

Università degli Studi di Milano
Facoltà di Farmacia
Dipartimento di Scienze Farmacologiche

Corso di Dottorato di Ricerca in
Scienze Farmacotossicologiche, Farmacognostiche e Biotecnologie Farmacologiche
XXIII ciclo

Graduate School in Pharmacological Sciences/ Scuola di dottorato in Scienze Farmacologiche

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**MODULAZIONE DI MECCANISMI DI PLASTICITA' NEURONALE
DOPO SOMMINISTRAZIONE ACUTA O CRONICA DI COCAINA**

Settore disciplinare BIO/14

Dott.ssa Lucia Caffino

Docente guida: Dott. Fabio Fumagalli

Coordinatore: Prof. Guido Franceschini

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 LA COCAINA	2
1.1.1 Preparazioni e vie di somministrazione	2
1.1.2 Assorbimento, distribuzione ed escrezione.....	2
1.1.3 Meccanismo d'azione.....	3
1.1.4 Tossicità acuta e cronica.....	4
1.2 TOLLERANZA E DIPENDENZA	5
1.3 ADDICTION	6
1.3.1 Fattori comportamentali nell' <i>addiction</i>	6
1.3.2 Meccanismi molecolari dell' <i>addiction</i>	7
1.3.3 Ruolo della trasmissione dopaminergica nell' <i>addiction</i>	13
1.3.4 Ruolo della trasmissione glutammatergica nell' <i>addiction</i>	14
1.4 MODELLI ANIMALI DI ADDICTION.....	16
1.5 STRESS E ADDICTION	18
1.6 PLASTICITÀ SINAPTICA: LTP E LTD.....	19
1.6.1 Cocaina e LTP nell'area ventro-tegmentale	23
1.6.2 Sensitizzazione e plasticità sinaptica.....	24
1.7 I FATTORI NEUROTROFICI	25
1.7.1 Ruolo dei fattori neurotrofici.....	26
1.7.2 Meccanismi intracellulari	27
1.7.3 Modalità d'azione dei fattori neurotrofici.....	27
1.8 BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) E ADDICTION	28
1.8.1 Struttura e caratteristiche	28
1.8.2 Alterazione dell'espressione endogena di BDNF mRNA/proteina nel sistema mesocorticolimbico in seguito a trattamento con sostanze d'abuso	30
1.8.3 Modificazioni indotte da alterati livelli di BDNF nei comportamenti indotti dalle sostanze d'abuso.....	31
1.8.4 Specificità regionale degli effetti del BDNF esogeno sui comportamenti di ricerca	

della sostanza	32
1.8.5 Modalità d'azione di BDNF e vie di trasduzione del segnale di TrkB	33
1.8.6 Cascata di segnalazione intracellulare delle MAPK/ERK	35
1.8.7 Cascata di segnalazione intracellulare della PI3K/AKT	39
1.9 ACTIVITY-REGULATED CYTOSKELETAL ASSOCIATED PROTEIN (Arc) E ADDICTION ..	41
2. SCOPO DELLA TESI	43
3. MATERIALI E METODI	44
3.1 MATERIALI	44
3.2 ANIMALI E PARADIGMI SPERIMENTALI	44
3.3 PREPARAZIONE DELL'RNA TOTALE	47
3.4 SINTESI DELLE SONDE RADIOATTIVE	47
3.5 <i>RNase PROTECTION ASSAY</i> (RPA)	48
3.6 QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI DI mRNA.....	49
3.7 ESTRAZIONE DI PROTEINE DA TESSUTO	49
3.8 WESTERN BLOT	50
3.9 ANALISI DELLE LASTRE	51
3.10 ANALISI STATISTICA DEI DATI	52
4. RISULTATI	53
4.1 EFFETTO DEL TRATTAMENTO ACUTO CON COCAINA SULL'ESPRESSIONE DI BDNF E ARC: DOSE-RISPOSTA E PROFILO TEMPORALE	53
4.2 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI BDNF E ARC DOPO TRATTAMENTO PROLUNGATO CON COCAINA	55
4.3 MODULAZIONE DELLA NEUROTROFINA BDNF IN ANIMALI SOTTOPOSTI A STRESS RIPETUTO E INIEZIONE ACUTA DI COCAINA.....	57
4.3.1 Analisi dei livelli di mRNA di BDNF	58

4.3.2	Analisi dei livelli di messaggero e di proteina di TrkB	58
4.3.3	Analisi dei livelli di messaggero di Arc	59
4.3.4	Modulazione delle vie di trasduzione del segnale attivate da BDNF	59
4.4	MODULAZIONE DI BDNF E ARC IN SEGUITO ALL'ASSUNZIONE ATTIVA O PASSIVA DI COCAINA	60
4.4.1	Analisi del comportamento durante l'autosomministrazione acuta	61
4.4.2	Analisi dei livelli di messaggero di BDNF e Arc in seguito ad autosomministrazione acuta	62
4.4.3	Analisi del comportamento durante l'autosomministrazione cronica	63
4.4.4	Analisi dei livelli di proteina di BDNF in seguito ad autosomministrazione ripetuta in corteccia prefrontale e nucleo accumbens	64
5.	DISCUSSIONE	86
6.	BIBLIOGRAFIA	96

1. INTRODUZIONE

Nel corso dell'ultimo decennio in Europa si è osservato un incremento globale nel consumo di cocaina, che è ora la seconda sostanza illecita per consumo, dopo la cannabis. Si stima che circa 14 milioni di europei l'abbiano provata almeno una volta nella vita, pari a una media del 4,1 % di adulti della fascia dei 15-64 anni di età. Si stima che circa 4 milioni di cittadini europei abbiano fatto uso della sostanza nell'ultimo anno (in media l'1,3 %). In Italia, gli individui che sono entrati in contatto almeno una volta con la cocaina sono stimati intorno al 7% della popolazione totale. Nel 2008 il numero di consumatori abituali di cocaina è stato stimato a circa 172 000 (tra i 4,2 e i 4,6 ogni 1 000 cittadini di età compresa tra i 15 e i 64 anni) (OE DT, 2010). I dati delle tendenze sul consumo abituale di cocaina indicano un aumento graduale del consumo di cocaina in Italia.

Tra i consumatori abituali o che fanno un uso intensivo della cocaina si possono distinguere due ampi gruppi. Il primo gruppo è costituito dai consumatori «socialmente integrati» che tendono a consumare cocaina durante i fine settimana, alle feste o in altre occasioni speciali, talvolta in grandi quantità o frequentemente. Numerosi consumatori socialmente integrati riferiscono di controllare il proprio consumo di cocaina imponendosi regole, per esempio su quantità, frequenza o contesto del consumo (Decorte, 2000). Il secondo gruppo include consumatori più «marginalizzati» o «socialmente esclusi», tra cui ex o attuali consumatori di oppioidi che possono fare uso di crack o assumere cocaina per via parenterale. Inoltre, appartengono a questo gruppo i consumatori assidui di cocaina e i consumatori di «crack» appartenenti a gruppi sociali svantaggiati, quali lavoratori del sesso o immigrati (Prinzleve e altri, 2004).

Le conseguenze del consumo di cocaina sulla salute sono spesso sottovalutate. Ciò è dovuto in parte alla natura spesso non specifica o cronica delle patologie che generalmente derivano dal consumo a lungo termine di cocaina e in parte alle difficoltà di stabilire nessi causali tra la malattia e il consumo della sostanza. Il consumo regolare di cocaina, anche sniffando la sostanza, può essere associato a problemi cardiovascolari, neurologici e psichiatrici, ad un aumento del rischio di incidenti e di trasmissione di malattie infettive attraverso rapporti sessuali non protetti (Brugal e altri, 2009). L'assunzione di cocaina per via parenterale e il consumo di crack sono associati a rischi per la salute più elevati, inclusi problemi cardiovascolari e mentali. Questi sono generalmente aggravati dalla marginalizzazione sociale e da problemi specifici aggiuntivi, quali i rischi connessi all'assunzione per via parenterale, compresa la trasmissione di malattie infettive e i rischi di overdose (OE DT, 2007). Nel complesso, esistono indicazioni di un costo sociale e sanitario significativo e probabilmente in crescita correlato al consumo di cocaina in Europa.

Studi recenti hanno suggerito che la dipendenza da sostanze d'abuso è una patologia nella quale le modificazioni neuronali a lungo termine nel sistema dopaminergico e glutammatergico dipendono da, e contribuiscono a, l'apprendimento associato all'uso della sostanza. Molte analogie sono state evidenziate fra i meccanismi cellulari e molecolari alla base della dipendenza e la plasticità neuronale associata all'apprendimento e alla memoria. Le sostanze d'abuso, inclusa la cocaina, inducono modificazioni sinaptiche nelle vie che controllano la ricompensa attraverso segnali coordinati fra il sistema dopaminergico e glutammatergico che portano a comportamenti anomali, come la ricerca incontrollata della sostanza e la ricaduta.

Sulla base di queste osservazioni e dell'incidenza dell'uso della cocaina sulla società, studi che definiscano i meccanismi molecolari alla base della plasticità indotta da cocaina sono essenziali al fine di identificare nuovi bersagli farmacologici per trattare i fenomeni di dipendenza.

1.1 LA COCAINA

1.1.1 Preparazioni e vie di somministrazione

La cocaina è il principale componente attivo delle foglie di *Erythroxylon coca*, utilizzate da oltre un millennio. La pasta di coca è la preparazione di base da cui si producono le varie forme di cocaina quali la preparazione in polvere idrosolubile, cloridrato di cocaina, utilizzata per iniezione endovenosa e inalazione endonasale. La forma di base libera (cocaina cloridrato bollita dopo aggiunta di soluzione acquosa di bicarbonato di sodio sino ad ottenere un precipitato) è vaporizzabile a temperature inferiori rispetto al cloridrato, e quindi può essere fumata aggiunta al tabacco; è conosciuta con il nome di *crack*, termine derivante dal rumore che il composto produce quando viene scaldato e vaporizza nelle pipe di vetro utilizzate per l'inalazione.

1.1.2 Assorbimento, distribuzione ed escrezione

Nelle foglie essiccate di coca per masticazione, la concentrazione di cocaina è dello 0.5%; nelle altre preparazioni il grado di purezza è estremamente variabile.

L'assorbimento orale è il più lento (tra 45 e 60 minuti) ed il metabolismo epatico degrada sino all'80% della dose ingerita; questa via di somministrazione induce blandi fenomeni di assuefazione in quanto i livelli ematici di cocaina aumentano lentamente nel tempo e altrettanto lentamente decadono.

Con la somministrazione per inalazione intranasale del cloridrato, si ha basso assorbimento dalla mucosa e le proprietà vasocostrittive della cocaina ne limitano ulteriormente il passaggio a livello ematico (l'ischemia localizzata può provocare perforazione del setto nasale).

L'effetto comportamentale inizia dopo 3-5 minuti ed il picco ematico si ha tra i 10 e 20 minuti; dopo 1 ora la cocaina non è più rilevabile. Per la somministrazione endovena, il fattore determinante l'efficacia è dipendente dalla purezza iniziale, in quanto la biodisponibilità è, per definizione, totale. Dopo circa 1 minuto l'effetto del farmaco è rilevabile e l'azione persiste sino a 20 minuti. La popolarità della forma per inalazione (*crack*) risiede nell'azione pressoché istantanea (entro 10 secondi), negli alti livelli plasmatici e nella facilità di somministrazione.

La cocaina base è più volatile e maggiormente liposolubile rispetto alle altre forme. L'assorbimento a livello polmonare induce, grazie alla notevole area di assorbimento, livelli ematici molto alti (simili all'iniezione endovenosa), ed il passaggio nel circolo venoso produce la disponibilità diretta nel cervello, in quanto il sangue viene pompato direttamente a livello cerebrale, senza diluizione nella circolazione sistemica.

I fenomeni di combustione ne limitano la biodisponibilità tra il 6 ed il 32%. Il 5% della cocaina viene escreto inalterato nelle urine (rilevabile dopo 3-6 ore dall'uso); l'85% è metabolizzato dalle esterasi plasmatiche ed epatiche a dare ecgonina metilestere e benzoilecgonina, rilevabili nelle urine per più di 14 giorni dopo l'assunzione.

1.1.3 Meccanismo d'azione

Le interazioni della cocaina e dell'amfetamina con la neurotrasmissione dopaminergica sono alla base dei loro effetti psicostimolanti e della loro capacità di provocare dipendenza psichica. L'azione inibitoria della cocaina e dei suoi analoghi sul trasportatore della dopamina (DAT) determina una riduzione della ricaptazione di dopamina e un conseguente incremento della concentrazione extracellulare del neurotrasmettitore liberato dalla terminazione nervosa. L'effetto della cocaina sulla trasmissione dopaminergica dipende, quindi, dalla liberazione escitotica del trasmettitore provocata dall'impulso nervoso (Schmitt and Reith, 2010).

Il DAT è una glicoproteina di circa 80 kDa con molteplici varianti localizzate in diverse aree cerebrali e caratterizzate da distinte catene laterali di carboidrati. Sebbene sia associato prevalentemente ai neuroni dopaminergici, il trasportatore della dopamina è anche espresso nelle piastrine ed in numerose linee di cellule tumorali come quelle di neuroblastoma. La delezione selettiva (*knock-out*) del gene per il DAT nei topi determina un drammatico incremento dell'attività motoria basale negli omozigoti rispetto ai controlli (Giros et al., 1996). Inoltre, i topi mutanti non mostrano alcun aumento dell'attività motoria in risposta alla somministrazione di dosi elevate di cocaina. Questi dati confermano l'ipotesi che il DAT costituisce il sito di origine delle azioni stimolanti motorie della cocaina e dell'amfetamina.

Tuttavia, contrariamente a quanto previsto dall'ipotesi dopaminergica sui meccanismi che determinano la dipendenza da farmaci psicostimolanti, si è osservato che i topi mutanti privi di

DAT sono capaci di apprendere ad autosomministrarsi la cocaina e a ricercarne gli effetti (Rocha et al., 1998). Questi risultati non sono necessariamente contrari all'ipotesi che gli effetti gratificanti della cocaina siano mediati dal blocco del DAT nell'animale normale, ma possono invece indicare che esistono meccanismi alternativi attraverso i quali la cocaina può provocare gratificazione, tra cui il più probabile è il blocco del trasportatore per la noradrenalina (NET). Infatti nelle aree cerebrali che fanno parte dell'amigdala estesa e delle sue aree di transizione (ad esempio, *shell* del nucleo accumbens), dove la cocaina provoca gli aumenti più pronunciati della concentrazione extracellulare di dopamina, è presente un'alta densità di terminazioni noradrenergiche. Pertanto, nei mutanti privi di DAT, la dopamina potrebbe essere in larga parte trasportata dal NET all'interno delle terminazioni noradrenergiche. Dato che la cocaina è un efficace bloccante del NET oltre che del DAT, l'assenza del DAT nei mutanti potrebbe non diminuire significativamente la sua capacità di aumentare la concentrazione extracellulare di dopamina nelle aree suddette e produrre così effetti gratificanti.

1.1.4 Tossicità acuta e cronica

La cocaina induce acutamente un repentino senso di euforia che, dipendente dalla dose, dalla via di somministrazione e dallo stato di tolleranza individuale, dura da pochi secondi a vari minuti. L'euforia è associata a senso di sicurezza, seguita da diminuzione dell'umore con insorgenza di leggero stato ansioso (entro 60-90 minuti) accompagnata successivamente da ansia che si può protrarre anche per ore. L'alternanza degli stati euforici e ansiosi porta alla modalità d'uso definita *binge*, caratterizzata da uso ripetuto a brevi intervalli di tempo sino ad esaurimento della disponibilità della droga. In analogia con altri stimolanti quali amfetamina, l'appetito è inibito e la fatica è percepita meno intensamente. Con dosi più elevate il senso di sicurezza è breve ed è seguito da fenomeni di agitazione psicomotoria. In conseguenza dell'aumentato tono catecolaminergico periferico si può notare tachicardia e ipertermia.

L'assunzione cronica di cocaina induce disturbi affettivi, della personalità e sintomatologia schizofrenica. Lo stato di euforia diminuisce gradatamente anche dopo l'assunzione di dosi elevate. I cocainomani riferiscono che lo stato di attivazione che si ottiene con il primo contatto con la cocaina è d'intensità e potenza ineguagliabile rispetto a quelli successivi ed anche a quelli dopo un periodo prolungato di astinenza. Con l'aumentare della dose e delle assunzioni si verificano deliri, paura, depressione, perdita di controllo intellettuale, attacchi di panico sino ad allucinazioni visive ed uditive che possono portare anche ad una condotta suicidaria. Le azioni periferiche includono aritmia, cardiopatia, sino ad infarto dovuto anche all'azione vasocostrittiva.

1.2 TOLLERANZA E DIPENDENZA

Con il termine di tolleranza farmacologica si definisce il fenomeno caratterizzato dalla necessità di aumentare la dose di un farmaco per mantenere costante l'intensità dell'azione da esso prodotta. La tolleranza farmacologica si dice semplice quando la sospensione del farmaco non provoca alcun disturbo, né accende il desiderio del farmaco stesso. Al contrario, si definisce tossicomaniaca quando la brusca sospensione del farmaco porta alla crisi o sindrome d'astinenza, caratterizzata da spasmodica ricerca della sostanza in questione e disturbi psichici e somatici più o meno gravi con quadri clinici che variano secondo il farmaco in oggetto. La cocaina, insieme a eroina, morfina, benzodiazepine, barbiturici, etanolo, rientra tra le potenziali sostanze d'abuso in grado di dare abitudine tossicomaniaca. La comparsa della sindrome d'astinenza è la conseguenza dell'instaurarsi della cosiddetta dipendenza fisica: questo termine indica una modificazione dello stato fisiologico provocata dall'assunzione cronica della sostanza. Come conseguenza si hanno delle modifiche adattative dell'organismo, per cui la presenza del farmaco diventa necessaria per lo svolgimento delle normali funzioni tissutali. Ulteriore caratteristica dell'abitudine tossicomaniaca è il desiderio incoercibile della sostanza oggetto d'abuso per il quale l'individuo, divenuto tollerante, non esita a superare ogni limite o vincolo di ordine etico o morale per la ricerca della stessa.

La tolleranza può in molti casi essere interpretata come conseguenza di modificazioni delle funzioni della cellula o del tessuto sui quali la sostanza d'abuso ha esplicato la sua azione principale. In altri termini questo fenomeno è la manifestazione di processi adattativi che il tessuto mette in atto per riportare il sistema biologico al livello di attività che aveva prima della protratta esposizione alla sostanza. Diversi sono i meccanismi attraverso i quali può essere indotta una modificazione della risposta tissutale ed è possibile che più processi adattativi contribuiscano al livello complessivo della tolleranza che viene osservata per una data sostanza.

La comparsa di modificazioni nel numero o nelle proprietà degli stessi recettori a cui si lega la sostanza, tali da rendere la loro risposta meno efficace, è un primo meccanismo possibile: una delle risposte adattative che viene messa in atto è la diminuzione del loro numero a livello della membrana cellulare (*down-regulation*), fenomeno dovuto ad internalizzazione, degradazione nel compartimento lisosomiale e/o alterazioni nel processo di *turnover* del recettore. Vi può essere, inoltre, una modifica delle vie intracellulari di trasduzione del segnale con una conseguente minore risposta allo stimolo recettoriale. Alternativamente, la tolleranza può manifestarsi perché gli effetti che scaturiscono dall'interazione continua della sostanza con il suo recettore vengono antagonizzati o compensati da modifiche che avvengono a distanza dal tessuto bersaglio dell'azione farmacotossicologica. In quest'ultimo caso si ha un disturbo dell'equilibrio tissutale. Pertanto l'attivazione di

vie metaboliche o di particolari circuiti neuronali (è il caso della cocaina, che svolge la propria azione a livello del sistema nervoso centrale) garantirebbe il ripristino dell'omeostasi in presenza del farmaco. Il risultato netto degli adattamenti in entrambi i casi sarebbe la richiesta di una dose più elevata rispetto a quella che produceva l'effetto iniziale.

Accanto alla tolleranza, la cocaina e altre sostanze d'abuso possono indurre anche sensitizzazione. Si definisce "sensitizzazione comportamentale" quel fenomeno nel quale la ripetuta esposizione a sostanze d'abuso porta ad un progressivo e persistente aumento dell'attività locomotoria in risposta all'esposizione alla medesima sostanza in seguito ad un periodo di astinenza dalla stessa (Robinson and Berridge, 1993). Invece, con il termine "sensitizzazione neuronale", ci si riferisce ai cambiamenti indotti dalle droghe a livello dei circuiti neuronali di soggetti sensitizzati. La tolleranza ad alcuni effetti di una droga può coesistere con la sensitizzazione verso altri, sottolineando il coinvolgimento di circuiti differenti.

Numerose tecniche sperimentali sono state messe a punto per predire la capacità di un farmaco di indurre *addiction*, ossia l'insieme di quei fenomeni adattativi indotti dall'uso delle droghe che comprende la dipendenza, la tolleranza e la sensitizzazione. Per la maggior parte queste tecniche si basano sull'autosomministrazione del farmaco in animali da esperimento. La sospensione del farmaco agli animali resi dipendenti è di valido aiuto nello studio della natura della sindrome d'astinenza.

1.3 ADDICTION

1.3.1 Fattori comportamentali nell'*addiction*

L'impiego di sostanze d'abuso, saltuario o compulsivo, può essere considerato come un comportamento che viene mantenuto dalle sue stesse conseguenze. Quest'ultime sono classificate come rafforzanti quando spingono l'individuo a ripetere un certo modulo di comportamento. Le sostanze d'abuso possono rinforzare il precedente comportamento di assunzione inducendo effetti piacevoli (rinforzo positivo) oppure ponendo fine ad una situazione sgradevole (rinforzo negativo). Può intervenire un rinforzo secondario indipendente da effetti farmacologici legato a motivazioni di carattere sociale. Lo sviluppo della dipendenza fisica dischiude la possibilità di un'altra forma di rinforzo: ogni volta che l'utilizzo di una sostanza allevia la sofferenza della sindrome d'astinenza, il precedente comportamento di assunzione della stessa viene ulteriormente rafforzato. Anche quando lo sviluppo della tolleranza attenua gli effetti rinforzanti iniziali, le sostanze d'abuso possono provocare un senso di disforia o sofferenza, ricorrente con regolarità, che viene eliminato immediatamente da un'altra somministrazione.

Il termine *addiction* viene spesso utilizzato per indicare uno stato di dipendenza da sostanze, ovvero uno stato persistente nel quale l'uso compulsivo della sostanza sfugge al controllo. L'obiettivo principale nello studio dell'*addiction* è comprendere come gli effetti di una sostanza d'abuso durante un'iniziale esposizione portino progressivamente a stabili cambiamenti molecolari e cellulari dopo esposizioni ripetute (Nestler, 2001; Russo et al., 2010).

1.3.2 Meccanismi molecolari dell'*addiction*

Il fenomeno dell'*addiction* è caratterizzato da una serie di anomalie comportamentali che si sviluppano gradualmente e progressivamente in seguito a un'esposizione ripetuta a sostanze d'abuso; tali anomalie possono persistere per mesi o addirittura anni dopo la sospensione dell'assunzione della sostanza. Il grado di stabilità delle anomalie comportamentali che caratterizzano l'*addiction*, suggerisce che l'espressione di determinati geni possa svolgere un ruolo estremamente significativo nell'ambito di questo processo. In accordo con questa ipotesi, è stato osservato che l'esposizione ripetuta a sostanze d'abuso è in grado di alterare sia la quantità che il tipo di geni espressi in determinate aree cerebrali.

I meccanismi alla base delle modificazioni dell'espressione genica indotte dall'assunzione di sostanze d'abuso sono molteplici (Nestler, 2001):

- alterazione della velocità di trascrizione di specifici geni bersaglio;
- alterazione dei processi di trasformazione degli RNA trascritti primari in mRNA maturi;
- alterata traduzione di mRNA in proteine;
- alterata traslocazione delle proteine mature verso i siti d'azione intracellulari.

Il meccanismo principale e meglio conosciuto è la regolazione della espressione genica: infatti, la perturbazione della trasmissione sinaptica da parte delle sostanze d'abuso è causa di cambiamenti rilevanti in numerose vie intracellulari di trasduzione del segnale, soprattutto a livello nucleare (fig. 1.1), dove si verificano alterazioni a carico di fattori di trascrizione specifici (proteine nucleari che si legano ai promotori di certi geni regolandone la loro trascrizione in mRNA). In base agli studi effettuati nell'ambito dei fattori trascrizionali coinvolti nella dipendenza, due sono quelli maggiormente implicati: CREB (*cAMP response element binding protein*) e Δ FosB. Una molecola a monte di CREB e Δ FosB, la cui attività risulta modificata da diverse sostanze d'abuso, è ERK (*extracellular signal regulated kinase*). Poiché la via del segnale di ERK riveste un ruolo chiave in molti tipi di plasticità sinaptica, tale meccanismo molecolare potrebbe rappresentare un valido candidato alla base dell'induzione dei cambiamenti a lungo termine tipici dell'*addiction* (Nestler, 2001).

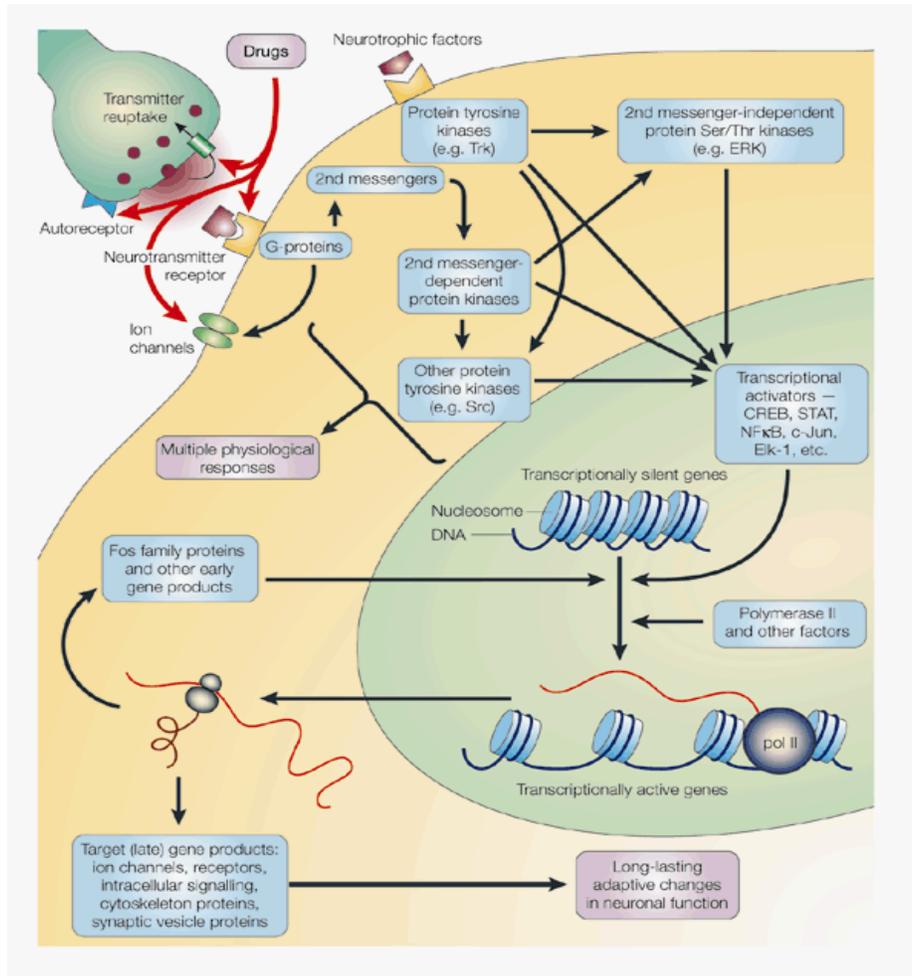


Fig. 1.1 Regolazione dell'espressione genica da parte delle sostanze d'abuso. La velocità del processo di trascrizione di un determinato gene dipende dall'organizzazione del DNA in nucleosomi e dall'attività degli enzimi trascrizionali. Il nucleosoma rappresenta l'unità fondamentale della cromatina ed è costituito da due giri sinistrorsi di DNA avvolti attorno ad una particella core formata da proteine istoniche. Affinchè avvenga la trascrizione, è necessario che il nucleosoma si srotoli in modo da rendere accessibile il DNA al complesso basale trascrizionale. Tale complesso comprende l'RNA polimerasi II e numerose proteine regolatorie, alcune delle quali sono in grado di srotolare il nucleosoma in seguito ad acetilazione degli istoni permettendo agli enzimi che catalizzano la trascrizione dell'RNA l'accesso al DNA. I fattori trascrizionali sono proteine nucleari che legano i siti promotori di certi geni regolandone la loro trascrizione in mRNA: agiscono potenziando o inibendo l'attività del complesso basale di trascrizione, alterando la struttura del nucleosoma attraverso modificazioni del grado di acetilazione degli istoni. L'esposizione ripetuta a sostanze d'abuso è in grado di indurre modificazioni dello stato di fosforilazione dei fattori trascrizionali e di altre proteine nucleari (Nature Reviews Neuroscience).

cAMP e CREB

Il principale meccanismo adattativo conseguente ad un'esposizione cronica a sostanze d'abuso è rappresentato dalla sovraregolazione della via del cAMP (3',5'-adenosin monofosfato ciclico), un fenomeno inizialmente osservato nelle cellule di neuroblastoma, ma successivamente riscontrato

anche a livello neuronale in risposta alla somministrazione ripetuta di oppiacei (Nestler, 1992). Numerose evidenze indicano che il trattamento cronico con morfina è in grado di potenziare questa via di trasduzione del segnale a livello del locus coeruleus, il principale nucleo noradrenergico del cervello (Nestler and Aghajanian, 1997). È stato dimostrato che questa struttura cerebrale svolge un ruolo essenziale nella sindrome d'astinenza da oppiacei (Koob, 1992; Koob and Nestler, 1997; Williams et al., 2001), ma non è altrettanto importante per gli effetti di ricompensa legati all'assunzione di sostanze d'abuso. Infatti, il trattamento cronico dell'animale da esperimento con morfina, cocaina ed etanolo attiva la via del cAMP nel nucleo accumbens (NAc), area cerebrale coinvolta negli stati motivazionali e negli effetti di rinforzo prodotti dalle sostanze d'abuso (Koob and Nestler, 1997): ciò si traduce in un aumento della funzionalità di CREB conseguente alla sua fosforilazione a livello del residuo di Ser-133 da parte della proteina-chinasi A (PKA). L'attivazione di CREB può essere indotta anche da molte altre cascate di trasduzione del segnale, come il calcio intracellulare attraverso la chinasi calcio-calmodulina dipendente (CaMK), la via di Ras/ERK, la via del fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)/Akt (Shaywitz and Greenberg, 1999). Dopo essere stato fosforilato, CREB si lega come dimero al sito CRE (*cAMP response element*) presente all'interno delle regioni regolatorie di numerosi geni. La proteina fosforilata può così interagire con la proteina adattatrice CPB (*CREB binding protein*), la quale stimola il complesso basale di trascrizione.

Al fine di comprendere gli effetti di CREB sul circuito di ricompensa, sono stati condotti degli studi di *over*-espressione di questo fattore trascrizionale nel NAc di ratto attraverso modelli di trasfezione genica: l'aumentata espressione di CREB in quest'area cerebrale riduce gli effetti di ricompensa della cocaina e degli oppiacei, mentre l'*over*-espressione di una forma mutante mCREB (identica alla molecola *wild-type* eccetto che per la presenza di un residuo di alanina al posto di Ser-133, quindi incapace di interagire con il complesso basale di trascrizione) ha l'effetto opposto (Barrot et al., 2002; Carlezon et al., 1998). Questi risultati suggeriscono che l'attivazione di CREB nel NAc potrebbe rappresentare una risposta omeostatica in grado di mediare una forma di tolleranza agli effetti di rinforzo delle sostanze d'abuso.

Oltre ad attenuare gli effetti di ricompensa indotti dalla cocaina e da altre droghe, la stimolazione della via del cAMP e di CREB nel NAc potrebbe anche contribuire allo stato di disforia caratteristico delle prime fasi di astinenza: infatti l'aumentata funzionalità di CREB nel NAc di ratto è in grado di diminuire la responsività dell'animale a una serie di stimoli emozionali negativi (Barrot et al., 2002; Pliakas et al., 2001).

Essendo un fattore trascrizionale, CREB determina i propri effetti attraverso la regolazione del processo di trascrizione di altri geni. I geni che contengono il sito CRE a livello delle regioni promotrici sono molteplici (Mayr and Montminy, 2001), ma numerose evidenze sperimentali

indicano che la dinorfina potrebbe rappresentare un bersaglio rilevante di CREB proprio nel NAc. Il trattamento cronico con cocaina e/o altri psicostimolanti aumenta l'espressione di dinorfina in questa struttura cerebrale, e tale induzione è legata all'attivazione di CREB (Carlezon et al., 1998; Cole et al., 1995).

Dati di letteratura suggeriscono che la dinorfina è in grado di deprimere i meccanismi di ricompensa attraverso l'attivazione dei recettori oppioidi κ localizzati a livello dei terminali nervosi e dei corpi cellulari dei neuroni dopaminergici (per dettagli fig. 1.2), inibendo il rilascio di dopamina (Shippenberg and Rea, 1997). Inoltre la somministrazione di κ -antagonisti blocca la capacità di CREB di attenuare gli effetti di rinforzo prodotti dalla cocaina (Pliakas et al., 2001).

L'*over*-espressione di CREB nella VTA si traduce, anche, in un aumento della subunità GluR1 del recettore AMPA, e tale incremento sembrerebbe giocare un ruolo essenziale per lo sviluppo di sensitizzazione indotta dalla cocaina (Carlezon and Nestler, 2002).

La regolazione della via del cAMP e di CREB sembra essere un meccanismo di breve durata: il sistema ritorna nelle condizioni basali nell'arco di pochi giorni dopo l'astinenza dalla droga (fig 1.3). Questi cambiamenti potrebbero quindi contribuire allo stato emozionale negativo durante le prime fasi dell'astinenza, ma non sono in grado di mediare, da soli, i comportamenti associati all'*addiction*.

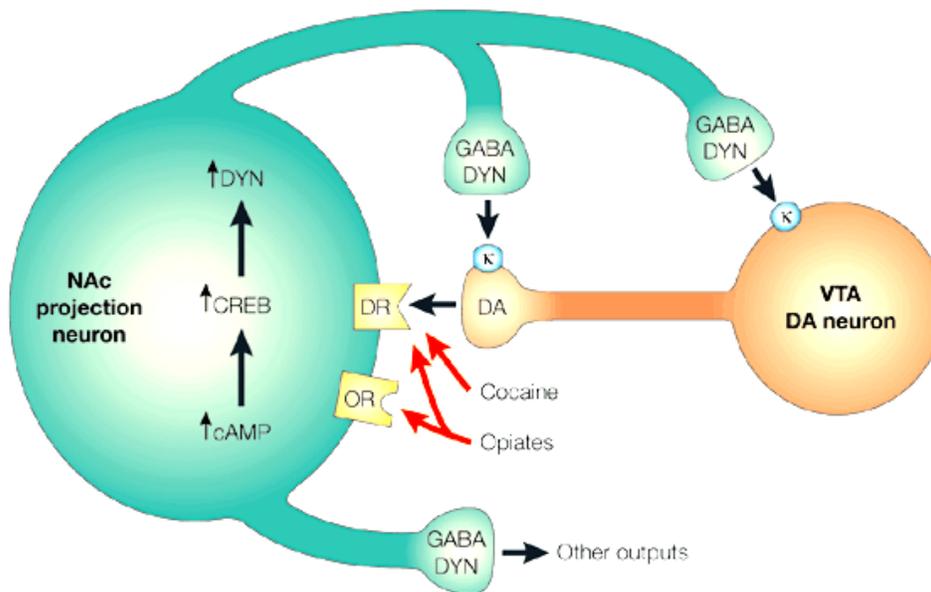


Fig. 1.2 Regolazione di CREB da parte delle sostanze d'abuso. La figura illustra il meccanismo a feedback negativo che si instaura a livello del circuito VTA-NAc in seguito ad esposizione ripetuta a cocaina e/o oppiacei (Nature Reviews Neuroscience).

ΔFosB

Uno degli obiettivi principali nello studio dell'*addiction* è individuare le basi dei meccanismi adattativi a lungo termine tipici di questo fenomeno, sia da un punto di vista molecolare che da un punto di vista cellulare. Una possibilità è rappresentata dal fatto che tali adattamenti possono coinvolgere alterazioni nell'espressione di determinati geni che persistono per mesi e, addirittura anni, dopo la sospensione dell'assunzione della droga. Tra questi geni, ΔFosB assume un ruolo preponderante.

ΔFosB è uno dei membri della famiglia di fattori di trascrizione Fos. Queste proteine eterodimerizzano con i fattori trascrizionali della famiglia Jun per formare il complesso AP-1 (*activator protein-1*). Tale complesso si lega ad una sequenza specifica sul DNA presente nelle regioni regolatorie di molti geni, agendo da induttore o da repressore della trascrizione a seconda del promotore a cui si lega.

La somministrazione acuta di vari tipi di sostanze d'abuso determina una rapida induzione di molti membri delle famiglie Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) e Jun (c-Jun, JunB) a livello del NAc e del caudato-putamen (CPu) (Nestler, 2001). La natura transiente di tale induzione è legata al fatto che gli mRNA che codificano per queste proteine e le stesse proteine sono altamente instabili.

Al contrario, le isoforme di ΔFosB sono indotte solo debolmente dall'esposizione acuta alle droghe, ma grazie alla loro maggiore stabilità (*in vivo* hanno dimostrato un'emivita di settimane) si accumulano nei neuroni durante i fenomeni di abuso, diventando la forma di proteina Fos predominante (Moratalla et al., 1996). Questo suggerisce il ruolo dinamico che ΔFosB giocherebbe nella regolazione dell'espressione genica a lungo termine.

Il maggior grado di stabilità di ΔFosB dipende da due fattori principali: innanzitutto esso è privo di una porzione del dominio C-terminale di transattivazione presente, invece, in altre proteine Fos e derivante da *splicing* alternativo del gene che codifica per FosB (Carle et al., 2007); inoltre, ΔFosB è fosforilato dalla casein-chinasi II su parecchi residui di serina, e tale fosforilazione stabilizza ulteriormente la proteina (Ulery et al., 2006). A causa delle sue caratteristiche proprietà temporali, il significato funzionale di ΔFosB nei comportamenti indotti dalle sostanze d'abuso è stato ampiamente studiato: topi transgenici che sovraesprimono il gene che codifica per questa proteina mostrano sia un'aumentata responsività agli effetti di ricompensa di cocaina e morfina (Kelz et al., 1999), sia un comportamento sensitizzato in risposta agli psicostimolanti (Nestler, 2001). Sono stati effettuati altri studi utilizzando modelli animali differenti: topi che esprimono una forma mutante dominante-negativa di c-Jun (in grado di antagonizzare l'azione di ΔFosB e di altri membri della famiglia Fos) a livello del NAc e dello striato dorsale, manifestano una ridotta responsività agli effetti rinforzanti indotti dalle sostanze d'abuso (Peakman et al., 2003) (Zachariou et al., 2003). Nel complesso, questi risultati suggeriscono che l'espressione di ΔFosB è condizione necessaria e

sufficiente per l'induzione di uno stato comportamentale sensitizzato in risposta all'esposizione a sostanze d'abuso. L'accumulo di questo fattore trascrizionale potrebbe rappresentare uno *switch* molecolare: la sua stabile espressione potrebbe fare da ponte tra le risposte ad una somministrazione acuta di droga e gli adattamenti a lungo termine nella plasticità neuronale e comportamentale tipici dell'*addiction* (fig. 1.3) (Nestler, 2001).

Tra i geni bersaglio di Δ FosB, non è da trascurare il ruolo svolto dalla subunità GluR2 del recettore AMPA per il glutammato: la sovraespressione di Δ FosB induce GluR2 nel NAc, mentre tale induzione è bloccata quando è espressa l'isoforma dominante negativa di c-Jun (Kelz et al., 1999; Peakman et al., 2003). Inoltre, l'*over*-espressione di GluR2 nel NAc attraverso l'impiego di vettori virali, determina un'aumentata sensitizzazione agli effetti comportamentali della cocaina. Questi risultati indicano che l'induzione di GluR2 potrebbe essere responsabile, almeno in parte, dei fenomeni adattativi mediati da Δ FosB. Inoltre, poiché i recettori AMPA GluR2-*lacking* mostrano una maggiore conduttanza (sono permeabili sia a Na^+ che a Ca^{++} perché privi della subunità fondamentale che determina la permeabilità del canale) rispetto ai recettori GluR2-*containing* (permeabili solo allo ione Na^+), è possibile che l'induzione di questa subunità mediata dalla cocaina e da Δ FosB sia uno dei meccanismi attraverso i quali l'esposizione cronica alle sostanze d'abuso è in grado di alterare la neurotrasmissione glutammatergica a livello del NAc (Baker et al., 2003).

Un ulteriore gene bersaglio di Δ FosB è la chinasi ciclina-dipendente, Cdk5, una proteina coinvolta nei processi di sopravvivenza cellulare e in grado di regolare la crescita neuronale. Dati di letteratura indicano che il trattamento cronico con cocaina aumenta i livelli di mRNA che codifica per questa proteina sia a livello del NAc che del CPU (Bibb et al., 2001). Visto l'ipotetico ruolo di Cdk5 nella crescita neuronale, è lecito ipotizzare che la comprovata capacità della cocaina di indurre le spine dendritiche nei neuroni del NAc sia legata all'attivazione di questa proteina (Robinson and Kolb, 2004). Inoltre, l'infusione intra-NAc di roscovitina, un inibitore di Cdk5, previene l'induzione delle spine dendritiche da parte della cocaina in questa regione (Norrholm et al., 2003). Questi risultati consentono di identificare Δ FosB responsabile dei cambiamenti morfologici e della riorganizzazione dei circuiti neuronali indotti dall'uso delle droghe.

Δ FosB va incontro ad un processo di proteolisi che lo riporta a livelli normali nell'arco di uno o due mesi di astinenza. Ciò indica che, accanto a quelli mediati da Δ FosB, altri meccanismi contribuirebbero a determinare i cambiamenti neuronali e comportamentali a lungo termine associati all'*addiction*.

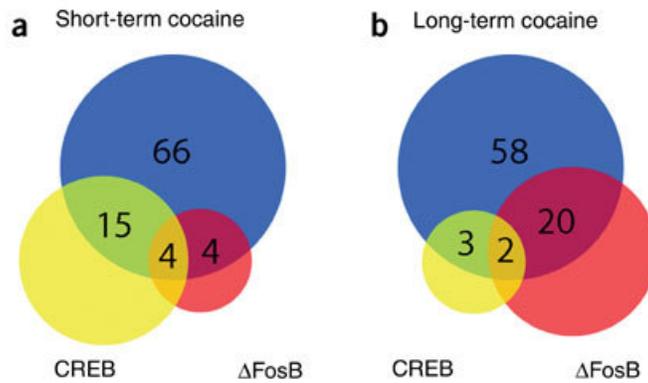


Fig. 1.3 Modulazione dell'espressione genica dopo trattamento acuto e cronico con cocaina: ruolo di CREB e Δ FosB. La figura evidenzia il ruolo dominante di CREB (giallo) nell'induzione dell'espressione genica dopo somministrazione acuta di cocaina. Invece, la regolazione genica dopo un'esposizione a lungo termine dipenderebbe da Δ FosB (rosso) (Nature Neuroscience).

1.3.3 Ruolo della trasmissione dopaminergica nell'*addiction*

L'assunzione di sostanze d'abuso può produrre modificazioni a lungo termine a carico di diversi sistemi neurotrasmettitoriali. In particolare, la trasmissione dopaminergica riveste un ruolo centrale nell'ambito degli studi sulle caratteristiche neurobiologiche dell'*addiction*.

La cocaina è in grado di potenziare la neurotrasmissione dopaminergica elevando la concentrazione extracellulare di dopamina a livello del sistema mesocorticolimbico che, normalmente, regola le risposte di ricompensa a stimoli naturali quali il cibo, il sesso, le interazioni sociali (Koob, 1992). Questo circuito comprende i neuroni dopaminergici che originano nell'area ventro-tegmentale (VTA) e nella sostanza nera (SN) e che proiettano al nucleo accumbens (NAc), al caudato putamen (CPu) e ad altre regioni del sistema corticolimbico quali la corteccia, l'amigdala e l'ippocampo.

La trasmissione dopaminergica è mediata da specifici recettori di membrana che appartengono alla famiglia dei recettori a sette domini transmembrana associati a proteine G. Sono stati isolati cinque sottotipi recettoriali, raggruppati in due classi principali: la classe D_1 comprende i recettori D_1 e D_5 , e la classe D_2 cui appartengono i recettori D_2 , D_3 , D_4 .

I primi sono accoppiati a proteine G_s e attivano l'adenilato ciclasi, mentre i recettori D_2 inibiscono questo enzima attraverso la stimolazione di proteine G_i .

Numerose evidenze indicano che l'effetto di un'esposizione ripetuta a cocaina sull'espressione dei recettori D_1 e D_2 potrebbe dipendere da molteplici fattori, quali la dose impiegata nei paradigmi sperimentali, la via di somministrazione adottata e la durata del periodo di astinenza. Kleven e colleghi (Kleven et al., 1990) riportano una *down-regulation* dei recettori D_1 a livello del NAc dopo trattamento cronico con cocaina, mentre si verificherebbe una sovraregolazione in seguito a lunghi

periodi di astinenza (Unterwald et al., 1993). Inoltre, nelle stesse condizioni sperimentali, si riscontra un'inibizione a lungo termine dei neuroni del NAc dovuta ad ipersensibilità dei recettori D₁ (Beurrier and Malenka, 2002); invece, la somministrazione cronica di psicostimolanti produce una rapida e transiente desensitizzazione degli autorecettori D₂ nella VTA, con conseguente amplificazione del rilascio di dopamina a livello del NAc (Nestler et al., 1990). Tali modificazioni riflettono alterazioni a carico delle principali vie di trasduzione del segnale intracellulare: dati di letteratura dimostrano una *up-regulation* della via del cAMP nel NAc (Crawford et al., 2004) e una riduzione dei livelli di proteine G_i nella VTA (Nestler et al., 1990). I recettori dopaminergici D₁ rivestono un ruolo chiave nel mediare le risposte comportamentali indotte da cocaina: antagonisti dei recettori D₁ possono prevenire o attenuare lo sviluppo di sensitizzazione prodotta da psicostimolanti (White and Kalivas, 1998). Attraverso topi mutanti che esprimono una forma inattiva di recettori D₁, è stato visto che questa classe recettoriale media gli effetti locomotori indotti dai trattamenti acuto e cronico con cocaina (Xu et al., 2000). Il grado di stabilità delle anomalie comportamentali che caratterizzano l'*addiction* suggerisce che l'esposizione prolungata a sostanze d'abuso possa produrre alterazioni permanenti nei livelli di espressione genica: tali modificazioni sembrerebbero essere mediate proprio dall'attivazione dei recettori D₁ (Hyman and Malenka, 2001).

In particolare, la somministrazione acuta di cocaina induce l'espressione di c-Fos e CREB attraverso la stimolazione dei recettori D₁, mentre dopo trattamento cronico si riscontrano cambiamenti nei livelli di espressione di parecchi geni che contengono i siti di legame AP-1 a livello delle regioni regolatorie (Zhang et al., 2005). L'aumentata espressione di ΔFosB nei neuroni che esprimono questa classe recettoriale a livello del NAc può contribuire agli effetti locomotori e di ricompensa della cocaina (Colby et al., 2003). Invece, l'*over*-espressione di CREB in quest'area cerebrale riduce gli effetti di *reward* indotti dallo psicostimolante (Carlezon et al., 1998).

Pertanto, in base a queste osservazioni, è possibile affermare che tali fattori di trascrizione potrebbero dare inizio a programmi di espressione genica alla base dei neuroadattamenti a lungo termine che si sviluppano a livello cerebrale in seguito a esposizione ripetuta a cocaina.

1.3.4 Ruolo della trasmissione glutammatergica nell'*addiction*

La maggior parte degli studi sulle caratteristiche neurobiologiche dell'*addiction* da cocaina si concentra per lo più sul ruolo svolto dalla trasmissione dopaminergica. Infatti, è noto che l'aumentata trasmissione dopaminergica nei neuroni che proiettano dal mesencefalo ventrale al sistema limbico, rappresenta il bersaglio farmacologico per la stimolazione locomotoria e il rinforzo indotti dalla droga. Tuttavia, sebbene questi fenomeni neuroadattativi direttamente correlati alla stimolazione dei recettori dopaminergici appaiono critici per lo sviluppo dell'*addiction*, dati

emergenti indicano, invece, un possibile coinvolgimento della trasmissione glutammatergica nell'espressione di tali eventi (Kalivas, 2004).

Una singola iniezione di cocaina produce un marcato rilascio di glutammato a livello del NAc di animali precedentemente sottoposti ad un trattamento cronico con la sostanza d'abuso (McFarland et al., 2003). Questa liberazione dipende da una riduzione dei livelli basali del neurotrasmettitore sia nello spazio extracellulare sia all'interno dei terminali presinaptici (Baker et al., 2003). Dati recenti indicano che la diminuzione della concentrazione extracellulare di glutammato dipende da un'ipoattività dello scambiatore cisteina/glutammato localizzato a livello delle cellule gliali, dovuta a *down-regulation* dei recettori metabotropici mGluR1 in seguito a esposizione ripetuta a cocaina. In particolare, tale risposta adattativa sarebbe il risultato di una riduzione dei livelli di Homer 1b/c, una proteina in grado di legare selettivamente i recettori metabotropici del glutammato e, quindi, di modulare la via di trasduzione del segnale legata all'inositolo trifosfato e al calcio intracellulare (Brakeman et al., 1997; Swanson et al., 2001). L'importanza di tali risultati è legata al fatto che la ridotta espressione di questa proteina a livello del NAc produce, nell'animale, un fenotipo comportamentale che riflette gli aspetti tipici dell'*addiction*, ossia sensitizzazione locomotoria e aumentata responsività agli effetti di ricompensa indotti dalla cocaina (Ghasemzadeh et al., 2003). Invece, attraverso l'impiego di topi mGluR5 *knock-out* o di antagonisti di questa classe recettoriale, è stata dimostrata una riduzione degli effetti di *reward* (Chiamulera et al., 2001).

Oltre ad alterazioni della trasmissione glutammatergica a livello presinaptico, sono state riportate modificazioni anche a livello postsinaptico, in particolare a carico dei recettori ionotropici AMPA, i principali responsabili del potenziale postsinaptico eccitatorio. I recettori AMPA sono complessi polimerici formati da quattro subunità (GluR1-4): l'espressione di GluR1 nella VTA è maggiore in seguito ad un trattamento ripetuto con psicostimolanti (Churchill et al., 1999). Poiché tali recettori sono permeabili allo ione Ca^{++} , è stato proposto che l'aumento transiente della subunità GluR1 osservato nella VTA possa dare origine ai fenomeni neuroadattativi che si instaurano in risposta alle sostanze d'abuso permettendo l'ingresso di calcio nelle cellule (Carlezon and Nestler, 2002). Tuttavia, studi postmortem effettuati su soggetti deceduti per overdose di cocaina hanno evidenziato una aumentata espressione di GluR2 (Tang et al., 2003), subunità in grado di promuovere la crescita assonale a livello della VTA (Passafaro et al., 2003).

Il fenomeno dell'*addiction* è associato a cambiamenti in molte altre aree cerebrali oltre alla VTA e al NAc, più precisamente in strutture che mediano risposte legate all'apprendimento e alla memoria: in ippocampo, ad esempio, i recettori NMDA giocano un ruolo chiave nell'instaurarsi della memoria a lungo termine. Evidenze farmacologiche suggeriscono che le risposte comportamentali promosse dagli psicostimolanti possono essere attenuate attraverso la somministrazione di antagonisti non competitivi del recettore NMDA, come MK-801 (Vanderschuren and Kalivas, 2000).

Inoltre, Bisaga e colleghi (Bisaga et al., 2000) hanno proposto l'impiego di tali sostanze come potenziali agenti terapeutici per la prevenzione del rischio di ricaduta anche dopo lunghi periodi di astinenza.

1.4 MODELLI ANIMALI DI ADDICTION

Le basi biochimiche della dipendenza sono state inizialmente studiate in animali da laboratorio che ricevevano iniezioni forzate di droga dallo sperimentatore (somministrazione non contingente). Questi studi hanno fornito importanti informazioni sugli effetti farmacologici a breve e lungo termine delle sostanze d'abuso nel cervello e hanno contribuito ad aggiungere informazioni all'attuale visione neurobiologica della dipendenza. Negli ultimi anni sono stati fatti importanti passi avanti nello sviluppo di nuovi modelli animali creati per identificare i meccanismi d'azione delle sostanze psicostimolanti approfondendone gli effetti comportamentali e fisiologici, incluso l'abuso e altre conseguenze negative, in particolare la tossicità e letalità associate all'uso di queste sostanze. Fra questi modelli troviamo l'autostimolazione intracranica (ICSS), la conditioned place preference (CPP), la sensitizzazione comportamentale e l'autosomministrazione.

Nel modello della conditioned place preference, gli animali vengono esposti ad un particolare apparato consistente in due ambienti inizialmente neutrali che differiscono in termini di numero e modalità di stimoli (colori, odore, luce). Gli animali vengono poi esposti ad un ambiente in seguito ad un pretrattamento con una sostanza d'abuso, mentre l'altro ambiente è associato ad un trattamento con veicolo. In seguito ad un numero preciso di sessioni di condizionamento, gli animali, senza aver subito un pretrattamento, vengono lasciati liberi di accedere ai due ambienti dell'apparato. In accordo con i principi del condizionamento, se una droga ha proprietà rinforzanti, l'animale preferisce l'ambiente associato al pretrattamento con la sostanza d'abuso; questo comportamento si osserva in animali trattati con oppiacei, nicotina e cocaina (Koob and Swerdlow, 1988). Questa procedura è un modo utile e poco costosa per valutare le proprietà additive di una sostanza in tempi abbastanza brevi, senza dover operare l'animale e con un allenamento molto breve (Bardo and Bevins, 2000). Tuttavia il modello CPP ha alcuni limiti, inclusi il metodo con cui viene somministrata la sostanza (iniezione intraperitoneale o sottocute), la difficoltà nel generare dati per le curve dose-effetto e la novità dell'ambiente potrebbe confondere i risultati nel giorno del test. Tuttavia questo modello è fondamentalmente limitato in quanto l'animale non fa mai esperienza di somministrazione della sostanza in modo contingente.

Nella maggior parte degli studi biochimici sulla dipendenza, le sostanze vengono somministrate dallo sperimentatore (somministrazione passiva). Questo può seriamente inficiare l'interpretazione

dei risultati, dato il ruolo cruciale dei processi cognitivi (apprendimento dovuto al rinforzo, impulsività e attenzione) che sono associati ai comportamenti presenti nei soggetti dipendenti. A questo riguardo, possono essere distinte almeno due forme di neuroplasticità indotte dall'assunzione di sostanze d'abuso. La prima forma di neuroplasticità è dovuta agli effetti farmacologici (incluso il condizionamento pavloviano) della sostanza, mentre l'altra è causata dai processi cognitivi associati all'autosomministrazione attiva. Sulla base di queste osservazioni, il più accettato modello animale di studio della dipendenza è il paradigma di autosomministrazione. In questo modello l'animale viene allenato per effettuare un comportamento operante (ad esempio premere una leva) per ricevere una sostanza rinforzante. In modo simile all'uomo, l'animale è in grado di autosomministrarsi le sostanze d'abuso, fra cui oppiacei, alcol, nicotina, cannabinoidi, amfetamina e cocaina scegliendo il rinforzo attivo a discapito del non attivo. Il potenziale d'abuso di una droga nell'uomo può essere predetto nel modello animale di autosomministrazione che mima l'abuso clinico di una sostanza molto meglio rispetto alla somministrazione intraperitoneale o sottocute effettuata dall'operatore (Markou et al., 1993). Il modello di autosomministrazione ha mostrato buona *face* e *construct validity*, un paradigma eccellente per esaminare le basi ub unità rila e che e neuroanatomiche degli effetti acuti delle sostanze e i loro effetti nel ciclo della dipendenza.

E', quindi, importante utilizzare modelli animali che dissociano le conseguenze molecolari e cellulari dagli effetti farmacologici diretti della sostanza d'abuso dagli effetti che risultano dai processi cognitivi associati all'autosomministrazione di queste sostanze. Per distinguere fra i diversi tipi di neuroplasticità precedentemente descritti, è stato messo a punto il paradigma yoked control-operant nel quale l'animale che si autosomministra la sostanza (o infilando il naso in un buco o premendo una leva) causa un'infusione passiva della sostanza anche ad un secondo animale collegato ad esso alla stessa dose, allo stesso tempo e nello stesso ambiente dell'animale che si autosomministra (fig. 1.4). Le azioni effettuate dall'animale che riceve passivamente la sostanza non producono effetto sul rilascio della droga e l'apprendimento strumentale, ad esempio della pressione della leva, non sembra influenzare i risultati (Madden et al., 1983).

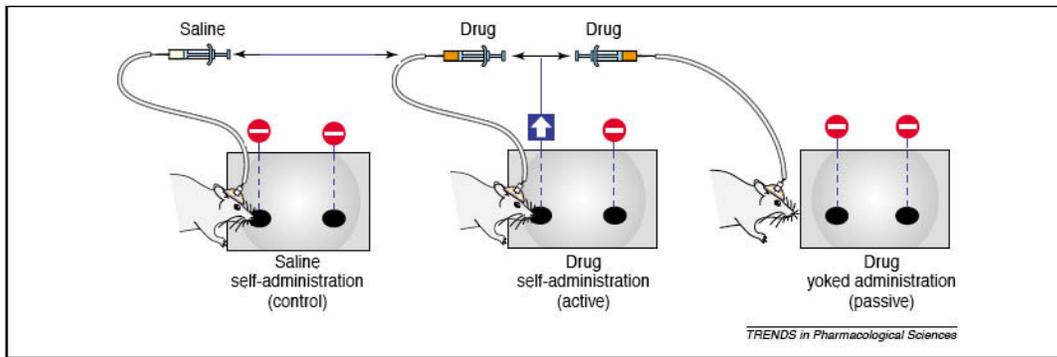


Fig 1.4 Paradigma yoked control-operant. Il modello yoked control-operant permette di valutare i diversi effetti dei meccanismi neuroadattativi causati dalla somministrazione attiva o passiva della sostanza. Gli animali che attivamente si autosomministrano la droga, premendo la leva attiva, attivano una pompa che è attaccata ad una siringa. La leva inattiva è presente per determinare le preferenze dell'animale per la leva associata all'infusione della sostanza. Gli animali attivi hanno il controllo anche sulla sostanza che viene somministrata all'animale collegato ad esso, entrambi gli animali ricevono una dose identica di sostanza, allo stesso tempo e nelle stesse condizioni. Tuttavia gli animali che ricevono la sostanza passivamente non hanno il controllo sul loro consumo di sostanza e la pressione di entrambe le leve non provoca conseguenze. Utilizzando questo paradigma sperimentale, gli effetti molecolari e cellulari possono essere dissociati dall'effetto farmacologico della droga stessa che si osserva anche negli animali passivi. (Jacobs et al., 2003)

1.5 STRESS E ADDICTION

Ricerche cliniche hanno dimostrato che individui esposti a stress cronico mostrano una maggiore tendenza a diventare dipendenti da sostanze d'abuso o alcol. Ad esempio, abusi sessuali, o traumi durante l'adolescenza, aumentano la vulnerabilità alla dipendenza (DeWit et al., 1999). Oltre allo stress cronico, anche gravi traumi acuti aumentano la vulnerabilità alla dipendenza e la percentuale di ricaduta (Dewart et al., 2006). Analisi di comorbidità indicano che pazienti a cui sono stati diagnosticati ansia e depressione presentano problemi di dipendenza (Ford et al., 2009) suggerendo che eventi stressanti nell'arco della vita potrebbero predisporre gli individui alla dipendenza da sostanze d'abuso e a perpetuare il ciclo della dipendenza.

Al fine di determinare se lo stress è un fattore causale nello sviluppo della dipendenza, sono stati utilizzati dei modelli animali per valutare l'interazione fra stress e dipendenza. L'esposizione a stress ripetuto porta ad una sensitizzazione della risposta al challenge con la sostanza d'abuso. In particolare, la risposta comportamentale (attività locomotoria e stereotipie) a challenge con cocaina, amfetamina e morfina è aumentata in seguito a stress (Antelman et al., 1980) (Leyton and Stewart, 1990). In aggiunta a ciò, lo stress determina un potenziamento dei livelli extracellulari di dopamina indotti da cocaina come ad un aumento del rilascio di dopamina in striato in seguito a challenge con amfetamina (Pacchioni et al., 2002; Sorg and Kalivas, 1993).

L'esposizione a stress cronico, oltre a provocare una risposta comportale e neurochimica alla somministrazione di sostanze d'abuso, facilita l'acquisizione del comportamento di autosomministrazione (Haney et al., 1995; Kabbaj et al., 2001). Lo stress potenzia la 'conditioned place preference' di cocaina e morfina (Rozeske et al., 2009).

Al contrario, sia la somministrazione acuta che ripetuta di sostanze d'abuso porta ad una sensitizzazione delle risposte comportamentali e neurochimiche allo stress. L'esposizione cronica a droghe è in grado di aumentare il metabolismo della dopamina in corteccia prefrontale e nel nucleo accumbens in risposta ad uno stress di footshock e di aumentare il rilascio di dopamina nella corteccia prefrontale (Hamamura and Fibiger, 1993; Kalivas and Duffy, 1989).

Il circuito neuronale alla base della risposta allo stress converge con quello che promuove la ricompensa. Studi di risonanza magnetica funzionale indicano che lo stress e l'esposizione a sostanze d'abuso attivano regioni cerebrali simili, incluse le regioni mesolimbiche e mesocorticali (Kufahl et al., 2005; Sinha, 2001; Sinha and Li, 2007). Studi preclinici hanno dimostrato che sia lo stress che l'esposizione a sostanze additive aumenta la trasmissione dopaminergica nella via mesolimbica (Kalivas and Duffy, 1989). La somministrazione acuta di sostanze d'abuso e lo stress acuto inducono un aumento simile nel potenziale sinaptico eccitatorio nell'area ventrotegmentale (Saal et al., 2003), rafforzando l'ipotesi che questi stimoli attivano circuiti simili.

Mentre una serie di componenti dei circuiti neuronali alla base dei cambiamenti indotti dallo stress e dalla somministrazione di sostanze d'abuso sono stati identificati in paradigmi comportamentali, sono poche le informazioni in letteratura riguardo ai meccanismi molecolari che potrebbero controllare questa interazione.

1.6 PLASTICITÀ SINAPTICA: LTP E LTD

Le sostanze d'abuso sono in grado di indurre una riorganizzazione dei circuiti neuronali del sistema mesolimbico dopaminergico tale da contribuire all'instaurarsi dei comportamenti tipici dell'*addiction*. Benché i meccanismi funzionali che mediano questa forma di plasticità comportamentale indotta dalle droghe siano ancora sconosciuti, si sta facendo sempre più strada l'ipotesi che le modificazioni plastiche del sistema nervoso centrale che sono alla base dei fenomeni di apprendimento e memoria possano esercitare un ruolo critico per lo sviluppo dell'*addiction*. Tali modificazioni consistono in variazioni dell'efficacia della trasmissione dei segnali tra cellule: alcune variazioni di efficacia sinaptica sono di breve durata, da alcuni millisecondi ad alcuni minuti, altre sono modificazioni sinaptiche a lungo termine che durano per giorni, settimane, mesi o addirittura anni. La facilitazione sinaptica è un aumento transitorio di efficacia sinaptica che avviene quando

due o più potenziali d'azione raggiungono il terminale sinaptico di un assone in stretta successione, determinando un aumento progressivo della quantità di neurotrasmettitore rilasciato da ogni potenziale d'azione. Di conseguenza, le variazioni di voltaggio che il neurotrasmettitore genera nella cellula postsinaptica diventano progressivamente più grandi. Per spiegare il meccanismo della facilitazione sinaptica bisogna partire dal fatto che il segnale che provoca il rilascio di neurotrasmettitore è un aumento di ioni Ca^{++} all'interno del terminale sinaptico. Tale aumento di Ca^{++} è causato dall'arrivo del potenziale d'azione ed è rapidissimo. Invece, la ridiscendenza del Ca^{++} ai livelli di riposo è più lenta, ed è possibile che un secondo potenziale d'azione raggiunga il terminale prima che il Ca^{++} sia tornato ai livelli iniziali. Allora il secondo aumento di Ca^{++} parte da un livello più alto, e raggiunge una concentrazione maggiore nel terminale. Ciò determina il rilascio di una maggiore quantità di neurotrasmettitore. La facilitazione sinaptica dura solo qualche frazione di secondo, quindi è una forma di plasticità di durata molto breve.

Il potenziamento e la diminuzione a lungo termine della forza sinaptica (*LTP, long term potentiation; LTD, long term depression*) sono forme di plasticità sinaptica che possono persistere per un tempo più lungo (fig. 1.4). Esistono sufficienti dati sperimentali per poter sostenere che in alcune zone del cervello ambedue questi fenomeni sono indotti dall'attivazione di recettori NMDA e da opportune modificazioni delle concentrazioni di calcio all'interno del neurone postsinaptico. I terminali presinaptici possono tuttavia avere un ruolo importante nella plasticità sinaptica, sia come sede di azione di possibili messaggeri retrogradi (cioè generati a livello postsinaptico e capaci di diffondere e modulare l'attività presinaptica; esempi di messaggeri retrogradi sono l'acido arachidonico e il nitrossido) che per l'azione diretta del trasmettitore su recettori presinaptici. Recettori metabotropici presinaptici sono stati ben caratterizzati e la loro stimolazione può potenziare o inibire la liberazione del trasmettitore. Tale regolazione della liberazione del trasmettitore è forse uno dei meccanismi che partecipano sia alla LTP che alla LTD.

La LTP è un fenomeno scoperto da diversi anni ed è attualmente studiata soprattutto nell'ippocampo, struttura comunemente associata con i fenomeni dell'apprendimento e della memoria. Sia *in vitro* che *in vivo* è possibile evocare LTP applicando una serie di stimoli ad alta frequenza sulle fibre nervose (collaterali di Schaffer) che formano sinapsi con le cellule piramidali della zona ippocampale CA1. Ogni stimolo a bassa frequenza applicato successivamente ad un treno di impulsi ad alta frequenza evoca una risposta sinaptica notevolmente aumentata. Tuttavia, se la stimolazione avviene in presenza di un antagonista dei recettori NMDA, il potenziamento sinaptico a lungo termine non viene evocato. L'ipotesi attualmente più accettata è che l'aumento del calcio, indotto nei neuroni postsinaptici dall'attivazione del recettore NMDA a seguito della stimolazione ad alta frequenza, porti alla formazione di un messaggero retrogrado capace di indurre un aumento persistente della liberazione di neurotrasmettitore evocata dagli stimoli a

bassa frequenza (per dettagli fig. 1.5). Nella genesi della LTP sarebbero coinvolti anche i recettori metabotropi del glutammato situati a livello postsinaptico: essi sarebbero in grado di modulare la funzione dei recettori ionotropi permettendo la fosforilazione di una sub unità del recettore NMDA da parte della protein chinasi C. Il recettore fosforilato è più sensibile all'azione depolarizzante del neurotrasmettitore.

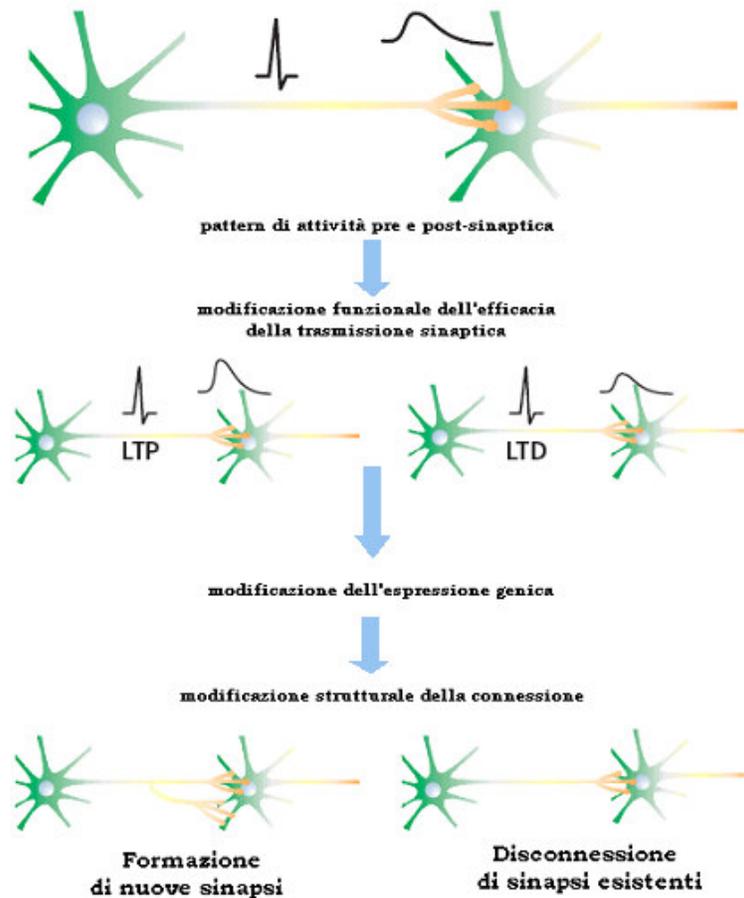


Fig. 1.4 Meccanismi dipendenti dall'attività che regolano la formazione delle sinapsi. In coincidenza di specifici patterns di attività pre- e post-sinaptica vengono indotte modificazioni funzionali dell'efficacia della trasmissione sinaptica, note come potenziamento (LTP) o depressione a lungo termine (LTD). Questi fenomeni sono associati a modificazioni dell'espressione genica nei neuroni coinvolti, seguite dal rimodellamento strutturale delle connessioni: il numero dei contatti aumenta in seguito a LTP, diminuisce in seguito a LTD.

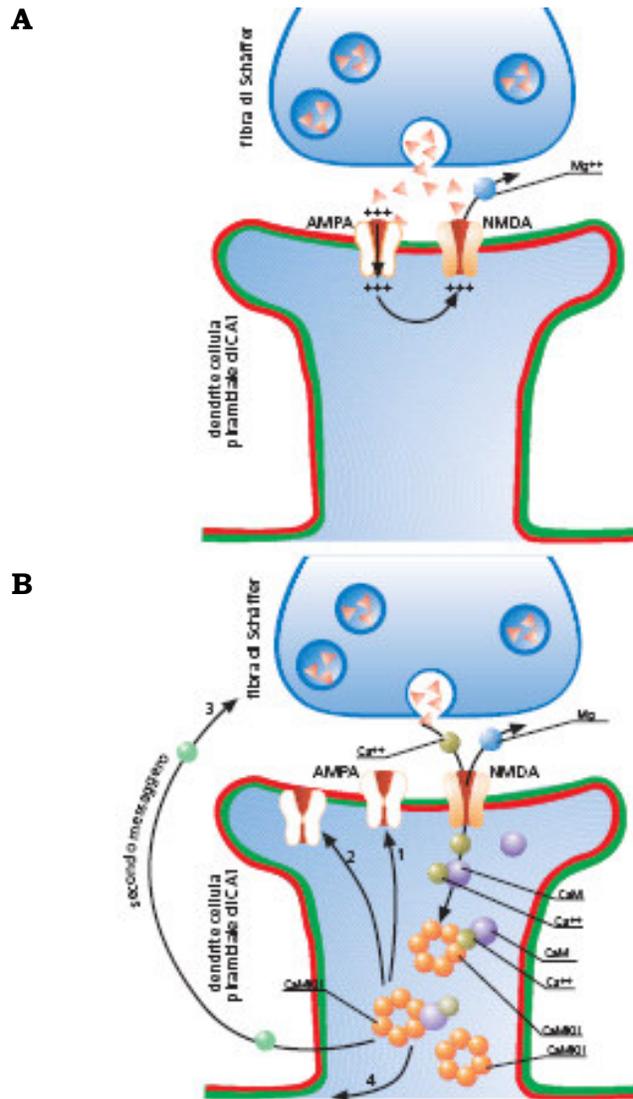


Fig. 1.5 Meccanismo di induzione del potenziamento a lungo termine (LTP) tra fibra di Schaffer e una spina dendritica della cellula piramidale di CA1.

A. Il glutammato (triangoli rosa) rilasciato dalla fibra di Schaffer, si lega a recettori AMPA e NMDA presenti sulla membrana della spina dendritica. L'apertura dei canali recettoriali AMPA depolarizza la membrana rimuovendo il blocco da Mg^{++} dal vicino recettore NMDA.

B. Gli ioni Ca^{++} che entrano attraverso il recettore NMDA si legano alla calmodulina (CaM) ed insieme attivano l'enzima calcio-calmodulina chinasi II (CaMK II) che si ub unita rila. La CaMK II fosforilata è attiva e può mediare la LTP con quattro possibili meccanismi: (1) fosforilazione del recettore AMPA; (2) inserimento in membrana di nuovi recettori AMPA che si trovano all'interno del dendrite in forma inattiva; (3) liberazione di un messaggero retrogrado che va a potenziare il rilascio di glutammato dalla fibra di Schaffer; (4) effetti sull'espressione di geni della cellula piramidale.

1.6.1 Cocaina e LTP nell'area ventro-tegmentale

L'assunzione ripetuta di sostanze d'abuso può determinare cambiamenti a livello di LTP e/o LTD nelle strutture mesolimbiche dopaminergiche tali da contribuire allo sviluppo delle anomalie comportamentali tipiche dell'*addiction* (Wolf, 1998). Tuttavia, il meccanismo attraverso il quale la cocaina e altri psicostimolanti potenziano le sinapsi in queste aree non è stato ancora completamente chiarito. Ungless e colleghi (Liu et al., 2005; Ungless et al., 2001) hanno dimostrato che le sinapsi eccitatorie nella VTA sono potenziate in seguito ad una singola iniezione di cocaina *in vivo*. Tale rafforzamento dell'efficacia sinaptica sembra essere collegato al fenomeno di *up-regulation* dei recettori AMPA e, inoltre, è area-specifico, nel senso che il potenziamento degli *input* eccitatori non si verifica né a livello dei neuroni piramidali dell'area CA1 dell'ippocampo né a livello dei neuroni GABAergici dell'area ventro-tegmentale. Recentemente, Liu e colleghi (Liu et al., 2005) hanno dimostrato che la somministrazione ripetuta di cocaina, *in vivo*, facilita l'induzione di LTP a livello dei neuroni dopaminergici mesencefalici. Tale effetto sembrerebbe essere collegato ad un'aumentata eccitabilità di questi neuroni conseguente ad una diminuzione funzionale delle afferente inibitorie GABAergiche. Quindi, ci si potrebbe aspettare che il rafforzamento dell'efficacia sinaptica abbia sostanziali effetti sull'attività del sistema dopaminergico e conseguentemente su una vasta gamma di comportamenti associati all'abuso di droghe. In particolare, questo potenziamento potrebbe rappresentare una componente importante del processo di sensitizzazione, che si suppone essere centrale nello sviluppo del comportamento compulsivo di ricerca della droga.

Due caratteristiche principali indicano una potenziale correlazione tra il rafforzamento dell'efficacia sinaptica indotto dalla cocaina e l'induzione di sensitizzazione comportamentale: in primo luogo, il fenomeno di LTP è rilevabile soltanto dopo cinque giorni dall'esposizione allo psicostimolante e non dopo dieci giorni. Questo risultato concorda con diversi dati di letteratura che sottolineano il ruolo essenziale ma transitorio svolto dalla VTA nell'indurre sensitizzazione (Carlezon and Nestler, 2002; Everitt and Wolf, 2002). In secondo luogo, il potenziamento a lungo termine provocato dalla cocaina è bloccato dalla co-somministrazione, *in vivo*, di un antagonista del recettore NMDA, in modo del tutto analogo a quanto osservato per il processo di sensitizzazione (Thomas and Malenka, 2003). Il fatto che questa riorganizzazione dei circuiti neuronali possa essere estremamente importante da un punto di vista funzionale è supportato da evidenze recenti che indicano che la somministrazione *in vivo* di diverse sostanze d'abuso (amfetamina, morfina, nicotina, etanolo) così come l'esposizione ad uno stress acuto è in grado di potenziare notevolmente le sinapsi eccitatorie nella VTA (Saal et al., 2003). Questi risultati dimostrano che i meccanismi cellulari alla base delle forme adattative di plasticità dipendente dall'esperienza (interazione stress-ambiente) possono essere modificati dalle sostanze d'abuso.

1.6.2 Sensitizzazione e plasticità sinaptica

Le sostanze d'abuso inducono modificazioni dell'attività *pacemaker* dei neuroni dopaminergici non in modo diretto, ossia agendo sulla conduttanza agli ioni, ma mediante meccanismi pre- e postsinaptici. In questo contesto, particolarmente importanti sono le modificazioni a lungo termine a livello del mesencefalo della trasmissione eccitatoria, come l'aumento della subunità GluR1 del recettore AMPA. L'alterazione della trasmissione sinaptica mediata dal glutammato svolge un ruolo cruciale nello sviluppo del rinforzo positivo mediato dalla cocaina, poiché induce una riorganizzazione dell'attività dei neuroni dopaminergici che costituiscono il circuito di ricompensa.

Grignaschi e collaboratori (Grignaschi et al., 2004) hanno dimostrato che una singola dose di 20 mg/kg di cocaina è in grado di indurre sensitizzazione comportamentale in risposta ad un *challenge* con la stessa sostanza (10 mg/kg). Questo effetto è associato ad un aumento transitorio dei livelli di messaggero di GluR1 sia nella VTA che nel Nac. La regolazione dell'espressione genica di questa subunità recettoriale potrebbe rappresentare uno dei meccanismi che contribuiscono allo sviluppo (VTA) e all'espressione (Nac) della sensitizzazione comportamentale (Vanderschuren and Kalivas, 2000; Wolf, 1998).

Il fenomeno di sensitizzazione comportamentale è correlato non soltanto a cambiamenti dal punto di vista biochimico, ma anche a modificazioni cerebrali da un punto di vista strutturale, attraverso un riarrangiamento delle connessioni sinaptiche. Numerose evidenze sperimentali riportano un incremento della densità di spine dendritiche sia nel Nac che in corteccia prefrontale, in seguito a un trattamento cronico con cocaina o amfetamina (Robinson and Kolb, 2004) (fig. 1.6). Nel sistema nervoso centrale, il processo di riorganizzazione sinaptica avviene, solitamente, in risposta ad un danno neuronale, ed è associato a variazioni nell'espressione genica di GAP-43 (*growth-associated protein 43*), una proteina responsabile della crescita assonale durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale e in grado di svolgere un ruolo importante nei processi di plasticità esperienza-dipendente (Benowitz and Routtenberg, 1997). Dati di letteratura indicano che una singola dose di cocaina aumenta i livelli di messaggero che codifica per questa proteina nella VTA e nel Nac (Grignaschi et al., 2004; Levi-Montalcini and Hamburger, 1951): questo effetto ritorna a livelli basali dopo una settimana dalla fine del trattamento, mentre il fenomeno di sensitizzazione comportamentale si mantiene ancora su livelli elevati. Ciò suggerisce che l'incremento di mRNA di GAP-43 indotto dalla cocaina potrebbe rappresentare l'elemento iniziale responsabile dei cambiamenti strutturali che si verificano a livello assonale nel sistema mesolimbico dopaminergico.

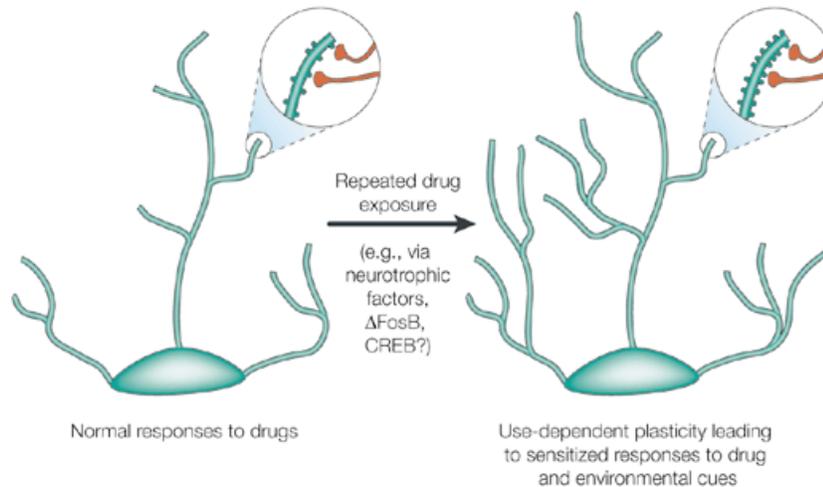


Fig. 1.6 Incremento delle spine dendritiche in seguito ad esposizione ripetuta a sostanze d'abuso (Nature Reviews Neuroscience).

1.7 I FATTORI NEUROTROFICI

I fattori neurotrofici sono molecole essenziali per lo sviluppo, la sopravvivenza ed il mantenimento delle cellule neuronali del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP).

Sono passati più di quarant'anni da quando Rita Levi Montalcini e Viktor Hamburger scoprirono il *Nerve Growth Factor* (NGF), la prima proteina ad azione neurotrofica (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951), ma ancora oggi lo studio dei fattori neurotrofici costituisce uno dei settori della ricerca maggiormente attivi.

La denominazione "fattori neurotrofici" (NTFs) è una terminologia utilizzata dai neurobiologi per indicare sostanze a carattere proteico dotate di molteplici funzioni e indirizzate verso specifici bersagli sia nel SNC sia nel SNP. È una ben nota caratteristica del sistema nervoso dei vertebrati che molti neuroni siano eliminati durante il periodo dello sviluppo (Barde, 1988). Questo fenomeno si verifica quando gli assoni in accrescimento si connettono con i rispettivi territori bersaglio. Nella fase di sviluppo neuronale una grossa percentuale di neuroni già formati va incontro a degenerazione (20%-70%), sottolineando il ruolo che questi tessuti bersaglio svolgono nel regolare il numero dei neuroni da cui hanno bisogno di essere innervati. Già alcuni anni fa si postulò che questa degenerazione fisiologica fosse regolata da proteine denominate fattori neurotrofici e sintetizzate nelle aree a cui si connettono i neuroni (Purves et al., 1988). Ai fattori

neurotrofici sono state inizialmente attribuite le stesse attività esplicate dall'NGF. Il concetto di fattore neurotrofico, pertanto, era quello di un segnale prodotto dal tessuto innervato per la limitazione selettiva dei neuroni afferenti.

Dopo essere stato scoperto, l'NGF è rimasto a lungo l'unica molecola conosciuta ad azione neurotrofica. Tuttavia, sulla base della vicinanza genetica con il fattore capostipite, negli ultimi quindici anni sono state identificate altre proteine denominate fattori neurotrofici "NGF correlati" e "NGF non correlati".

I fattori neurotrofici che costituiscono il gruppo di molecole correlate a NGF vengono chiamati "neurotrofine" e sono:

- **BDNF**, *Brain-derived neurotrophic factor*;
- **NT-3**, *Neurotrophin-3*;
- **NT-4/5** *Neurotrophin-4/5*;
- **NT-6**, *Neurotrophin-6*;
- **NT-7**, *Neurotrophin-7*.

Al gruppo di fattori neurotrofici non correlati a NGF appartengono:

- **CNTF**, *Ciliary-neurotrophic factor*;
- **GDNF**, *Glial-cell-line-derived neurotrophic factor*;
- **TGF $\alpha\beta$** ;
- **FGFs**, *Fibroblast growth factors*;
- **EGF**, *Epidermal growth factor*;
- **PDGF**, *Platelet-derived growth factor*.

1.7.1 Ruolo dei fattori neurotrofici

I fattori neurotrofici sono molecole-segnale di natura endogena che regolano sia la sopravvivenza a lungo termine e la differenziazione di specifiche popolazioni di neuroni durante lo sviluppo, sia la vitalità dei neuroni in età adulta.

Tuttavia, studi recenti hanno modificato questa visione tradizionale suggerendo un inaspettato ruolo per tali fattori: la regolazione della trasmissione e della plasticità sinaptica. I fattori neurotrofici potrebbero rappresentare, infatti, una nuova classe di fattori di crescita che mediano le modificazioni attività-dipendenti dell'efficacia sinaptica. Diminuzioni della loro espressione potrebbero rendere il sistema più vulnerabile ad eventi potenzialmente tossici e avere effetti deleteri sulla plasticità sinaptica e sulla capacità di adattamento del sistema nervoso.

1.7.2 Meccanismi intracellulari

I fattori neurotrofici agiscono mediante il legame a specifici recettori tirosin-chinasici determinando la dimerizzazione del recettore e l'attivazione della sua attività chinastica con conseguente attivazione della fosforilazione del recettore e stimolazione di diverse vie del segnale intracellulari, come la via delle MAPKs e della PI3K (Segal and Greenberg, 1996). L'attivazione delle diverse vie avviene grazie a specifiche proteine che riconoscono il recettore fosforilato e vi interagiscono facendo da ponte ad altre proteine adattatrici (ad es. Sos) le quali, a loro volta, riconoscono altre proteine specifiche per una certa via di trasduzione. In questo modo si induce l'attività chinastica di enzimi come la PI3K e le MAPKs, in grado di fosforilare una serie di substrati coinvolti nella proliferazione, nella sopravvivenza e nel differenziamento neuronale.

Sulla base di questo modello è possibile spiegare l'azione pleiotrofica e ridondante dei fattori neurotrofici: un singolo fattore neurotrofico può esercitare azioni differenti su un determinato tipo neuronale coinvolgendo diversi messaggeri cellulari nella trasduzione del segnale; può influenzare più tipi neuronali a prescindere dalla localizzazione o dal tipo neurotrasmettitoriale del neurone; può influenzare sia neuroni sia altre cellule. *In vitro* è stato dimostrato che NGF agisce su cellule del sistema immunitario (Otten et al., 1989), mentre FGF è in grado di aumentare la proliferazione di precursori neuronali e gliali (Vlodavsky et al., 1991).

1.7.3 Modalità d'azione dei fattori neurotrofici

I fattori neurotrofici possono agire attraverso trasporto retrogrado e anterogrado. Il trasporto retrogrado consiste nella sintesi del fattore da parte di cellule bersaglio la cui sopravvivenza dipende dal fattore neurotrofico stesso. Pertanto, una volta secreto, esso viene ricaptato dallo spazio extracellulare dal neurone che innerva il tessuto e trasportato fino al corpo cellulare. Il trasporto retrogrado rappresenta il meccanismo più tradizionale ed è caratteristico dell'NGF. Il trasporto anterogrado prevede la sintesi del fattore neurotrofico da parte del neurone innervante ed il successivo rilascio verso la cellula bersaglio. Questo tipo di trasporto è stato studiato per BDNF, NT-3, FGF-1 (Altar et al., 1997).

L'effetto dei fattori neurotrofici può esplicarsi per via paracrina o autocrina: una volta secrete nello spazio extracellulare, queste proteine possono interagire con recettori localizzati su membrane citoplasmatiche di cellule presenti nelle dirette vicinanze della zona di secrezione (via paracrina), o agire sulla stessa cellula che le libera (via autocrina).

1.8 BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) E ADDICTION

Negli ultimi anni, diversi studi hanno suggerito che l'esposizione prolungata a sostanze d'abuso causa modificazioni neurochimiche e cellulari a lungo termine che determinano stabili cambiamenti nella neuroplasticità dei circuiti cerebrali e che sono alla base dei comportamenti di ricerca della sostanza e di ricaduta anche in seguito a lunghi periodi di astinenza (Nestler and Aghajanian, 1997; White and Kalivas, 1998). A livello molecolare, gli effetti indotti dal consumo ripetuto di sostanze psicotrofici coinvolgono diverse vie di trasduzione del segnale la cui attivazione partecipa a sviluppare sensitizzazione e a cambiamenti dei circuiti neuronali alla base della memoria e dell'apprendimento. Nonostante gli studi in questo campo siano ormai numerosi, le basi molecolari della dipendenza da cocaina sono state solo parzialmente spiegate.

Recenti evidenze suggeriscono che le neurotrofine, in particolare il BDNF e le sue vie di segnalazione intracellulare, sono coinvolte nei meccanismi neuroadattativi alla base dell'abuso e della dipendenza da psicotrofici (Altar et al., 1992; Filip et al., 2006; Grimm et al., 2003). Alterazioni nel sistema BDNF potrebbero regolare la modificazione dei componenti molecolari a livello delle sinapsi, variazioni nell'espressione genica e quindi alterazioni nella risposta comportamentale.

1.8.1 Struttura e caratteristiche

Il BDNF è un membro della famiglia delle neurotrofine, e svolge un ruolo importante sia durante lo sviluppo sia nei meccanismi di plasticità neuronale che si instaurano nell'adulto. Gli studi effettuati in questi anni hanno dimostrato che BDNF possiede un'organizzazione sofisticata in termini di meccanismi regolatori trascrizionali e traduzionali. L'organizzazione strutturale del gene di BDNF in ratto e topo è stata recentemente rivista (Aid et al., 2007) e risulta essere molto complessa: vi sono 9 esoni non tradotti all'estremità 5' e un esone codificante la proteina pro-BDNF all'estremità 3'. Si formano in questo modo i seguenti trascritti, come risultato dell'evento di *splicing* tra un esone al 5' e l'esone al 3' del gene: BDNF I, BDNF II, BDNF III, BDNF IV, BDNF V, BDNF VI, BDNF VII, BDNF VIII e BDNF IXA. Sono inoltre stati individuati diversi siti donatori di *splicing* all'interno di alcuni esoni: l'esone II ne contiene tre che danno origine alle tre varianti di BDNF II, BDNF IIA, BDNF IIB e BDNF IIC, mentre a partire dall'esone VII si può originare il BDNF 6B come risultato dell'evento di *splicing* che incorpora l'esone VII, VIII e IX. La trascrizione è guidata da 9 promotori separati che producono 24 differenti trascritti i quali vengono tutti tradotti in un'unica proteina matura dimerica (Fig. 1.7) (Cunha et al., 2010).

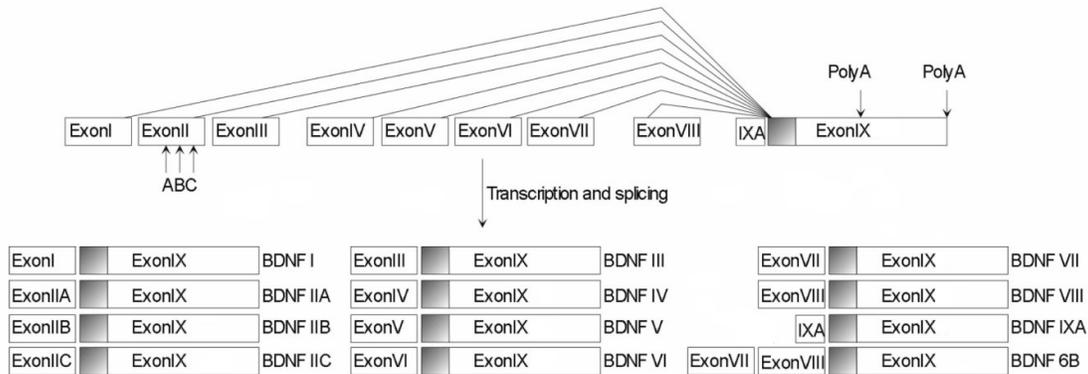


Fig. 1.7 Struttura genica di BDNF e dei suoi trascritti in topo e ratto.

I promotori alternativi sono utilizzati come meccanismo versatile per creare diversità e flessibilità nella regolazione dell'espressione genica (Ayoubi and Van De Ven, 1996) e sono, infatti, coinvolti nel controllo dell'espressione tessuto- e regione-specifica di questo gene (Timmusk et al., 1993). La trascrizione dei vari esoni è controllata da stimoli specifici quali calcio, CREB, MEK, MeCP2, CaMKII e ormoni. Inoltre recentemente Lubin e collaboratori (Lubin et al., 2008) hanno dimostrato che la trascrizione delle diverse varianti di *splicing* di BDNF è controllata anche da una serie di meccanismi epigenetici, quali la metilazione del DNA e le modificazioni postraduzionali degli istoni. Ciò porta ad una precisa regolazione spaziale e temporale dei trascritti di BDNF. Aid et al. (Aid et al., 2007), infatti, hanno osservato che alcuni trascritti sono espressi selettivamente nel cervello, come BDNF II, V, VII e VIII, mentre altri sono espressi anche in tessuti non neurali, come BDNF IV e VI, soprattutto a livello cardiaco e polmonare. Per quanto riguarda l'espressione stadio-specifica, BDNF I, IV e VI risultano essere i trascritti maggiormente espressi nei tessuti cerebrali dell'adulto, mentre sono stati riportati bassi livelli per BDNF II, V, VII, VIII e IXA. Lo *splicing* alternativo, inoltre, stabilisce la distribuzione subcellulare e la sintesi locale di BDNF. Chiaruttini et al., (Chiaruttini et al., 2008), hanno dimostrato che mentre la maggior parte dei trascritti ha una localizzazione a livello somatico, BDNF VI è indirizzato ai dendriti distali, così come le tre varianti dell'esone II, in modo da avere una traduzione della proteina nel soma, ma anche una più rapida risposta ad un input sinaptico a livello dei dendriti (Pattabiraman et al., 2005). Infine, la risposta dei vari promotori a stimoli diversi ha suggerito che l'esone I e IV sono quelli che maggiormente rispondono all'attivazione neuronale: la trascrizione di entrambi è attivata dall'ingresso di Ca^{2+} ma, mentre l'esone IV risponde all'aumento di Ca^{2+} mediato dai recettori NMDA e dai canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti di tipo L (L-VDCC), l'esone I è attivato in modo predominante solo da quest'ultimi (Tabuchi et al., 2002). Si è visto inoltre che l'esone IV presenta due elementi localizzati al 5' del sito d'inizio dell'mRNA: un elemento responsivo al Ca^{2+} attivo sia

durante lo stadio embrionale che in quello postnatale, e una sequenza *consensus* per CRE che serve per la transattivazione nell'adulto (Shieh et al., 1998).

Il promotore dell'esone VI, invece, è regolato in modo completamente diverso, in quanto contiene elementi responsivi ai glucocorticoidi (GRE) e la sua attività è dunque influenzata dal corticosterone (Hansson et al., 2006; Schaaf et al., 2000).

Il BDNF viene sintetizzato all'interno del reticolo endoplasmico come una pre-pro-proteina e dopo taglio proteolitico si ottiene una proteina di 32 kDa, il proBDNF (Fig. 1.8), che migra successivamente nell'apparato del Golgi e poi nel sistema trans-Golgi (TGN), dove viene immagazzinato nei granuli di secrezione. Il BDNF può essere processato intracellularmente durante il processo di inclusione vescicolare da enzimi quali furina o pro-convertasi e secreta quindi come BDNF maturo (14kDa), oppure può essere secreta come proBDNF e subire il taglio proteolitico da parte di metalloproteinasi della matrice (MMP) e plasmina nel comparto extracellulare (Lessmann et al., 2003).

Il proBDNF non è un precursore inattivo, ma è di per sé una proteina segnale. Il proBDNF viene rilasciato nel Sistema Nervoso Centrale in modo attività-dipendente e il legame al recettore p75^{NTR} sembra svolgere una funzione opposta a quella della neurotrofina matura. Infatti, se da un lato il legame di mBDNF al suo recettore ad alta affinità TrkB attiva il *signalling* che promuove la sopravvivenza neuronale, dall'altro il legame di proBDNF a p75^{NTR} induce apoptosi.



Fig. 1.8 Pre-pro-BDNF. La porzione pre (18 Aa) subisce taglio proteolitico all'interno del reticolo endoplasmico. Il BDNF maturo (in nero) viene exciso dal precursore da parte di enzimi presenti o intracellularmente nel sistema trans-Golgi o nel comparto extracellulare.

1.8.2 Alterazione dell'espressione endogena di BDNF mRNA/proteina nel sistema mesocorticolimbico in seguito a trattamento con sostanze d'abuso

Fra le aree cerebrali alterate dall'abuso di sostanze psicostimolanti vi sono la corteccia prefrontale (PFC) e il nucleo accumbens (NAc); entrambe ricevono innervazione dopaminergica dall'area ventrotegmentale (VTA) attraverso la via dopaminergica mesocorticolimbica. Diverse alterazioni della plasticità indotte dall'uso di cocaina che si pensa portino all'instaurarsi del comportamento di ricerca compulsiva della sostanza sembrerebbero essere a carico della via prefrontale-nucleo accumbens. E' ormai noto che BDNF viene espresso nei neuroni glutammatergici piramidali che proiettano dalla corteccia prefrontale e nei neuroni dopaminergici che proiettano dalla VTA e che

entrambe le vie formano sinapsi con i neuroni 'medium spiny' GABAergici nel nucleo accumbens. BDNF subisce anche un trasporto anterogrado verso lo striato.

In alcune condizioni, il BDNF endogeno, messaggero e proteina, viene regolato diversamente nei neuroni mesolimbici e corticali in risposta sia alla somministrazione acuta di sostanze d'abuso sia durante prolungati periodi di astinenza da somministrazione prolungata. La somministrazione acuta di cocaina, amfetamina o alcol induce in maniera temporanea l'espressione del messaggero di BDNF in corteccia prefrontale, nella corteccia cingolata e/o nello striato da 45 minuti fino a 4 ore dopo (McGough et al., 2004) ((Kerns et al., 2005; Le Foll et al., 2005; Saylor and McGinty, 2008). Questa induzione acuta del messaggero di BDNF potrebbe rappresentare lo stadio iniziale della plasticità corticale che innesca successive alterazioni di vie di segnalazione intracellulari e di alterazione della neurotrasmissione. In seguito a somministrazione ripetuta di cocaina, amfetamina o alcol, l'espressione del messaggero e della proteina di BDNF sono aumentate in maniera temporanea in diverse strutture cerebrali (McGough et al., 2004; Meredith et al., 2002). Contrariamente, 22 ore, ma non 21 giorni, dopo la fine di un paradigma di autosomministrazione di cocaina, i livelli di messaggero di BDNF nella corteccia dorso mediale sono ridotti (McGinty et al., 2010). In aggiunta a ciò, una persistente risposta della proteina BDNF si sviluppa nelle strutture mesolimbiche e corticali e viene mantenuta per lunghi periodi durante l'astinenza dalla cocaina. In seguito ad autosomministrazione di cocaina, la proteina di BDNF è indotta nelle strutture mesolimbiche fra cui l'area ventrotegmentale, il nucleo accumbens e l'amigdala dopo lunghi periodi di astinenza (Grimm et al., 2003). La proteina di BDNF risulta indotta anche nella corteccia prefrontale 21 giorni dopo l'autosomministrazione di cocaina sia negli animali che hanno subito un 'challenge' o meno di cocaina 30 minuti prima del sacrificio (McGinty et al., 2010). E' noto che il BDNF viene trasportato nelle proiezioni corticali glutammatergiche dalla corteccia prefrontale al nucleo accumbens (Altar et al., 1997) e che questa via regola la ricaduta nella ricerca della sostanza (McFarland et al., 2003); l'espressione variabile di BDNF in questa rete in cui le strutture cerebrali sono reciprocamente interconnesse suggerisce che BDNF potrebbe costituire una componente critica della plasticità indotta da cocaina nei neuroni mesolimbici e corticali.

1.8.3 Modificazioni indotte da alterati livelli di BDNF nei comportamenti indotti dalle sostanze d'abuso

L'infusione di BDNF nel mesencefalo ventrale o nel nucleo accumbens incrementa l'attività motoria, il riassunzione di cocaina dopo periodi di astinenza prolungata, la sensitizzazione alla cocaina e la risposta condizionata a stimoli (Altar et al., 1992; Bahi et al., 2008; Horger et al., 1999; Lu et al., 2004). Questi dati suggeriscono che l'aumento dei livelli di BDNF è associato ad un aumento della neurotrasmissione dopaminergica, dell'attivazione motoria e dei comportamenti diretti ad un

obiettivo. In accordo con questa ipotesi, la microinfusione di anticorpo contro il BDNF o il recettore TrkB nel nucleo accumbens attenua l'aumento acuto indotto da METH nei livelli extracellulari di dopamina e l'attività motoria indotta dallo psicostimolante (Narita et al., 2003). L'aumento dell'espressione genica di BDNF indotta dall'alcol regola negativamente i comportamenti legati all'assunzione di alcol e il consumo di alcol (Janak et al., 2006). In accordo con questi dati, l'infusione di un oligonucleotide antisense per BDNF nell'amigdala centrale o mediale, ma non basolaterale, aumenta l'assunzione di alcol, prevenuta invece dalla co-infusione con BDNF (Pandey et al., 2006). Contrariamente a ciò, i topi eterozigoti per BDNF mostrano un aumento della 'conditioned-place preference' e un'incrementata sensitizzazione locomotoria all'alcol e mostrano un aumento prolungato del consumo di alcol dopo un periodo di astinenza (McGough et al., 2004). Similmente, l'iniezione acuta di amfetamina stimola maggiormente il comportamento locomotorio nei topi BDNF^{+/-} rispetto ai topi wild-type (Dluzen et al., 2001; Saylor and McGinty, 2008).

1.8.4 Specificità regionale degli effetti del BDNF esogeno sui comportamenti di ricerca della sostanza

L'infusione di BDNF in strutture subcorticali, come il nucleo accumbens e l'area ventrotegmentale, aumenta i comportamenti di ricerca di cocaina e oppioidi (Graham et al., 2007; Vargas-Perez et al., 2009). Invece, la somministrazione ripetuta dell'anticorpo di BDNF nel nucleo accumbens durante un trattamento cronico di autosomministrazione di cocaina attenua il comportamento di riassunzione indotto dalla cocaina (Graham et al., 2007). Nell'insieme, questi dati suggeriscono un'implicazione del BDNF nella modulazione a lungo termine dei comportamenti indotti dalla cocaina nella VTA e nel NAc, probabilmente interagendo con l'incrementata neurotrasmissione dopaminergica o con la trasduzione del segnale GABAergico nella VTA (Vargas-Perez et al., 2009). Queste evidenze e le alterazioni indotte dalla cocaina nell'espressione di BDNF osservate durante l'astinenza hanno indotto alcuni ricercatori a speculare che l'attività di BDNF promuove la vulnerabilità alla dipendenza da sostanze d'abuso e che gli approcci terapeutici che inibiscono il signaling di BDNF potrebbero diminuire la motivazione individuale alla ricerca della sostanza (Graham et al., 2007). Tuttavia questa conclusione è basata solo sull'alterata espressione di BDNF nelle regioni cerebrali subcorticali e non considera che gli effetti del BDNF sulla ricerca della sostanza sono regione-specifici. Ad esempio, in modelli di depressione il BDNF ha un profilo antidepressivo quando infuso nell'ippocampo e un profilo prodepressivo quando viene infuso nella VTA (Eisch et al., 2003; Shirayama et al., 2002). Similmente, in opposizione agli effetti a favore della ricerca di sostanza in seguito ad infusione subcorticale di BDNF, McGinty e collaboratori (McGinty et al., 2010) mostrano che l'infusione di BDNF nella corteccia prefrontale sopprime la ricerca della sostanza. In particolare, l'infusione di BDNF nella corteccia prefrontale

immediatamente dopo l'ultima sessione di autosomministrazione di cocaina attenua la ricaduta dopo un periodo di astinenza, come la riassunzione della sostanza indotta dall'ambiente o da un'iniezione 'challenge' di cocaina provoca la ricerca della cocaina anche dopo estinzione (Berglind et al., 2007). In questo paradigma i ratti si autosomministrano 0.6 mg/kg di cocaina 2 ore al giorno per 10 giorni. Immediatamente dopo l'ultima sessione di autosomministrazione, i ratti ricevono una singola infusione bilaterale di BDNF o veicolo nella corteccia prelimbica (0.75 µg/lato). I ratti che ricevono l'infusione di BDNF mostrano una significativa attenuazione della risposta nel test di estinzione. In aggiunta a ciò, l'infusione di BDNF nella corteccia prefrontale diminuisce la risposta nel test di estinzione e previene la riduzione della fosforilazione di ERK indotta dalla cocaina in nucleo accumbens, ma non in caudato putamen, dopo un giorno di astinenza, rivelando una regolazione trans-sinaptica dei neuroni dell'accumbens da parte dell'attività svolta dal BDNF in corteccia prefrontale (McGinty et al., 2010).

L'insieme di questi dati mostra il ruolo complesso di BDNF nei comportamenti di ricaduta nella ricerca della cocaina e suggerisce il BDNF come possibile bersaglio terapeutico nel trattamento della dipendenza da cocaina.

1.8.5 Modalità d'azione di BDNF e vie di trasduzione del segnale di TrkB

Il BDNF lega ed attiva, sia a livello presinaptico che postsinaptico, due tipi di recettori transmembrana differenti: quelli appartenenti alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici correlati alla tropomiosina chinasi (Trk) e un membro dei recettori della superfamiglia dei *Tumor Necrosis Factor* (TNF), il recettore p75^{NTR}. Questi recettori non mostrano tra loro nessuna omologia di sequenza, né nel dominio citoplasmatico, né in quello responsabile del legame con il ligando, e portano all'attivazione di vie di *signaling* differenti.

Il recettore TrkB presenta anche due forme tronche prive del dominio intracellulare tirosin-chinasico, che non possiedono quindi attività chinasi. La forma *full length* e le forme tronche del recettore tirosin-chinasico sono ottenute tramite *splicing* alternativo dello stesso messaggero e, mentre la prima è espressa soprattutto nei neuroni, le altre si trovano anche nella glia. Le varianti di *splicing* del recettore TrkB che mancano del dominio tirosin-chinasico hanno un ruolo di dominante negativo nel *signaling* di BDNF poiché formano eterodimeri con la forma *full length* di TrkB, e questi *clearance receptors* internalizzano il BDNF (Haapasalo et al., 2002).

Il recettore p75^{NTR} regola la crescita assonale, media il trasporto retrogrado della neurotrofina ed è importante nel promuovere l'eliminazione di neuroni in cui il segnale mediato da TrkB non è attivo. Il legame di BDNF a p75^{NTR} attiva diverse vie intracellulari, comprese la stimolazione di NF-κB, di Jun chinasi e di sfingomielinasi acida. La via mediata da NF-κB promuove la sopravvivenza, mentre le altre due vie mediano l'apoptosi. L'attivazione di TrkB ha importanti effetti sul segnale mediato

da p75^{NTR}, infatti l'attivazione del TrkB sopprime l'attivazione di Jun chinasi e l'idrolisi della sfingomielinina, mentre non influenza l'induzione di NF- κ B.

Esistono tre vie di trasduzione del segnale attivate dal legame del BDNF con TrkB (Fig.1.9): la via della fosfolipasi-C γ (PLC γ), della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) e quella delle chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK), membri della famiglia delle proteine chinasi attivate dai mitogeni (MAPK) (Segal, 2003). Il legame con BDNF provoca la dimerizzazione del recettore TrkB e l'autofosforilazione di residui specifici presenti sul dominio chinamico citoplasmatico. La transfosforilazione su Y785 recluta PLC γ e ciò porta ad un aumento del Ca²⁺ intracellulare e alla conseguente attivazione della chinasi dipendente da Ca²⁺-calmodulina (CaMKII). La CaMKII a sua volta attiva il fattore trascrizionale CREB che, oltre ad attivare la trascrizione di diversi geni, riconosce la sequenza CRE e l'elemento regolatore CaRE presenti sul gene di BDNF ed è in grado in questo modo di attivare la trascrizione della neurotrofina stessa (West et al., 2001). La transfosforilazione di TrkB su Y490, invece, determina il reclutamento di proteine adattatrici come Src, IRS1 e IRS2. Ciò porta all'attivazione delle vie di segnale mediate da PI3K e ERK. Src recluta la proteina Grb2 e il fattore di scambio dei nucleotidi guaninici, SOS, e avvia la cascata del segnale che coinvolge le chinasi Ras, Raf, MEK e ERK. Quest'ultimo, una volta fosforilato, trasloca nel nucleo e attiva una serie di fattori trascrizionali che regolano l'espressione genica. Grb2 può reclutare anche un'altra proteina di legame intermediaria, Gab1, per attivare PI3K e la chinasi a valle, Akt (conosciuta anche come protein-chinasi B). L'attivazione di questa via può avvenire anche mediante interazione diretta di PI3K con IRS1/IRS2 (Yamada et al., 1997).

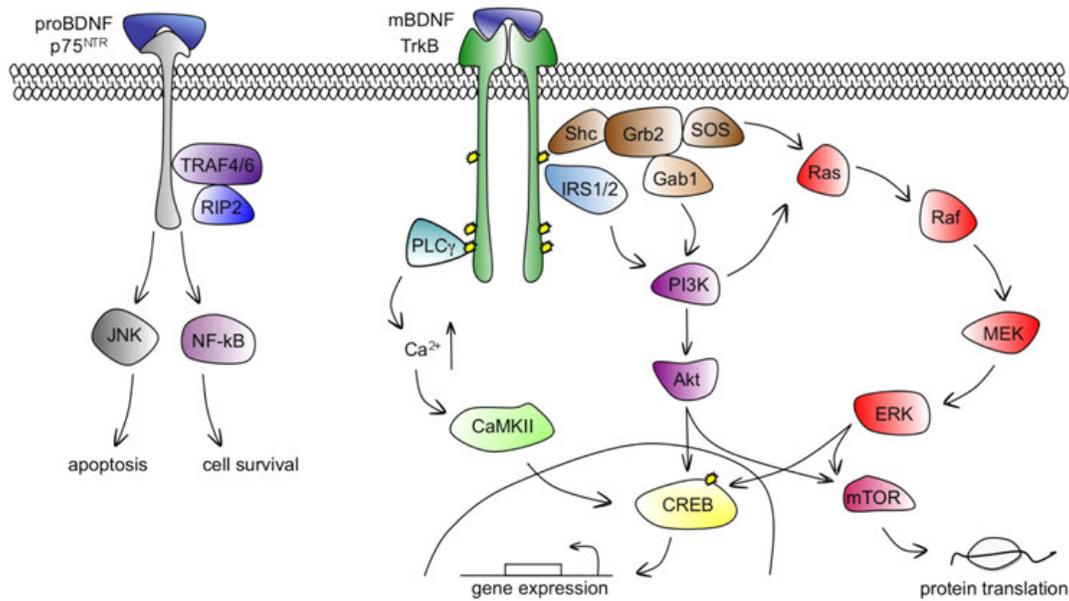


Fig. 1.9 Vie di 'signaling' intracellulare attivate dal legame di BDNF con p75^{NTR} e TrkB.

Queste tre vie di trasduzione del segnale non sono indipendenti, ma interagiscono tra loro a vari livelli, instaurando meccanismi di regolazione e di compensazione.

E' stato suggerito che il ruolo del BDNF nella dipendenza da cocaina è mediato, almeno in parte, dall'alterazione di queste vie di trasduzione del segnale. L'attivazione di queste cascate di segnalazione intracellulare è stata implicata nella risposta del sistema nervoso centrale alla somministrazione acuta o cronica di psicostimolanti e in alcuni casi è in grado di modificare i comportamenti legati all'assunzione di queste sostanze.

1.8.6 Cascata di segnalazione intracellulare delle MAPK/ERK

Le proteine ERKs appartengono alla famiglia delle *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), che rappresentano un nodo importante d'interazione di diverse cascate di segnale coinvolte nella regolazione di processi cellulari quali la modulazione dei canali del potassio, la funzionalità dei recettori del glutammato, la crescita e il differenziamento cellulare, ma anche l'apprendimento e la memoria, e il potenziamento a lungo termine (Molteni et al., 2009). Esistono varie isoforme di ERK, ma tra queste le meglio caratterizzate sono ERK1 ed ERK2, del peso molecolare di 44 e 42 kDa rispettivamente. L'attivazione di entrambe le isoforme di ERK richiede la loro dimerizzazione e la fosforilazione su due residui regolatori: Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ per ERK1 e Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵ per ERK2 (Khokhlatchev et al., 1998).

A livello neuronale queste proteine sono attivate attraverso fosforilazione da numerosi segnali extracellulari e, quindi, dalla stimolazione di diversi recettori cellulari, tra cui recettori accoppiati a proteine G (attraverso la PKA) e recettori con attività tirosin-chinasica intrinseca (attraverso l'attivazione delle *small G proteins*). Le due vie convergono attraverso la fosforilazione di una chinasi, MEK (*mitogen-activated protein kinase/ERK kinase*), che è responsabile della fosforilazione di ERK.

Una volta attivata, ERK può fosforilare altre proteine citosoliche o traslocare nel nucleo e fosforilare una serie di fattori trascrizionali (tra cui CREB e Elk-1) e controllare la trascrizione di molti geni attraverso le sequenze (tra cui il gene che codifica per c-Fos) (Adams and Bradley, 2002).

Molte sostanze d'abuso, in particolare cocaina e amfetamina, esercitano i loro effetti additivi aumentando la concentrazione extracellulare di dopamina a livello del NAc, determinando un'alterazione della trasmissione glutammatergica cortico-striatale (Di Chiara et al., 1999). Poiché l'attivazione di ERK dipende sia dalla stimolazione del recettore dopaminergico D₁ che dalla stimolazione del recettore NMDA, è lecito ipotizzare che questa proteina svolga un ruolo chiave nei meccanismi adattativi di plasticità sinaptica che si instaurano in risposta all'esposizione alle sostanze d'abuso (Valjent et al., 2005).

La stimolazione dei recettori dopaminergici D₁ e la conseguente attivazione della PKA possono indurre la fosforilazione di ERK attraverso due meccanismi indipendenti. Da un lato, dati di letteratura indicano che la fosforilazione di questa proteina potrebbe dipendere da Rap1 (appartenente alla famiglia delle *small Ras-related G protein*) e, quindi, dall'attivazione di B-Raf (Valjent et al., 2004; Vossler et al., 1997); dall'altro, l'attivazione della PKA conseguente alla stimolazione dei recettori D₁, induce la fosforilazione della subunità NR1 del recettore NMDA, determinando un incremento dei livelli citosolici di Ca⁺⁺ che può portare alla fosforilazione di ERK attraverso un meccanismo Ras/Raf indipendente (Sweatt, 2001).

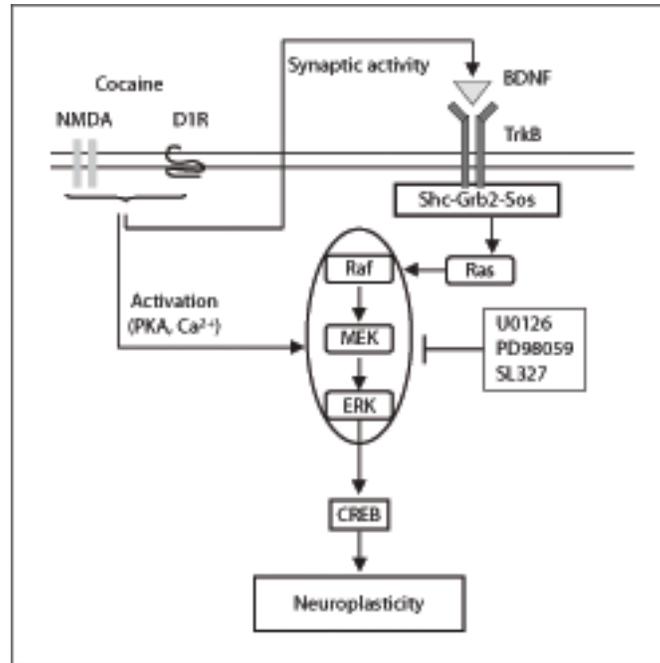


Fig. 1.10 Via di segnalazione intracellulare delle MAPK. La figura comprende una delle due vie di trasduzione del segnale controllate da BDNF e coinvolte nella dipendenza da cocaina e le sue interazioni con i sistemi intracellulari dopaminergico e glutammatergico. La via di segnalazione intracellulare del BDNF inizia con il legame del BDNF al recettore TrkB. Una volta attivato, il recettore TrkB si autofosforila in specifici residui di tirosina posti nel suo dominio intracellulare. Le tirosine fosforilate servono come sito di interazione per le proteine Shc (SH2-containing adapter protein) che portano all'inizio di reazioni di fosforilazione di proteine come Raf, MEK e MAPK/ERK. L'elemento responsivo all'AMP ciclico (CREB) è un importante mediatore a valle delle funzioni del BDNF che porta a cambiamenti neuronali e neuroplasticità. C'è un'interazione incrociata fra i meccanismi di segnalazione intracellulari mediati dal BDNF e la trasmissione dopaminergica e glutammatergica, probabilmente attraverso la protein chinasi A (PKA) e il calcio. U0126, PD98059 e SL327 sono inibitori della cascata di Ras/ERK.

Il trattamento acuto con d-amfetamina o cocaina attiva ERK nello striato dorsale e nel NAC mediante stimolazione dei recettori D₁ e NMDA (Valjent et al., 2005). Infatti, il pretrattamento con SCH-23390 (D₁-antagonista) o MK-801 (antagonista del recettore NMDA) blocca la fosforilazione di ERK. Studi recenti hanno mostrato che la somministrazione acuta di cocaina attiva ERK anche in altre regioni del circuito legato alla ricompensa, inclusa l'amigdala e la corteccia prefrontale (Valjent et al., 2004). In aggiunta a ciò, l'inibizione dell'attività di ERK altera le proprietà di ricompensa della somministrazione acuta di cocaina (Valjent et al., 2000).

La natura dell'induzione di ERK è rapida e transiente e sembra dipendere dall'attivazione di DARPP-32 (*dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of M_r 32,000*), una proteina che svolge un ruolo chiave in diverse vie di trasduzione del segnale (Svenningsson et al., 2004). In particolare, la fosforilazione di DARPP-32 a livello del residuo Thr-34 è condizione necessaria e sufficiente per

l'induzione di ERK in striato da parte della cocaina (Desdouits et al., 1995): infatti, una volta fosforilata, DARPP-32 inibisce PP-1 (*protein phosphatase-1*), enzima coinvolto in diversi stadi della cascata del segnale di ERK. Se, da una lato, l'inibizione di PP-1 è in grado di prevenire la defosforilazione di ERK da parte di STEP (*striatal-enriched tyrosine phosphatase*) mantenendo questa tirosin-fosfatasi nello stato fosforilato, inattivo, dall'altro lato l'inibizione di PP-1 contribuisce alla fosforilazione di ERK da parte di MEK (per dettagli fig. 1.11).

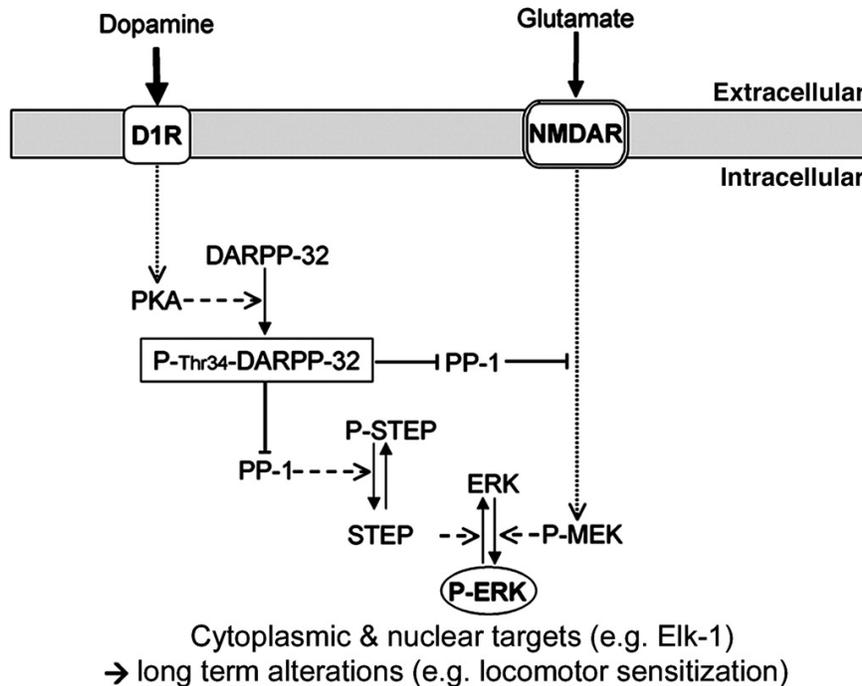


Fig. 1.11 Rappresentazione schematica del ruolo delle fosfatasi nella regolazione di ERK dopo attivazione dei recettori D₁ e NMDA da parte degli psicostimolanti (Valjent et al., 2005).

La regolazione del *pathway* di ERK da parte di DARPP-32 a livello del NAc (*shell*) è un elemento comune a diverse sostanze d'abuso, suggerendo che tale processo potrebbe svolgere un ruolo critico negli effetti a lungo termine indotti dalle droghe. Dati di letteratura indicano che il pretrattamento con SL-327, un inibitore selettivo di MEK, blocca le risposte locomotorie e gli effetti di ricompensa della cocaina. Lo stesso risultato è stato riscontrato attraverso l'impiego di topi DARPP-32 *knock-out* (Valjent et al., 2005). Questo suggerisce che il controllo esercitato dalla cascata di ERK sull'espressione genica in striato esercita un ruolo cruciale nelle risposte comportamentali alla cocaina, così come nei suoi effetti di rinforzo.

Invece, il trattamento cronico con cocaina porta all'attivazione di ERK nella VTA: l'inibizione di tale processo blocca la sensitizzazione comportamentale indotta dallo psicostimolante (Pierce et al.,

1999). L'incremento dell'attività di ERK in seguito a trattamento cronico con cocaina è dovuto ad un aumento del suo stato di fosforilazione ma non ad alterazioni nei suoi livelli totali. Numerose evidenze sperimentali dimostrano che l'infusione intra-VTA di BDNF può prevenire o annullare la capacità della morfina e della cocaina di indurre l'attivazione di ERK in quest'area cerebrale (Berhow et al., 1996). Questi dati suggeriscono che BDNF è in grado di indurre una risposta omeostatica nelle cellule della VTA in grado di prevenire l'incremento di ERK dopo somministrazione ripetuta di cocaina e di riportare i livelli di ERK a livello dei controlli. Questo supporta l'ipotesi che BDNF, ma non ERK, è in grado di agire come un fattore neuro protettivo attenuando gli effetti della cocaina cronica riducendo la capacità dei neuroni della VTA a rispondere alla somministrazione ripetuta alle sostanze d'abuso (Berhow et al., 1996).

L'infusione di neurotrofine attenua anche altri adattamenti biochimici indotti dalle sostanze d'abuso nel sistema mesolimbico dopaminergico. Questo suggerisce che alcuni degli effetti della cocaina e/o della morfina nel circuito VTA-NAc potrebbero essere mediati da una perturbazione della cascata del segnale delle neurotrofine: essa rappresenterebbe, così, un possibile punto di convergenza tra neurotrofine e sostanze d'abuso.

Il *pathway* di ERK potrebbe essere coinvolto negli effetti di ricompensa attraverso meccanismi differenti: il controllo di geni che codificano per fattori trascrizionali e la regolazione di geni associati all'attività dopaminergica neuronale dopo attivazione di recettori per le neurotrofine.

1.8.7 Cascata di segnalazione intracellulare della PI3K/AKT

La fosfatidil-inositolo-3 chinasi è una chinasi lipidica e un secondo messaggero per BDNF che gioca un ruolo cruciale nei meccanismi cellulari dell'LTP, essendo necessaria per l'espressione dell'LTP, ma non per la sua induzione e il mantenimento (Opazo et al., 2003). PI3K/Akt è una via di trasduzione del segnale comune per l'espressione di diverse forme di plasticità sinaptica come le modificazioni dinamiche delle spine dendritiche (Sanna et al., 2002) e gioca un ruolo importante nei meccanismi di apprendimento e memoria (Mizuno et al., 2003; Yamada and Nabeshima, 2003). Akt è un omologo delle protein-chinasi della famiglia di PKA e PKC. In seguito al legame BDNF-TrkB, il legame di proteine intermedie quali GAB1, IRS1 e IRS2 media il reclutamento di PI3K e l'associazione di questo con TrkB (Minichiello, 2009). L'attivazione di PI3K induce la sintesi dei fosfatidilinositoli trifosfato in membrana che reclutano Akt che viene successivamente attivato tramite fosforilazione sui residui di treonina 308 e serina 473 effettuata da una chinasi intracellulare, PDK1, e di rictor-mTORC2, proteina bersaglio del complesso 2 della rapamicina. Akt a sua volta fosforila i suoi substrati in membrana, nel citosol e nel nucleo. Uno dei substrati più studiati di Akt è GSK-3, costitutivamente attivato nelle cellule e che richiede la fosforilazione da parte di Akt per essere inattivato.

GSK-3 β è a sua volta mediatore di diverse vie, tra cui la cascata attivata da Wnt, che coinvolge una serie di proteine che hanno un ruolo importante nell'embriogenesi e nella vita adulta. Il risultato finale dell'attivazione di questa via è l'accumulo di β -catenina nel compartimento citosolico e la sua conseguente traslocazione nucleare.

Recentemente, alcune evidenze hanno suggerito l'implicazione della PI3K nei meccanismi alla base della dipendenza da cocaina. Ratti sensitizzati con cocaina, trattati il giorno della dose challenge di cocaina con LY294002, un inibitore della PI3K, non mostrano un aumento dell'attività locomotoria. Al contrario, quando i ratti vengono trattati con lo stesso inibitore durante la fase iniziale del paradigma di sensitizzazione cioè durante le somministrazioni ripetute di cocaina, gli animali mostrano un significativo aumento nell'attività locomotoria dopo l'iniezione challenge di cocaina. Questi dati suggeriscono che la PI3K è necessaria per l'espressione della sensitizzazione comportamentale alla cocaina ma non per l'induzione e il mantenimento del comportamento sensitizzato (Izzo et al., 2002). Questo è in contrasto con quanto osservato per la cascata di trasduzione del segnale di ERK che è coinvolta nell'induzione della sensitizzazione, ma non nella sua espressione (Pierce et al., 1999; Valjent et al., 2006), suggerendo che queste due vie di 'signaling' intracellulari possono giocare un ruolo complementare nella dipendenza da cocaina.

E' stato anche valutato il coinvolgimento di diverse strutture cerebrali nella sensitizzazione con cocaina dipendente dalla PI3K. In seguito a somministrazioni ripetute di cocaina, i ratti mostrano un incremento nell'attività locomotoria associato ad un aumento dell'attività p85a/p110 della PI3K nello shell del nucleo accumbens, misurata dopo 23 giorni di astinenza. La somministrazione di pergolide (un agonista D1/D2) e ondansetrone (un antagonista selettivo dei 5-HT3) dopo astinenza reverte la sensitizzazione comportamentale e normalizza l'aumento dell'attività di PI3K. Allo stesso tempo, è stata osservata una diminuzione e un aumento di PI3K nel core del nucleo accumbens e in corteccia prefrontale, rispettivamente. Tuttavia, in queste due regioni del cervello, l'attività della PI3K non viene normalizzata dal blocco della sensitizzazione da cocaina. Questi risultati suggeriscono che la PI3K nello shell del nucleo accumbens possa essere uno dei bersagli alla base della stabilizzazione e del mantenimento a lungo termine del comportamento di sensitizzazione (Zhang et al., 2006).

1.9 ACTIVITY-REGULATED CYTOSKELETAL ASSOCIATED PROTEIN (Arc) E ADDICTION

Arc, acronimo di *Activity-Regulated Cytoskeletal associated protein*, appartiene alla classe degli *Effector Immediate Early Genes*, e si differenzia dai geni precoci classici in quanto di per sé ha un ruolo effettore. I primi studi hanno dimostrato che Arc è un indice di attività neuronale in quanto svolge un ruolo importante nella plasticità sinaptica attività-dipendente. Più recentemente è stato anche dimostrato che Arc influenza direttamente l'omeostasi e le funzioni cellulari.

Arc è un gene a copia singola che codifica per una proteina molto conservata tra i vertebrati, localizzata nella cellula soprattutto a livello delle spine dendritiche. È importante nella regolazione della *long-term depression* attivata dai recettori glutammatergici metabotropici e dai recettori NMDA, in quanto la sua traduzione è indotta entro 5 minuti dall'attivazione di questi e porta a endocitosi dei recettori AMPA e quindi a depressione della trasmissione sinaptica eccitatoria. Arc gioca un ruolo cruciale anche nel consolidamento del potenziamento a lungo termine (*long-term potentiation*, LTP) e quindi nei fenomeni di plasticità sinaptica. Uno dei principali regolatori di questo processo è BDNF ed è stato osservato che la *long-term potentiation* dipendente da BDNF è associata con il trasporto a livello dendritico dell'mRNA di Arc (Bramham et al., 2008). Studi recenti suggeriscono un'associazione tra la formazione di actina filamentosa a livello delle spine dendritiche, Arc e la sintesi proteica durante i fenomeni di LTP, secondo questa sequenza di eventi: formazione di actina filamentosa a livello delle spine dendritiche, ancoraggio dell'mRNA all'actina filamentosa, sintesi di Arc e conseguente fosforilazione di cofilina, una proteina ubiquitaria fondamentale per l'organizzazione del citoscheletro (Bramham et al., 2010).

È stato suggerito che i meccanismi alla base dell'immagazzinamento della memoria vengono usurpati nel contesto della dipendenza da sostanze d'abuso e nei fenomeni di ricaduta. L'astinenza da oppiacei, ad esempio, porta all'emergere di un comportamento anomalo che può essere condizionato da uno specifico ambiente. La riattivazione dei meccanismi che controllano la memoria potrebbero condurre alla ricaduta in un comportamento di ricerca della sostanza in soggetti in astinenza da oppiacei. Studi recenti hanno mostrato un incremento nei livelli di espressione di Arc, nel nucleo basolaterale dell'amigdala, durante l'acquisizione della 'conditioned place aversion' e in seguito alla riesposizione di ratti ad un ambiente associato all'astinenza (Li et al., 2009; Lucas et al., 2008).

Il ruolo di Arc è stato studiato anche in modelli animali di alcolismo. L'effetto ansiolitico dell'esposizione acuta ad alcol è associata ad un incremento dei livelli d'espressione di BDNF e TrkB, della fosforilazione di ERK, dell'espressione di Arc e ad un incremento della densità delle spine dendritiche nell'amigdala centrale e mediale (ma non basolaterale) (Pandey et al., 2006). Al

contrario, questi effetti risultano diminuiti durante l'astinenza da etanolo associata ad un incremento del comportamento ansioso. L'infusione di BDNF nell'amigdala centrale normalizza l'espressione di Arc e protegge dall'ansia legata all'astinenza in ratti trattati con etanolo. In aggiunta a ciò, l'infusione intra-amigdala di Arc aumenta il comportamento ansioso in ratti solo se non trattati con etanolo.

L'insieme di questi dati suggerisce che Arc è un sistema dinamicamente modulato dalle sostanze d'abuso ed è coinvolto in una serie di interazioni tra geni diversi e meccanismi complessi attraverso cui queste sostanze provocano l'insorgenza di comportamenti anomali.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è stato investigare compiutamente il ruolo della neurotrofina BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) e del gene precoce Arc (Activity Regulated Cytoskeletal-associated protein) nel meccanismo d'azione dello psicostimolante cocaina. La cocaina è uno psicostimolante altamente abusato che, bloccando il trasportatore della dopamina, potenzia la trasmissione dopaminergica. L'abuso ripetuto di cocaina determina cambiamenti nell'espressione di proteine cruciali per una corretta omeostasi cellulare. Studi recenti hanno dimostrato l'esistenza di comorbidità fra abuso di cocaina e patologie psichiatriche come la depressione suggerendo che la alterazioni di alcune proteine o circuitazioni neuronali possano costituire una base comune degli effetti permanenti della cocaina e della eziologia di malattie psichiatriche.

La neurotrofina BDNF svolge un ruolo importante durante lo sviluppo cerebrale, esercita attività neuroprotettiva in diverse condizioni sperimentali di danno neuronale e, più recentemente, è stata studiata per il suo coinvolgimento nei fenomeni di plasticità sinaptica e per il suo ruolo nell'azione di diverse sostanze psicotrope come i farmaci antidepressivi e antipsicotici. Il gene precoce Arc è considerato un valido indice di attività neuronale e, più recentemente, è stato dimostrato un suo ruolo come mediatore di neuroplasticità.

Il ruolo del BDNF, e del gene precoce Arc, verrà quindi studiato attraverso diversi approcci sperimentali. Innanzitutto caratterizzando la dose-dipendenza della modulazione di BDNF ed Arc da parte della cocaina; quindi valutando la persistenza dei cambiamenti di espressione indotti dalla cocaina. Successivamente, analizzeremo l'effetto della somministrazione ripetuta dello psicostimolante investigando i livelli di espressione di BDNF e di Arc.

Considerando che l'abuso di sostanze come la cocaina presenta alcuni fattori di rischio come l'esposizione ad eventi avversi, nella seconda parte della presente tesi analizzeremo come l'esposizione ad uno stress prolungato possa influenzare l'espressione di BDNF ed Arc per valutare il ruolo di queste molecole nella vulnerabilità indotta dallo stress in relazione all'abuso di sostanze.

Quindi, al fine di approfondire ulteriormente le nostre conoscenze sul contributo di queste proteine nell'azione della cocaina, utilizzeremo un paradigma di auto somministrazione modificato, caratterizzato dalla possibilità di distinguere fra l'effetto farmacologico puro della sostanza e il desiderio di autosomministrarsi la stessa, il cosiddetto "yoked-control paradigm".

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

I reagenti generali sono stati ottenuti dalla Sigma (Milano, Italia), mentre quelli di biologia molecolare sono stati forniti dalla Celbio (Pero, Milano, Italia) e dalla Promega (Milano, Italia).

3.2 ANIMALI E PARADIGMI SPERIMENTALI

Ratti maschi adulti Sprague-Dawley del peso di 250-275 g (Charles River, Calco, Italia) sono stati sottoposti a diversi paradigmi sperimentali:

Somministrazione acuta

- *Dose-risposta*: gli animali (n=7-13/gruppo) hanno ricevuto per via intraperitoneale una singola iniezione di salina o cocaina (5, 10, 20 mg/kg) e sono stati sacrificati per decapitazione 2 ore dopo la fine del trattamento.
- *Profilo temporale*: i ratti (n=7-13/gruppo) sono stati trattati acutamente per via intraperitoneale con salina o con cocaina alla dose di 5 mg/kg. Gli animali sono stati sacrificati 0.5, 2, 6, 24 ore dopo la singola somministrazione.

Somministrazione ripetuta

- Gli animali (n=10/gruppo) sono stati sottoposti per cinque giorni consecutivi a un trattamento per via sottocutanea con salina o cocaina (5 mg/kg) e sono stati sacrificati 2 e 72 ore dopo la quinta somministrazione.

Stress cronico e somministrazione acuta

- I ratti (n=6/gruppo) sono stati sottoposti ad uno stress cronico della durata di 14 giorni (tabella 3.1) e immediatamente dopo l'ultima sessione di stress sono stati trattati acutamente con cocaina alla dose di 10 mg/kg. Lo psicostimolante (o la soluzione salina) è stato somministrato per via intraperitoneale e gli animali sono stati sacrificati dopo 2 ore dalla somministrazione dello psicostimolante.

Tabella 3.1: Protocollo stress cronico

	AM	PM
Giorno 1	Immobilizzazione, 1h	Immobilizzazione, 2h
Giorno 2	Immobilizzazione, 3h	
Giorno 3		Immobilizzazione, 3h
Giorno 4	Immobilizzazione, 2h	Nuoto Forzato, 5min
Giorno 5 ^a	Nuoto Forzato, 10min; Immobilizzazione, 1h ^b	Immobilizzazione, 1h; Nuoto Forzato, 10min ^b
Giorno 6	Nuoto Forzato, 5min	Immobilizzazione, 2h
Giorno 7	Immobilizzazione, 30min; Nuoto Forzato, 10min ^b	Nuoto Forzato, 10min
Giorno 8	Immobilizzazione, 1h	Immobilizzazione, 2h
Giorno 9	Immobilizzazione, 3h	
Giorno 10		Immobilizzazione, 10min; Nuoto Forzato, 10min ^b
Giorno 11	Immobilizzazione, 2h	Nuoto Forzato, 5min
Giorno 12 ^a	Nuoto Forzato, 10min; Immobilizzazione, 1h ^b	Immobilizzazione, 1h; Nuoto Forzato, 10min ^b
Giorno 13	Nuoto Forzato, 10min	Immobilizzazione, 2h
Giorno 14	Immobilizzazione, 30min	

a: luce accesa O/N

b: la seconda manipolazione è stata eseguita immediatamente dopo la prima

Temperatura acqua nuoto: 17°C

Ogni sessione di restraint è stata effettuata in presenza di luce intensa

Autosomministrazione

A una settimana dall'arrivo in stabulario gli animali sono stati anestetizzati con equitesina e gli è stato impiantato un catetere nella vena giugulare. Durante i primi cinque giorni successivi all'operazione i ratti hanno subito una iniezione al giorno di ampicillina sottocute alla dose di 45 mg/kg. I cateteri sono stati puliti giornalmente con infusione di una soluzione di eparina sterile 0,1 in salina 0,9%. Una settimana dopo l'operazione sono stati condotti gli esperimenti di autosomministrazione durante la fase buia del ciclo luce/buio nelle apposite gabbie di self-administration (Med associates Ltd, USA) ventilate e insonorizzate. Gli stimoli luminosi e le pompe

di infusione sono controllate da un computer con un software MED che monitora anche gli input delle leve presenti all'interno delle gabbie.

Tre animali vengono messi singolarmente nelle tre gabbie di autosomministrazione e la sessione inizia con l'introduzione delle due leve e con l'illuminazione della gabbia. Uno dei tre ratti può autosomministrarsi la cocaina premendo la leva attiva (ratto attivo, cocaine self-administration, SA), ad ogni pressione della leva attiva riceve un'infusione endovenosa della durata di 6 secondi di 0.25 mg/ 0.1 ml di cocaina attraverso una pompa di infusione che si trova al di sopra della gabbia collegata tramite un tubicino alla cannula esterna del catetere. La pressione della leva attiva è seguita dalla retenzione di entrambe le leve, dallo spegnersi della luce della gabbia e dall'illuminazione dello stimolo luminoso al di sopra della leva attiva, tutte queste variazioni ambientali durano 20 secondi. Le successive pressioni della leva attiva da parte del ratto attivo portano alla stessa sequenza di eventi. La pressione dell'altra leva, quella inattiva, non provoca conseguenze. Gli altri due animali, posizionati singolarmente in altre due gabbie, ricevono un'infusione della stessa dose di cocaina, per quanto riguarda il ratto passivo (yoked-cocaine, YC), o salina, per quanto riguarda il veicolo (yoked-vehicle, YV), accompagnata dalla retenzione delle leve e dall'illuminazione dello stimolo luminoso ogni volta che il ratto attivo preme la leva attiva. Solo i ratti che si sono autosomministrati 10 o più infusioni sono stati inseriti nelle analisi di espressione genica e proteica.

- *Autosomministrazione acuta:* i ratti (n=7 per gruppo) hanno subito una singola sessione di autosomministrazione della durata di 2 ore e sono stati sacrificati immediatamente dopo la fine della sessione.
- *Autosomministrazione ripetuta:* i ratti (n=7 per gruppo) hanno subito una volta al giorno per 14 giorni l'autosomministrazione (ogni sessione durava 2 ore) e sono stati sacrificati a tre tempi diversi: immediatamente dopo, 24 ore dopo e 7 giorni dopo la fine della quattordicesima sessione.

Gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione e le aree cerebrali d'interesse (striato, corteccia prefrontale, corteccia frontale, ippocampo, nucleo accumbens, ipotalamo e mesencefalo) sono state prelevate rapidamente, congelate su ghiaccio secco e conservate a -80°C fino alle successive analisi biochimiche.

Le procedure sperimentali seguite sono in pieno accordo con le linee guida della Comunità Europea (86/109, 1987) e con la legislazione italiana (Decreto L.vo 116/92) in materia di sperimentazione animale.

3.3 PREPARAZIONE DELL'RNA TOTALE

I tessuti cerebrali sono stati omogeneizzati in un unico passaggio in PureZol (Bio-Rad Laboratories S.r.l. Italia), contenente guanidina isotiocianato e fenolo. L'RNA totale, estratto con cloroformio e successivamente risospeso in acqua trattata con dietilpirocarbonato, è stato valutato mediante spettrofotometria misurando la sua assorbanza a 260nm (regione dello spettro elettromagnetico in cui gli acidi nucleici presentano il massimo assorbimento). Per valutare la contaminazione da proteine è stata misurata l'assorbanza dei campioni anche a 280 nm controllando che l'indice di purezza dell'RNA, dato dal rapporto A260/A280, si mantenesse superiore a 1.8.

I campioni sono stati conservati a -80°C fino alle successive analisi.

3.4 SINTESI DELLE SONDE RADIOATTIVE

Le sonde radioattive di RNA complementari agli mRNA che codificano per BDNF, Arc, TrkB, Zif268, FGF-2 e β -actina di ratto sono state preparate mediante trascrizione *in vitro* utilizzando appropriate RNA polimerasi in presenza di ^{32}P -CTP. I DNA templati sono stati ottenuti riarrangiando le sequenze dei plasmidi contenenti i cDNA d'interesse.

BDNF

Il plasmide pSK-rB(C1) (Dr. Yancopoulos) contenente la regione codificante, comune a tutti i trascritti (Altar et al., 2007), del cDNA di BDNF di ratto, è stato linearizzato con XMaI per ottenere il template da cui generare, con la RNA polimerasi T7, un cRNA di 800 basi di cui 740 del frammento protetto e 60 del polilinker.

Arc

Il plasmide contenente una porzione del cDNA di Arc di ratto (Dr. Worley) è stato linearizzato con NdeI per ottenere il template da cui generare un cRNA di 630 basi di cui 620 del frammento protetto e 10 del polilinker, con la RNA polimerasi T7.

TrkB

Il plasmide pSK-rTRKB (A1) (Dr. Yancopoulos) contenente una porzione del cDNA di TrkB di ratto, è stato linearizzato con Hinc II per ottenere il template da cui generare, con la RNA polimerasi T7, due frammenti protetti: un frammento da 244 basi, specifico per la forma tronca, e un frammento da 366 basi specifico per la forma full length.

Zif268

Il plasmide pJDM33 contenente una porzione del cDNA di Zif268 di ratto (Dr. Millbrandt) è stato linearizzato con NcoI per ottenere il template da cui generare, con la RNA polimerasi T7, un cRNA di 312 bp di cui 198 del frammento protetto e 114 del polilinker.

FGF-2

Il plasmide RobFGF103 contenente una porzione del cDNA di FGF-2 di ratto è stato linearizzato con NcoI per ottenere il template da cui generare, con la RNA polimerasi T7, un cRNA di 524 bp di cui 477 del frammento protetto e 47 del polilinker.

β-actina

Una sonda codificante per la β-actina è stata utilizzata come standard interno in quanto l'espressione di questo gene non è modificata da alcun trattamento farmacologico. Utilizzando la RNA polimerasi T3, dal plasmide pTRI-β-actin-rat (Ambion) è stato ottenuto un cRNA di 164 basi di cui 126 del frammento protetto e 38 del polilinker.

3.5 RNase PROTECTION ASSAY (RPA)

L'RPA è una metodica estremamente sensibile che consente di quantizzare i livelli di RNA messaggero codificanti per una determinata proteina in una miscela di RNA totale. Rispetto alla tecnica di *Northern Blotting*, metodo semi-quantitativo tradizionalmente usato per la determinazione di RNA messaggero, l'RPA assicura sensibilità e specificità più elevate e rende possibile la quantizzazione contemporanea di più mRNA nello stesso campione biologico.

L'*RNase protection assay* si realizza attraverso i seguenti passaggi:

- Mediante trascrizione in vitro si sintetizza una sonda marcata con ³²P di RNA complementare (antisense) all'mRNA d'interesse.
- Le aliquote di RNA totale (10 µg), precipitate dalla fase etanolica per centrifugazione ed essiccate mediante *speed-vacuum*, sono state risospese in 20 µl di miscela di ibridizzazione (80% formammide, 40 mM PIPES pH 6.4, 400 mM sodio acetato pH 6.4, 1 mM EDTA) contenente a seconda dell'esperimento: 150000 cpm della sonda radioattiva per BDNF, 150000 cpm della sonda radioattiva per Arc, 150000 cpm della sonda radioattiva per TrkB, 150000 cpm della sonda radioattiva per Zif268, 150000 cpm della sonda radioattiva per FGF-2 e 50000 cpm della sonda radioattiva per β-actina. I campioni sono stati denaturati a 85°C per 10 minuti e lasciati ibridizzare per una notte a 45°C.
- Al termine del processo di ibridizzazione, ogni campione è stato diluito in 200 µL di tampone di digestione (300 mM NaCl, 10 mM Tris·HCl pH 7.4, 5mM EDTA pH 7.5) contenente una miscela di RNasi 1:400 rispetto alla soluzione stock (1 µg/µL RNasi A e 20 U/µL RNasi T1) e incubato a 30°C per 30 minuti. Le ribonucleasi idrolizzano l'RNA a singolo filamento costituito dall'RNA totale non riconosciuto dalla sonda e dalla porzione della sonda non complementare all'mRNA da quantizzare, in quanto derivante dal polilinker plasmidico.

- Dopo l'aggiunta di 10 µg di proteinasi K e 20µL di una soluzione al 10% di sodiododecilsolfato (SDS), i campioni sono stati ulteriormente incubati a 37°C per 15 minuti.
- Al termine dell'incubazione, gli ibridi ³²P-cRNA-RNA in esame sono stati estratti dalla miscela mediante passaggi successivi con SEVAC (fenolo-tris, cloroformio, alcool isoamilico) e cloroformio e precipitati con etanolo 100% mantenendoli in ghiaccio secco per almeno un'ora.
- Dopo precipitazione dalla fase etanolica, ogni pellet è stato essiccato mediante passaggio in *speed-vacuum*, risospeso nel tampone di caricamento (80% formammide, 0.1% xilene cianolo, 0.1% blu di bromofenolo e 2 mM EDTA), denaturato a 95°C per 5 minuti e separato attraverso elettroforesi su gel al 5% di poliacrilammide in condizioni denaturanti (7 M urea). Al termine della corsa (3 ore a 75-80 W), il gel è stato essiccato e i frammenti protetti sono stati evidenziati mediante esposizione autoradiografica.

3.6 QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI DI mRNA

I livelli di mRNA per BDNF, Arc, TrkB, Zif268, FGF-2 e β-actina sono stati calcolati misurando l'intensità delle bande con un programma di analisi d'immagine (*Quantity One*, Biorad). Affinché le intensità delle bande autoradiografiche rientrassero in un *range* di linearità, sono state utilizzate lastre con tempi di esposizione differenti. I valori così ottenuti sono stati normalizzati rapportandoli a quelli relativi allo standard interno (β-actina), la cui espressione non è modificata da alcun trattamento farmacologico.

3.7 ESTRAZIONE DI PROTEINE DA TESSUTO

Per l'estrazione delle proteine, i tessuti sono stati omogeneizzati mediante l'utilizzo di un Potter vetro-vetro in un opportuno tampone contenente 0.32 M saccarosio, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Hepes, 0.1 mM EGTA pH 7.4, 1X Complete, 1X cocktail di inibitori fosfatasi. L'omogeneizzazione è stata condotta mantenendo i campioni in ghiaccio e l'omogenato è stato centrifugato a 4°C per 10 minuti a 1.000 g; il pellet P1, arricchito in componenti nucleari, è stato risospeso in una soluzione contenente 20 mM Hepes, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EGTA, 1X Complete, 1X cocktail di inibitori fosfatasi, mentre il surnatante S1 è stato centrifugato per 15 minuti a 9.000 g, ottenendo le frazioni arricchite in componenti citosolici e di membrana, che corrispondono al surnatante S2 e al pellet P2, rispettivamente. Il pellet P2 è stato poi risospeso nello stesso tampone utilizzato per la risospensione del pellet P1.

Tutte le frazioni ottenute sono state conservate a -20°C e scongelate al momento dell'analisi. Il materiale proteico estratto dai tessuti omogeneizzati è stato successivamente quantizzato

utilizzando il metodo colorimetrico del Bradford (Biorad), in riferimento alla curva di calibrazione standard.

3.8 WESTERN BLOT

I campioni contenenti una quantità nota di proteine sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel denaturante di acrilammide. Sia la quantità di proteina che la percentuale del gel è stata scelta sulla base dell'abbondanza e del peso molecolare delle proteine di interesse, rispettivamente. Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Biorad, Milano) o su PVDF (solo nel caso dell'analisi di BDNF) utilizzando un apparecchio per transblot ad un amperaggio costante di 30 mA overnight a 4°C in tampone di trasferimento (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 20 %, pH 8.3). Per saturare i siti aspecifici, le membrane sono state mantenute in blocking buffer (TBS pH 7.5 contenente 0,1% Tween-20 e 5-10% proteine del latte). Dopo un lavaggio in TBS-T (0,1% Tween in TBS), le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario, che riconosce in modo specifico la proteina d'interesse. Sono riportate in tabella 3.2 le condizioni in cui ciascun anticorpo è stato impiegato. Dopo tre lavaggi in TBS-T, è stata effettuata un'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario anti IgG coniugato ad una perossidasi di rafano (Sigma). Gli immuno-complessi sono stati infine visualizzati mediante chemiluminescenza (ECL -Amersham Life Science). Per effettuare il riconoscimento di diverse proteine sulla stessa membrana, questa è stata sottoposta ad agitazione per 20 minuti in 20 ml di stripping buffer (2% SDS, 62.5 mM pH 6.7 e 10 mM β -mercaptoetanololo) a 50°C, in modo da rimuovere gli anticorpi utilizzati precedentemente. La membrana è stata incubata in blocking buffer ed è stata effettuato un riconoscimento con un nuovo anticorpo primario.

Tabella 3.2 Condizioni degli anticorpi utilizzati

proteina	blocking	Ab primario	Ab secondario
<i>BDNF</i>	Latte 10% 2h RT	1:500 Latte 5% O/N 4°C (Santa Cruz)	Anti-rabbit IgG-HRP 1:1000 Latte 5% 1h
<i>trkB fl</i>	Latte 10% 1h RT	1:750 Latte 5% O/N 4°C (Santa Cruz)	Anti-rabbit IgG-HRP 1:5000 Latte 5% 1h
<i>pERK1/2</i>	Latte 10% 1h RT	1:1000 Latte 1% 2h RT (Santa Cruz)	Anti-mouse IgG-HRP 1:5000 Latte 1% 1h
<i>ERK1/2</i>	Latte 10% 1h RT	1:5000 Latte 1% 2h, RT (Santa Cruz)	Anti-rabbit IgG-HRP 1:5000 Latte 1% 1h
<i>pAKT (Ser 473)</i>	Latte 10% 1h RT	1:1000 Latte 5% O/N 4°C (Cell Signaling Technology)	Anti-rabbit IgG-HRP 1:2000 Latte 5% 1h
<i>AKT</i>	Latte 10% 1h RT	1:1000 Latte 10% 2h, RT (Cell Signaling Technology)	Anti-rabbit IgG-HRP 1:10000 Latte 3%
<i>pPLCγ (Tyr 783)</i>	Latte 10% 1h RT	1:1000 Latte 3% O/N 4°C (Cell Signaling Technology)	Anti-rabbit IgG-HRP 1:1000 Latte 3% 1h
<i>PLCγ</i>	Latte 10% 1h RT	1:1000 Latte 5% O/N 4°C (Cell Signaling Technology)	Anti-mouse IgG-HRP 1:1000 Latte 5% 1h
<i>ARC</i>	Latte 10% 1h RT	1:4000 Latte 3% O/N 4°C (Dr. Worley)	Anti-rabbit IgG-HRP 1:10000 Latte 3% 1h
<i>β-ACTINA</i>	Latte 10% 1h RT	1:10000 Latte 3% 1h RT (Sigma)	Anti-mouse IgG-HRP 1:10000 Latte 3% 1h

3.9 ANALISI DELLE LASTRE

I livelli di proteina sono stati calcolati misurando con un programma di analisi d'immagine (Quantity One, Biorad) l'intensità delle bande delle lastre autoradiografiche ottenute dalla tecnica del Western blotting. Affinché le intensità delle bande rientrassero in un range di linearità, sono state utilizzate lastre con tempi di esposizione differenti. I valori così ottenuti sono stati normalizzati rapportandoli a quelli relativi allo standard interno β -actina, una proteina strutturale la cui espressione non viene modificata dal paradigma sperimentale adottato. Per chiarezza grafica, i dati sono stati espressi come percentuale rispetto agli animali trattati solamente con salina (100%).

3.10 ANALISI STATISTICA DEI DATI

I cambiamenti nei livelli di espressione di RNA messaggero e di proteina sono stati stimati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) a una via o a due vie in base al paradigma sperimentale analizzato. I post-hoc utilizzati per valutare la significatività delle variazioni osservate nell'anova a una via sono il test di Dunnett, a partire da $p < 0.05$. Con l'analisi della varianza a due vie è possibile confrontare i due gruppi di animali trattati con cocaina con quelli trattati con veicolo, per valutare l'effetto del trattamento, e paragonare i due gruppi sperimentali esposti allo stress con quelli sham (effetto dello stress). Quando appropriato, le ulteriori differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante *Single Contrast Post-Hoc Test* (SCPHT).

In tutte le analisi, le variazioni osservate sono state considerate statisticamente significative a partire da $p < 0.05$.

Per chiarezza grafica, i dati sono stati espressi come percentuale rispetto agli animali controllo (valore posto a 100%) e rappresentano il valore medio \pm errore standard (SEM) di 7-13 determinazioni indipendenti.

4. RISULTATI

Il primo obiettivo di questa tesi è stato valutare il contributo della neurotrofina BDNF nel meccanismo d'azione della cocaina e stabilire se eventuali alterazioni nel profilo d'espressione genica di questo fattore neurotrofico possano contribuire ai meccanismi adattativi indotti dall'assunzione cronica di questa sostanza d'abuso. In parallelo abbiamo analizzato l'espressione di Arc, un gene precoce regolato dall'attività neuronale e da stimoli che modulano la neuroplasticità, in quanto studi di letteratura hanno mostrato una cooperazione fra BDNF e Arc nella modulazione di meccanismi adattativi (Bramham et al., 2010). Inoltre sulla base di dati preclinici e clinici, che identificano lo stress come un evento precipitante l'abuso di cocaina (Piazza and Le Moal, 1998), abbiamo esaminato se un paradigma di stress cronico potesse essere in grado di alterare l'espressione di BDNF e delle vie di 'signaling' controllate da questa neurotrofina in seguito a somministrazione acuta di cocaina. Dopo aver analizzato l'effetto della cocaina in seguito a somministrazione da parte dell'operatore, abbiamo deciso di investigare la regolazione di BDNF ed Arc in risposta ad autosomministrazione acuta o cronica di cocaina in un particolare paradigma sperimentale, denominato 'yoked self-administration model', che permette di discriminare fra gli effetti determinati dalla volontarietà di assunzione della sostanza dagli effetti farmacologici della stessa.

4.1 EFFETTO DEL TRATTAMENTO ACUTO CON COCAINA SULL'ESPRESSIONE DI BDNF E ARC: DOSE-RISPOSTA E PROFILO TEMPORALE

Al fine di valutare il ruolo della neurotrofina BDNF e del gene precoce Arc nell'azione della cocaina, abbiamo inizialmente sottoposto gli animali ad una somministrazione acuta con diverse dosi di cocaina (5, 10, 20 mg/kg) e sacrificato gli animali 2 ore dopo la singola iniezione. Come mostrato in figura 4.1a, la somministrazione acuta dello psicostimolante aumenta l'espressione corticale di BDNF. In corteccia prefrontale, l'incremento dell'espressione genica della neurotrofina risulta statisticamente significativa già alla dose più bassa dello psicostimolante, effetto che si osserva indipendentemente dalla dose analizzata (5 mg/kg: +97%, $p < 0.01$; 10 mg/kg: +70%, $p < 0.01$; 20 mg/kg: +80%, $p < 0.01$), mentre in corteccia frontale un incremento significativo dei livelli di BDNF si osserva alla dose di 10 mg/kg (+48%, $p < 0.05$) e alla dose di 20 mg/kg (+70%; $p < 0.01$) ma non

alla dose di 5 mg/kg (+21%, non significativo). Nelle stesse condizioni sperimentali non si osservano variazioni significative nell'ippocampo.

L'analisi dell'espressione di Arc ha rivelato uno specifico pattern di induzione in tutte le aree esaminate (fig. 4.1b). Infatti, in striato, la cocaina aumenta i livelli di messaggero di Arc in modo dose-dipendente (5 mg/kg: +231%, $p < 0.01$; 10 mg/kg: +311%, $p < 0.01$; 20 mg/kg: +435%, $p < 0.001$). L'espressione genica di Arc è aumentata anche in corteccia prefrontale in modo simile alle dosi di 5 mg/kg e 10 mg/kg (+304%, $p < 0.001$; +271%, $p < 0.001$, rispettivamente), mentre alla dose più alta di 20 mg/kg l'incremento dei livelli di Arc è molto più marcato (+894%, $p < 0.001$). In ippocampo, l'aumento dell'espressione genica di Arc è meno marcato rispetto alle altre aree analizzate (5 mg/kg: +21%, non significativo; 10 mg/kg: +51%, $p < 0.01$; 20 mg/kg: +64%, $p < 0.01$).

Dopo aver esaminato le variazioni nell'espressione genica di BDNF e Arc prodotte da diverse dosi di cocaina, abbiamo analizzato il profilo temporale del trattamento acuto focalizzando la nostra attenzione sulla corteccia prefrontale che già alla dose minima di cocaina mostrava un aumento della espressione di BDNF. Gli animali sono stati sacrificati a tempi differenti (30 min, 2h, 6h e 24h) dopo una singola iniezione di cocaina (5 mg/kg).

Questo esperimento ha evidenziato un rapido e stabile incremento dei livelli di messaggero di BDNF in corteccia prefrontale; come mostrato in figura 4.2a l'espressione della neurotrofina risulta aumentata già 30 minuti dopo l'iniezione di cocaina (+71%, $p < 0.01$), effetto che persiste a tutti i tempi da noi analizzati (2h: +97%, $p < 0.01$; 6h: +129%, $p < 0.01$; 24h: +56%, $p < 0.05$). Tale aumento nei livelli di messaggero è accompagnato da un aumento dei livelli della forma matura della proteina BDNF 24 ore dopo il trattamento (+37%, $p < 0.01$), mentre non si osservano variazioni significative né nei livelli di precursore né nei livelli di forma matura 2 ore dopo l'iniezione acuta (fig. 4.2b). In ippocampo, in accordo con l'esperimento precedente, non abbiamo riscontrato variazioni significative nei livelli di BDNF a nessuno dei tempi analizzati (dati non mostrati).

L'analisi del profilo temporale di Arc rivela un profilo di induzione differente a seconda della regione presa in considerazione. In striato, l'espressione di Arc aumenta già 30 minuti dopo la singola iniezione (+163%, $p < 0.05$), ha un picco di induzione 2 ore dopo (+231%, $p < 0.01$) quindi diminuisce 6 ore dopo (+29%, non significativo) e torna ai livelli basali a 24 ore dal trattamento (fig. 4.3). Invece, in corteccia prefrontale, si osserva un significativo aumento dei livelli di messaggero di Arc soltanto 2 ore dopo l'iniezione intraperitoneale di cocaina (+56%, $p < 0.01$). Tale

effetto si normalizza più rapidamente: infatti l'espressione di Arc ritorna a livelli basali già 6 ore dopo l'iniezione (fig. 4.3). In ippocampo, la cocaina induce un andamento bifasico dei livelli di espressione genica di Arc che risultano aumentati 30 minuti e 24 ore dopo la somministrazione dello psicostimolante (30 min: +59%, $p < 0.05$; 24h: +49%, $p < 0.05$), mentre 2 e 6 ore dopo l'iniezione dello psicostimolante i livelli di messaggero di Arc non sono significativamente diversi dai controlli (fig. 4.3).

4.2 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI BDNF E ARC DOPO TRATTAMENTO PROLUNGATO CON COCAINA

Dopo aver valutato gli effetti acuti della cocaina, probabilmente dovuti alla rapida alterazione di sistemi neurotrasmettitoriali, abbiamo valutato gli effetti di un trattamento prolungato con lo psicostimolante, che potrebbe determinare cambiamenti nell'espressione di BDNF e Arc presumibilmente interpretabili come risposta adattativa alla somministrazione ripetuta. Gli animali sono stati quindi trattati per 5 giorni, una volta al giorno con 5 mg/kg di cocaina e sono stati sacrificati a tempi differenti (2 h e 72 h) dall'ultima iniezione.

Inizialmente abbiamo confrontato la modulazione della neurotrofina BDNF in risposta ad una singola iniezione di cocaina rispetto al trattamento subcronico sacrificando gli animali due ore dopo la fine del trattamento. Come si può osservare in figura 4.4 il trattamento con cocaina aumenta i livelli di messaggero di BDNF in corteccia prefrontale ($F_{3,39}=32.3$, $p= 0.0001$, ANOVA due vie); l'ANOVA a due vie indica anche un effetto significativo della durata del trattamento ($F_{3,39}=7.3$, $p= 0.01$, ANOVA due vie) e un'interazione somministrazione di cocaina x durata del trattamento significativa ($F_{3,39}=4.4$, $p= 0.043$, ANOVA due vie). L'espressione della neurotrofina è incrementata sia dalla singola iniezione ($F_{1,20}=13.8$, $p= 0.001$, ANOVA due vie con SCPHT) che in seguito alle cinque iniezioni ($F_{1,20}=19.7$, $p= 0.0002$, ANOVA due vie con SCPHT). Inoltre l'aumento di BDNF in seguito a trattamento subcronico è significativamente maggiore rispetto all'aumento osservato dopo il trattamento acuto ($F_{1,20}=9.7$, $p= 0.01$, ANOVA due vie con SCPHT).

Sulla base di dati di letteratura che dimostrano che il fattore di trascrizione CREB è il principale regolatore della trascrizione di BDNF (Nestler, 2001), abbiamo deciso di analizzare i suoi livelli di fosforilazione e di espressione nel nostro paradigma sperimentale per verificare se la modulazione del messaggero di BDNF che abbiamo osservato in corteccia prefrontale è controllata o meno da questo fattore trascrizionale. La fosforilazione di CREB viene modificata dalla somministrazione con

cocaina ($F_{3,39}=16$, $p= 0.001$, ANOVA due vie) e dalla durata del trattamento ($F_{3,39}=18.7$, $p= 0.0003$, ANOVA due vie) ed anche l'interazione trattamento x durata del trattamento è risultata statisticamente significativa ($F_{3,39}=18.7$, $p= 0.0003$, ANOVA due vie). Esaminando separatamente gli effetti dei due trattamenti, come mostra la figura 3.5, la singola somministrazione non modifica i livelli di fosforilazione di CREB ($F_{1,20}=0.062$, $p= 2.415$, ANOVA due vie con SCPHT), mentre le cinque iniezioni causano un aumento nei livelli di fosfo-CREB ($F_{1,20}=29.34$, $p= 0.0001$, ANOVA due vie con SCPHT) che risulta significativamente maggiore in confronto ai livelli di fosfo-CREB osservati negli animali trattati acutamente con lo psicostimolante ($F_{1,20}=33.8$, $p= 0.0003$, ANOVA due vie con SCPHT) (fig. 4.5). Dal momento che, in seguito ad una somministrazione acuta, CREB potrebbe essere attivato più rapidamente abbiamo misurato i livelli di fosforilazione del fattore di trascrizione 30 minuti dopo la singola iniezione ma non abbiamo osservato variazioni significative (dati non mostrati). I livelli d'espressione di CREB vengono modulati in maniera simile a quanto appena osservato per i livelli di fosforilazione: l'ANOVA a due vie indica un effetto significativo della somministrazione di cocaina ($F_{3,39}=8.2$, $p= 0.008$, ANOVA due vie), della durata del trattamento ($F_{3,39}=34.2$, $p= 0.0004$, ANOVA due vie) e dell'interazione trattamento x durata ($F_{3,39}=34.3$, $p= 0.0004$, ANOVA due vie). Anche per quanto riguarda i livelli di espressione di CREB, la somministrazione acuta non provoca variazioni ($F_{1,20}=5.02$, $p= 0.1$, ANOVA due vie con SCPHT), mentre il trattamento ripetuto ne aumenta i livelli ($F_{1,20}=34.4$, $p= 0.0001$, ANOVA due vie con SCPHT); l'espressione di CREB nel gruppo degli animali trattati ripetutamente è maggiore rispetto a quella osservata nel gruppo degli animali trattati acutamente ($F_{1,20}=65.7$, $p= 0.00001$, ANOVA due vie con SCPHT) (fig. 4.5).

Al fine di approfondire l'analisi della modulazione di BDNF in seguito ad un trattamento prolungato abbiamo esaminato i livelli di messaggero e di proteina 2 e 72 ore dopo l'ultima di cinque somministrazioni. Due ore dopo l'ultima di cinque iniezioni di cocaina si osserva un marcato incremento nei livelli di messaggero di BDNF (+208%, $p<0.01$), effetto che risulta attenuato 72 ore dopo la fine del trattamento (+60%, $p=0.07$) (fig. 4.6a). Tuttavia, in concomitanza con l'aumento dei livelli di messaggero, sia la forma precursore che la forma matura della neurotrofina sono ridotte nella frazione citoplasmatica della corteccia prefrontale sia 2 che 72 ore dopo l'ultima di cinque iniezioni (fig. 4.6b).

Sulla base dei risultati ottenuti in corteccia prefrontale, abbiamo deciso di analizzare i livelli proteici di BDNF anche in striato, dove, a fronte di una scarsa espressione di messaggero di BDNF basale, la proteina viene trasportata grazie ad un meccanismo di trasporto anterogrado dalla corteccia

(Altar et al., 1997; Conner et al., 1997). Nella frazione citosolica dello striato abbiamo osservato un incremento nella forma precursore del BDNF sia due che settantadue ore dopo la fine del trattamento ripetuto (rispettivamente +59%, $p < 0.01$ e +73%, $p < 0.01$), mentre non sono state evidenziate variazioni significative della forma matura (fig. 4.7).

L'analisi dell'espressione di Arc dopo trattamento ripetuto ha rivelato una diversa modulazione rispetto al trattamento acuto. In striato, le cinque iniezioni consecutive di cocaina aumentano l'espressione di Arc ad entrambi i tempi analizzati (2h: +222%, $p < 0.05$; 72h: +230%, $p < 0.05$), indicando che l'aumento dei livelli di mRNA di Arc a livello striatale potrebbe rappresentare un cambiamento stabile indotto dallo psicostimolante (fig. 4.8a). In corteccia prefrontale, invece, non si osservano variazioni significative a nessuno dei due tempi analizzati (fig. 4.8a). L'analisi dei livelli proteici di Arc in striato mostra un incremento 2 ore dopo l'ultima iniezione, aumento che torna ai livelli basali 72 ore dalla fine del trattamento (fig. 4.8b).

4.3 MODULAZIONE DELLA NEUROTROFINA BDNF IN ANIMALI SOTTOPOSTI A STRESS RIPETUTO E INIEZIONE ACUTA DI COCAINA

Numerosi dati preclinici e clinici hanno evidenziato che lo stress è un evento precipitante l'abuso di cocaina (Piazza and Le Moal, 1998), in quanto è in grado di alterare circuiti simili a quelli modulati dalle sostanze d'abuso fornendo supporto alla teoria della sensitizzazione crociata. Sulla base di diverse evidenze sperimentali che individuano i fattori neurotrofici quali regolatori della plasticità sinaptica, è lecito ipotizzare che tali fattori possano contribuire alle modificazioni causate dalla somministrazione di sostanze d'abuso e dall'esposizione allo stress (Nestler, 2001). Fra tutti questi fattori, il brain derived neurotrophic factor (BDNF) sembra svolgere un ruolo fondamentale nelle funzionalità neuronali durante lo sviluppo e l'età adulta, nella neuroprotezione, nei processi cognitivi e nella risposta comportamentale e molecolare a farmaci psicoattivi.

Al fine di valutare se lo stress influenza l'espressione di BDNF in seguito all'iniezione acuta di cocaina, abbiamo sottoposto i ratti ad un paradigma di stress ripetuto, principalmente composto da sessioni di immobilizzazione e di nuoto forzato alternati in maniera non prevedibile dall'animale, della durata di 14 giorni. Immediatamente dopo l'ultima sessione di stress gli animali sono stati trattati acutamente con cocaina alla dose di 10 mg/kg e sono stati sacrificati due ore dopo l'iniezione. In particolare, ci siamo focalizzati sullo studio della corteccia prefrontale, un'area particolarmente implicata nello sviluppo delle proprietà additive della cocaina e dei processi

cognitivi alterati negli individui che abusano della sostanza, e dell'ippocampo, la regione cerebrale con la maggiore espressione di recettori dei glucocorticoidi che mediano la risposta allo stress.

4.3.1 Analisi dei livelli di mRNA di BDNF

In corteccia prefrontale si osserva un effetto significativo dello stress ripetuto ($F_{3,21}=17.64$, $p=0.0006$, ANOVA due vie) e solo un effetto marginale del trattamento con cocaina ($F_{3,21}=3.95$, $p=0.063$, ANOVA due vie), mentre la risposta all'iniezione di cocaina è diversa se gli animali sono stati precedentemente stressati o meno (interazione stress x cocaina, $F_{3,21}=9.29$, $p=0.007$, ANOVA due vie) (fig. 4.9). La cocaina causa un incremento statisticamente significativo dei livelli di espressione di BDNF nel gruppo degli animali non stressati ($F_{1,11}=13.26$, $p=0.004$, ANOVA due vie con SCPHT), mentre lo stress cronico è in grado di abolire tale aumento ($F_{1,10}=0.54$, $p=0.95$, ANOVA due vie con SCPHT). Non abbiamo riscontrato variazioni significative a carico dei livelli di espressione genica della neurotrofina in ippocampo (fig. 4.9).

4.3.2 Analisi dei livelli di messaggero e di proteina di TrkB

È noto che la neurotrofina BDNF determina i propri effetti molecolari attraverso l'interazione con il proprio recettore ad alta affinità TrkB. L'analisi dei livelli d'espressione di quest'ultimo in corteccia prefrontale mostra un andamento simile a quello del BDNF. Abbiamo osservato un effetto significativo dello stress ripetuto ($F_{3,24}=14.28$, $p=0.001$, ANOVA due vie), nessun effetto del trattamento con cocaina ($F_{3,24}=0.30$, $p=0.592$, ANOVA due vie) e un'interazione significativa dello stress ripetuto con l'iniezione acuta di psicostimolante ($F_{3,24}=7.40$, $p=0.013$, ANOVA due vie). Similmente agli effetti osservati a carico dell'espressione di BDNF, la cocaina produce un aumento dei livelli di espressione del recettore TrkB negli animali non stressati ($F_{1,14}=6.32$, $p=0.04$, ANOVA due vie con SCPHT), ma non negli animali sottoposti a stress ripetuto ($F_{1,10}=2.05$, $p=0.34$, ANOVA due vie con SCPHT) (fig. 4.10a). In ippocampo, invece, non si riscontrano variazioni significative nei livelli di espressione del recettore di membrana TrkB (fig. 4.10a).

Abbiamo, quindi, analizzato in corteccia prefrontale il 'trafficking' del recettore in membrana confrontando i suoi livelli proteici in omogenato totale e nella frazione sinaptosomiale grezza. Mentre non si osservano variazioni significative in omogenato totale in queste condizioni sperimentali, l'ANOVA a due vie indica un'interazione significativa stress ripetuto x trattamento acuto nella frazione di membrana ($F_{1,19}=6.62$, $p=0.02$, ANOVA due vie). La cocaina provoca un aumento dell'espressione proteica di TrkB nel gruppo dei ratti non stressati ($F_{1,10}=9.86$, $p=0.01$, ANOVA due vie con SCPHT), effetto che non si osserva più nel gruppo degli animali stressati trattati con cocaina ($F_{1,9}=0.33$, $p=0.57$, ANOVA due vie con SCPHT) (fig. 4.10b). L'aumento dei livelli totali di TrkB nella frazione di membrana della corteccia prefrontale dei ratti non stressati

trattati con cocaina, che non si osserva in omogenato, suggerisce una traslocazione in membrana del recettore. Siccome questa traslocazione può essere considerata un indice di rilascio di BDNF e tale effetto è abolito nei ratti stressati, è possibile ipotizzare che lo stress ripetuto riduca non solo l'espressione di BDNF ma anche il rilascio della neurotrofina.

4.3.3 Analisi dei livelli di messaggero di Arc

Al fine di escludere che tali cambiamenti negli animali stressati potessero essere dovuti ad una diminuzione della responsività cellulare allo stress ripetuto, abbiamo misurato l'espressione genica di Arc, un noto marker dell'attività neuronale. I suoi livelli di espressione risultano significativamente aumentati in seguito al trattamento con cocaina ($F_{3,25}=22.60$, $p= 0.000001$, ANOVA due vie) e all'esposizione a stress ripetuto ($F_{3,25}=45.28$, $p= 0.0001$, ANOVA due vie). La mancanza di un'interazione significativa stress x cocaina ($F_{3,25}=0.79$, $p= 0.39$, ANOVA due vie) (fig. 4.11) suggerisce che Arc viene regolato dalla cocaina in maniera indipendente dallo stress e che la responsività cellulare è intatta anche negli animali sottoposti a stress ripetuto.

4.3.4 Modulazione delle vie di trasduzione del segnale attivate da BDNF

Al fine di approfondire se gli effetti promossi dalla cocaina sul "signaling" intracellulare controllato da BDNF siano influenzati dallo stress, abbiamo analizzato le vie principalmente attivate dalla neurotrofina. Abbiamo valutato in corteccia prefrontale, quindi, i livelli di fosforilazione e di espressione delle principali proteine appartenenti alle vie di trasduzione in grado di propagare il segnale mediato da BDNF: le MAPK ERK1/2, AKT e PLC γ . Per quanto riguarda i livelli di fosforilazione di ERK1, l'ANOVA a due vie indica un effetto significativo del trattamento con cocaina ($F_{3,24}=4.83$, $p= 0.04$, ANOVA due vie), nessun effetto dello stress cronico ($F_{3,24}=1.93$, $p= 0.18$, ANOVA due vie) e un'interazione significativa cocaina x stress ($F_{3,24}=9.47$, $p= 0.006$, ANOVA due vie). L'analisi della fosforilazione di ERK2 (pERK2) mostra un andamento identico a quello di pERK1; infatti l'ANOVA a due vie indica un effetto significativo del trattamento con cocaina ($F_{3,25}=5.11$, $p= 0.035$, ANOVA due vie), nessun effetto dello stress ($F_{3,25}=0.76$, $p= 0.39$, ANOVA due vie) e un'interazione significativa stress x cocaina ($F_{3,25}=0.39$, $p= 0.031$, ANOVA due vie). Come mostrato in figura 4.12 si osserva un massiccio aumento di fosforilazione di ERK1/2 in seguito a trattamento con cocaina nella frazione di membrana nel gruppo dei ratti non stressati (pERK1: $F_{1,12}=13.91$, $p= 0.002$; pERK2: $F_{1,13}=10.85$, $p= 0.006$, ANOVA due vie con SCPHT), aumento che non si osserva nel gruppo dei ratti stressati cronicamente e poi trattati con cocaina (pERK1: $F_{1,12}=1.43$, $p= 0.49$; pERK2: $F_{1,13}=0.001$, $p= 1.95$, ANOVA due vie con SCPHT). Non si osservano variazioni significative a carico dell'espressione proteica totale delle stesse (fig 4.12a). Di contro, non abbiamo riscontrato nessuna variazione né per quanto riguarda i livelli di

fosforilazione né per quanto riguarda i livelli di espressione di PLC γ e AKT (fig. 4.12b, 4.12c). La via di 'signaling' intracellulare di ERK 1/2 sembra quindi essere la via attraverso la quale l'azione combinata di stress e cocaina trasduce un alterato segnale che potrebbe portare, a seconda della localizzazione pre- o post-sinaptica di queste chinasi, ad un'alterata plasticità, a problemi di apprendimento e ad un modificato rilascio di neurotrasmettitore.

4.4 MODULAZIONE DI BDNF E ARC IN SEGUITO ALL'ASSUNZIONE ATTIVA O PASSIVA DI COCAINA

I dati mostrati finora suggeriscono che l'esposizione acuta o ripetuta a cocaina causa cambiamenti a lungo termine nell'espressione di molecole coinvolte nei meccanismi di plasticità in diverse strutture cerebrali che mediano i comportamenti di assunzione della sostanza e della ricerca compulsiva della stessa. L'instaurarsi di questi meccanismi potrebbe contribuire allo svilupparsi del fenomeno dell'*addiction*, un disturbo cronico caratterizzato dalla ricerca compulsiva della sostanza d'abuso e dalla perdita di controllo dell'individuo che non è in grado di porre fine a tale comportamento (Kalivas and O'Brien, 2008; Koob, 2008). La dipendenza da sostanze d'abuso può quindi essere considerato un fenomeno dinamico che, in seguito alla ripetuta assunzione di una determinata sostanza d'abuso, può determinare processi neuroplastici anomali in specifici circuiti cerebrali che normalmente mediano funzioni fisiologiche quali l'apprendimento di stimoli naturali (cibo, sesso), usurpando quindi tali circuiti dalle proprie normali funzioni.

Tutti i dati ottenuti nei nostri studi, presentati nei paragrafi precedenti, sono l'esito di una somministrazione forzata della sostanza da parte dell'operatore nell'animale da laboratorio. Tuttavia nel campo dello studio delle sostanze d'abuso questa non può essere considerata una situazione fisiologica in quanto nella realtà l'individuo sceglie volontariamente di assumere la sostanza per ricercare il piacere che la sostanza è in grado di fornire. Sulla base di queste osservazioni abbiamo deciso di utilizzare un approccio diverso per lo studio degli effetti della cocaina: l'autosomministrazione. Gli animali da laboratorio, dai primati fino ai mammiferi filogeneticamente meno evoluti come i roditori, se messi in condizioni opportune, sono disposti ad apprendere e ad attuare comportamenti anche complessi che non necessariamente fanno parte del loro "corredo genetico" (come per esempio premere una leva di una gabbia per il condizionamento operante) per assumere le stesse sostanze psicoattive di cui l'uomo abusa. Nei nostri esperimenti abbiamo, quindi, utilizzato un nuovo approccio, differente dalla classica autosomministrazione, consistente nella cosiddetta 'yoked self-administration'. Questo paradigma sperimentale consiste di tre diversi gruppi sperimentali; in particolare vi è il ratto cosiddetto 'attivo' che, all'interno della

gabbia di autosomministrazione, preme la leva per ottenere la cocaina, cioè emette un atto operante per raggiungere uno scopo; nella gabbia a fianco, collegata alla gabbia dell'animale attivo, vi è un animale definito 'passivo', il quale riceverà un'iniezione di cocaina alla stessa dose e nello stesso momento in cui il ratto attivo la riceve ma senza aver premuto la leva, cioè senza emettere un atto operante e quindi passivamente; collegata alla gabbia dell'animale attivo vi è anche una gabbia in cui un terzo ratto riceverà un'iniezione di salina e che fungerà da ratto controllo. Questo approccio è utile per confrontare gli effetti della somministrazione attiva (cioè volontaria) e passiva (cioè involontaria) di cocaina e può essere usato per studiare il rapido orientamento di comportamenti mirati ad un obiettivo e i cambiamenti neurochimici prodotti dal comportamento di ricerca attivo della sostanza in opposizione ad altri fenomeni provocati dalla sostanza stessa, quali memoria, tolleranza o sensitizzazione (Jacobs et al., 2003).

Un primo gruppo di animali è stato sottoposto ad una singola sessione di autosomministrazione di cocaina della durata di due ore, immediatamente dopo la fine delle due ore gli animali sono stati sacrificati. Abbiamo effettuato poi degli esperimenti di autosomministrazione ripetuta, in cui gli animali sono stati sottoposti per due ore una volta al giorno per 14 giorni all'autosomministrazione e sono stati sacrificati a diversi tempi: immediatamente dopo e 24 ore dopo l'ultima sessione.

4.4.1 Analisi del comportamento durante l'autosomministrazione acuta

La figura 4.13 mostra il numero medio di pressioni della leva attiva e inattiva effettuate dai tre gruppi di ratti durante la singola sessione di autosomministrazione. L'ANOVA a due vie indica una differenza significativa nella scelta fra la leva attiva o inattiva ($F_{1,36}=3.3$, $p<0.05$, ANOVA a due vie), nella pressione della leva fra i gruppi ($F_{2,36}=1.6$, $p<0.05$, ANOVA a due vie) e nell'interazione ($F_{2,36}=4.1$, $p<0.05$, ANOVA a due vie). Il gruppo degli animali attivi preme la leva attiva un numero di volte statisticamente maggiore rispetto agli animali passivi e agli animali veicolo. La differenza fra il numero di pressioni della leva attiva rispetto alla leva inattiva è significativo solo per gli animali attivi (fig. 4.13). Questi dati suggeriscono che è sufficiente una singola esposizione alla cocaina nella gabbia di autosomministrazione per acquisire un comportamento orientato a raggiungere l'obiettivo di autosomministrarsi la sostanza.

In figura 4.14 si può osservare lo schema di infusione del gruppo degli animali attivi durante le due ore di autosomministrazione. La media \pm SEM del numero di infusioni è 15.7 ± 5.1 (con un numero individuale di infusioni che va da 10 a 22) corrispondente a una media \pm SEM di assunzione di cocaina di 3.9 ± 1.3 mg (con un'assunzione individuale di sostanza che va da 2.5 a 5.5 mg). La frequenza della pressione della leva attiva in presenza di cocaina associata alla pressione è sostenuta durante tutto l'arco della sessione.

4.4.2 Analisi dei livelli di messaggero di BDNF e Arc in seguito ad autosomministrazione acuta

Sulla base degli effetti comportamentali osservati negli animali sottoposti al paradigma 'yoked control-operant' abbiamo deciso di analizzare i livelli di espressione di alcune delle molecole di plasticità che avevamo trovato modificate nei nostri esperimenti precedenti al fine di valutare se queste variazioni potessero dipendere dalla volontarietà di assunzione della sostanza o dall'effetto farmacologico della stessa.

In corteccia prefrontale il comportamento di ricerca della sostanza del gruppo degli animali attivi è accompagnato da un aumento selettivo del gene precoce Arc solo negli animali che si autosomministrano cocaina ($F_{2,18}=5.9$, $p<0.05$, ANOVA ad una via; $p<0.05$ vs. ratti passivi e ratti veicolo, test di Dunnett) (Fig. 4.15a). In questa area l'espressione degli altri geni analizzati (i fattori di crescita BDNF ed FGF-2 e il gene precoce Zif268) non è modificata in queste condizioni sperimentali (Fig. 4.15b, c, d).

In striato, area caratterizzata da un'elevata densità di terminali dopaminergici, la situazione che si osserva è diversa, in quanto l'espressione dei geni precoci Arc e zif268 è risultata aumentata sia nei ratti attivi che in quelli passivi (Arc: $F_{2,18}=6.1$, $p<0.05$, Zif268: $F_{2,18}=7.9$, $p<0.05$, ANOVA ad una via; $p<0.05$ vs. ratti veicolo, test di Dunnett), in maniera quindi indipendente dalla volontà di autosomministrarsi la sostanza (fig. 4.16a, b). Questo aumento, che non è in grado di discriminare i due gruppi, evidenzia quindi l'effetto farmacologico della sostanza stessa. Non si osservano variazioni significative nei livelli di espressione di FGF-2, in accordo con dati di letteratura (Altar et al., 1997) (fig. 4.16c), mentre i livelli di messaggero di BDNF in striato risultano troppo bassi per essere analizzati.

Al fine di verificare la specificità delle variazioni osservate nella via corticostriatale, abbiamo ampliato la nostra analisi anche ad altre aree cerebrali. Come riportato in tabella 4.1 l'espressione di Zif268 in nucleo accumbens è aumentata sia nel gruppo degli animali attivi che nel gruppo degli animali passivi ($F_{2,18}=8.9$, $p<0.05$, ANOVA ad una via; $p<0.05$ vs. ratti veicolo, test di Dunnett). Non si osservano variazioni significative in ippocampo, ipotalamo, corteccia frontale e cervelletto in nessuno dei geni analizzati.

Tabella 4.1. Effetti di una singola sessione di autosomministrazione di cocaina sui livelli di messaggero di Arc, zif268, BDNF ed FGF-2 in diverse regioni cerebrali.

Regione cerebrale	Controlli	Passivi	Attivi	ANOVA una via
<u>Arc</u>				
Nucleus accumbens	100.2 ± 10.8	117.0 ± 16.7	145.3 ± 15.4	F(2,17)=2.5, NS
Ipotalamo	100.0 ± 4.5	111.2 ± 16.3	106.2 ± 5.5	F(2,16)=0.3, NS
Ippocampo	100.0 ± 19.3	103.8 ± 35.4	95.5 ± 15.6	F(2,15)=0.03, NS
Corteccia frontale	99.8 ± 8.5	112.3 ± 10.2	117.4 ± 7.3	F(2,15)=0.9, NS
Mesencefalo	100.2 ± 10.6	113.5 ± 4.1	99.2 ± 8.6	F(2,16)=1.0, NS
<u>Zif 268</u>				
Nucleus accumbens	100.0 ± 7.5	153.0 ± 12.2*	143.7 ± 8.0*	F(2,17)=8.9, p<0.05
Ipotalamo	99.7 ± 8.0	109.2 ± 12.6	96.3 ± 3.7	F(2,16)=0.6, NS
Ippocampo	99.8 ± 10.2	87.5 ± 8.4	96.6 ± 7.2	F(2,17)=0.9, NS
Corteccia frontale	100.0 ± 8.5	87.5 ± 8.4	96.6 ± 7.2	F(2,15)=0.6, NS
Striato	100.0 ± 17.0	191.5 ± 23.6*	200.8 ± 18.3*	F(2,18)=7.9, p<0.05
<u>BDNF</u>				
Ipotalamo	100.0 ± 6.0	97.0 ± 6.7	92.7 ± 3.2	F(2,14)=0.6, NS
Ippocampo	100.0 ± 13.4	81.3 ± 14.2	106.3 ± 11.7	F(2,16)=1.0, NS
Corteccia frontale	100.0 ± 11.0	106.8 ± 8.3	100.8 ± 5.8	F(2,16)=0.2, NS
Mesencefalo	100.2 ± 6.3	114. ± 5.6	106.4 ± 6.2	F(2,16)=1.4, NS
<u>FGF-2</u>				
Nucleus accumbens	100.0 ± 9.5	105.8 ± 13.9	111.2 ± 14.2	F(2,17)=0.2, NS
Ipotalamo	100.0 ± 2.4	109.6 ± 4.5	101.7 ± 4.4	F(2,16)=1.7, NS
Ippocampo	100.2 ± 8.5	108.3 ± 6.2	111.0 ± 4.3	F(2,17)=0.7, NS
Corteccia frontale	100.0 ± 7.1	102.7 ± 9.0	96.4 ± 4.7	F(2,16)=0.2, NS
Mesencefalo	100.0 ± 4.0	103.5 ± 8.8	94.4 ± 10.1	F(2,16)=0.3, NS
Striato	100.0 ± 5.2	113.5 ± 5.7	103.0 ± 8.8	F(2,18)=6.1, NS

I risultati, espressi come percentuale rispetto ai ratti veicolo, sono la media ± SEM di 7 ratti.

*p<0.05 verso il gruppo dei controlli, ANOVA ad una via seguita dal test di Dunnett.

NS = non significativo

4.4.3 Analisi del comportamento durante l'autosomministrazione cronica

Il passo successivo è stato quello di analizzare gli effetti di una esposizione ripetuta (14 giorni, 2 ore al giorno) alla gabbia di autosomministrazione, sacrificando gli animali immediatamente e 24 ore dopo l'ultima esposizione.

L'analisi del comportamento dei tre gruppi di animali durante l'ultima sessione di autosomministrazione rispecchia quello osservato durante l'esperimento acuto sia per quanto riguarda il gruppo di animali che verranno sacrificati immediatamente dopo la fine del trattamento sia nel gruppo di animali che verranno sacrificati 24 ore dopo (fig. 4.17). Il numero medio di pressioni della leva attiva e inattiva effettuate dai tre gruppi di ratti è significativamente diverso nella scelta fra la leva attiva o inattiva (sacrificio immediato: $F_{1,36}=3.5$, $p<0.05$; sacrificio 24 ore: $F_{1,36}=2.9$, $p<0.05$ ANOVA a due vie), nella pressione della leva fra i gruppi (sacrificio immediato: $F_{1,36}=1.4$, $p<0.05$; sacrificio 24 ore: $F_{1,36}=1.8$, $p<0.05$ ANOVA a due vie) e nell'interazione (sacrificio immediato: $F_{1,36}=4.5$, $p<0.05$; sacrificio 24 ore: $F_{1,36}=4.1$, $p<0.05$ ANOVA a due vie). Il gruppo degli animali attivi preme la leva attiva un numero di volte statisticamente maggiore rispetto agli animali passivi e agli animali veicolo sia nel gruppo degli animali sacrificati immediatamente dopo quest'ultima sessione (fig. 4.17a) sia nel gruppo degli animali sacrificati 24 ore dopo (fig. 4.17b). La differenza fra il numero di pressioni della leva attiva rispetto alla leva inattiva è significativo solo per gli animali attivi anche in questo caso in entrambi gli esperimenti (fig. 4.17a, b).

4.4.4 Analisi dei livelli di proteina di BDNF in seguito ad autosomministrazione ripetuta in corteccia prefrontale e nucleo accumbens

Negli esperimenti in cui i ratti si sono autosomministrati cocaina per 14 giorni abbiamo analizzato l'espressione proteica di BDNF. L'analisi dei livelli proteici di BDNF nell'omogenato totale, nella frazione arricchita di membrane e nella frazione citosolica della corteccia prefrontale degli animali sacrificati immediatamente dopo l'ultima sessione dell'esperimento cronico non ha rilevato nessuna modificazione, sia nei livelli del precursore che della forma matura (fig. 4.18a, b, c).

Di contro, quando sono state analizzate le cortecce prefrontali degli animali sacrificati dopo 24 ore dall'ultima esposizione a cocaina, si è osservato in omogenato totale una tendenza all'aumento di espressione della forma matura di BDNF in entrambi i gruppi sperimentali ($F_{2,21}=2.9$, $p=0.08$, ANOVA ad una via), aumento che raggiunge la significatività statistica nella frazione sinaptosomiale grezza ($F_{2,21}=9.6$, $p<0.01$, ANOVA ad una via; $p<0.01$ vs. ratti veicolo, test di Dunnet) e nella frazione citosolica ($F_{2,21}=11.55$, $p<0.001$, ANOVA ad una via; $p<0.001$ ratti attivi vs. ratti veicolo, $p<0.001$ ratti passivi vs. ratti veicolo, test di Dunnet).

L'analisi dei livelli di espressione della proteina BDNF in nucleo accumbens, area appartenente ai circuiti che controllano la motivazione e la ricompensa e che riceve terminazioni glutammatergiche dalla corteccia prefrontale, mostra una risposta diversa della neurotrofina all'autosomministrazione

di cocaina rispetto a quella osservata in corteccia prefrontale. Nell'omogenato totale del nucleo accumbens degli animali sacrificati immediatamente dopo l'ultima sessione dell'esperimento prolungato, si osserva un incremento nei livelli della forma matura del BDNF sia nel gruppo degli animali attivi sia nel gruppo degli animali passivi ($F_{2,21}=18.19$, $p<0.001$, ANOVA ad una via; $p<0.05$ ratti attivi vs. ratti veicolo, $p<0.01$ ratti passivi vs. ratti veicolo test di Dunnet), anche se l'effetto è maggiore nel gruppo degli animali passivi rispetto agli animali attivi ($p<0.01$ ratti attivi vs. ratti passivi, test di Dunnet). Nella frazione sinaptosomiale grezza, invece, l'incremento della forma matura della neurotrofina è presente solo nel gruppo degli animali passivi ($F_{2,21}=18.19$, $p<0.01$, ANOVA ad una via; $p<0.01$ vs. ratti veicolo, test di Dunnet). Nel citosol, invece, non si osservano variazioni significative.

L'espressione del precursore e della forma matura del BDNF non risultano variare in nessuna delle frazioni analizzate nel nucleo accumbens degli animali sacrificati 24 ore dopo l'ultima sessione di autosomministrazione.

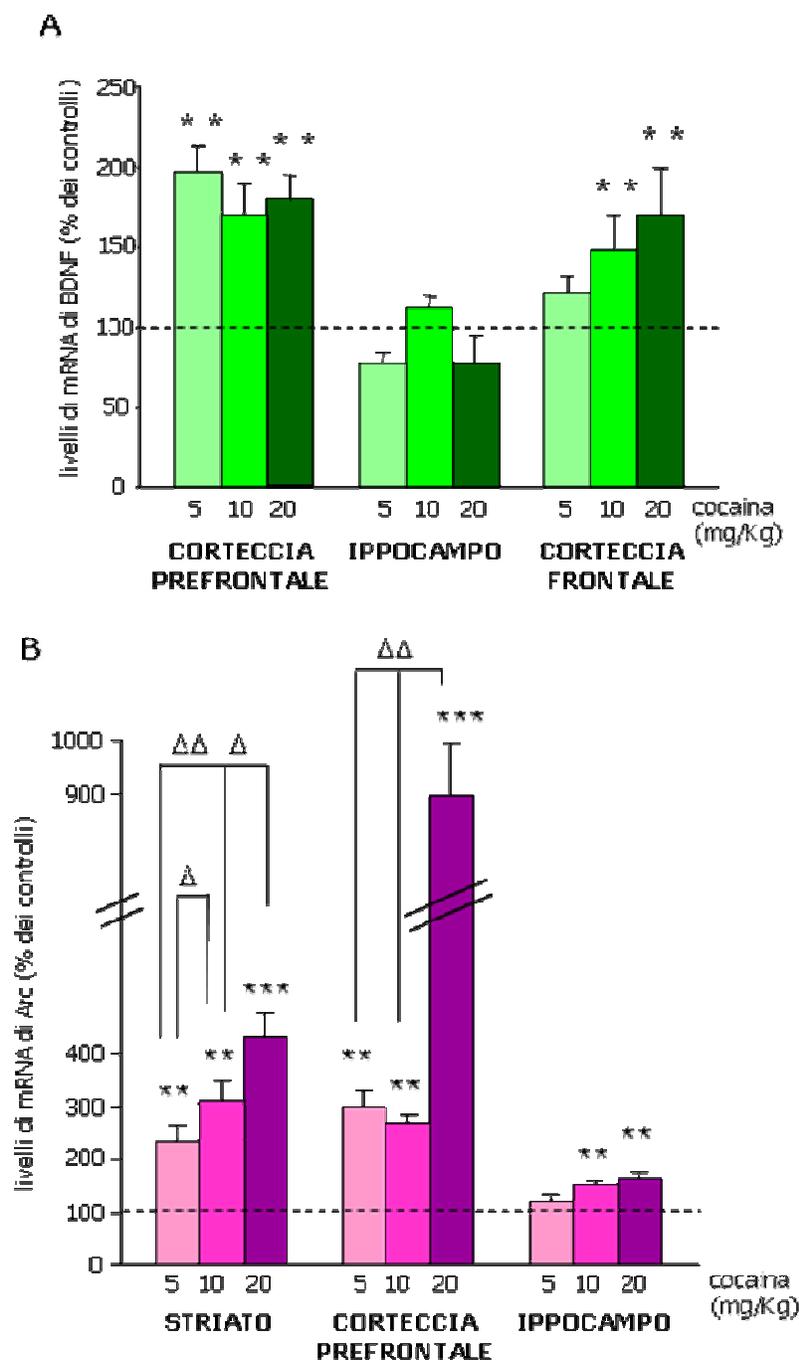


Fig. 4.1 Effetto del trattamento acuto con cocaina (5, 10 o 20 mg/kg) sull'espressione genica di BDNF (a) e Arc (b) nelle diverse regioni cerebrali di ratto: dose risposta. Gli animali sono stati sottoposti a somministrazione acuta con 5, 10, 20 mg/kg di cocaina e sacrificati 2 ore dopo la singola somministrazione. L'RNA totale delle aree d'interesse è stato quindi estratto e l'espressione di BDNF e Arc determinata mediante RNase Protection Assay. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 7-13 determinazioni indipendenti. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ vs. salina, Δ , $p < 0.05$ e $\Delta\Delta$, $p < 0.01$ vs. animali trattati con cocaina (ANOVA a una via con test di Dunnett).

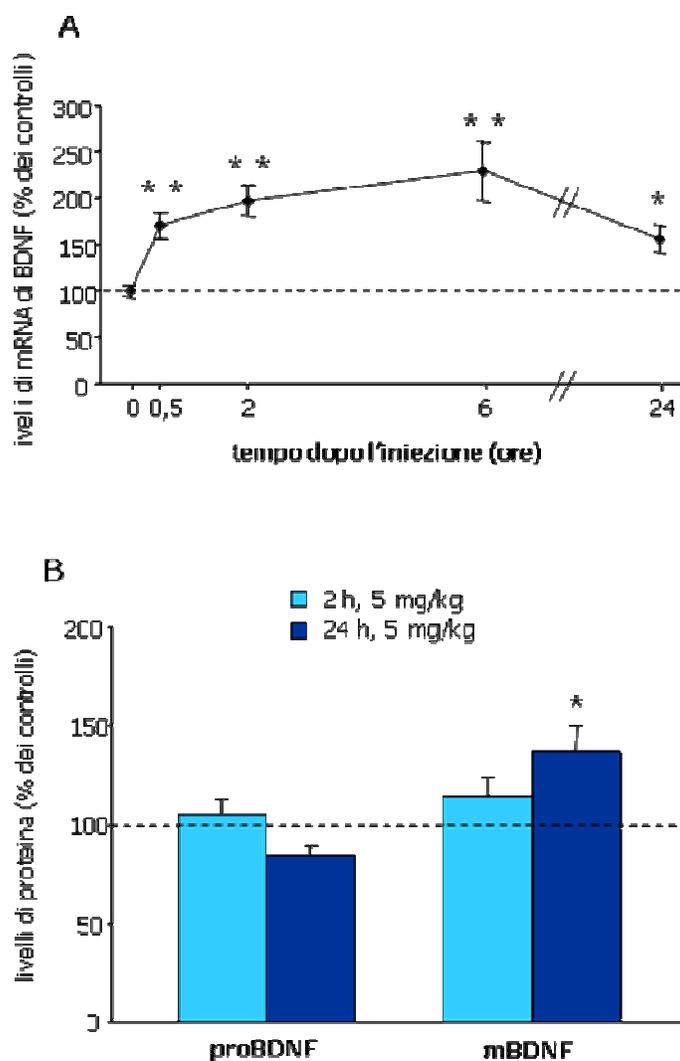


Fig. 4.2 Profilo temporale dell'espressione genica (a) e proteica (b) di BDNF in seguito ad una singola iniezione di cocaina (5 mg/kg) nella corteccia prefrontale di ratto. Gli animali sono stati sottoposti a somministrazione acuta con 5 mg/kg di cocaina e sacrificati 0,5, 2, 6, 24 ore dopo la singola iniezione. L'RNA totale della corteccia prefrontale è stato quindi estratto e l'espressione di BDNF determinata mediante RNase Protection Assay. Le analisi della forma precursore (proBDNF) e di quella matura (mBDNF) di BDNF sono state condotte nella frazione citosolica degli estratti di corteccia prefrontale mediante Western Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 7-13 determinazioni indipendenti.

* $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$ vs. salina (ANOVA a una via con test di Dunnett)

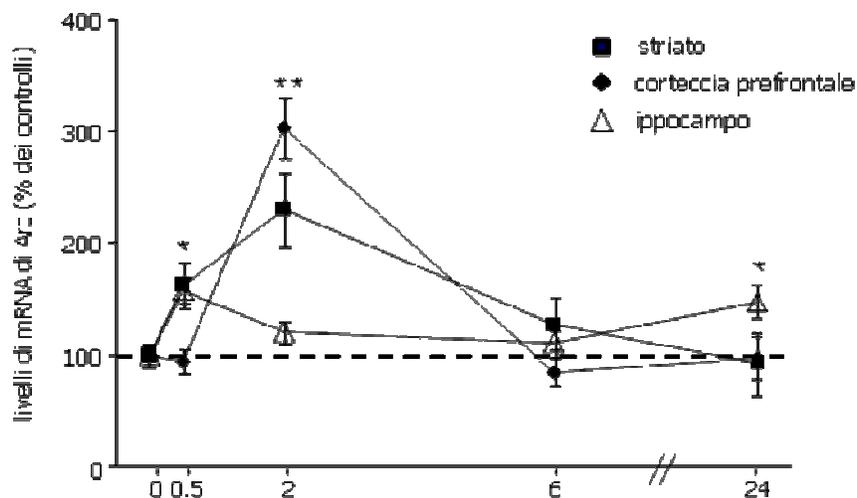


Fig. 4.3 Profilo temporale dell'espressione genica Arc in seguito ad una singola iniezione di cocaina (5 mg/kg) nelle diverse regioni cerebrali di ratto. Gli animali sono stati sottoposti a somministrazione acuta con 5 mg/kg di cocaina e sacrificati 0,5, 2, 6, 24 ore dopo la singola iniezione. L'RNA totale delle aree d'interesse è stato quindi estratto e l'espressione di Arc determinata mediante RNase Protection Assay. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 7-13 determinazioni indipendenti. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs. salina (ANOVA a una via con test di Dunnett)

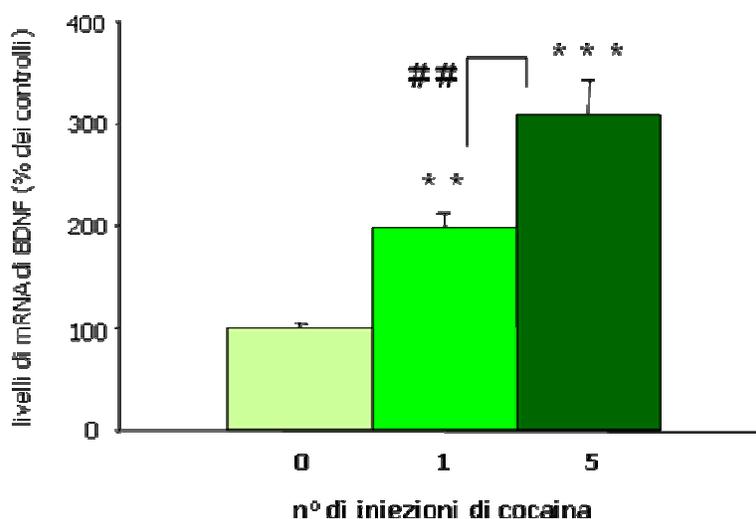


Fig. 4.4 Effetto a breve termine sull'espressione genica di BDNF dopo trattamento acuto o ripetuto con cocaina nella corteccia prefrontale di ratto. Gli animali sono stati sottoposti a somministrazione acuta o ripetuta (5 giorni) con cocaina alla dose di 5 mg/kg e sacrificati 2 ore dopo la fine del trattamento. L'RNA totale della corteccia prefrontale è stato quindi estratto e l'espressione di BDNF determinata mediante RNase Protection Assay. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 7-13 determinazioni indipendenti. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$ vs. salina; # $p < 0.01$ vs. ratti che hanno ricevuto la singola iniezione di cocaina (ANOVA a due vie con SCPHT)

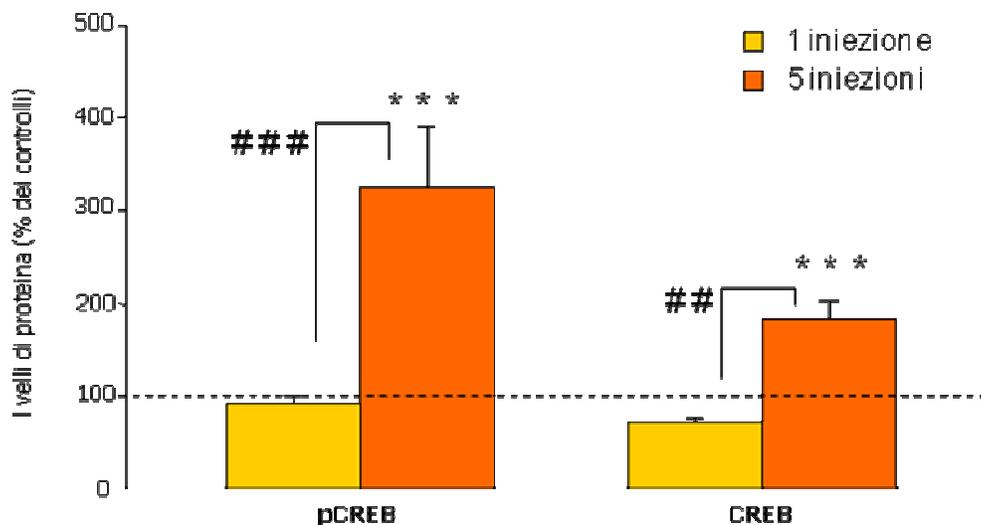


Fig. 4.5 Modulazione dei livelli del cAMP response element-binding protein (CREB) dopo trattamento acuto o ripetuto con cocaina nella corteccia prefrontale di ratto. Gli animali sono stati sottoposti a somministrazione acuta o ripetuta (5 giorni) con cocaina alla dose di 5 mg/kg e sacrificati 2 ore dopo la fine del trattamento. L'RNA totale della corteccia prefrontale è stato quindi estratto e l'espressione di BDNF determinata mediante RNase Protection Assay. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 7-13 determinazioni indipendenti. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$ vs. salina; # $p < 0.01$ vs. ratti che hanno ricevuto la singola iniezione di cocaina (ANOVA a due vie con SCPHT)

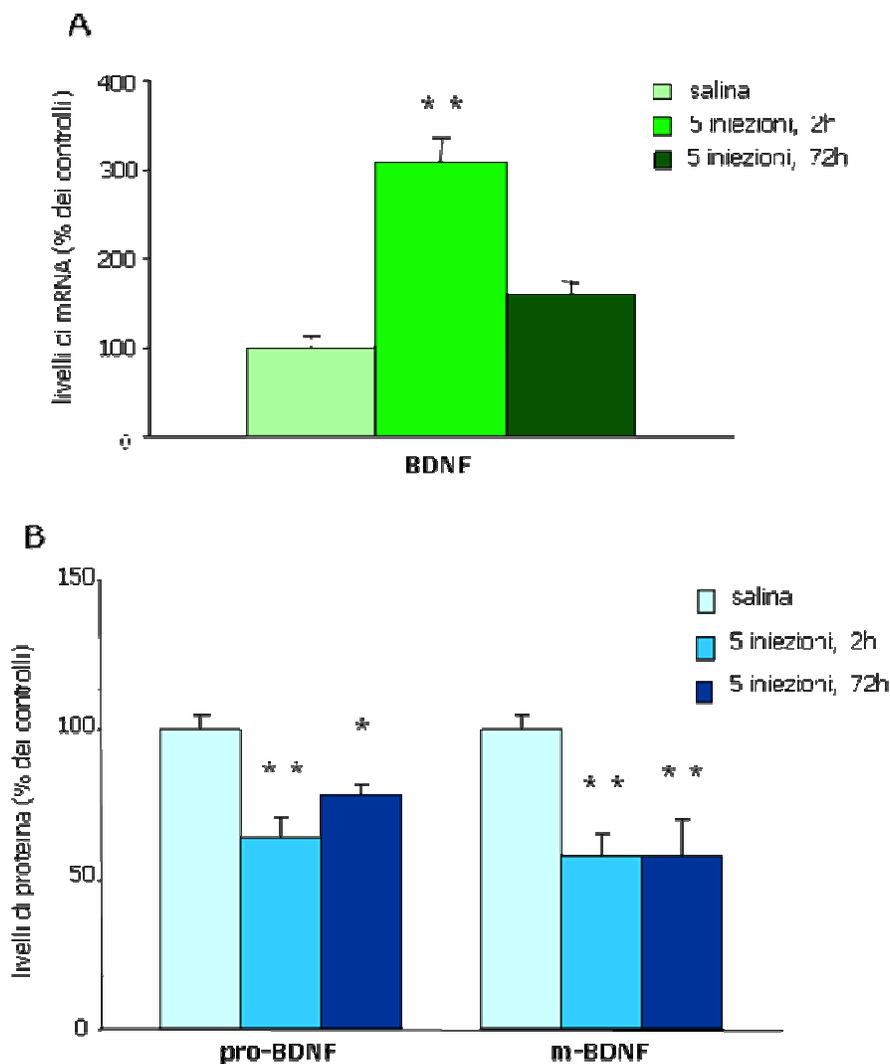


Fig. 4.6 Modulazione dell'espressione genica (a) e proteica (b) di BDNF dopo trattamento ripetuto con cocaina nella corteccia prefrontale di ratto. Gli animali sono stati sottoposti a somministrazione ripetuta (5 giorni) con cocaina alla dose di 5 mg/kg e sacrificati 2 e 72 ore dopo la fine del trattamento. L'RNA totale della corteccia prefrontale è stato quindi estratto e l'espressione di BDNF determinata mediante RNase Protection Assay. Le analisi della forma precursore (proBDNF) e di quella matura (mBDNF) di BDNF sono state condotte nella frazione citosolica degli estratti di corteccia prefrontale mediante Western Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 10 determinazioni indipendenti.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. salina (ANOVA a una via con test di Dunnett)

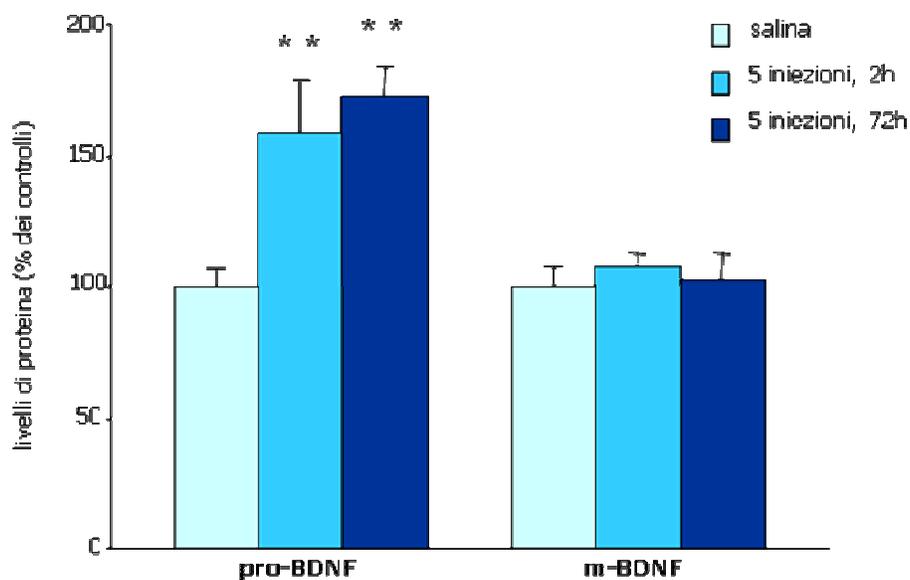


Fig. 4.7 Modulazione dell'espressione proteica di BDNF dopo trattamento ripetuto con cocaina nello striato di ratto. Gli animali sono stati sottoposti a somministrazione ripetuta (5 giorni) con cocaina alla dose di 5 mg/kg e sacrificati 2 e 72 ore dopo la fine del trattamento. Le analisi della forma precursore (proBDNF) e di quella matura (mBDNF) di BDNF sono state condotte nella frazione citosolica degli estratti di striato mediante Western Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 10 determinazioni indipendenti. ** $p < 0.01$ vs. salina (ANOVA a una via con test di Dunnett)

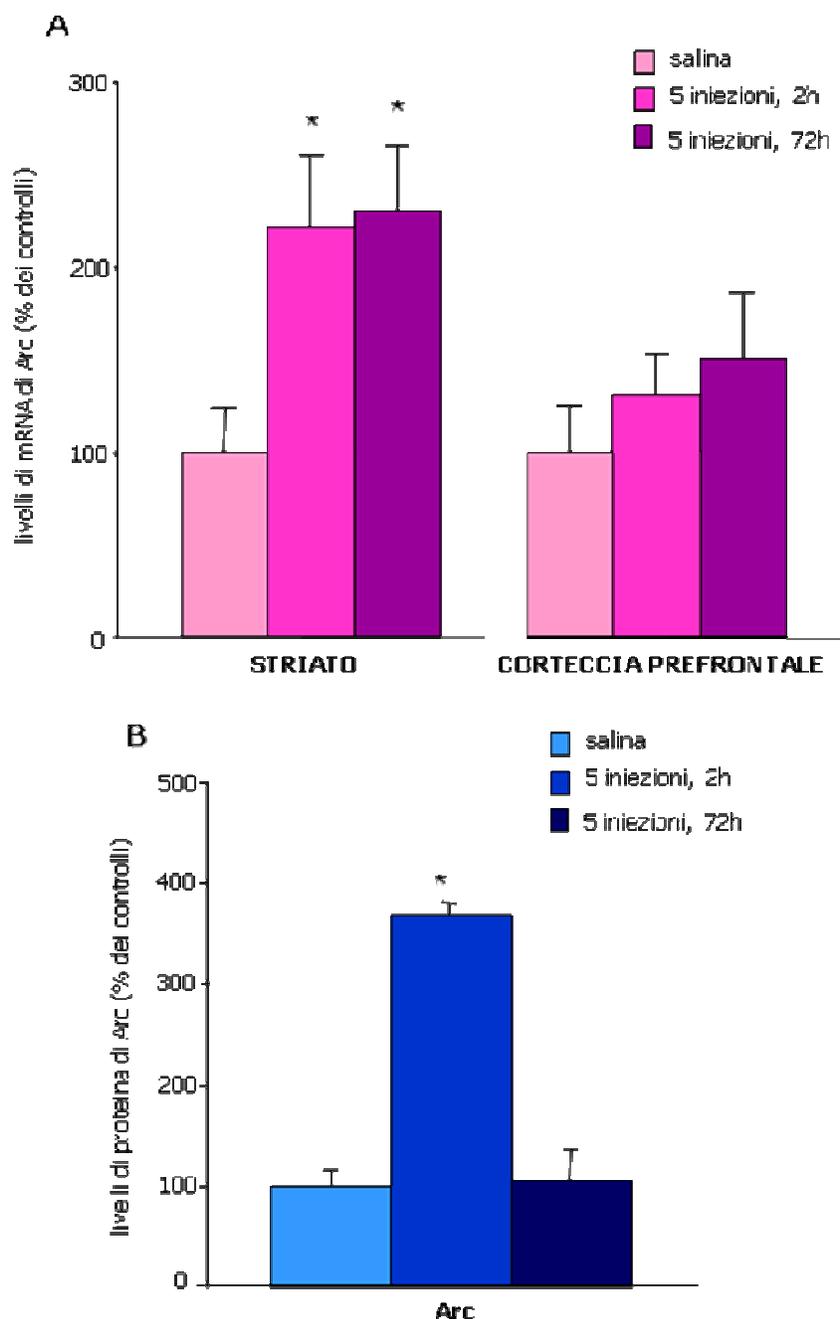


Fig. 4.8 Modulation dell'espressione genica nello striato e nella corteccia prefrontale di ratto (a) e proteica nello striato (b) di Arc dopo trattamento ripetuto con cocaina. Gli animali sono stati sottoposti a somministrazione ripetuta (5 giorni) con cocaina alla dose di 5 mg/kg e sacrificati 2 e 72 ore dopo la fine del trattamento. L'RNA totale delle aree d'interesse è stato quindi estratto e l'espressione di Arc determinata mediante RNase Protection Assay. Le analisi proteiche di Arc sono state condotte nell'omogenato totale di striato mediante Western Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 10 determinazioni indipendenti.

* $p < 0.05$ vs. salina (ANOVA a una via con test di Dunnett)

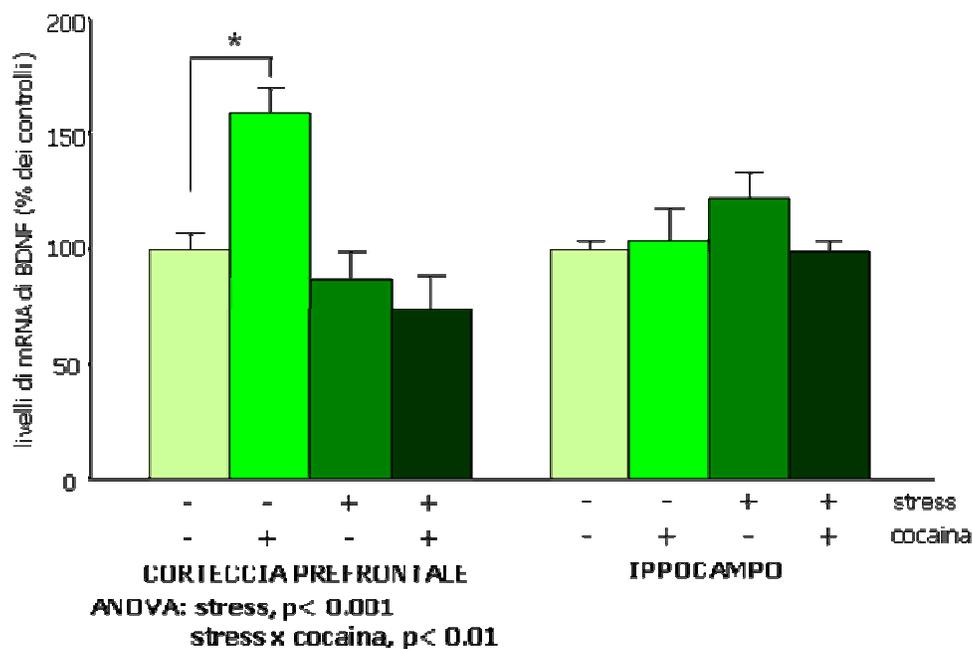


Fig. 4.9 Effetto dello stress ripetuto e della successiva somministrazione acuta di cocaina sull'espressione genica di BDNF. Gli animali sono stati sottoposti ad uno stress ripetuto della durata di 14 giorni, quindi immediatamente dopo la fine dell'ultima sessione di stress, i ratti hanno subito una singola iniezione di cocaina alla dose di 10 mg/kg e sacrificati 2 ore dopo. L'RNA totale delle aree d'interesse è stato quindi estratto e l'espressione di BDNF determinata mediante RNase Protection Assay. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 6 determinazioni indipendenti.

* $p < 0.05$ vs. saline non sottoposte a stress (ANOVA a due vie con SCPHT)

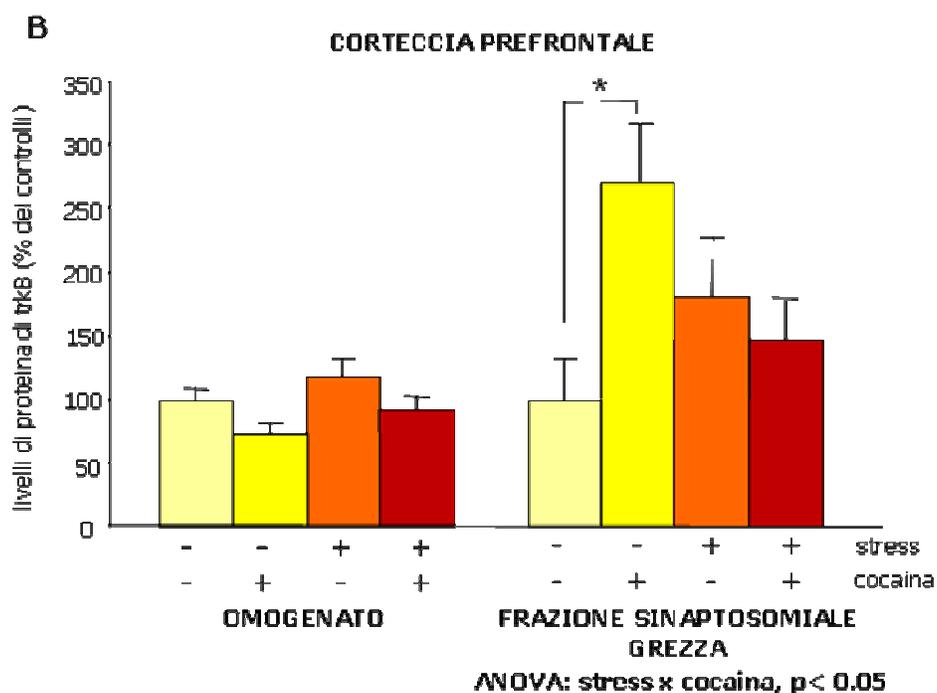
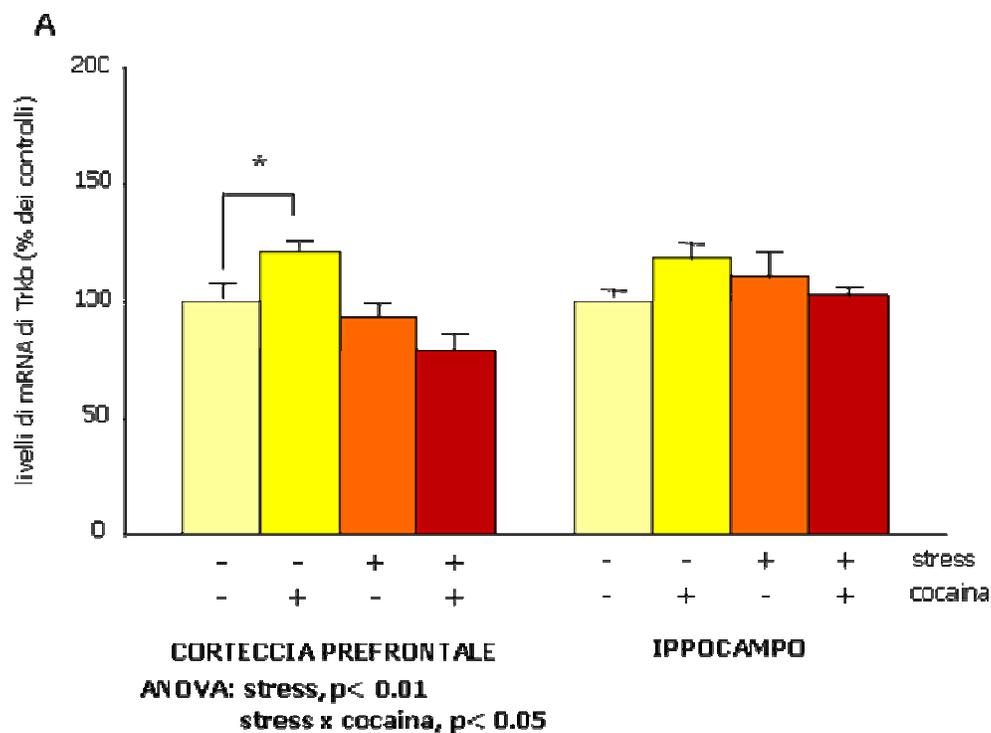


Fig. 4.10 Effetto dello stress cronico e della successiva somministrazione acuta di cocaina sull'espressione genica (a) e proteica (b) di TrkB nella corteccia prefrontale e nell'ippocampo di ratto. Gli animali sono stati sottoposti ad uno stress cronico della durata di 14 giorni e, immediatamente dopo la fine dell'ultima sessione di stress, i ratti hanno subito una singola iniezione di cocaina (10 mg/kg) e sacrificati 2 ore dopo. L'RNA totale delle aree di interesse è stato quindi estratto e l'espressione di TrkB determinata mediante RNase Protection Assay. Le analisi proteiche di TrkB sono state condotte nell'omogenato totale e nella frazione sinaptosomiale grezza della corteccia prefrontale mediante Western

Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 6 determinazioni indipendenti.

* $p < 0.05$ vs. saline non sottoposte a stress (ANOVA a due vie con SCPHT)

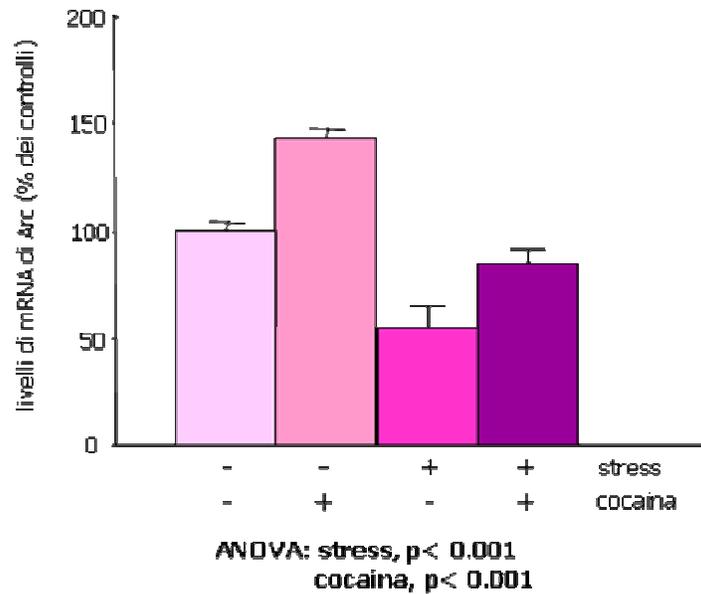
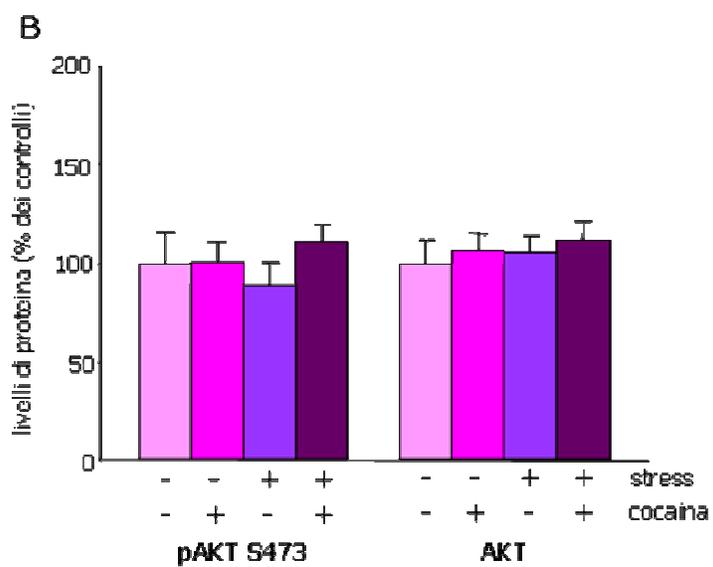
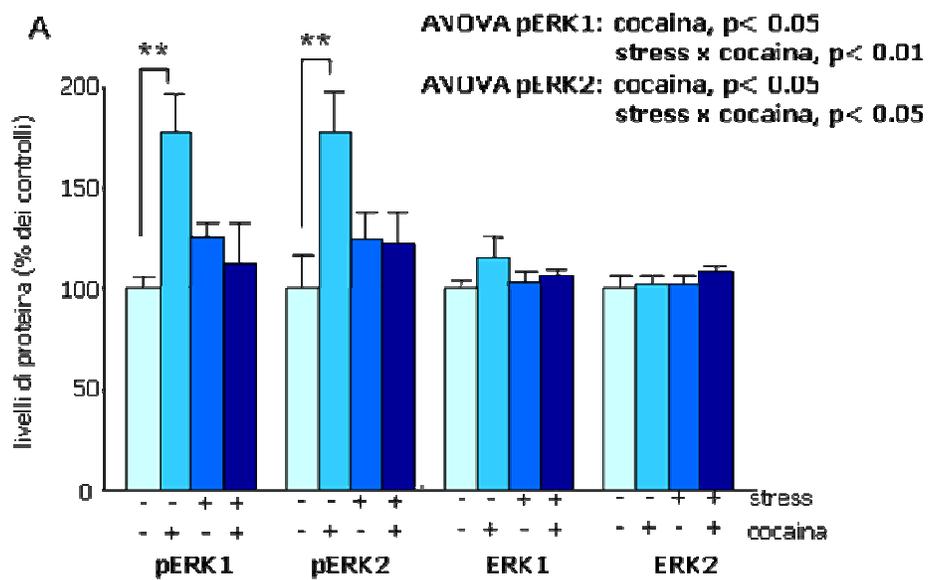


Fig. 4.11 Effetto dello stress cronico e della successiva somministrazione acuta di cocaina sull'espressione genica di Arc nella corteccia prefrontale di ratto. Gli animali sono stati sottoposti ad uno stress cronico della durata di 14 giorni e, immediatamente dopo la fine dell'ultima sessione di stress, i ratti hanno subito una singola iniezione di cocaina (10 mg/kg) e sacrificati 2 ore dopo. L'RNA totale della corteccia prefrontale è stato quindi estratto e l'espressione di Arc determinata mediante RNase Protection Assay. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 6 determinazioni indipendenti.



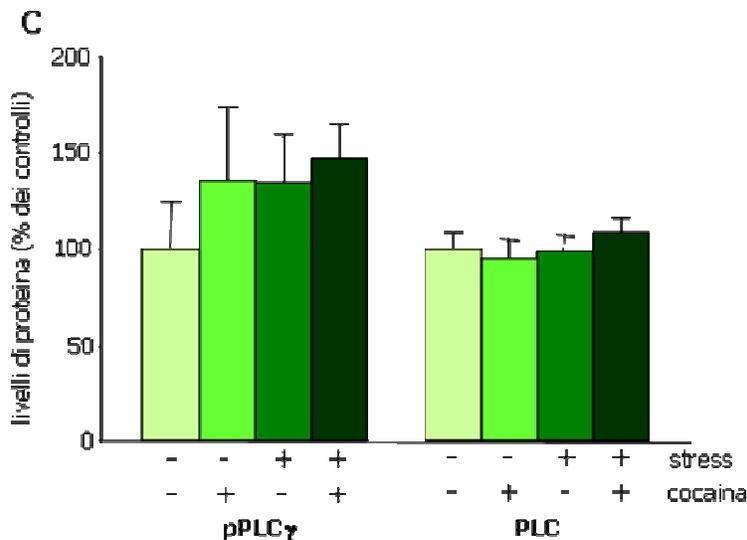
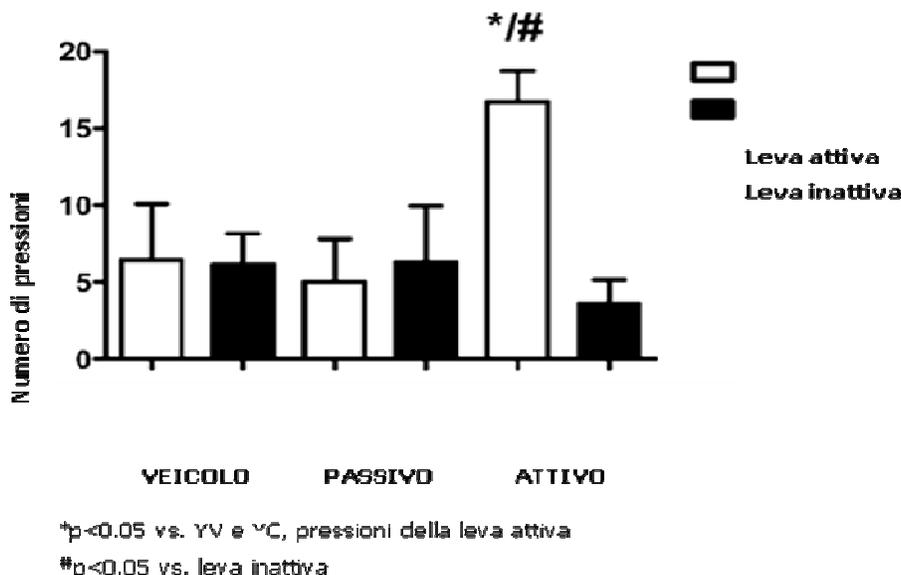


Fig. 4.12 Effetto dello stress cronico e della successiva somministrazione acuta di cocaina sulla fosforilazione e sull'espressione proteica di ERK1/2 (a), AKT (b) e PLC γ (c) nella corteccia prefrontale di ratto. Gli animali sono stati sottoposti ad uno stress cronico della durata di 14 giorni e, immediatamente dopo la fine dell'ultima sessione di stress, i ratti hanno subito una singola iniezione di cocaina alla dose di 10 mg/kg e sacrificati 2 ore dopo. Tutte le analisi proteiche sono state condotte nella frazione sinaptosomiale grezza della corteccia prefrontale mediante Western Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina), rappresentano la media \pm SEM di 6 determinazioni indipendenti.

**p<0.01 vs. saline non sottoposte a stress (ANOVA a due vie con SCPHT)



*p<0.05 vs. YV e YC, pressioni della leva attiva

#p<0.05 vs. leva inattiva

Fig. 4.13 Media delle pressioni sulla leva attiva o inattiva in una singola sessione di autosomministrazione di cocaina della durata di 2 ore. Ogni pressione della leva attiva da parte del ratto attivo determina una infusione di cocaina (0.25 mg/0.1 ml) sia nell'animale attivo (cocaine self-administration, SA) che nell'animale passivo (yoked-cocaine, YC) ed una infusione di salina nell'animale controllo (yoked-vehicle, YV). Gli istogrammi rappresentano media \pm SEM di almeno 7 triplete di ratti. *P<0.05 vs. veicolo; #p<0.05 vs. passivo (ANOVA a due vie).

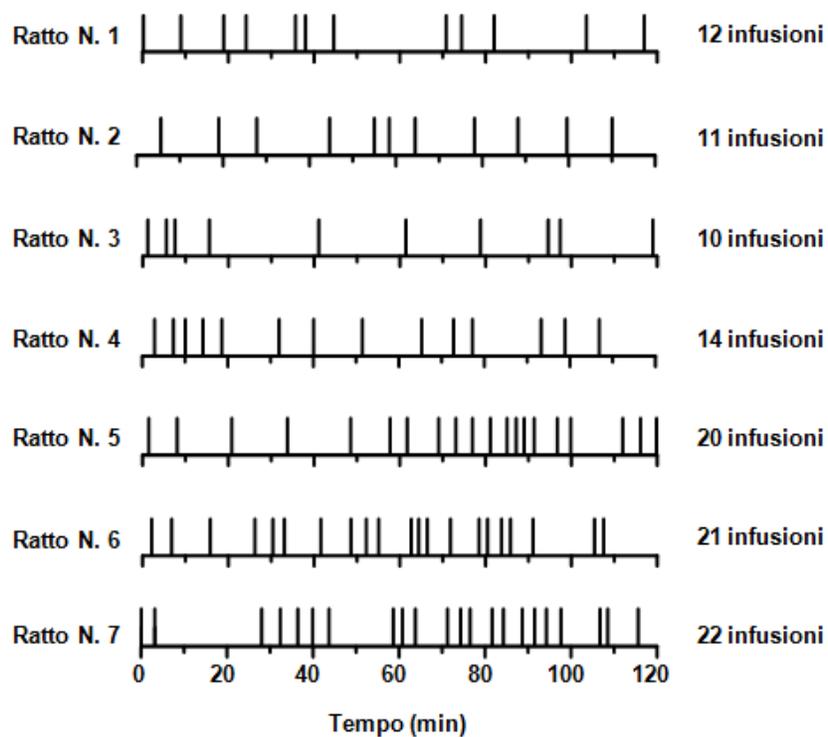


Fig. 4.14 Schema di infusione degli animali che si autosomministrano cocaina in una singola sessione di autosomministrazione dello psicostimolante della durata di 2 ore. Ogni trattino verticale rappresenta una infusione di 0.25 mg/0.1 ml.

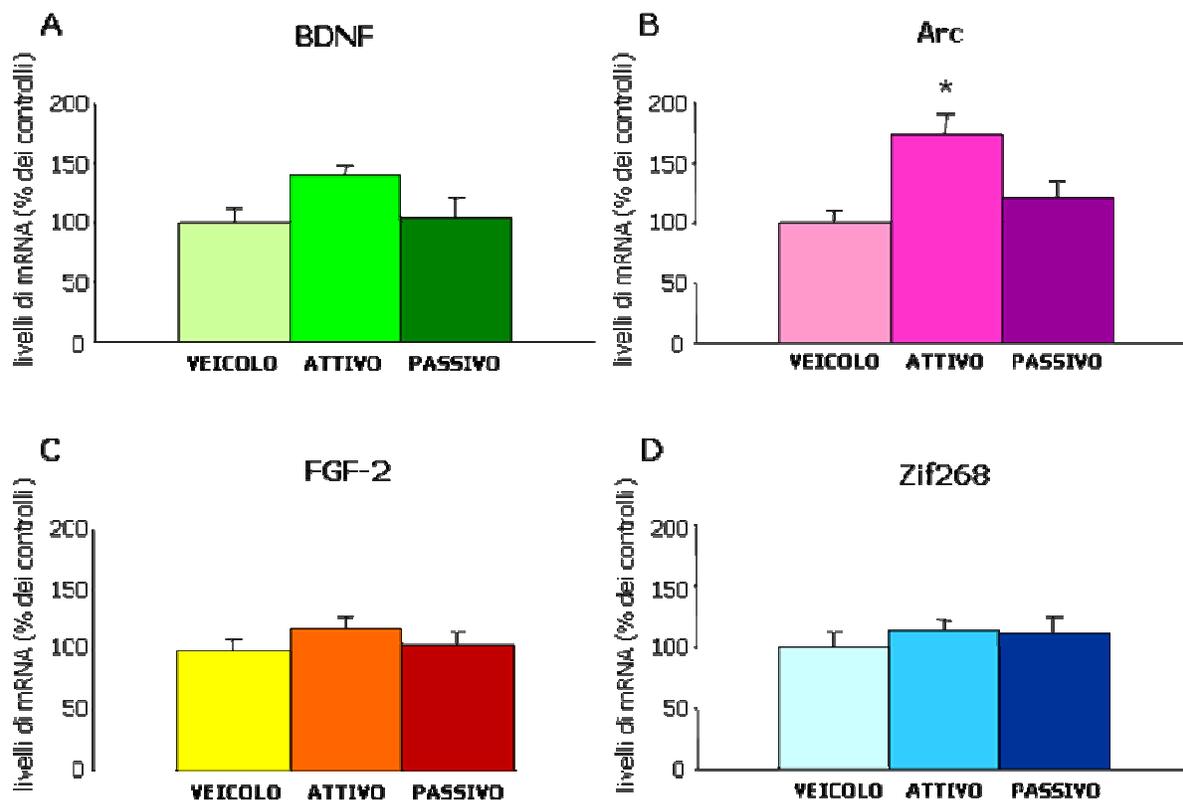


Fig. 4.15 Effetto dell'esposizione ad una singola sessione di autosomministrazione di cocaina sull'espressione genica di Arc (a), BDNF (b), FGF-2 (c) e Zif-268 (d) nella corteccia prefrontale di ratto. Gli animali sono stati sacrificati immediatamente dopo la fine della sessione. L'RNA totale della corteccia prefrontale è stato quindi estratto e l'espressione di Arc, BDNF, FGF-2 e Zif-268 determinata mediante RNase Protection Assay. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina, yoked vehicle), rappresentano la media \pm SEM di 7 determinazioni indipendenti.

* $p < 0.05$ vs. yoked-vehicle group (ANOVA a una via seguita da test di Dunnett)

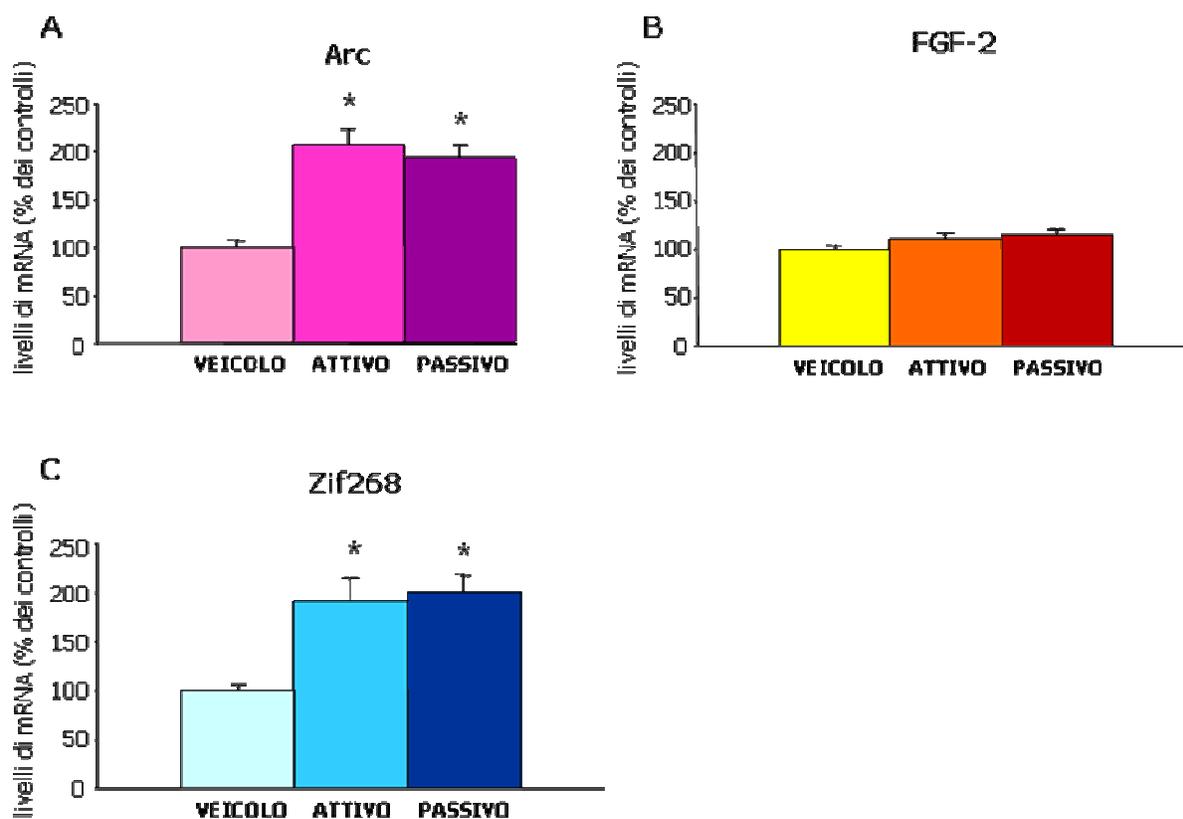
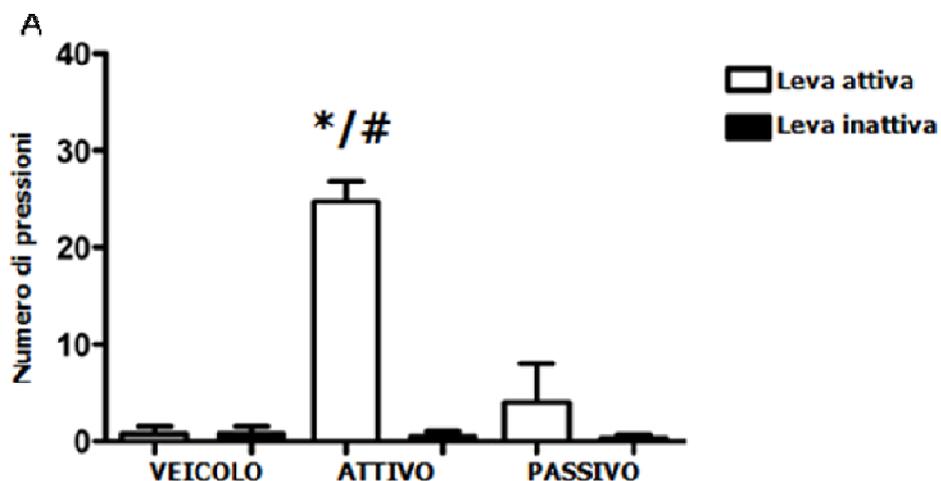


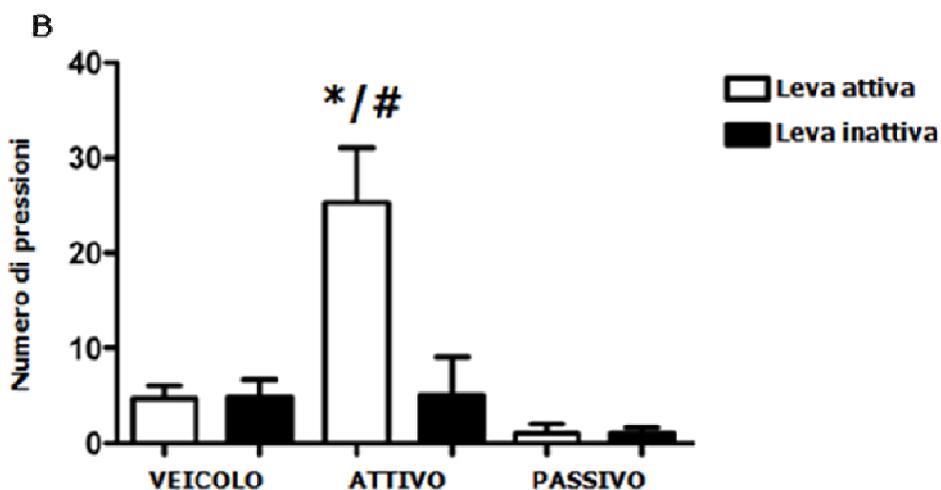
Fig. 4.16 Effetto dell'esposizione ad una singola sessione di autosomministrazione di cocaina sull'espressione genica di Arc (a), Zif-268 (b) e FGF-2 (c) nello striato di ratto. Gli animali sono stati sacrificati immediatamente dopo la fine della sessione. L'RNA totale dello striato è stato quindi estratto e l'espressione di Arc, BDNF, FGF-2 e Zif-268 determinata mediante RNase Protection Assay. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina, yoked vehicle), rappresentano la media \pm SEM di 7 determinazioni indipendenti.

* $p < 0.05$ vs. yoked-vehicle group (ANOVA a una via seguita da test di Dunnet)



* $p < 0.05$ vs. YV e YC, pressioni della leva attiva

$p < 0.05$ vs. leva inattiva



* $p < 0.05$ vs. YV e YC, pressioni della leva attiva

$p < 0.05$ vs. leva inattiva

Fig. 4.17 Media delle pressioni sulla leva attiva o inattiva dell'ultima sessione di un'esposizione prolungata (14 giorni) alla gabbia di autosomministrazione di cocaina. Gli animali sono stati sacrificati immediatamente dopo quest'ultima esposizione **(A)** oppure 24 ore dopo **(B)**. Ogni pressione della leva attiva da parte del ratto attivo determina una infusione di cocaina (0.25 mg/0.1 ml) sia nell'animale attivo (cocaine self-administration, SA) che nell'animale passivo (yoked-cocaine, YC) ed una infusione di salina nell'animale controllo (yoked-vehicle, YV). Gli istogrammi rappresentano media \pm SEM di almeno 7 triplette di ratti. * $P < 0.05$ vs. veicolo; # $p < 0.05$ vs. passivo (ANOVA a una via seguita da test di Newman-Keuls).

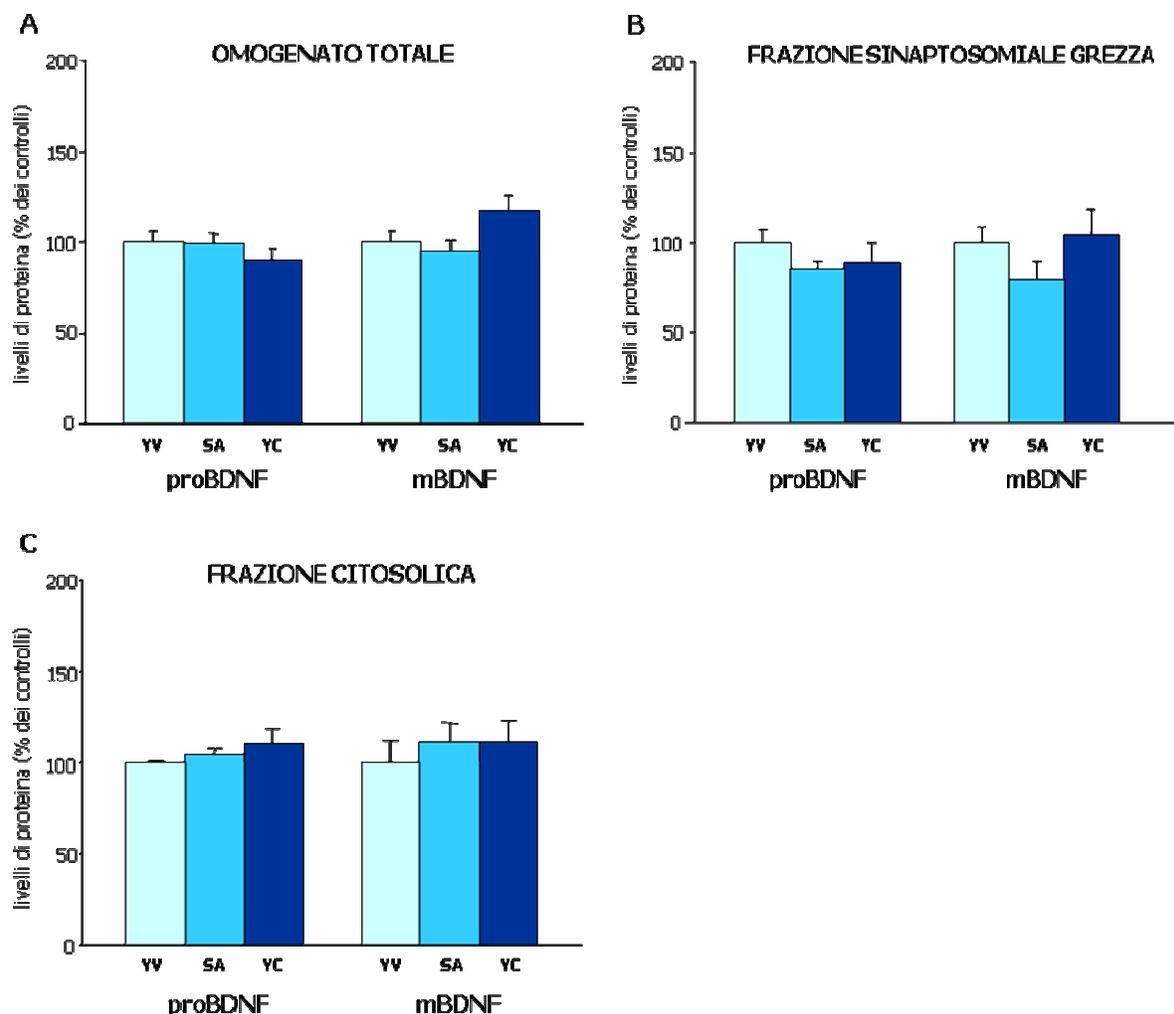


Fig. 4.18 Effetto dell'esposizione ripetuta alla gabbia di autosomministrazione di cocaina sull'espressione di BDNF (precursore e maturo) nella corteccia prefrontale di ratto. Gli animali sono stati sacrificati immediatamente dopo la fine dell'ultima sessione di autosomministrazione. Le analisi proteiche di BDNF precursore (proBDNF) e maturo (mBDNF) sono state condotte nell'omogenato totale **(A)**, nella frazione sinaptosomiale grezza **(B)** e nella frazione citosolica **(C)** della corteccia prefrontale mediante Western Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina, yoked vehicle), rappresentano la media \pm SEM di 7 determinazioni indipendenti.

YV: yoked-vehicle, animali controllo; SA: cocaine self-administration, animali attivi; YC: yoked-cocaine, animali passivi. (ANOVA a una via)

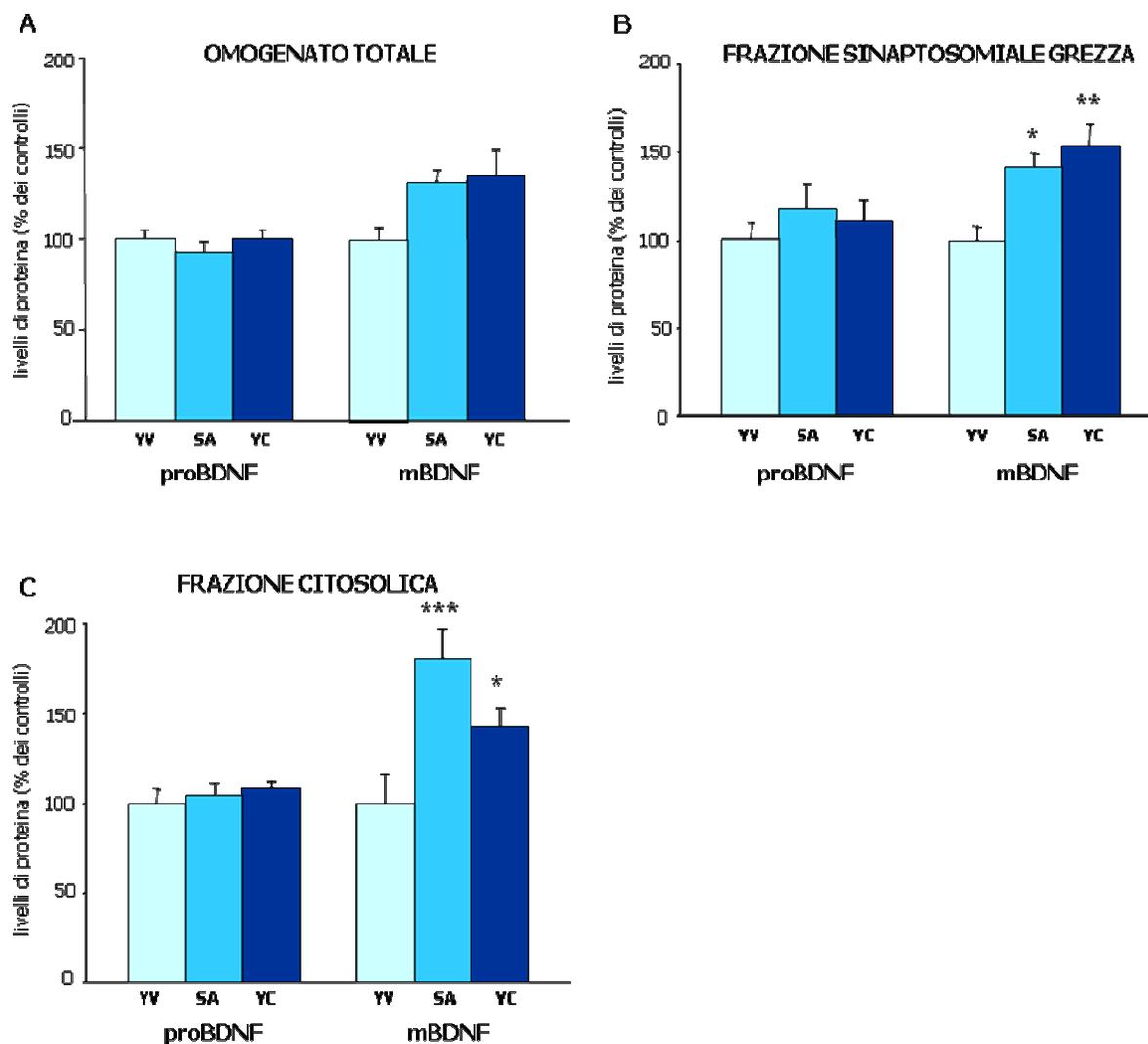


Fig. 4.19 Effetto dell'esposizione ripetuta alla gabbia di autosomministrazione di cocaina sull'espressione di BDNF (precursore e maturo) nella corteccia prefrontale di ratto. Gli animali sono stati sacrificati 24 ore dopo la fine dell'ultima sessione di autosomministrazione. Le analisi proteiche di BDNF precursore (proBDNF) e maturo (mBDNF) sono state condotte nell'omogenato totale **(A)**, nella frazione sinaptosomiale grezza **(B)** e nella frazione citosolica **(C)** della corteccia prefrontale mediante Western Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina, yoked vehicle), rappresentano la media \pm SEM di 7 determinazioni indipendenti.

YV: yoked-vehicle, animali controllo; SA: cocaine self-administration, animali attivi; YC: yoked-cocaine, animali passivi.

* $p < 0.05$ vs. veicolo (ANOVA a una via seguita da test di Dunnett)

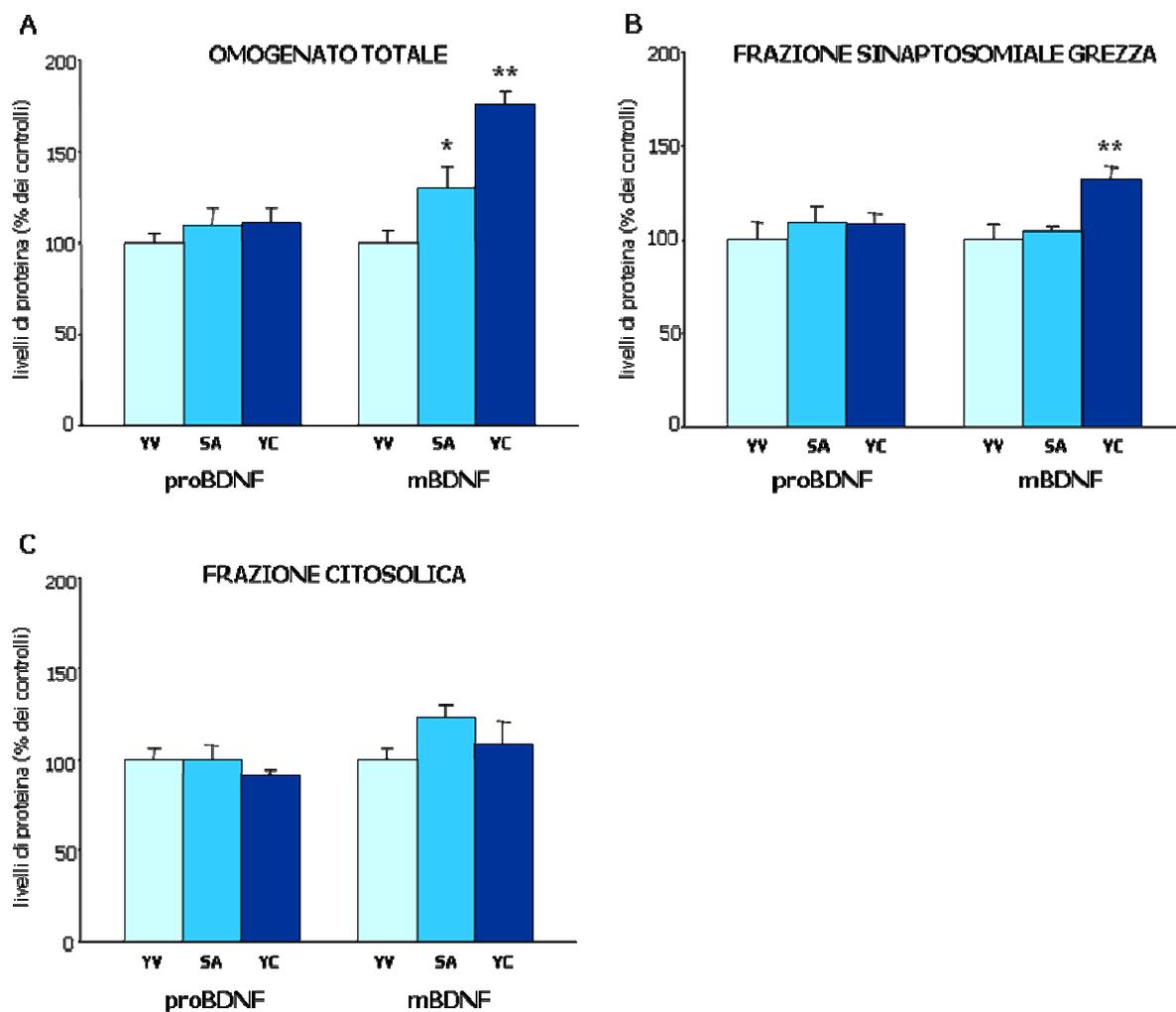


Fig. 4.20 Effetto dell'esposizione ripetuta alla gabbia di autosomministrazione di cocaina sull'espressione di BDNF (precursore e maturo) nel nucleo accumbens di ratto. Gli animali sono stati sacrificati immediatamente dopo la fine dell'ultima sessione di autosomministrazione. Le analisi proteiche di BDNF precursore (proBDNF) e maturo (mBDNF) sono state condotte nell'omogenato totale **(A)**, nella frazione sinaptosomiale grezza **(B)** e nella frazione citosolica **(C)** del nucleo accumbens mediante Western Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina, yoked vehicle), rappresentano la media \pm SEM di 7 determinazioni indipendenti. YV: yoked-vehicle, animali controllo; SA: cocaine self-administration, animali attivi; YC: yoked-cocaine, animali passivi.

* $p < 0.05$ vs. veicolo, ** $p < 0.01$ vs. veicolo (ANOVA a una via seguita da test di Dunnett)

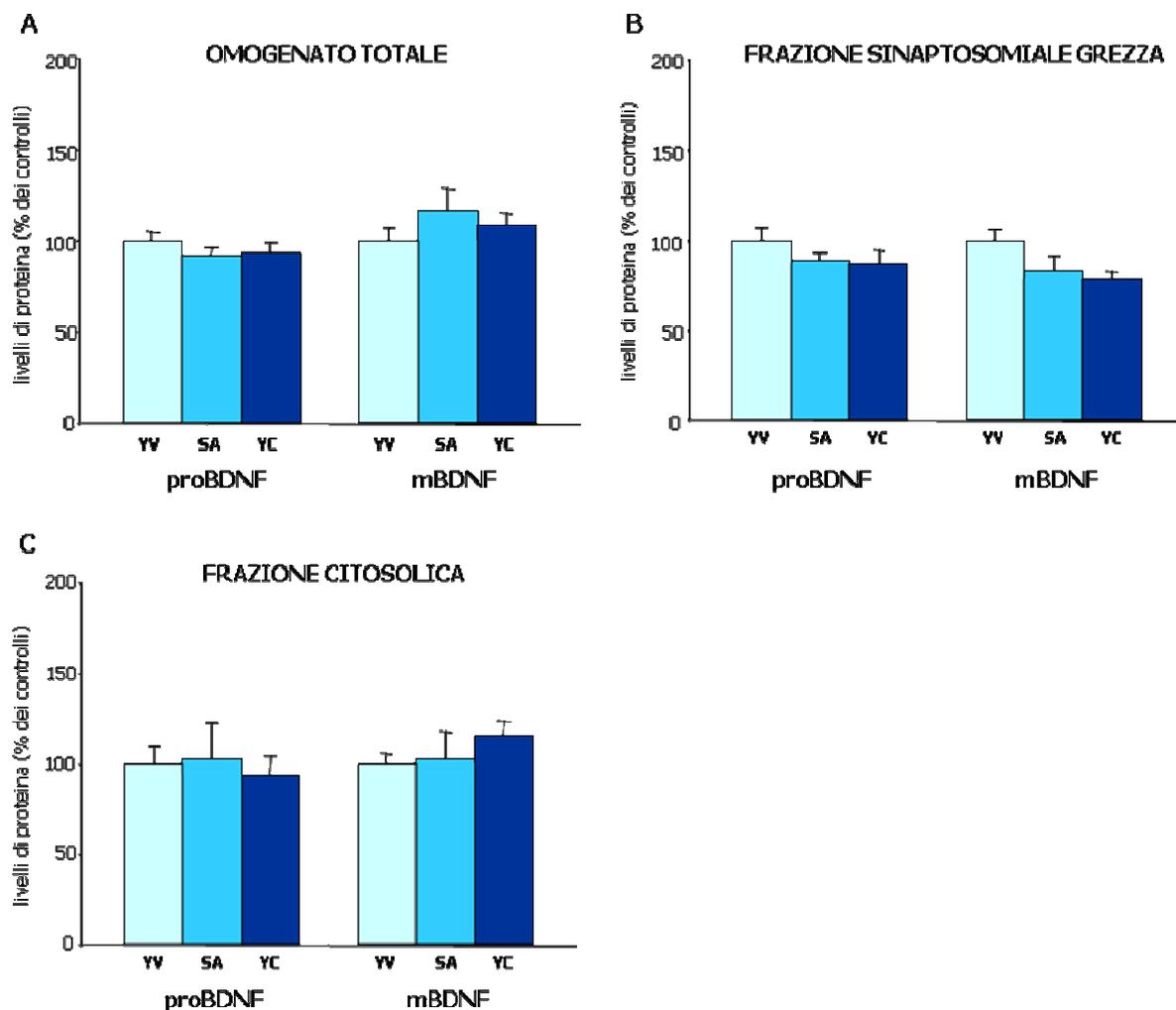


Fig. 4.21 Effetto dell'esposizione ripetuta alla gabbia di autosomministrazione di cocaina sull'espressione di BDNF (precursore e maturo) nel nucleo accumbens di ratto. Gli animali sono stati sacrificati 24 ore dopo la fine dell'ultima sessione di autosomministrazione. Le analisi proteiche di BDNF precursore (proBDNF) e maturo (mBDNF) sono state condotte nell'omogenato totale **(A)**, nella frazione sinaptosomiale grezza **(B)** e nella frazione citosolica **(C)** del nucleo accumbens mediante Western Blot. I risultati, espressi come % rispetto ai relativi controlli (animali che hanno ricevuto solo salina, yoked vehicle), rappresentano la media \pm SEM di 7 determinazioni indipendenti.

YV: yoked-vehicle, animali controllo; SA: cocaine self-administration, animali attivi; YC: yoked-cocaine, animali passivi. (ANOVA a una via)

5. DISCUSSIONE

L'esposizione acuta o ripetuta a sostanze d'abuso produce modificazioni a lungo termine sia funzionali che strutturali in aree cerebrali note per mediare i comportamenti di ricerca compulsiva della sostanza (Jones and Bonci, 2005; Nestler, 2001). Nonostante siano stati fatti progressi significativi in questo campo, le dinamiche molecolari della dipendenza rimangono per la maggior parte oscure. Recentemente è stato ipotizzato un ruolo importante dei fattori neurotrofici in tali meccanismi in seguito all'evidenza che le sostanze d'abuso modificano non solo il rilascio di neurotrasmettitori ma anche alterano processi cerebrali come l'apprendimento nei quali i fattori di crescita, ed in particolar modo il BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), e i geni precoci, specialmente Arc (Activity Regulated Cytoskeletal-associated protein) svolgono un ruolo principale.

I nostri dati dimostrano che la cocaina modifica l'espressione della neurotrofina BDNF in diverse condizioni sperimentali. Infatti, l'espressione di BDNF è alterata in maniera dose-, tempo- e regione cerebrale-dipendente dopo trattamento acuto con lo psicostimolante. Similmente, la ripetuta esposizione a cocaina altera l'espressione di BDNF evidenziando un potenziale ruolo della neurotrofina anche nei meccanismi molecolari che sottendono l'esposizione ripetuta allo psicostimolante. Inoltre, l'esposizione ad uno stress ripetuto è in grado di influenzare l'espressione di BDNF conseguente alla somministrazione acuta di cocaina suggerendo un ruolo della neurotrofina anche negli eventi plastici che caratterizzano l'interazione fra stress e cocaina.

Gli esperimenti acuti hanno dimostrato che BDNF è implicato nelle alterazioni molecolari rapide conseguenti all'esposizione acuta allo psicostimolante cocaina. Tale effetto sembra essere caratteristico delle regioni corticali, in particolare la corteccia prefrontale, rispetto alle aree cerebrali limbiche come l'ippocampo. Ciò non è sorprendente in quanto la cocaina, soprattutto acutamente, agisce modificando la neurotrasmissione dopaminergica che svolge indubbiamente un ruolo chiave a livello corticale piuttosto che limbico. Diverse evidenze sperimentali dimostrano che le sostanze d'abuso, direttamente od indirettamente, attivano il sistema dopaminergico mesocorticolimbico, il circuito preposto alla mediazione del piacere (Kelley and Berridge, 2002). Infatti, le sostanze d'abuso aumentano il rilascio di dopamina nella corteccia prefrontale, nello striato e nell'amigdala. La dopamina serve a facilitare e consolidare l'apprendimento di un comportamento di ricompensa (drug-taking behavior) e a richiamare le informazioni acquisite e quindi ricadere (drug-seeking behavior and relapse) (Kalivas and O'Brien, 2008). L'aumento dei livelli di messaggero di BDNF in corteccia prefrontale, quindi, potrebbe dipendere dall'attivazione dei neuroni dopaminergici che proiettano dall'area ventro-tegmentale alla corteccia prefrontale (Pum et al., 2007), in linea con l'aumento di espressione di Arc.

L'aumento dell'espressione genica di BDNF in seguito a singola esposizione con cocaina non sembra dipendere dal fattore di trascrizione CREB, in quanto la sua fosforilazione non risulta alterata né 30 minuti né 2 ore dopo l'iniezione. Di contro, abbiamo osservato un incremento di fosforilazione e d'espressione di questo fattore di trascrizione in seguito a somministrazione ripetuta di cocaina. L'aumento di fosforilazione di CREB in parallelo all'incremento dei livelli di messaggero di BDNF suggerisce che l'esposizione ripetuta allo psicostimolante potrebbe innescare meccanismi di 'signaling' intracellulari che modulano la trascrizione del BDNF in corteccia prefrontale, evidenziando un diverso meccanismo molecolare alla base della risposta alla somministrazione acuta e ripetuta di cocaina. E' interessante notare che i livelli di CREB risultano duplicati nei ratti trattati ripetutamente con cocaina rispetto ai livelli osservati nei ratti trattati acutamente, suggerendo che una somministrazione prolungata non porta solo ad un aumento dell'attivazione della trascrizione controllata da CREB ma che questo stesso fattore di trascrizione partecipa ai meccanismi adattativi determinati dalla cocaina. E' noto che gli effetti della modulazione di CREB sui meccanismi di ricompensa dipendono dalla regione cerebrale in cui avvengono le modificazioni (Carlezon et al., 2005). Tuttavia, è difficile stabilire le conseguenze funzionali delle variazioni di CREB che abbiamo osservato in corteccia prefrontale. Dato il ruolo di CREB nell'apprendimento (Kuo et al., 2007; Wang et al., 2006), è possibile speculare che l'aumentata espressione del fattore di trascrizione potrebbe essere legata ai meccanismi di apprendimento indotti dalla cocaina.

Esaminando i livelli di messaggero e di proteina di BDNF sia dopo trattamento acuto che dopo trattamento ripetuto si osservano delle discrepanze. Acutamente, l'aumento dell'espressione genica di BDNF, che si osserva già dopo 30 minuti dall'iniezione, non è accompagnato da un incremento nei livelli di proteina che, infatti, abbiamo osservato solo 24 ore dopo l'iniezione. Diversamente, nella corteccia prefrontale degli animali trattati subcronicamente, la forma precursore e la forma matura della neurotrofina sono ridotte sia 2 che 72 ore dopo l'ultima di cinque iniezioni, mentre il messaggero è aumentato ad entrambi i tempi. Questa differenza pone un'interessante questione riguardante l'impatto della cocaina sull'espressione di BDNF. E' noto da dati di letteratura che le funzioni della neurotrofina vengono controllate secondo un meccanismo dinamico e molto complesso che avviene a diversi livelli, cioè a livello trascrizionale e traduzionale, ma anche attraverso il 'targeting' dell'RNA, il processamento e la secrezione delle sue varianti proteiche (Santi et al., 2006; Tongiorgi et al., 2006). La disparità fra i livelli di mRNA e di proteina di BDNF in seguito all'esposizione ripetuta di cocaina suggerisce che lo psicostimolante potrebbe alterarne i meccanismi post-trascrizionali. Studi precedenti hanno dimostrato che i livelli di mRNA di BDNF sono aumentati in diverse regioni cerebrali in seguito a somministrazione di cocaina (Filip et al., 2006; Graham et al., 2007; Le Foll et al., 2005; Liu et al., 2006), tuttavia questi risultati sono stati

ottenuti con dosi più elevate rispetto a quella da noi utilizzata. I nostri dati suggeriscono che la capacità della cocaina di attivare la corteccia prefrontale e di aumentare l'espressione genica di BDNF è preservata dopo trattamento ripetuto, anche se non possiamo escludere la possibilità di un accumulo di messaggero che codifica per la neurotrofina in questa regione. La diminuzione dei livelli del precursore e della forma matura nella frazione citosolica osservata nei ratti trattati ripetutamente con la cocaina suggerisce un'alterazione nei meccanismi di traduzione, ma potrebbe anche essere dovuta a cambiamenti nel 'trafficking' cortico-striatale della proteina o in un aumento della degradazione. In alternativa, l'aumento del messaggero di BDNF potrebbe rappresentare una risposta compensatoria alla riduzione di espressione della proteina. Bisogna inoltre considerare che la somministrazione ripetuta di cocaina potrebbe alterare i meccanismi post-traduzionali che controllano la maturazione del BDNF a livello striatale, in quanto l'aumento dei livelli di precursore non sono accompagnati da una variazione della forma matura. La rilevanza funzionale di un aumento del precursore in striato non è chiara. Sulla base di dati recenti di letteratura che mostrano che pro-BDNF influisce negativamente sulla vitalità neuronale e indebolisce le connessioni sinaptiche (Teng et al., 2005; Woo et al., 2005), è possibile speculare che il suo accumulo sia negativo per la cellula. Tuttavia, questa interpretazione non prende in considerazione che il pro-BDNF può essere processato, sia a livello intracellulare che extracellulare, nella forma matura da diversi enzimi come la furina, la plasmina e diverse metalloproteasi (Mowla et al., 2001), suggerendo quindi la possibilità che l'accumulo di pro-BDNF possa invece rappresentare una riserva di neurotrofina pronta per essere usata in caso di necessità.

Il ruolo di BDNF nella regolazione dei comportamenti di dipendenza in corteccia prefrontale è molto complesso. Berglind e collaboratori (Berglind et al., 2007) hanno recentemente dimostrato che l'infusione di BDNF direttamente nella corteccia prefrontale sopprime la ricerca incoercibile della sostanza, mentre l'infusione della neurotrofica nel nucleo accumbens determina un aumento della propensione a sviluppare comportamenti di dipendenza (Graham et al., 2007). In accordo con quest'ultima evidenza, il gruppo di Filip (Filip et al., 2006) ha dimostrato un aumento dell'espressione di BDNF in accumbens in seguito a paradigmi di sensitizzazione. E' interessante notare che una dicotomia simile fra l'espressione regionale e il ruolo di BDNF è presente nella depressione; infatti, è stato dimostrato che, in nucleo accumbens, la neurotrofina può contribuire allo sviluppo di fenotipi simili a quello depressivo (Eisch et al., 2003), mentre un ruolo opposto di BDNF è stato proposto in ippocampo (Duman and Monteggia, 2006). I nostri dati, che mostrano un diverso profilo trascrizionale e traduzionale di BDNF in seguito a somministrazione ripetuta di cocaina, aumentano la complessità e la specificità della regolazione della neurotrofina nei comportamenti indotti da sostanze d'abuso a livello del Sistema Nervoso Centrale.

L'insieme di questi dati suggerisce un ruolo di BDNF nell'interazione fra corteccia prefrontale e striato, che costituiscono aree associate alla ricerca compulsiva della sostanza suggerendo che la selettività cerebrale di questi cambiamenti probabilmente riflette il bersaglio di specifici processi neuroplastici piuttosto che un'interferenza globale con l'attività neurotrofica di BDNF. Quindi, considerando il ruolo protettivo di BDNF, non possiamo escludere la possibilità che i neuroni della corteccia prefrontale che esprimono bassi livelli di BDNF in seguito ad esposizione a cocaina siano più vulnerabili a causa del ridotto supporto trofico, ipotesi corroborata da dati recenti che dimostrano che l'inibizione di BDNF aumenta la citotossicità della cocaina in cellule in coltura (Yan et al., 2007). Inoltre, data l'implicazione di BDNF nei meccanismi di trasmissione e plasticità sinaptica (Bramham and Messaoudi, 2005) e nelle funzioni cognitive mediate dalla corteccia prefrontale (Goldberg and Weinberger, 2004), è possibile speculare che i ridotti livelli di neurotrofina da noi osservati potrebbero compromettere, almeno in parte, questi processi negli individui dipendenti.

È interessante notare che le alterazioni nell'espressione della neurotrofina BDNF sono in linea con i cambiamenti di espressione di un indice riconosciuto di attività neuronale, Arc. Infatti, la dose più bassa di cocaina è sufficiente ad aumentare i livelli di messaggero di Arc. Inoltre, tale aumento si riscontra anche in corteccia prefrontale identificando Arc come un gene che potrebbe costituire un ponte molecolare fra l'attività neuronale indotta da cocaina e l'adattamento a lungo termine provocato dalla cocaina.

Fra i fattori di rischio più comuni che possono facilitare l'abuso e la ricaduta in un comportamento caratterizzato dal consumo di sostanze psicotrofici, lo stress rappresenta sicuramente uno dei più importanti. In particolare, lo stress è considerato un fattore precipitante di abuso in quanto potrebbe aumentare la vulnerabilità a comportamenti rischiosi come l'abuso di sostanze. Considerando il ruolo neuroprotettivo del BDNF e tenendo in considerazione che BDNF è regolato dall'esposizione a eventi stressanti (Smith et al., 1995), nei nostri esperimenti abbiamo voluto esaminare l'influenza dello stress cronico sulla modulazione di BDNF indotta da cocaina. Abbiamo quindi sottoposto gli animali ad uno stress non prevedibile per due settimane e quindi esposto gli stessi ad un'iniezione acuta di cocaina, esaminando quindi l'espressione di BDNF e delle vie di 'signaling' ad esso sottese nella corteccia prefrontale. I risultati ottenuti dimostrano che, in corteccia prefrontale, lo stress ripetuto altera gli effetti di un'iniezione acuta di cocaina sull'espressione di BDNF e sulle sue vie di 'signaling', rivelando quindi un meccanismo dinamico dell'interazione fra stress e cocaina. In particolare, abbiamo osservato che l'espressione del recettore ad alta affinità del BDNF, trkB, è anch'essa aumentata solamente nel gruppo degli animali non stressati; inoltre, all'attivazione del sistema BDNF-trkB sembra corrispondere un aumento selettivo dell'attivazione della via di trasduzione mediata dalle MAP chinasi, in particolar

modo della via mediata da ERK 1/2 che è aumentata, anch'essa selettivamente, negli animali non sottoposti a stress, mentre nessun cambiamento è stato osservato per le altre vie di 'signaling' attivate dal BDNF, cioè la PI-3 chinasi e la via della fosfolipasi C γ . Inoltre, l'evidenza che gli animali stressati ripetutamente mantengano la capacità di rispondere all'esposizione acuta a cocaina, come evidenziato dall'aumento dei livelli di messaggero di Arc, implica che lo stress non interferisce con i meccanismi di attivazione corticale dimostrando la specificità della regolazione di BDNF da parte di uno stress ripetuto. Come già anticipato, è noto che lo stress rappresenta un fattore di rischio per l'abuso di sostanze; tuttavia, a livello preclinico, poco è stato fatto per comprendere i meccanismi alla base di tale interazione. Infatti, nel caso specifico dell'interazione stress-cocaina, è noto che lo stress aumenta il desiderio incoercibile di abuso di cocaina (Sinha et al., 2006) ma non ne sono noti i meccanismi molecolari. L'aumento di espressione di BDNF in corteccia prefrontale osservato negli animali non sottoposti a stress ripetuto potrebbe rappresentare un meccanismo difensivo messo in atto come conseguenza dell'esposizione allo psicostimolante oppure potrebbe rappresentare l'inizio di una cascata di eventi neuroplastici necessari per attivare i meccanismi di ricompensa propri delle sostanze d'abuso. Sulla base dell'intrinseca natura della neurotrofina è possibile ipotizzare che, a differenza dell'esposizione cronica a cocaina che può causare cambiamenti adattativi presumibilmente responsabili dei fenomeni di dipendenza, l'aumento di espressione di BDNF dopo esposizione acuta potrebbe invece rappresentare una risposta neuroprotettiva, cioè atta a mantenere una corretta omeostasi cellulare nonostante i marcati cambiamenti, ad esempio un aumentato rilascio di neurotrasmettitori, rapidamente provocato dall'esposizione acuta alla cocaina. Tale ipotesi è corroborata dall'evidenza che l'inibizione dell'espressione di BDNF aumenta la citotossicità alla cocaina in cellule in coltura (Yan et al., 2007). E' possibile ipotizzare che, negli animali stressati cronicamente, se il BDNF non può essere reclutato per attenuare il marcato rilascio di neurotrasmettitori (dopamina, glutammato) messo in atto dall'esposizione acuta a cocaina, allora la resilienza cellulare potrebbe essere a rischio; lo stress cronico potrebbe determinare uno stato paragonabile alla tolleranza che, a sua volta, potrebbe aumentare la soglia di attivazione della risposta di tipo neuroprotettivo rendendo quindi l'animale più vulnerabile agli effetti deleteri della cocaina. Nonostante la natura di tale attivazione non sia chiara, come già riportato precedentemente, l'infusione di BDNF in corteccia prefrontale attenua la ricerca di cocaina (Berglind et al., 2007). I nostri risultati, quindi, suggeriscono che il sistema BDNF e le vie di 'signaling' ad esso sottese possono rappresentare un bersaglio vulnerabile da parte di stress cronico ed esposizione a cocaina. Inoltre, questi dati rafforzano l'idea che sia opportuno valutare la risposta a sostanze d'abuso sulla base del contesto ambientale ed in animali che presentano alterazioni comportamentali o molecolari che possono essere riscontrate nell'uomo.

Dopo aver dimostrato che l'espressione di BDNF è alterata dal trattamento acuto o cronico con cocaina identificando quindi tale neurotrofina come uno dei bersagli molecolari attraverso cui lo psicostimolante modifica l'omeostasi cellulare determinando modificazioni neuroplastiche che portano, verosimilmente, alla dipendenza da cocaina, il passaggio successivo è consistito nell'approfondimento di tale ruolo utilizzando un diverso modello animale. Il paradigma che abbiamo utilizzato è quello dell'auto-somministrazione. Tale scelta nasce dalle evidenze, sempre più chiare, che la dipendenza da sostanze d'abuso è un disturbo cronico caratterizzato dalla ricerca compulsiva della sostanza d'abuso e dalla perdita di controllo dell'individuo che non è in grado di porre fine a tale comportamento (Kalivas and O'Brien, 2008; Koob, 2008). La dipendenza da sostanze d'abuso può quindi essere considerato un fenomeno dinamico che, in seguito alla ripetuta assunzione di una determinata sostanza, può indurre processi neuroplastici anomali in specifici circuiti cerebrali che normalmente mediano funzioni fisiologiche quali l'apprendimento di stimoli naturali (cibo, sesso), usurpando quindi tali circuiti dalle proprie normali funzioni. Questi processi neuroadattativi possono guidare la transizione fra un uso sociale della sostanza d'abuso ad un uso incontrollato e potrebbero essere coinvolti nello sviluppo di una perdurante vulnerabilità alla ricaduta qualora venga interrotto l'abuso della sostanza (Kalivas and O'Brien, 2008).

Infatti, gli animali da laboratorio, dai primati fino ai mammiferi filogeneticamente meno evoluti come i roditori, se messi in condizioni opportune, sono disposti ad apprendere e ad attuare comportamenti anche complessi che non necessariamente fanno parte del loro "corredo genetico" (come per esempio premere una leva di una gabbia per il condizionamento operante) per assumere le stesse sostanze psicoattive di cui l'uomo abusa. A questo proposito, nei nostri esperimenti, abbiamo utilizzato un nuovo approccio, differente dalla classica auto-somministrazione, consistente nella cosiddetta 'yoked self-administration' che consiste di tre diversi gruppi sperimentali; in questo paradigma sperimentale si riconoscono 3 attori principali : 1) il ratto cosiddetto 'attivo' che, all'interno della gabbia di auto-somministrazione, preme la leva per ottenere la cocaina, cioè emette un atto operante per raggiungere uno scopo; 2) nella gabbia a fianco, collegata alla gabbia dell'animale attivo, vi è un animale definito 'passivo', il quale riceverà un'iniezione di cocaina alla stessa dose e nello stesso momento in cui il ratto attivo la riceve ma senza aver premuto la leva, cioè senza emettere un atto operante e quindi passivamente e 3) collegata alla gabbia dell'animale attivo, vi è anche una gabbia in cui un terzo ratto riceverà un'iniezione di salina e che fungerà da ratto controllo.

Il primo approccio utilizzando questo specifico paradigma sperimentale ha consistito nell'analisi dell'esposizione acuta alla gabbia di auto-somministrazione. Gli animali che si autosomministrano la cocaina (animali attivi) hanno premuto la leva un numero di volte statisticamente superiore rispetto agli animali passivi ed ai controlli suggerendo che è sufficiente

una singola esposizione alla cocaina nella gabbia di auto-somministrazione per acquisire un comportamento orientato a raggiungere un obiettivo mirato, cioè l'obiettivo di autosomministrarsi la sostanza. Questo comportamento è stato accompagnato da un aumento selettivo del gene precoce Arc nella corteccia prefrontale senza nessuna alterazione, invece, di BDNF. È interessante notare che, in striato, l'espressione del gene precoce Arc è aumentata sia nei ratti attivi che in quelli passivi, in maniera quindi indipendente dal desiderio di autosomministrarsi la sostanza, evidenziando quindi l'effetto farmacologico della sostanza stessa in quest'area caratterizzata da un'elevata densità di terminali dopaminergici. Inoltre tale effetto non dipende dal momento in cui l'animale attivo ha premuto la leva attiva in quanto l'aumento di Arc si è osservato sia negli animali che hanno premuto tale leva immediatamente prima della fine della sessione di auto-somministrazione sia in quelli che, invece, l'hanno premuta 10 minuti prima che la sessione finisse.

Questi risultati dimostrano che l'esposizione ad una singola sessione di auto-somministrazione di cocaina è sufficiente a determinare un comportamento mirato all'ottenimento della sostanza d'abuso e che ciò si esplica in concomitanza con un aumento selettivo di Arc in corteccia prefrontale. Considerando che Arc è stato coinvolto in processi di apprendimento (Bramham et al., 2008) è possibile ipotizzare che tale aumento selettivo svolga un ruolo nella modulazione dell'apprendimento del comportamento di auto-somministrazione. Inoltre questi risultati indicano che è sufficiente una sola esposizione alla cocaina per influenzare le funzioni svolte dalla corteccia prefrontali nei processi di apprendimento. L'evidenza che l'espressione di BDNF non sia modificata in questo paradigma sperimentale, a differenza di quanto osservato finora quando la cocaina era stata somministrata dallo sperimentatore, può essere spiegata prendendo in considerazione la modalità di somministrazione dello psicostimolante. Infatti, la somministrazione da parte dell'operatore, per via intraperitoneale o sottocutanea, implica che, nel momento dell'iniezione, tutta la dose designata venga iniettata nell'animale nell'unità di tempo, per quanto per via sistemica; la modalità di auto-somministrazione, invece, implica che l'animale riceva la dose designata premendo la leva, e non dall'operatore: siccome, però, in quest'ultima condizione sperimentale la cocaina viene iniettata direttamente nel sangue ad ogni pressione della leva, ed è quindi immediatamente biodisponibile, le concentrazioni sono molto inferiori rispetto alla somministrazione intraperitoneale o sottocutanea (ad esempio per via intraperitoneale o sottocutanea la dose più bassa utilizzata nei nostri esperimenti è di 5 mg/kg mentre nel modello dell'auto-somministrazione abbiamo utilizzato 0.25 mg per ogni pressione della leva che hanno portato, nell'arco delle due ore di esposizione alla gabbia di auto somministrazione, ad un 'intake' totale di 5 mg, cioè ciò che lo sperimentatore ha iniettato in una sola volta negli altri esperimenti).

Dato che l'aumento di Arc dopo esposizione singola alla gabbia di auto-somministrazione è stato osservato solamente negli animali attivi e non negli animali passivi e prendendo in

considerazione il ruolo specifico di Arc nell'apprendimento, è difficile dire se l'aumento osservato sia una conseguenza dell'auto-somministrazione di cocaina o sia invece dovuto all'apprendimento che la pressione della leva produce l'iniezione di una sostanza che genera gratificazione per l'animale. L'esposizione di animali assetati all'acquisizione iniziale di un paradigma di pressione di una leva per ottenere acqua come ricompensa determina l'aumento dei livelli di messaggero che codifica per Arc suggerendo quindi che Arc sia un substrato importante per la plasticità sinaptica associata con l'acquisizione di nuovi comportamenti (Kelly and Deadwyler, 2002), anche se è indubbio che esistano differenze essenziali tra i due rinforzi costituiti dall'acqua e dalla cocaina: infatti, l'acqua, che rappresenta un bisogno primario per la sopravvivenza, produce una ricompensa che può essere 'processata' in aree cerebrali non tradizionalmente considerate mesocorticolimbiche mentre la cocaina, che rappresenta un rinforzo artificiale, opera primariamente, sebbene non esclusivamente, attraverso il sistema mesocorticolimbico (Kelley and Berridge, 2002).

Successivamente, abbiamo analizzato l'espressione della neurotrofina BDNF e del gene precoce Arc in questo stesso modello dopo esposizione ripetuta di 14 giorni, sacrificando l'animale immediatamente oppure 24 ore dopo l'ultima esposizione nella gabbia di auto-somministrazione. Come già osservato dopo l'esposizione acuta, l'animale attivo preme la leva attiva in maniera significativamente più elevata rispetto alla leva inattiva suggerendo, e confermando, che l'animale sottoposto a questa procedura ha acquisito un comportamento orientato a raggiungere l'obiettivo di autosomministrarsi la sostanza. Dopo l'esposizione ripetuta alla gabbia di auto-somministrazione abbiamo analizzato l'espressione di BDNF in due aree principali: la corteccia prefrontale, coinvolta nell'apprendimento e già ampiamente esaminata negli esperimenti precedenti, e il nucleo accumbens, la cui attivazione caratterizza il processo di dipendenza. I nostri risultati dimostrano che l'espressione di BDNF è aumentata in maniera tempo- e area cerebrale-dipendente. Infatti, il sacrificio immediatamente successivo al termine dell'ultima sessione di auto-somministrazione ha mostrato che l'espressione di BDNF è aumentata solamente nel nucleo accumbens senza effetti in corteccia prefrontale mentre il sacrificio 24 ore dopo la fine della sessione di auto-somministrazione ha indicato che l'espressione di BDNF è aumentata in corteccia prefrontale ma non nel nucleo accumbens. E' interessante notare che, in entrambi gli esperimenti, l'espressione di BDNF aumenta nelle due aree sia nel gruppo degli animali attivi che in quello degli animali passivi suggerendo che, almeno in questi due condizioni sperimentali (14 giorni di auto-somministrazione, 0,25 mg di cocaina/pressione della leva e sacrificio 2 o 24 ore dopo l'ultima esposizione), tale espressione sia da mettere in relazione con l'azione farmacologica della sostanza d'abuso piuttosto che al desiderio di autosomministrarsi la sostanza o all'apprendimento di un comportamento che determina gratificazione. Tuttavia non possiamo escludere che aumentando la durata del

trattamento (nel nostro caso abbiamo scelto 14 giorni in quanto esperimenti preliminari avevano dimostrato che dopo due settimane il comportamento di auto-somministrazione è ormai consolidato e poco variabile da un animale ad un altro) oppure la quantità di sostanza che gli animali ricevono ad ogni pressione della leva non sia possibile osservare differenze di espressione di BDNF fra gli animali attivi e passivi.

Inoltre, un dato interessante che emerge da questo studio è che il nucleo accumbens sembra mediare la modulazione di BDNF dovuta alla cocaina circolante nell'organismo, dato che l'espressione della neurotrofina risulta modificata in quest'area solamente quando gli animali sono sacrificati immediatamente dopo la fine dell'ultima sessione di auto-somministrazione mentre la corteccia prefrontale media la modulazione a medio-termine di BDNF, siccome in questa area cerebrale i cambiamenti della neurotrofina si osservano solamente 24 ore dopo l'ultima sessione di auto-somministrazione. Tuttavia, sulla base dei nostri dati, non possiamo escludere che l'aumento di BDNF osservato dopo 24 ore rappresenti l'inizio di un processo di astinenza piuttosto che l'effetto della sostanza che, dopo 24 ore, non dovrebbe essere più circolante a livello cerebrale.

E' inoltre interessante notare che, a differenza di quanto osservato per BDNF, l'esposizione ripetuta di cocaina attraverso la modalità di auto-somministrazione non modifica l'espressione di Arc suggerendo quindi una desensibilizzazione dei meccanismi che avevano determinato l'aumento di Arc dopo la singola esposizione e confermando il suo potenziale ruolo come proteina coinvolta nell'apprendimento rapido di un comportamento mediato dalla cocaina.

In conclusione, i nostri esperimenti hanno dimostrato che la somministrazione di cocaina modula l'espressione di BDNF secondo un profilo che dipende dal numero di somministrazioni della sostanza e dalla tipologia della via di somministrazione della stessa indicando che la via di somministrazione è una variabile importante per studiare il coinvolgimento di proteine o vie di 'signaling' nel meccanismo d'azione delle sostanze d'abuso. La somministrazione di cocaina modifica l'espressione di BDNF in maniera regione cerebrale-dipendente suggerendo che, per quanto BDNF sia pressoché ubiquitario nel Sistema Nervoso Centrale, diverse sostanze d'abuso, con un diverso profilo recettoriale, possono indurre cambiamenti diversi e quindi, potenzialmente, avere una diversa rilevanza funzionale. L'analisi, parallela a quella della neurotrofina BDNF, di un gene precoce come Arc ha permesso di identificare questo gene precoce come un importante determinante molecolare di plasticità sinaptica, importante per processi di apprendimento conseguenti all'esposizione acuta allo psicostimolante.

Inoltre, i nostri esperimenti hanno dimostrato che il contesto è cruciale per determinare i cambiamenti di espressione di cocaina; infatti in condizioni di stress cronico il sistema risponde prevenendo, o eliminando, l'aumento acuto di espressione di BDNF in corteccia prefrontale che potrebbe rivestire un ruolo protettivo, cioè di mantenimento dell'omeostasi cellulare in

conseguenza dell'aumentato efflusso di neurotrasmettitori potenzialmente neurotossici come dopamina e glutammato dopo esposizione a cocaina. Tale diversa modulazione di BDNF in corteccia prefrontale potrebbe costituire un importante cambiamento molecolare prodotto dallo stress e spiegare, almeno in parte, l'aumentata predisposizione al consumo di cocaina causato da situazioni stressanti.

E' importante ricordare che sia la neurotrofina BDNF che il gene precoce Arc, oltre alle funzioni classicamente loro attribuite, e cioè le proprietà neuroprotettive di BDNF e le proprietà come indice di attività neuronale di Arc, svolgono un ruolo nei processi di apprendimento. A questo proposito bisogna considerare che una delle teorie della dipendenza più recenti suggerisce che le sostanze d'abuso possano ingaggiare le stesse vie di trasduzione del segnale che vengono utilizzate dall'apprendimento fisiologico e dalla plasticità attività-dipendente (Kelley, 2004; Robinson and Kolb, 2004) quindi usurpando il normale funzionamento dei 'networks' sinaptici. A questo riguardo, Kolb e collaboratori (Kolb et al., 2003) hanno dimostrato che la somministrazione precedente di cocaina è in grado di alterare successive esperienze di apprendimento modulate dalla corteccia prefrontale da diversi stimoli pro-cognitivi. Su questa base è possibile ipotizzare che gli aumenti di espressione di BDNF e di Arc possano elevare la soglia, oppure rappresentare uno stimolo interferente, per l'apprendimento fisiologico che potrebbe essere compromesso a causa di una sorta di saturazione sinaptica conseguente all'aumento di queste due proteine. Seppur altamente speculativo, è possibile ipotizzare quindi che l'individuo dipendente dalla cocaina non sia in grado di interrompere questa deleteria abitudine perchè non più in grado di apprendere che è un'esperienza dannosa in quanto i meccanismi preposti a tale apprendimento sono ormai saturi, e quindi mal funzionanti, come conseguenza dell'esposizione cronica allo psicostimolante.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adams DJ and Bradley A (2002) Induced mitotic recombination: a switch in time. *Nat Genet* **30**(1):6-7.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K and Timmusk T (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* **85**(3):525-535.
- Altar CA, Boylan CB, Jackson C, Hershenson S, Miller J, Wiegand SJ, Lindsay RM and Hyman C (1992) Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23):11347-11351.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM and Wiegand SJ (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* **389**(6653):856-860.
- Antelman SM, Eichler AJ, Black CA and Kocan D (1980) Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. *Science* **207**(4428):329-331.
- Ayoubi TA and Van De Ven WJ (1996) Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J* **10**(4):453-460.
- Bahi A, Boyer F, Chandrasekar V and Dreyer JL (2008) Role of accumbens BDNF and TrkB in cocaine-induced psychomotor sensitization, conditioned-place preference, and reinstatement in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **199**(2):169-182.
- Baker DA, McFarland K, Lake RW, Shen H, Tang XC, Toda S and Kalivas PW (2003) Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat Neurosci* **6**(7):743-749.
- Barde YA (1988) What, if anything, is a neurotrophic factor? *Trends Neurosci* **11**(8):343-346.
- Bardo MT and Bevins RA (2000) Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)* **153**(1):31-43.
- Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, Storm DR, Neve RL, Yin JC, Zachariou V and Nestler EJ (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17):11435-11440.
- Benowitz LI and Routtenberg A (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* **20**(2):84-91.
- Berglind WJ, See RE, Fuchs RA, Ghee SM, Whitfield TW, Jr., Miller SW and McGinty JF (2007) A BDNF infusion into the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking in rats. *Eur J Neurosci* **26**(3):757-766.
- Berhow MT, Hiroi N and Nestler EJ (1996) Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J Neurosci* **16**(15):4707-4715.
- Beurrier C and Malenka RC (2002) Enhanced inhibition of synaptic transmission by dopamine in the nucleus accumbens during behavioral sensitization to cocaine. *J Neurosci* **22**(14):5817-5822.

- Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, Yan Z, Sagawa ZK, Ouimet CC, Nairn AC, Nestler EJ and Greengard P (2001) Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* **410**(6826):376-380.
- Bisaga A, Popik P, Bernalov AY and Danysz W (2000) Therapeutic potential of NMDA receptor antagonists in the treatment of alcohol and substance use disorders. *Expert Opin Investig Drugs* **9**(10):2233-2248.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Haganir RL and Worley PF (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**(6622):284-288.
- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A and Wibrand K (2010) The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* **200**(2):125-140.
- Bramham CR and Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* **76**(2):99-125.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ and Guzowski JF (2008) The immediate early gene arc/arg3.1: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* **28**(46):11760-11767.
- Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A and Nestler EJ (2007) Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for DeltaFosB stability. *Eur J Neurosci* **25**(10):3009-3019.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS and Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* **28**(8):436-445.
- Carlezon WA, Jr. and Nestler EJ (2002) Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci* **25**(12):610-615.
- Carlezon WA, Jr., Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL and Nestler EJ (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* **282**(5397):2272-2275.
- Chiamulera C, Epping-Jordan MP, Zocchi A, Marcon C, Cottiny C, Tacconi S, Corsi M, Orzi F and Conquet F (2001) Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat Neurosci* **4**(9):873-874.
- Chiaruttini C, Sonogo M, Baj G, Simonato M and Tongiorgi E (2008) BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol Cell Neurosci* **37**(1):11-19.
- Churchill L, Swanson CJ, Urbina M and Kalivas PW (1999) Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem* **72**(6):2397-2403.
- Colby CR, Whisler K, Steffen C, Nestler EJ and Self DW (2003) Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. *J Neurosci* **23**(6):2488-2493.
- Cole RL, Konradi C, Douglass J and Hyman SE (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* **14**(4):813-823.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM and Varon S (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* **17**(7):2295-2313.
- Crawford CA, Choi FY, Kohutec JL, Yoshida ST and McDougall SA (2004) Changes in PKA activity and Gs alpha and Golf alpha levels after amphetamine- and cocaine-induced behavioral sensitization. *Synapse* **51**(4):241-248.

- Cunha C, Brambilla R and Thomas KL (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* **3**:1.
- Desdouits F, Cohen D, Nairn AC, Greengard P and Girault JA (1995) Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase I in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**(15):8772-8778.
- Dewart T, Frank B and Schmeidler J (2006) The impact of 9/11 on patients in New York City's substance abuse treatment programs. *Am J Drug Alcohol Abuse* **32**(4):665-672.
- DeWit DJ, MacDonald K and Offord DR (1999) Childhood stress and symptoms of drug dependence in adolescence and early adulthood: social phobia as a mediator. *Am J Orthopsychiatry* **69**(1):61-72.
- Di Chiara G, Loddo P and Tanda G (1999) Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biol Psychiatry* **46**(12):1624-1633.
- Dluzen DE, McDermott JL and Anderson LI (2001) Tamoxifen diminishes methamphetamine-induced striatal dopamine depletion in intact female and male mice. *J Neuroendocrinol* **13**(7):618-624.
- Duman RS and Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* **59**(12):1116-1127.
- Eisch AJ, Bolanos CA, de Wit J, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, Verhaagen J and Nestler EJ (2003) Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry* **54**(10):994-1005.
- Everitt BJ and Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* **22**(9):3312-3320.
- Filip M, Faron-Gorecka A, Kusmider M, Golda A, Frankowska M and Dziedzicka-Wasylewska M (2006) Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Res* **1071**(1):218-225.
- Ford JD, Elhai JD, Ruggiero KJ and Frueh BC (2009) Refining posttraumatic stress disorder diagnosis: evaluation of symptom criteria with the National Survey of Adolescents. *J Clin Psychiatry* **70**(5):748-755.
- Ghasemzadeh MB, Permenter LK, Lake R, Worley PF and Kalivas PW (2003) Homer1 proteins and AMPA receptors modulate cocaine-induced behavioural plasticity. *Eur J Neurosci* **18**(6):1645-1651.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM and Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**(6566):606-612.
- Goldberg TE and Weinberger DR (2004) Genes and the parsing of cognitive processes. *Trends Cogn Sci* **8**(7):325-335.
- Graham DL, Edwards S, Bachtell RK, DiLeone RJ, Rios M and Self DW (2007) Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat Neurosci* **10**(8):1029-1037.
- Grignaschi G, Burbassi S, Zennaro E, Bendotti C and Cervo L (2004) A single high dose of cocaine induces behavioural sensitization and modifies mRNA encoding GluR1 and GAP-43 in rats. *Eur J Neurosci* **20**(10):2833-2837.
- Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su TP and Shaham Y (2003) Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after

- withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci* **23**(3):742-747.
- Haapasalo A, Sipola I, Larsson K, Akerman KE, Stoilov P, Stamm S, Wong G and Castren E (2002) Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *J Biol Chem* **277**(45):43160-43167.
- Hamamura T and Fibiger HC (1993) Enhanced stress-induced dopamine release in the prefrontal cortex of amphetamine-sensitized rats. *Eur J Pharmacol* **237**(1):65-71.
- Haney M, Maccari S, Le Moal M, Simon H and Piazza PV (1995) Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. *Brain Res* **698**(1-2):46-52.
- Hansson AC, Sommer WH, Metsis M, Stromberg I, Agnati LF and Fuxe K (2006) Corticosterone actions on the hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression are mediated by exon IV promoter. *J Neuroendocrinol* **18**(2):104-114.
- Horger BA, Iyasere CA, Berhow MT, Messer CJ, Nestler EJ and Taylor JR (1999) Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* **19**(10):4110-4122.
- Hyman SE and Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* **2**(10):695-703.
- Izzo E, Martin-Fardon R, Koob GF, Weiss F and Sanna PP (2002) Neural plasticity and addiction: PI3-kinase and cocaine behavioral sensitization. *Nat Neurosci* **5**(12):1263-1264.
- Jacobs EH, Smit AB, de Vries TJ and Schoffelmeer AN (2003) Neuroadaptive effects of active versus passive drug administration in addiction research. *Trends Pharmacol Sci* **24**(11):566-573.
- Jones S and Bonci A (2005) Synaptic plasticity and drug addiction. *Curr Opin Pharmacol* **5**(1):20-25.
- Kabbaj M, Norton CS, Kollack-Walker S, Watson SJ, Robinson TE and Akil H (2001) Social defeat alters the acquisition of cocaine self-administration in rats: role of individual differences in cocaine-taking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* **158**(4):382-387.
- Kalivas PW (2004) Recent understanding in the mechanisms of addiction. *Curr Psychiatry Rep* **6**(5):347-351.
- Kalivas PW and Duffy P (1989) Similar effects of daily cocaine and stress on mesocorticolimbic dopamine neurotransmission in the rat. *Biol Psychiatry* **25**(7):913-928.
- Kalivas PW and O'Brien C (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* **33**(1):166-180.
- Kelley AE (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* **44**(1):161-179.
- Kelley AE and Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* **22**(9):3306-3311.
- Kelly MP and Deadwyler SA (2002) Acquisition of a novel behavior induces higher levels of Arc mRNA than does overtrained performance. *Neuroscience* **110**(4):617-626.
- Kelz MB, Chen J, Carlezon WA, Jr., Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, Steffen C, Zhang YJ, Marotti L, Self DW, Tkatch T, Baranaukas G, Surmeier DJ, Neve RL, Duman RS, Picciotto MR and Nestler EJ (1999) Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* **401**(6750):272-276.

- Kerns RT, Ravindranathan A, Hassan S, Cage MP, York T, Sikela JM, Williams RW and Miles MF (2005) Ethanol-responsive brain region expression networks: implications for behavioral responses to acute ethanol in DBA/2J versus C57BL/6J mice. *J Neurosci* **25**(9):2255-2266.
- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E and Cobb MH (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**(4):605-615.
- Kleven MS, Perry BD, Woolverton WL and Seiden LS (1990) Effects of repeated injections of cocaine on D1 and D2 dopamine receptors in rat brain. *Brain Res* **532**(1-2):265-270.
- Kolb B, Gorny G, Li Y, Samaha AN and Robinson TE (2003) Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18):10523-10528.
- Koob GF (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* **654**:171-191.
- Koob GF (2008) A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* **59**(1):11-34.
- Koob GF and Nestler EJ (1997) The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **9**(3):482-497.
- Koob GF and Swerdlow NR (1988) The functional output of the mesolimbic dopamine system. *Ann N Y Acad Sci* **537**:216-227.
- Kufahl PR, Li Z, Risinger RC, Rainey CJ, Wu G, Bloom AS and Li SJ (2005) Neural responses to acute cocaine administration in the human brain detected by fMRI. *Neuroimage* **28**(4):904-914.
- Kuo YM, Liang KC, Chen HH, Cherng CG, Lee HT, Lin Y, Huang AM, Liao RM and Yu L (2007) Cocaine-but not methamphetamine-associated memory requires de novo protein synthesis. *Neurobiol Learn Mem* **87**(1):93-100.
- Le Foll B, Diaz J and Sokoloff P (2005) A single cocaine exposure increases BDNF and D3 receptor expression: implications for drug-conditioning. *Neuroreport* **16**(2):175-178.
- Lessmann V, Gottmann K and Malsangio M (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* **69**(5):341-374.
- Levi-Montalcini R and Hamburger V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* **116**(2):321-361.
- Leyton M and Stewart J (1990) Preexposure to foot-shock sensitizes the locomotor response to subsequent systemic morphine and intra-nucleus accumbens amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* **37**(2):303-310.
- Li M, Hou YY, Lu B, Chen J, Chi ZQ and Liu JG (2009) Expression pattern of neural synaptic plasticity marker-Arc in different brain regions induced by conditioned drug withdrawal from acute morphine-dependent rats. *Acta Pharmacol Sin* **30**(3):282-290.
- Liu QR, Lu L, Zhu XG, Gong JP, Shaham Y and Uhl GR (2006) Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res* **1067**(1):1-12.
- Liu QS, Pu L and Poo MM (2005) Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons. *Nature* **437**(7061):1027-1031.
- Lu L, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM and Shaham Y (2004) A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *J Neurosci* **24**(7):1604-1611.
- Lubin FD, Roth TL and Sweatt JD (2008) Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* **28**(42):10576-10586.

- Lucas M, Frenois F, Vouillac C, Stinus L, Cador M and Le Moine C (2008) Reactivity and plasticity in the amygdala nuclei during opiate withdrawal conditioning: differential expression of c-fos and arc immediate early genes. *Neuroscience* **154**(3):1021-1033.
- Madden C, Oei TP and Singer G (1983) The 'direct' pharmacological effects of heroin on operant responding and activity: the yoked-operant procedure. *Psychopharmacology (Berl)* **80**(4):331-337.
- Markou A, Weiss F, Gold LH, Caine SB, Schulteis G and Koob GF (1993) Animal models of drug craving. *Psychopharmacology (Berl)* **112**(2-3):163-182.
- Mayr B and Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(8):599-609.
- McFarland K, Lapish CC and Kalivas PW (2003) Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* **23**(8):3531-3537.
- McGinty JF, Whitfield TW, Jr. and Berglind WJ (2010) Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Res* **1314**:183-193.
- McGough NN, He DY, Logrip ML, Jeanblanc J, Phamluong K, Luong K, Kharazia V, Janak PH and Ron D (2004) RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci* **24**(46):10542-10552.
- Meredith GE, Callen S and Scheuer DA (2002) Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. *Brain Res* **949**(1-2):218-227.
- Minichiello L (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* **10**(12):850-860.
- Mizuno M, Yamada K, Takei N, Tran MH, He J, Nakajima A, Nawa H and Nabeshima T (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. *Mol Psychiatry* **8**(2):217-224.
- Molteni R, Calabrese F, Racagni G, Fumagalli F and Riva MA (2009) Antipsychotic drug actions on gene modulation and signaling mechanisms. *Pharmacol Ther* **124**(1):74-85.
- Moratalla R, Vallejo M, Elibol B and Graybiel AM (1996) D1-class dopamine receptors influence cocaine-induced persistent expression of Fos-related proteins in striatum. *Neuroreport* **8**(1):1-5.
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG and Murphy RA (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* **276**(16):12660-12666.
- Narita M, Aoki K, Takagi M, Yajima Y and Suzuki T (2003) Implication of brain-derived neurotrophic factor in the release of dopamine and dopamine-related behaviors induced by methamphetamine. *Neuroscience* **119**(3):767-775.
- Nestler EJ (1992) Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* **12**(7):2439-2450.
- Nestler EJ (2001) Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* **10**(3):201-217.
- Nestler EJ and Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* **278**(5335):58-63.
- Nestler EJ, Terwilliger RZ, Walker JR, Sevarino KA and Duman RS (1990) Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain. *J Neurochem* **55**(3):1079-1082.

- Opazo P, Watabe AM, Grant SG and O'Dell TJ (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J Neurosci* **23**(9):3679-3688.
- Otten U, Ehrhard P and Peck R (1989) Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(24):10059-10063.
- Pacchioni AM, Gioino G, Assis A and Cancela LM (2002) A single exposure to restraint stress induces behavioral and neurochemical sensitization to stimulating effects of amphetamine: involvement of NMDA receptors. *Ann N Y Acad Sci* **965**:233-246.
- Pandey SC, Zhang H, Roy A and Misra K (2006) Central and medial amygdaloid brain-derived neurotrophic factor signaling plays a critical role in alcohol-drinking and anxiety-like behaviors. *J Neurosci* **26**(32):8320-8331.
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C and Sheng M (2003) Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature* **424**(6949):677-681.
- Pattabiraman PP, Tropea D, Chiaruttini C, Tongiorgi E, Cattaneo A and Domenici L (2005) Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol Cell Neurosci* **28**(3):556-570.
- Peakman MC, Colby C, Perrotti LI, Tekumalla P, Carle T, Ulery P, Chao J, Duman C, Steffen C, Monteggia L, Allen MR, Stock JL, Duman RS, McNeish JD, Barrot M, Self DW, Nestler EJ and Schaeffer E (2003) Inducible, brain region-specific expression of a dominant negative mutant of c-Jun in transgenic mice decreases sensitivity to cocaine. *Brain Res* **970**(1-2):73-86.
- Piazza PV and Le Moal M (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* **19**(2):67-74.
- Pierce RC, Pierce-Bancroft AF and Prasad BM (1999) Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *J Neurosci* **19**(19):8685-8695.
- Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ and Carlezon WA, Jr. (2001) Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci* **21**(18):7397-7403.
- Pum M, Carey RJ, Huston JP and Muller CP (2007) Dissociating effects of cocaine and d-amphetamine on dopamine and serotonin in the perirhinal, entorhinal, and prefrontal cortex of freely moving rats. *Psychopharmacology (Berl)* **193**(3):375-390.
- Purves D, Snider WD and Voyvodic JT (1988) Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* **336**(6195):123-128.
- Robinson TE and Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* **18**(3):247-291.
- Robinson TE and Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**:33-46.
- Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B, Miller GW and Caron MG (1998) Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci* **1**(2):132-137.
- Rozeske RR, Der-Avakian A, Bland ST, Beckley JT, Watkins LR and Maier SF (2009) The medial prefrontal cortex regulates the differential expression of morphine-conditioned place preference following a single exposure to controllable or uncontrollable stress. *Neuropsychopharmacology* **34**(4):834-843.

- Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Morrison JH, Malenka RC and Nestler EJ (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci* **33**(6):267-276.
- Saal D, Dong Y, Bonci A and Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* **37**(4):577-582.
- Sanna PP, Cammalleri M, Berton F, Simpson C, Lutjens R, Bloom FE and Francesconi W (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci* **22**(9):3359-3365.
- Santi S, Cappello S, Riccio M, Bergami M, Aicardi G, Schenk U, Matteoli M and Canossa M (2006) Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *EMBO J* **25**(18):4372-4380.
- Saylor AJ and McGinty JF (2008) Amphetamine-induced locomotion and gene expression are altered in BDNF heterozygous mice. *Genes Brain Behav* **7**(8):906-914.
- Schaaf MJ, De Kloet ER and Vreugdenhil E (2000) Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress* **3**(3):201-208.
- Schmitt KC and Reith ME (2010) Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* **1187**:316-340.
- Segal RA (2003) Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci* **26**:299-330.
- Segal RA and Greenberg ME (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* **19**:463-489.
- Shaywitz AJ and Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* **68**:821-861.
- Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T and Ghosh A (1998) Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* **20**(4):727-740.
- Shippenberg TS and Rea W (1997) Sensitization to the behavioral effects of cocaine: modulation by dynorphin and kappa-opioid receptor agonists. *Pharmacol Biochem Behav* **57**(3):449-455.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS and Duman RS (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* **22**(8):3251-3261.
- Sinha R (2001) How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* **158**(4):343-359.
- Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ and Rounsaville BJ (2006) Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry* **63**(3):324-331.
- Sinha R and Li CS (2007) Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. *Drug Alcohol Rev* **26**(1):25-31.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R and Post RM (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* **15**(3 Pt 1):1768-1777.
- Sorg BA and Kalivas PW (1993) Effects of cocaine and footshock stress on extracellular dopamine levels in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* **53**(3):695-703.
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC and Greengard P (2004) DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**:269-296.

- Swanson CJ, Baker DA, Carson D, Worley PF and Kalivas PW (2001) Repeated cocaine administration attenuates group I metabotropic glutamate receptor-mediated glutamate release and behavioral activation: a potential role for Homer. *J Neurosci* **21**(22):9043-9052.
- Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* **76**(1):1-10.
- Tabuchi A, Sakaya H, Kisukeda T, Fushiki H and Tsuda M (2002) Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *J Biol Chem* **277**(39):35920-35931.
- Tang WX, Fasulo WH, Mash DC and Hemby SE (2003) Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims. *J Neurochem* **85**(4):911-924.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A and Hempstead BL (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* **25**(22):5455-5463.
- Thomas MJ and Malenka RC (2003) Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1432):815-819.
- Timmusk T, Belluardo N, Metsis M and Persson H (1993) Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Neurosci* **5**(6):605-613.
- Tongiorgi E, Domenici L and Simonato M (2006) What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development. *Mol Neurobiol* **33**(1):17-32.
- Ulery PG, Rudenko G and Nestler EJ (2006) Regulation of DeltaFosB stability by phosphorylation. *J Neurosci* **26**(19):5131-5142.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC and Bonci A (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* **411**(6837):583-587.
- Unterwald EM, Cox BM, Kreek MJ, Cote TE and Izenwasser S (1993) Chronic repeated cocaine administration alters basal and opioid-regulated adenylyl cyclase activity. *Synapse* **15**(1):33-38.
- Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R and Caboche J (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* **20**(23):8701-8709.
- Valjent E, Corvol JC, Trzaskos JM, Girault JA and Herve D (2006) Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci* **7**:20.
- Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA and Caboche J (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci* **19**(7):1826-1836.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslin H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Herve D and Girault JA (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2):491-496.
- Vanderschuren LJ and Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* **151**(2-3):99-120.

- Vargas-Perez H, Ting AKR, Walton CH, Hansen DM, Razavi R, Clarke L, Bufalino MR, Allison DW, Steffensen SC and van der Kooy D (2009) Ventral tegmental area BDNF induces an opiate-dependent-like reward state in naive rats. *Science* **324**(5935):1732-1734.
- Vlodavsky I, Bar-Shavit R, Ishai-Michaeli R, Bashkin P and Fuks Z (1991) Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? *Trends Biochem Sci* **16**(7):268-271.
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS and Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**(1):73-82.
- Wang H, Hu Y and Tsien JZ (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* **79**(3):123-135.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X and Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20):11024-11031.
- White FJ and Kalivas PW (1998) Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* **51**(1-2):141-153.
- Williams JT, Christie MJ and Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* **81**(1):299-343.
- Wolf ME (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* **54**(6):679-720.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL and Lu B (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* **8**(8):1069-1077.
- Xu M, Guo Y, Vorhees CV and Zhang J (2000) Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Res* **852**(1):198-207.
- Yamada K and Nabeshima T (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* **91**(4):267-270.
- Yamada M, Ohnishi H, Sano S, Nakatani A, Ikeuchi T and Hatanaka H (1997) Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* **272**(48):30334-30339.
- Yan QS, Feng MJ and Yan SE (2007) RNA interference-mediated inhibition of brain-derived neurotrophic factor expression increases cocaine's cytotoxicity in cultured cells. *Neurosci Lett* **414**(2):165-169.
- Zachariou V, Georgescu D, Sanchez N, Rahman Z, DiLeone R, Berton O, Neve RL, Sim-Selley LJ, Selley DE, Gold SJ and Nestler EJ (2003) Essential role for RGS9 in opiate action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23):13656-13661.
- Zhang X, Mi J, Wetsel WC, Davidson C, Xiong X, Chen Q, Ellinwood EH and Lee TH (2006) PI3 kinase is involved in cocaine behavioral sensitization and its reversal with brain area specificity. *Biochem Biophys Res Commun* **340**(4):1144-1150.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA and Montminy M (2005) Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12):4459-4464.