante l'astinenza (Diana *et al.*, 1995, 1999). Una probabile spiegazione di questa aumentata durata dell'inibizione si può ritrovare nel fatto che l'esposizione cronica al  $\Delta^9$ -THC induce una *down-regulation* dei recettori CB<sub>1</sub> in numerose aree cerebrali, compresa la corteccia cerebrale, i gangli della base, il sistema limbico e l'ippocampo (Dudok *et al.*, 2015; Gonzalez *et al.*, 2004). Per cui, i recettori CB<sub>1</sub> presenti nelle terminazioni del RMTg in VTA potrebbero essere andati incontro a questo fenomeno, con conseguente riduzione del controllo inibitorio sul rilascio di GABA da queste terminazioni. A conferma di ciò, sono però necessari studi immunoistochimici e neurochimici. Questo risultato ci ha indotto ad approfondire il ruolo del RMTg nell'astinenza da  $\Delta^9$ -THC.

L'analisi dell'attività elettrica spontanea dei neuroni GABAergici del RMTg ha rivelato, però, del tutto inaspettatamente, che questi neuroni mostrano una ridotta frequenza di

scarica sia dopo S-W che P-W. Questo dato si discosta dunque dalle nostre aspettative, e dalle ipotesi formulate nella letteratura di riferimento (vedi per es. Rothwell and Lammel, 2013), in quanto un nucleo implicato nei processi avversivi come il RMTg dovrebbe risultare iperattivo in una condizione avversa quale l'astinenza. A supporto dei nostri risultati, tuttavia, uno studio recente di Kaufling e Aston-Jones (2015) ha riportato la presenza di una netta riduzione dell'attività neuronale nel RMTg anche dopo astinenza da morfina. Questa depressione dei neuroni del RMTg potrebbe essere ascrivibile ad un meccanismo compensatorio, atto a bilanciare l'aumentato rilascio di GABA in VTA, rilevato come aumentata durata dell'inibizione dei neuroni DAergici. Oppure, ancora, potrebbe essere dovuta ad un ridotto input glutammatergico proveniente dalla LHb, considerata la particolare rilevanza che rivestono queste proiezioni eccitatorie nel controllo dell'attività neuronale del RMTg e nella codifica degli stimoli avversivi (Stamatakis and Stuber, 2012; Jhou *et al.*, 2009a). Questa seconda possibilità è stata testata e confermata nel corso della terza fase sperimentale, nella quale abbiamo studiato l'attività dei neuroni della LHb dopo esposizione cronica al  $\Delta^9$ -THC. Infatti, in linea con i risultati ottenuti in RMTg, abbiamo riscontrato una notevole riduzione della frequenza di scarica dei neuroni della LHb in entrambi i gruppi in astinenza (S-W e P-W). Dato che la LHb è una delle principali afferenze eccitatorie al RMTg, questo risultato fornisce dunque un possibile meccanismo per l'ipofunzionalità riscontrata nel nucleo GABAergico. D'altra parte, considerando l'esistenza di un input diretto eccitatorio dalla LHb verso la VTA, le nostre osservazioni potrebbero in parte spiegare anche la ridotta attività rilevata durante l'astinenza in VTA. Ulteriori esperimenti volti ad investigare in modo selettivo i neuroni della LHb che proiettano alla VTA sono in corso di pianificazione.

Come estesamente discusso nell'Introduzione, la LHb gioca un ruolo determinante nelle risposte cerebrali alla gratificazione/avversione da stimoli naturali o da sostanze d'abuso. Ad esempio, disfunzioni o alterazioni morfo-funzionali della LHb sono state correlate alla depressione maggiore e, specificamente, è stata rilevata una riduzione delle dimensioni della LHb negli individui depressi (Ranft *et al.*, 2010). Coerentemente, la *deep brain stimulation* delle afferenze alla LHb è efficace nella remissione delle forme farmacoresistenti di questa patologia (Sartorius *et al.*, 2010).

L'input principale all'abenula è rappresentato dalla stria midollare, mentre l'output primario è costituito dal fascicolo retroflesso (FR), attraverso il quale la LHb convoglia le

informazioni rilevanti nei meccanismi di gratificazione e avversione al mesencefalo (Velasquez *et al.*, 2014). Le fibre che originano dalla LHb e formano la parte esterna del FR proiettano anche al RMTg, dove contraggono sinapsi di tipo eccitatorio. Attraverso questo input, la LHb esercita un controllo inibitorio indiretto sulle aree DAergiche mesencefaliche. Come già sottolineato, sono state caratterizzate anche proiezioni eccitatorie dirette, seppure meno dense delle precedenti, alla VTA (Lammel *et al.*, 2012).

Il segnale proveniente dalla LHb, via RMTg, inibisce i neuroni DAergici, riducendo il segnale di gratificazione, ciò rende questo nucleo responsabile degli effetti avversivi legati all'uso delle sostanze d'abuso, come ad esempio la cocaina (Jhou *et al.*, 2013). È stato osservato che la cocaina ha un effetto gratificante subito dopo l'assunzione, ma che l'avversione legata al suo utilizzo compare circa 15 minuti dopo la somministrazione endovenosa (Ettenberg *et al.*, 1999). Inoltre, studi *in vitro* hanno dimostrato che l'esposizione subcronica alla cocaina è in grado di potenziare selettivamente la trasmissione mediata dai recettori AMPA a livello dei neuroni della LHb che proiettano al RMTg, ma non in quelli che proiettano alla VTA (Maroteaux and Mameli, 2012). In accordo con questi risultati, un elegante lavoro dello stesso gruppo ha di recente evidenziato un incremento della trasmissione glutammatergica ed un'aumentata attività elettrica dei neuroni della LHb che inviano input al RMTg durante l'astinenza da cocaina (Meye *et al.*, 2015).

D'altra parte, diversi studi hanno riportato che durante l'esposizione cronica agli psicostimolanti il FR subisce una degenerazione, ciò implica una diminuita connessione della LHb con il mesencefalo (Ellison, 2002). Oltretutto, danni a carico della LHb sono in grado di aumentare il comportamento di ricerca della cocaina, suggerendo che questo comportamento possa essere il risultato di un indebolimento dell'input eccitatorio glutammatergico sulla VTA (Friedman *et al.*, 2010).

Riassumendo, con il nostro studio abbiamo cercato di identificare le possibili cause dell'ipodopaminergia del sistema mesolimbico che accompagna l'astinenza da cannabinoidi. Ci siamo concentrati sul circuito LHb-RMTg ed abbiamo rilevato che anch'esso risulta risentire dell'astinenza da  $\Delta^9$ -THC, con le medesime manifestazioni riscontrate nel sistema della gratificazione. Resta tuttavia da chiarire se questo stato generalizzato di ipoattività a livello dei sistemi della ricompensa/avversione sia



responsabile dell'anedonia e della depressione che caratterizzano questa fase cruciale della dipendenza.

Per quanto i nostri risultati supportino l'ipotesi secondo cui un aumentato input GABAergico proveniente dal RMTg potrebbe contribuire, almeno in parte, all'ipodopaminergia durante l'astinenza da  $\Delta^9$ -THC, il dato di un ridotta attività spontanea del RMTg appare al momento più difficilmente conciliabile. Ulteriori esperimenti volti ad investigare in modo selettivo il ruolo della sottopopolazione di neuroni LHB $\rightarrow$ VTA risultano a questo punto determinanti per verificare se questo input diretto alla VTA possa essere responsabile della ridotta funzionalità del sistema mesolimbico.

In conclusione, abbiamo confermato che la via RMTg-VTA è coinvolta nei meccanismi neuronali che sottendono la dipendenza da cannabinoidi. Per la prima volta abbiamo poi dimostrato che anche la LHB rappresenta un target per queste sostanze, risentendo in maniera profonda dell'esposizione cronica al  $\Delta^9$ -THC. Rimane da verificare se le modificazioni funzionali indotte dall'astinenza nella via LHB-RMTg possano essere una conseguenza piuttosto che una causa dell'ipodopaminergia. Così come resta da chiarire l'incongruenza tra l'aumentato input GABAergico a livello delle terminazioni dell'RMTg in VTA e la depressione dell'attività neuronale spontanea, anche se questa potrebbe essere il risultato di un meccanismo compensatorio e/o di feedback negativo polisinpatico.

Il passo successivo sarà quello di andare ad investigare altri input GABAergici alla VTA che possano contribuire meccanicisticamente all'ipodopaminergia. Un esempio è rappresentato dal pallido ventrale, che invia afferenze dirette sia ai neuroni DAergici della VTA che a quelli della LHB. Un altro possibile meccanismo dell'ipodopaminergia potrebbe essere costituito da una ipoattività delle afferenze glutammatergiche sia estrinseche che intrinseche alla VTA, come i neuroni glutammatergici della VTA. Questi neuroni sono connessi sinapticamente sia con i neuroni DAergici sia con quelli della LHB e risultano fondamentali nel processare sia gli stimoli gratificanti che quelli avversivi (Wang *et al.*, 2015). In accordo, la fotoattivazione in LHB dei terminali dei neuroni glutammatergici della VTA possiede un effetto avversivo (Lammel *et al.*, 2015).

Nel complesso i nostri dati sono importanti perché, per quanto in disaccordo con l'ipotesi di una iperattività del circuito dell'avversione durante l'astinenza, forniscono comunque nuove informazioni sui fenomeni neuroadattativi che sottendono questa fase cruciale della

dipendenza. Una maggiore comprensione di questi meccanismi è fondamentale al fine di individuare nuove strategie terapeutiche efficaci per ridurre il rischio di recidive associate alla dipendenza da cannabis.

## **RINGRAZIAMENTI**

Un ringraziamento speciale va al mio supervisore, il Prof. Marco Pistis, per i continui suggerimenti e per avermi permesso di lavorare a questo progetto e alla Dott.ssa Anna Lisa Muntoni per la sua partecipazione costante e attiva nello svolgimento del progetto e nella stesura della tesi.

Un ringraziamento particolare va a tutte le persone che hanno partecipato a questo progetto: la Dott.ssa Claudia Sagheddu per le registrazioni *in vivo*; la Dott.ssa Miriam Melis per i preziosi suggerimenti e gli spunti di riflessione e la Dott.ssa Marta De Felice per le osservazioni critiche e costruttive.

Un ultimo, ma altrettanto importante, ringraziamento va alla Regione Autonoma della Sardegna per il supporto finanziario delle scuole di dottorato.

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2014/2015 - XXVIII 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 1.3.1 "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".

## BIBLIOGRAFIA

- Aceto, M.D., Scates, S.M., Lowe, J.A., and Martin, B.R. (1995). Cannabinoid precipitated withdrawal by the selective cannabinoid receptor antagonist, SR 141716A. *European journal of pharmacology* 282, R1-2.
- Aceto, M.D., Scates, S.M., Lowe, J.A., and Martin, B.R. (1996). Dependence on delta 9-tetrahydrocannabinol: studies on precipitated and abrupt withdrawal. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 278, 1290-1295.
- Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T., and Okamoto, H. (2012). Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *The Journal of comparative neurology* 520, 4051-4066.
- Andres, K.H., von Düring, M., and Veh, R.W. (1999). Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *The Journal of comparative neurology* 407, 130-150.
- Barrot, M., Sesack, S.R., Georges, F., Pistis, M., Hong, S., and Jhou, T.C. (2012). Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *J Neurosci* 32, 14094-14101.
- Bayer, H.M., and Glimcher, P.W. (2005). Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal. *Neuron* 47, 129-141.
- Bayer, V.E., and Pickel, V.M. (1991). GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain research* 559, 44-55.
- Benarroch, E.E. (2015). Habenula: Recently recognized functions and potential clinical relevance. *Neurology*. 2015 Sep 15;85(11):992-1000. doi: 10.1212/WNL.0000000000001937. Epub 2015 Aug 19.
- Bisogno, T., Ligresti, A., and Di Marzo, V. (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 81, 224-238.
- Bjorklund, A., and Dunnett, S.B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences* 30, 194-202.
- Bland, T.M., Haining, R.L., Tracy, T.S., and Callery, P.S. (2005). CYP2C-catalyzed delta9-tetrahydrocannabinol metabolism: kinetics, pharmacogenetics and interaction with phenytoin. *Biochemical pharmacology* 70, 1096-1103.
- Boileau, I., Assaad, J.M., Pihl, R.O., Benkelfat, C., Leyton, M., Diksic, M., Tremblay, R.E., and Dagher, A. (2003). Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse* 49, 226-231.
- Bonci, A., and Williams, J.T. (1997). Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci* 17, 796-803.
- Bosson, M.G., van Berckel, B.N., Boellaard, R., Zuurman, L., Schuit, R.C., Windhorst, A.D., van Gerven, J.M., Ramsey, N.F., Lammertsma, A.A., Kahn, R.S. (2009). Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. *Neuropsychopharmacology*. 34(3):759-66.
- Bourdy, R., and Barrot, M. (2012). A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends in neurosciences* 35, 681-690.
- Bourdy, R., Sánchez-Catalán, M.J., Kaufling, J., Balcita-Pedicino, J.J., Freund-Mercier, M.J., Veinante, P., Sesack, S.R., Georges, F., Barrot, M. (2014). Control of the nigrostriatal dopamine neuron activity and motor function by the tail of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology*. 39(12):2788-98.

- Breivogel, C.S., Scates, S.M., Beletskaya, I.O., Lowery, O.B., Aceto, M.D., and Martin, B.R. (2003). The effects of delta9-tetrahydrocannabinol physical dependence on brain cannabinoid receptors. *European journal of pharmacology* 459, 139-150.
- Budney, A.J., and Hughes, J.R. (2006). The cannabis withdrawal syndrome. *Current opinion in psychiatry* 19, 233-238.
- Carlezon, W.A., Jr., and Wise, R.A. (1996). Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex. *J Neurosci* 16, 3112-3122.
- Chen, J.P., Paredes, W., Li, J., Smith, D., Lowinson, J., Gardner, E.L. (1990). D9-Tetrahydrocannabinol produces naloxone blockable enhancement of presynaptic basal dopamine efflux in nucleus accumbens of conscious, freely-moving rats as measured by intracerebral microdialysis. *Psychopharmacology (Berl)* 102: 156-162.
- Chen, J.P., Paredes, W., Lowinson, J.H., Gardner, E.L. (1991). Strain specific facilitation of dopamine efflux by D9-tetrahydrocannabinol in the nucleus accumbens of rat: An in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 129: 136-180.
- Christoph, G.R., Leonzio, R.J., and Wilcox, K.S. (1986). Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci* 6, 613-619.
- Cooper, Z.D., and Haney, M. (2008). Cannabis reinforcement and dependence: role of the cannabinoid CB1 receptor. *Addiction biology* 13, 188-195.
- Dagher, A., and Robbins, T.W. (2009). Personality, addiction, dopamine: insights from Parkinson's disease. *Neuron* 61, 502-510.
- Dani, J.A., De Biasi, M. (2013). Mesolimbic dopamine and habenulo-interpeduncular pathways in nicotine withdrawal. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Jun 1;3(6). pii: a012138. doi: 10.1101/cshperspect.a012138.
- Davis, M.I., Ronesi, J., and Lovinger, D.M. (2003). A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 48973-48980.
- Derkinderen, P., Ledent, C., Parmentier, M., and Girault, J.A. (2001). Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *Journal of neurochemistry* 77, 957-960.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., 3rd, Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology* 34, 605-613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., and Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.
- Dewey, W.L. (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacological reviews* 38, 151-178.
- Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behavioural brain research* 137, 75-114.
- Di, S., Boudaba, C., Popescu, I.R., Weng, F.J., Harris, C., Marcheselli, V.L., Bazan, N.G., and Tasker, J.G. (2005a). Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *The Journal of physiology* 569, 751-760.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Marcheselli, V.L., Bazan, N.G., and Tasker, J.G. (2005b). Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* 146, 4292-4301.

- Diana, M. (2011). The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Front Psychiatry*, 2:64.
- Diana, M., Brodie, M., Muntoni, A., Puddu, M.C., Pillolla, G., Steffensen, S., Spiga, S., and Little, H.J. (2003). Enduring effects of chronic ethanol in the CNS: basis for alcoholism. *Alcoholism, clinical and experimental research* 27, 354-361.
- Diana, M., Melis, M., and Gessa, G.L. (1998a). Increase in meso-prefrontal dopaminergic activity after stimulation of CB1 receptors by cannabinoids. *The European journal of neuroscience* 10, 2825-2830.
- Diana, M., Melis, M., Muntoni, A.L., and Gessa, G.L. (1998b). Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10269-10273.
- Diana, M., Muntoni, A. L., Pistis, M., Melis, M., Gessa, G.L. (1999). Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal. *Eur. J. Neurosci.* 11:1037–1041.
- Diana, M., Pistis, M., Carboni, S., Gessa, G.L., and Rossetti, Z.L. (1993). Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7966-7969.
- Diana, M., Pistis, M., Muntoni, A., and Gessa, G. (1995). Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 272, 781-785.
- Diana, M., Pistis, M., Muntoni, A.L., Gessa, G.L. (1996). Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: Evidence of protracted abstinence. *Neuroscience* 71: 411–415.
- Diana, M., Spiga, S., Acquas, E. (2006). Persistent and reversible morphine withdrawal-induced morphological changes in the nucleus accumbens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074:446–457.
- Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2002a). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10819-10824.
- Dinh, T.P., Freund, T.F., and Piomelli, D. (2002b). A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chemistry and physics of lipids* 121, 149-158.
- DSM-5. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th edition). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013.
- Dudok, B., Barna, L., Ledri, M., Szabo, S.I., Szabadits, E., Pinter, B., Woodhams, S.G., Henstridge, C.M., Balla, G.Y., Nyilas, R., et al. (2015). Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nature neuroscience* 18, 75-86.
- Ellison, G. (2002). Neural degeneration following chronic stimulant abuse reveals a weak link in brain, fasciculus retroflexus, implying the loss of forebrain control circuitry. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 12, 287-297.
- EMCDDA, (2015). "Relazione europea sulla droga". <http://www.emcdda.europa.eu/>.
- Ettenberg, A., Raven, M.A., Danluck, D.A., and Necessary, B.D. (1999). Evidence for opponent-process actions of intravenous cocaine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 64, 507-512.
- Fabricius, K., Helboe, L., Fink-Jensen, A., Wortwein, G., Steiniger-Brach, B., and Sotty, F. (2010). Increased dopaminergic activity in socially isolated rats: an electrophysiological study. *Neuroscience letters* 482, 117-122.

- Fadda, P., Scherma, M., Spano, M.S., Salis, P., Melis, V., Fattore, L., Fratta, W. (2006). Cannabinoid self-administration increases dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroreport* 17(15):1629-32.
- Fattore, L., Deiana, S., Spano, S.M., Cossu, G., Fadda, P., Scherma, M., and Fratta, W. (2005). Endocannabinoid system and opioid addiction: behavioural aspects. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 81, 343-359.
- Feenstra, M.G., Vogel, M., Botterblom, M.H., Joosten, R.N., and de Bruin, J.P. (2001). Dopamine and noradrenaline efflux in the rat prefrontal cortex after classical aversive conditioning to an auditory cue. *The European journal of neuroscience* 13, 1051-1054.
- Ferreira, J.G., Del-Fava, F., Hasue, R.H., and Shammah-Lagnado, S.J. (2008). Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153, 196-213.
- Ford, C.P., Mark, G.P., and Williams, J.T. (2006). Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J Neurosci* 26, 2788-2797.
- French, E.D. (1997). delta9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. *Neuroscience letters* 226, 159-162.
- French, E.D., Dillon, K., and Wu, X. (1997). Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* 8, 649-652.
- Friedman, A., Lax, E., Dikshtein, Y., Abraham, L., Flaumenhaft, Y., Sudai, E., Ben-Tzion, M., Ami-Ad, L., Yaka, R., and Yadid, G. (2010). Electrical stimulation of the lateral habenula produces enduring inhibitory effect on cocaine seeking behavior. *Neuropharmacology* 59, 452-459.
- Gaoni, Y., and Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86:1646-1647.
- Gardner, E.L. (2005). Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 81, 263-284.
- Gebremedhin, D., Lange, A.R., Campbell, W.B., Hillard, C.J., and Harder, D.R. (1999). Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current. *The American journal of physiology* 276, H2085-2093.
- Geisler, S., Andres, K.H., and Veh, R.W. (2003). Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. *The Journal of comparative neurology* 458, 78-97.
- Geisler, S., and Trimble, M. (2008). The lateral habenula: no longer neglected. *CNS spectrums* 13, 484-489.
- Gessa, G.L., Melis, M., Muntoni, A.L., and Diana, M. (1998). Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. *European journal of pharmacology* 341, 39-44.
- Glaser, S.T., Abumrad, N.A., Fatade, F., Kaczocha, M., Studholme, K.M., and Deutsch, D.G. (2003). Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4269-4274.
- Gomez Del Pulgar, T., De Ceballos, M.L., Guzman, M., and Velasco, G. (2002). Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *The Journal of biological chemistry* 277, 36527-36533.
- Gong, J.P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., and Uhl, G.R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain research* 1071, 10-23.

- Gonzalez, S., Cebeira, M., and Fernandez-Ruiz, J. (2005). Cannabinoid tolerance and dependence: a review of studies in laboratory animals. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 81, 300-318.
- Gonzalez, S., Fernandez-Ruiz, J., Di Marzo, V., Hernandez, M., Arevalo, C., Nicanor, C., Cascio, M.G., Ambrosio, E., and Ramos, J.A. (2004). Behavioral and molecular changes elicited by acute administration of SR141716 to Delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats: an experimental model of cannabinoid abstinence. *Drug Alcohol Depend* 74, 159-170.
- Grace, A.A., and Bunney, B.S. (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10, 301-315.
- Grace, A.A., and Bunney, B.S. (1984a). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4, 2877-2890.
- Grace, A.A., and Bunney, B.S. (1984b). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4, 2866-2876.
- Grace, A.A., Floresco, S.B., Goto, Y., and Lodge, D.J. (2007). Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in neurosciences* 30, 220-227.
- Grace, A.A., and Onn, S.P. (1989). Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* 9, 3463-3481.
- Grotenhermen, F. (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical pharmacokinetics* 42, 327-360.
- Hall, W., and Solowij, N. (1998). Adverse effects of cannabis. *Lancet* 352, 1611-1616.
- Haney, M., Hart, C.L., Vosburg, S.K., Nasser, J., Bennett, A., Zubarán, C., and Foltin, R.W. (2004). Marijuana withdrawal in humans: effects of oral THC or divalproex. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29, 158-170.
- Haney, M., Ward, A.S., Comer, S.D., Foltin, R.W., and Fischman, M.W. (1999). Abstinence symptoms following oral THC administration to humans. *Psychopharmacology* 141, 385-394.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11, 563-583.
- Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nature reviews Neuroscience* 11, 503-513.
- Hikosaka, O., Sesack, S.R., Lecourtier, L., and Shepard, P.D. (2008). Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci* 28, 11825-11829.
- Hollister, L.E. (1974). Structure-activity relationships in man of cannabis constituents, and homologs and metabolites of delta9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacology* 11, 3-11.
- Hong, S., Zhou, T.C., Smith, M., Saleem, K.S., and Hikosaka, O. (2011). Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *J Neurosci* 31, 11457-11471.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews* 54, 161-202.
- Huestis, M.A. (2007). Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chemistry & biodiversity* 4, 1770-1804.



- Hutchison, M.A., and Riley, A.L. (2008). Adolescent exposure to nicotine alters the aversive effects of cocaine in adult rats. *Neurotoxicology and teratology* 30, 404-411.
- Hyland, B.I., Reynolds, J.N., Hay, J., Perk, C.G., and Miller, R. (2002). Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114, 475-492.
- Ikeda, S.R. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 255-258.
- Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain research reviews* 56, 27-78.
- Ikemoto, S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35, 129-150.
- Iversen, L. (2003). Cannabis and the brain. *Brain : a journal of neurology* 126, 1252-1270.
- Jalabert, M., Bourdy, R., Courtin, J., Veinante, P., Manzoni, O.J., Barrot, M., and Georges, F. (2011). Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 16446-16450.
- Jhou, T. (2005). Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *The Journal of comparative neurology* 493, 111-114.
- Jhou, T.C., Fields, H.L., Baxter, M.G., Saper, C.B., and Holland, P.C. (2009a). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61, 786-800.
- Jhou, T.C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B.A., and Zahm, D.S. (2009b). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *The Journal of comparative neurology* 513, 566-596.
- Jhou, T.C., Good, C.H., Rowley, C.S., Xu, S.P., Wang, H., Burnham, N.W., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., and Ikemoto, S. (2013). Cocaine drives aversive conditioning via delayed activation of dopamine-responsive habenular and midbrain pathways. *J Neurosci* 33, 7501-7512.
- Ji, H., and Shepard, P.D. (2007). Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* 27, 6923-6930.
- Jin, W., Brown, S., Roche, J.P., Hsieh, C., Celver, J.P., Koo, A., Chavkin, C., and Mackie, K. (1999). Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci* 19, 3773-3780.
- Johns, A. (2001). Psychiatric effects of cannabis. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 178, 116-122.
- Johnson, P.I., Goodman, J.B., Condon, R., and Stellar, J.R. (1995). Reward shifts and motor responses following microinjections of opiate-specific agonists into either the core or shell of the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 120, 195-202.
- Jones, G., Pertwee, R.G., Gill, E.W., Paton, W.D., Nilsson, I.M., Widman, M., and Agurell, S. (1974). Relative pharmacological potency in mice of optical isomers of delta 1-tetrahydrocannabinol. *Biochemical pharmacology* 23, 439-446.
- Justinova, Z., Mascia, P., Wu, H.Q., Secci, M.E., Redhi, G.H., Panlilio, L.V., Scherma, M., Barnes, C., Parashos, A., Zara, T., Fratta, W., Solinas, M., Pistis, M., Bergman, J., Kangas, B.D., Ferré, S., Tanda, G., Schwarcz, R., Goldberg, S.R. (2013). Reducing cannabinoid abuse and preventing relapse by enhancing endogenous brain levels of kynurenic acid. *Nat Neurosci.* 16(11):1652-61.

- Kauffling, J., and Aston-Jones, G. (2015). Persistent Adaptations in Afferents to Ventral Tegmental Dopamine Neurons after Opiate Withdrawal. *J Neurosci* 35, 10290-10303.
- Kauffling, J., Veinante, P., Pawlowski, S.A., Freund-Mercier, M.J., and Barrot, M. (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *The Journal of comparative neurology* 513, 597-621.
- Kauffling, J., Veinante, P., Pawlowski, S.A., Freund-Mercier, M.J., and Barrot, M. (2010). gamma-Aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biological psychiatry* 67, 88-92.
- Kehagia, A.A., Murray, G.K., and Robbins, T.W. (2010). Learning and cognitive flexibility: frontostriatal function and monoaminergic modulation. *Current opinion in neurobiology* 20, 199-204.
- Kenny, P.J., Chen, S.A., Kitamura, O., Markou, A., Koob, G.F. (2006). Conditioned withdrawal drives heroin consumption and decreases reward sensitivity. *J. Neurosci.* 26:5894–5900.
- Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C., and Alger, B.E. (2002). Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci* 22, 10182-10191.
- Knackstedt, L.A., Samimi, M.M., and Ettenberg, A. (2002). Evidence for opponent-process actions of intravenous cocaine and cocaethylene. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 72, 931-936.
- Koob, G.F. (2004). Allostatic view of motivation: implications for psychopathology. *Nebraska Symposium on Motivation Nebraska Symposium on Motivation* 50, 1-18.
- Koob, G.F. (2013). Addiction is a Reward Deficit and Stress Surfeit Disorder. *Frontiers in psychiatry* 4, 72.
- Koob, G.F., and Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278, 52-58.
- Koob, G.F., and Le Moal, M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 24, 97-129.
- Koob, G.F., and Volkow, N.D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35, 217-238.
- Kowski, A.B., Veh, R.W., and Weiss, T. (2009). Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo. *Neuroscience* 161, 1154-1165.
- Lammel, S., Hetzel, A., Hackel, O., Jones, I., Liss, B., and Roeper, J. (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57, 760-773.
- Lammel, S., Lim, B.K., and Malenka, R.C. (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 351-359.
- Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., and Malenka, R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212-217.
- Lammel, S., Steinberg, E.E., Foldy, C., Wall, N.R., Beier, K., Luo, L., and Malenka, R.C. (2015). Diversity of transgenic mouse models for selective targeting of midbrain dopamine neurons. *Neuron* 85, 429-438.
- Lecca, D., Cacciapaglia, F., Valentini, V., Di Chiara, G. (2006). Monitoring extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens shell and core during acquisition and maintenance of intravenous WIN 55,212-2 self-administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 188(1):63-74.

- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Ennas, M.G., Castelli, M.P., Muntoni, A.L., and Pistis, M. (2011). Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36, 589-602.
- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Muntoni, A.L., and Pistis, M. (2012). Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37, 1164-1176.
- Lecca, S., Meye, F.J., and Mameli, M. (2014). The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *The European journal of neuroscience* 39, 1170-1178.
- Leroy, C., Karila, L., Martinot, J.L., Lukasiewicz, M., Duchesnay, E., Comtat, C., Dollé, F., Benyamina, A., Artiges, E., Ribeiro, M.J., Reynaud, M., Trichard, C. (2012). Striatal and extrastriatal dopamine transporter in cannabis and tobacco addiction: a high-resolution PET study. *Addict Biol.* 17(6):981-90.
- Li, B., Piriz, J., Mirrione, M., Chung, C., Proulx, C.D., Schulz, D., Henn, F., and Malinow, R. (2011). Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* 470, 535-539.
- Liu, J., Gao, B., Mirshahi, F., Sanyal, A.J., Khanolkar, A.D., Makriyannis, A., and Kunos, G. (2000). Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *The Biochemical journal* 346 Pt 3, 835-840.
- Lobb, C.J., Wilson, C.J., and Paladini, C.A. (2010). A dynamic role for GABA receptors on the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons. *Journal of neurophysiology* 104, 403-413.
- Lodge, D.J., and Grace, A.A. (2006). The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5167-5172.
- Lutz, B. (2002). Molecular biology of cannabinoid receptors. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 66, 123-142.
- Mackie, K., and Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 3825-3829.
- Mackie, K., Lai, Y., Westebroek, R., and Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 6552-6561.
- Malouff, J.M., Rooke, S.E., and Copeland, J. (2014). Experiences of marijuana-vaporizer users. *Substance abuse* 35, 127-128.
- Margolis, E.B., Lock, H., Chefer, V.I., Shippenberg, T.S., Hjelmstad, G.O., and Fields, H.L. (2006a). Kappa opioids selectively control dopaminergic neurons projecting to the prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2938-2942.
- Margolis, E.B., Lock, H., Hjelmstad, G.O., and Fields, H.L. (2006b). The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *The Journal of physiology* 577, 907-924.
- Margolis, E.B., Mitchell, J.M., Ishikawa, J., Hjelmstad, G.O., and Fields, H.L. (2008). Midbrain dopamine neurons: projection target determines action potential duration and dopamine D(2) receptor inhibition. *J Neurosci* 28, 8908-8913.
- Marinelli, M., Rudick, C.N., Hu, X.T., and White, F.J. (2006). Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS & neurological disorders drug targets* 5, 79-97.

- Maroteaux, M., and Mameli, M. (2012). Cocaine evokes projection-specific synaptic plasticity of lateral habenula neurons. *J Neurosci* 32, 12641-12646.
- Martinez, D., Gil, R., Slifstein, M., Hwang, D.R., Huang, Y., Perez, A., Kegeles, L., Talbot, P., Evans, S., Krystal, J., et al. (2005). Alcohol dependence is associated with blunted dopamine transmission in the ventral striatum. *Biological psychiatry* 58, 779-786.
- Martinez, D., Kim, J.H., Krystal, J., and Abi-Dargham, A. (2007). Imaging the neurochemistry of alcohol and substance abuse. *Neuroimaging clinics of North America* 17, 539-555, x.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.
- Matsui, A., and Williams, J.T. (2011). Opioid-sensitive GABA inputs from rostromedial tegmental nucleus synapse onto midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 31, 17729-17735.
- Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447, 1111-1115.
- Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nature neuroscience* 12, 77-84.
- McBride, W.J., Murphy, J.M., and Ikemoto, S. (1999). Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behavioural brain research* 101, 129-152.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology* 50, 83-90.
- Mechoulam, R., and Gaoni, Y. (1967). The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron letters* 12, 1109-1111.
- Melis, M., Perra, S., Muntoni, A.L., Pillolla, G., Lutz, B., Marsicano, G., Di Marzo, V., Gessa, G.L., and Pistis, M. (2004a). Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci* 24, 10707-10715.
- Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A.L., Pillolla, G., and Gessa, G.L. (2004b). Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J Neurosci* 24, 53-62.
- Melis, M., and Pistis, M. (2012). Hub and switches: endocannabinoid signalling in midbrain dopamine neurons. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 367, 3276-3285.
- Melis, M., Sgheddu, C., De Felice, M., Casti, A., Madeddu, C., Spiga, S., Muntoni, A.L., Mackie, K., Marsicano, G., Colombo, G., et al. (2014). Enhanced endocannabinoid-mediated modulation of rostromedial tegmental nucleus drive onto dopamine neurons in Sardinian alcohol-preferring rats. *J Neurosci* 34, 12716-12724.
- Melis, M., Spiga, S., and Diana, M. (2005). The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *International review of neurobiology* 63, 101-154.
- Meye, F.J., Valentinova, K., Lecca, S., Marion-Poll, L., Maroteaux, M.J., Musardo, S., Moutkine, I., Gardoni, F., Haganir, R.L., Georges, F., et al. (2015). Cocaine-evoked negative symptoms require AMPA receptor trafficking in the lateral habenula. *Nature neuroscience* 18, 376-378.
- Morikawa, H., and Paladini, C.A. (2011). Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. *Neuroscience* 198, 95-111.

- Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.
- Ng Cheong Ton, J.M., Gerhardt, G.A., Friedemann, M., Etgen, A.M., Rose, G.M., Sharpless, N.S., Gardner, E.L.(1988). The effects of D9-tetrahydrocannabinol on potassium-evoked release of dopamine in the rat caudate nucleus: An in vivo electrochemical and in vivo microdialysis study. *Brain Res* 451: 59–68.
- Oleson, E.B., Cheer, J.F. (2012). A brain on cannabinoids: the role of dopamine release in reward seeking. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(8).
- Olson, V.G., and Nestler, E.J. (2007). Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61, 87-95.
- Omelchenko, N., and Sesack, S.R. (2009). Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse* 63, 895-906.
- Overton, P.G., and Clark, D. (1997). Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain research Brain research reviews* 25, 312-334.
- Parolaro, D., Vigano, D., Realini, N., and Rubino, T. (2007). Role of endocannabinoids in regulating drug dependence. *Neuropsychiatric disease and treatment* 3, 711-721.
- Parolaro, D., Vigano, D., and Rubino, T. (2005). Endocannabinoids and drug dependence. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 4, 643-655.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th Edition. Amsterdam ; Boston: Academic Press/Elsevier.
- Perez-Reyes, M., White, W.R., McDonald, S.A., Hicks, R.E., Jeffcoat, A.R., and Cook, C.E. (1991). The pharmacologic effects of daily marijuana smoking in humans. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 40, 691-694.
- Perrotti, L.I., Bolanos, C.A., Choi, K.H., Russo, S.J., Edwards, S., Ulery, P.G., Wallace, D.L., Self, D.W., Nestler, E.J., and Barrot, M. (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *The European journal of neuroscience* 21, 2817-2824.
- Pijlman, F.T., Rigter, S.M., Hoek, J., Goldschmidt, H.M., and Niesink, R.J. (2005). Strong increase in total delta-THC in cannabis preparations sold in Dutch coffee shops. *Addiction biology* 10, 171-180.
- Pontieri, F.E., Tanda, G., and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12304-12308.
- Quickfall, J., and Crockford, D. (2006). Brain neuroimaging in cannabis use: a review. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 18, 318-332.
- Ramos, J., Cruz, V.L., Martinez-Salazar, J., Campillo, N.E., and Paez, J.A. (2011). Dissimilar interaction of CB1/CB2 with lipid bilayers as revealed by molecular dynamics simulation. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 13, 3660-3668.
- Ranft, K., Dobrowolny, H., Krell, D., Bielau, H., Bogerts, B., and Bernstein, H.G. (2010). Evidence for structural abnormalities of the human habenular complex in affective disorders but not in schizophrenia. *Psychological medicine* 40, 557-567.
- Rhee, M.H., Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R., and Vogel, Z. (1998). Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *Journal of neurochemistry* 71, 1525-1534.

- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Neliat, G., Caput, D., et al. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS letters* 350, 240-244.
- Robbins, T.W., and Arnsten, A.F. (2009). The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annual review of neuroscience* 32, 267-287.
- Robinson, T.E., and Kolb, B. (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* 17, 8491-8497.
- Robinson, T.E., and Kolb, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 33-46.
- Rossetti, Z.L., Hmaidan, Y., and Gessa, G.L. (1992). Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *European journal of pharmacology* 221, 227-234.
- Rothwell, P., Lammel, S. (2013). Illuminating the Opponent Process: Cocaine Effects on Habenulomesencephalic Circuitry. *J Neurosci.* 33(35): 13935–13937.
- Rueda, D., Galve-Roperh, I., Haro, A., and Guzman, M. (2000). The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Molecular pharmacology* 58, 814-820.
- Russo, S.J., and Nestler, E.J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews Neuroscience* 14, 609-625.
- Saario, S.M., Savinainen, J.R., Laitinen, J.T., Jarvinen, T., and Niemi, R. (2004). Monoglyceride lipase-like enzymatic activity is responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes. *Biochemical pharmacology* 67, 1381-1387.
- Sami, M.B., Rabiner, E.A., Bhattacharyya, S. (2015). Does cannabis affect dopaminergic signaling in the human brain? A systematic review of evidence to date. *Eur Neuropsychopharmacol.* 25(8):1201-24.
- Sartorius, A., Kiening, K.L., Kirsch, P., von Gall, C.C., Haberkorn, U., Unterberg, A.W., Henn, F.A., and Meyer-Lindenberg, A. (2010). Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biological psychiatry* 67, e9-e11.
- Scammell, T.E., Estabrooke, I.V., McCarthy, M.T., Chemelli, R.M., Yanagisawa, M., Miller, M.S., and Saper, C.B. (2000). Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci* 20, 8620-8628.
- Scherma, M., Dessì, C., Muntoni, A.L., Lecca, S., Satta, V., Luchicchi, A., Pistis, M., Panlilio, L.V., Fattore, L., Goldberg, S.R., Fratta, W., Fadda, P. (2015). Adolescent  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Exposure Alters WIN55,212-2 Self-Administration in Adult Rats. *Neuropsychopharmacology* (epub ahead of print).
- Schmid, P.C., Reddy, P.V., Natarajan, V., and Schmid, H.H. (1983). Metabolism of N-acyl ethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *The Journal of biological chemistry* 258, 9302-9306.
- Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of neurophysiology* 80, 1-27.
- Schultz, W. (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36, 241-263.
- Schultz, W. (2006). Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annual review of psychology* 57, 87-115.
- Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annual review of neuroscience* 30, 259-288.

- Schultz, W., and Dickinson, A. (2000). Neuronal coding of prediction errors. *Annual review of neuroscience* 23, 473-500.
- Sesack, S.R., and Grace, A.A. (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35, 27-47.
- Simpson, G.R., and Riley, A.L. (2005). Morphine preexposure facilitates morphine place preference and attenuates morphine taste aversion. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 80, 471-479.
- Sklair-Tavron, L., Shi, W.X., Lane, S.B., Harris, H.W., Bunney, B.S., Nestler, E.J. (1996). Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(20):11202-7.
- Solomon, R.L., and Corbit, J.D. (1974). An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychological review* 81, 119-145.
- Spiga, S., Lintas, A., Migliore, M., and Diana, M. (2010). Altered architecture and functional consequences of the mesolimbic dopamine system in cannabis dependence. *Addiction biology* 15, 266-276.
- Spiga, S., Puddu, M.C., Pisano, M., and Diana, M. (2005). Morphine withdrawal-induced morphological changes in the nucleus accumbens. *The European journal of neuroscience* 22, 2332-2340.
- Spiga, S., Serra, G.P., Puddu, M.C., Foddai, M., and Diana, M. (2003). Morphine withdrawal-induced abnormalities in the VTA: confocal laser scanning microscopy. *The European journal of neuroscience* 17, 605-612.
- Spiga, S., Talani, G., Mulas, G., Licheri, V., Fois, G.R., Muggirioni, G., Masala, N., Cannizzaro, C., Biggio, G., Sanna, E., Diana, M. (2014). Hampered long-term depression and thin spine loss in the nucleus accumbens of ethanol-dependent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(35): E3745-54.
- Stamatakis, A.M., and Stuber, G.D. (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nature neuroscience* 15, 1105-1107.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., and Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications* 215, 89-97.
- Tanda, G., Loddo, P., and Di Chiara, G. (1999). Dependence of mesolimbic dopamine transmission on delta9-tetrahydrocannabinol. *European journal of pharmacology* 376, 23-26.
- Tanda, G., Pontieri, F.E., and Di Chiara, G. (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 276, 2048-2050.
- Thomas, H. (1993). Psychiatric symptoms in cannabis users. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 163, 141-149.
- Tsou, K., Patrick, S.L., and Walker, J.M. (1995). Physical withdrawal in rats tolerant to delta 9-tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. *European journal of pharmacology* 280, R13-15.
- Turu, G., and Hunyady, L. (2010). Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of molecular endocrinology* 44, 75-85.
- Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* 367, 1-48.

- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., et al. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329-332.
- Varma, N., Carlson, G.C., Ledent, C., and Alger, B.E. (2001). Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci* 21, RC188.
- Velasquez, K.M., Molfese, D.L., and Salas, R. (2014). The role of the habenula in drug addiction. *Frontiers in human neuroscience* 8, 174.
- Volkow, N.D., Koob, G.F., McLellan, A.T. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N Engl J Med.* 2016 Jan 28;374(4):363-71.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Logan, J., Hitzemann, R., Ding, Y.S., Pappas, N., Shea, C., and Piscani, K. (1996). Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. *Alcoholism, clinical and experimental research* 20, 1594-1598.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Telang, F., Fowler, J.S., Logan, J., Jayne, M., Ma, Y., Pradhan, K., and Wong, C. (2007). Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *J Neurosci* 27, 12700-12706.
- Wang, H.L., Qi, J., Zhang, S., Wang, H., and Morales, M. (2015). Rewarding Effects of Optical Stimulation of Ventral Tegmental Area Glutamatergic Neurons. *J Neurosci* 35, 15948-15954.
- Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S.H., and Davis, R.J. (1995). The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS letters* 359, 133-136.
- Weiss, F., Markou, A., Lorang, M.T., and Koob, G.F. (1992). Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. *Brain research* 593, 314-318.
- Weiss, F., Parsons, L.H., Schulteis, G., Hyttia, P., Lorang, M.T., Bloom, F.E., and Koob, G.F. (1996). Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci* 16, 3474-3485.
- Wikler, A. (1952). A psychodynamic study of a patient during experimental self-regulated re-addiction to morphine. *The Psychiatric quarterly* 26, 270-293.
- Wise, R.A. (2009). Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci.* 2009 Oct;32(10):517-24. doi: 10.1016/j.tins.2009.06.004. Epub 2009 Sep 14.
- Witting, A., Walter, L., Wacker, J., Moller, T., and Stella, N. (2004). P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3214-3219.
- Yamaguchi, T., Sheen, W., and Morales, M. (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *The European journal of neuroscience* 25, 106-118.
- Yamaguchi, T., Wang, H.L., Li, X., Ng, T.H., and Morales, M. (2011). Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J Neurosci* 31, 8476-8490.