



Università degli Studi di Palermo

**DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE E
DISTURBI DEL COMPORTAMENTO**

Ciclo XXIV

**SELECTIVE DECREASE OF DENDRITIC SPINES IN THE NUCLEUS
ACCUMBENS OF ETHANOL DEPENDENT RATS.**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/06 ANATOMIA COMPARATA e CITOLOGIA

Presentata da:

Dott.ssa Giovanna Mulas

Coordinatore Dottorato:

Prof. Carla Cannizzaro

Relatore:

Prof. Carla Cannizzaro

Abstract	3
Introduzione	4
Etanolo: generalità	4
Metabolismo dell' etanolo	5
La Dopamina e il sistema Meso-Cortico-Limbico	7
Spine Dendritiche	12
Post Synaptic Density	15
Scopo della ricerca	16
Materiali e metodi	18
Risultati	24
Induzione della dipendenza da etanolo	24
Densità delle spine e immunoreattività della TH e della PSD-95	24
Conta dettagliata delle spine	27
Discussione	29
Bibliografia	34

Abstract

Neuronal refinement and stabilization are hypothesized to confer resilience to poor decision-making and addictive-like behaviors, such as excessive ethanol drinking and dependence. Accordingly, structural abnormalities are likely to contribute to the appearance of alcohol withdrawal signs and symptoms, that occur from suddenly ceasing the use of alcohol after chronic ingestion, thus perpetuating the addictive cycle. Here we show that ethanol dependent rats display a loss of dendritic spines in medium spiny neurons of the Nacc, accompanied by a reduction of TH-positive terminals and PSD-95 positive elements. Further analysis indicates that ‘long thin’, but not ‘mushroom’, spines are selectively affected. These changes are restricted to the withdrawal phase of ethanol dependence suggesting their relevance in the genesis of signs and/or symptoms affecting ethanol withdrawal, and thus the whole addicting cycle. Overall these results highlight the importance of spine function on the evolution of alcohol dependence and suggest that the selective loss of ‘long thin’ spines may affect learning dysfunctions and significantly contribute to further ‘impoverish’ the already deficient dopaminergic transmission whose hypofunctionality is a major factor for the emergence of the harmful consequences of alcohol abuse/dependence.

INTRODUZIONE

E' opinione comune che molte sostanze d'abuso, come l'alcol, siano in grado di indurre forme aberranti di plasticità sinaptica (Melis et al.,2005; Kalivas and Brady,2012). L'alcolismo è un disturbo neuropsichiatrico, caratterizzato da assunzione cronica, astinenza e ricaduta di etanolo (Crews et al., 1996; Fadda and Rossetti, 1998; Nestler and Aghajanian, 1997). L'etanolo dal punto di vista farmacologico viene classificato tra i farmaci in grado di deprimere le funzioni del sistema nervoso centrale. A un suo valore terapeutico estremamente limitato si contrappone un potenziale d'abuso molto elevato. Gli effetti indotti nell'uomo da tale sostanza sono fortemente dipendenti dalla quantità assunta. A basse dosi, si possono produrre effetti lievi, essenzialmente a livello gastrointestinale, cardiovascolare e sul SNC. A dosi più alte si osservano effetti euforici, ansiolitici e stimolanti, che sono i principali responsabili del suo ampio utilizzo. A dosi ancora più elevate l'etanolo offusca la memoria e il giudizio, riduce i tempi di reazione e disinibisce comportamenti impulsivi e aggressivi.

Etanolo: generalità

L'etanolo è una molecola organica costituita da una corta catena alifatica con due atomi di carbonio e un gruppo ossidrilico. La contemporanea presenza delle componenti sia idrossilica sia etilica conferiscono alla molecola proprietà sia idrofile

che lipofile: l'etanolo è pertanto un anfotero, caratteristica importante per la sua attività biologica.

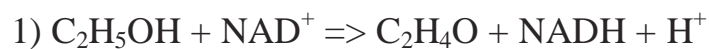
Metabolismo dell'etanolo

Il 90-95% dell'etanolo assunto viene metabolizzato dal fegato, la rimanente parte dallo stomaco, dal rene, dai polmoni e dai muscoli. Il metabolismo avviene principalmente a carico di enzimi deidrogenasici. Nel fegato, viene metabolizzato da tre sistemi enzimatici diversi. Il primo e più importante vede coinvolte due deidrogenasi:

1) alcol deidrogenasi

2) aldeide deidrogenasi

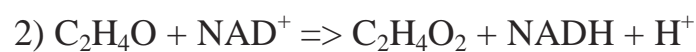
Questo sistema, localizzato nel citosol, metabolizza circa il 90% della dose di alcol che arriva al fegato. La prima reazione trasforma l'alcol in acetaldeide con liberazione di idrogeno e consumo di NAD^+ :



Etanolo

Acetaldeide

La seconda trasforma l'acetaldeide in acetato con liberazione di H^+ e consumo ancora di NAD^+ :



Acetaldeide

Acetato

Queste due ossidazioni portano allo sbilanciamento del rapporto NAD^+/NADH e all'eccesso di H^+ all'interno della cellula. Ciò comporta un aumento dell'acidità intracellulare cui conseguono una serie di contromisure che la cellula mette in atto per rialzare il pH, come il blocco della via metabolica che dal piruvato porta alla formazione di glucosio deviandola verso la formazione di acido lattico. Questa inversione metabolica porta ad alcune importanti conseguenze, in particolare all'ipoglicemia che assume particolare importanza nell'intossicazione acuta. La malnutrizione spesso associata ai pazienti alcolisti porta a un'ulteriore riduzione delle riserve glucidiche senza che queste possano essere ripristinate con un introito esogeno né con la gluconeogenesi, in quanto bloccata a livello del piruvato. A dosi elevate di etanolo sono sufficienti 14-16 ore di digiuno per avere una ipoglicemia sintomatica. L'eccesso di acido lattico intracellulare può inoltre provocare acidosi lattica interferendo con l'escrezione renale degli acidi ed in particolare dell'acido urico, provocando la comparsa di gotta. Anche l'ossidazione degli acidi grassi viene compromessa. Infatti gli H^+ in eccesso entrano nei mitocondri dove vengono utilizzati in alternativa agli H^+ prodotti dal metabolismo degli acidi grassi. Questa via viene quindi bloccata e si crea un eccesso di grassi che si depositano nel fegato determinando steatosi e dando inizio al danno epatico da alcol.

Il secondo sistema è costituito dagli enzimi microsomiali o MEOS e tale sistema è rappresentato in maggioranza da una NADPH-ossidasi. Il citocromo P4502E1 ha un'alta affinità per l'alcol e anche in questo caso lo trasforma in acetaldeide e acqua.



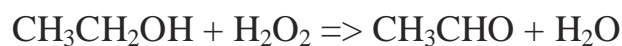
Etanolo

Acetaldeide

Il MEOS è un sistema inducibile ed è quindi capace di aumentare la sua attività in caso di aumentata richiesta; negli alcolisti infatti avviene che la sua funzione aumenti di 2-3 volte per eliminare più velocemente tutto l'alcol presente.

Il CitP-450 e in generale la catena respiratoria mitocondriale se stimolati in eccesso o in carenza di sostanze antiossidanti, come avviene nell'etilismo cronico, producono nella cellula un accumulo di radicali liberi. In particolare risultano in eccesso lo ione superossido, i radicali idrossilici e il perossido di idrogeno, molecole estremamente reattive capaci, a livello cellulare, di causare gravi alterazioni nella permeabilità di membrana, nei segnali intracellulari e nella sintesi proteica.

L'ultimo sistema metabolico dell'alcol, che però partecipa solo in minima parte al suo metabolismo, è rappresentato da una catalasi che porta alla seguente reazione:



Etanolo

Acetaldeide

La dopamina e il sistema dopaminergico meso-cortico-limbico

Sin dalla sua scoperta (Carlsson et al.,1957), la dopamina (DA) ha attratto l'attenzione della comunità scientifica per il ruolo che svolge nelle più nobili funzioni del sistema nervoso. La stragrande quantità di proiezioni DAergiche è di origine mesencefalica e, a tutt'oggi sono state identificate 4 principali vie DA-ergiche nel cervello dei mammiferi: quella nigro-striatale dall' area A9 o Substantia Nigra pars

compacta (SNc), quella mesolimbica e mesocorticale dall'area A10 o Area Ventrotegmentale (VTA) e la tubero infundibolare dall'area A8 o retrorubrica (Anden et al.,1964; Dahlstroem and Fuxe, 1964). La via mesolimbica proietta fibre DAergiche alle aree subcorticali e limbiche mentre quella mesocorticale proietta principalmente al giro del cingolo, alla corteccia entorinale e a quella prefrontale mediale.

Poiché la DA è coinvolta in una varietà di funzioni critiche, che vanno da semplici funzioni motorie a funzioni cognitive superiori, non sorprende che molte gravi malattie dipendano da sue disregolazioni. Infatti la patologia di Parkinson (PD) origina da una perdita di neuroni DA-ergici nella substantia nigra pars compacta (SNc) (Ehringer and Hornykiewicz, 1960), mentre l'“ipotesi dopaminergica” è la più conosciuta e, probabilmente, ancora la più accreditata nell'eziopatogenesi della schizofrenia (Snyder et al 1960; Creese et al 1976; Seeman et al 1976; Carlsson et al 2001). Una Disregolazione DA-ergica sembra sia alla base sia della sindrome di Tourette (Mink, 2006; Swanson et al., 2007; Gize et al., 2009) che di quella di Auntingon (Jakel and Maragos, 2000; Cyr et al., 2006). Sono stati dimostrati inoltre meccanismi di plasticità anomala del sistema della ricompensa associato all' utilizzo di droghe e alla tossicodipendenza suggerendo fortemente che la DA giochi un ruolo importante in queste condizioni patologiche (Hyman et al., 2006; Di Chiara and Bassareo,2007; Koob and Volkow,2010).

Tra le aree del cervello coinvolte nella via DAergica mesolimbica il nucleo Accumbens (Nacc) è probabilmente uno dei più importanti. Esso occupa la parte

ventrale del nucleo striato ed è fortemente coinvolto nell'attuarsi di comportamenti tendenti a preservare la propria sopravvivenza soddisfacendo bisogni primari come la fame, la sete, la ricerca di calore e gli impulsi sessuali ed elaborando strategie riproduttive come le cure parentali ricevendo in premio stimoli gratificanti. In questo circuito si inserisce "abusivamente" il piacere derivato dal consumo di sostanze che, sono in grado di stimolare tale circuito permettendo all'organismo di provare un'insieme di sensazioni fisiche ed emotive che vengono identificate come piacevoli. Il piacere quindi è in grado di fornire, soprattutto nei mammiferi non umani, l'incentivo all'azione e spesso la stessa motivazione finale del comportamento. Il Nacc è a sua volta, suddiviso in due sub-aree morfologicamente e funzionalmente distinte: la shell e il core. Mentre nel core risiedono funzioni prevalentemente sensorie e comportamenti stereotipati di tipo Pavloviano, la shell, al contrario, sembra essere maggiormente implicata nei comportamenti motivati che prevedono una ricompensa (reward). Grazie a queste caratteristiche, da molti autori, la shell del Nacc, è considerata una estensione dell'amigdala (Heimer et al.,1991). In altre parole la shell farebbe parte di un insieme di formazioni sottocorticali che dal punto di vista filogenetico derivano dal complesso nucleare principale dell' amigdala, ma che si estendono al di fuori dei suoi confini. Nel Nacc, e più in generale in tutto lo striato, la maggior parte (circa il 96%) delle cellule nervose è rappresentata da neuroni spinosi di taglia media (MSN) che utilizzano l'acido γ -amminobutirrico (GABA) come neurotrasmettitore. L'attività del Nacc è fortemente modulata da proiezioni contenenti glutammato (GLU) e dopamina (DA). Queste proiezioni originano da

regioni corticali e limbiche e convergono in un comune target post-sinaptico cioè nei MSNs. Qui, questi neurotrasmettitori si integrano in un delicato equilibrio di eccitazione ed inibizione che viene modificato quando il sistema è soggetto a stimoli volti a favorire la sopravvivenza e l'adattamento all'ambiente. Di conseguenza le interazioni tra DA e GLU sono alla base delle funzioni comunemente ascritte al Nacc come il già citato comportamento motivato da stimoli gratificanti o/e anche le funzioni motorie (Pulvirenti et al.,2001; Javitt et al.,2011).

Fisiologicamente la DA nella shell viene liberata quando si va incontro a stimoli naturali nuovi e salienti, ma anche quando si utilizzano farmaci e sostanze d'abuso che inducono dipendenza come la cocaina, l'eroina, l'amfetamina, la nicotina, l'alcool e il tetraidrocannabinolo. Sembra che, proprio questo aumento di concentrazioni di DA nella Shell, sia alla base del piacere prodotto da queste sostanze. Una volta che la DA viene rilasciata dai terminali pre-sinaptici, attiva una serie di recettori accoppiati a proteine G chiamati D₁,D₂,D₃,D₄ e D₅. Questi recettori possono essere divisi in due grandi sottofamiglie: i recettori D₁ (che comprendono i D₁ e i D₅) e i recettori D₂ (che comprendono i D₂, i D₃ e i D₄) (Andersen et al., 1990; Niznik and Van Tol, 1992; Sibley and Monsma, 1992; Vallone et al.,2000). Questa classificazione è generalmente basata sulla capacità della DA di modulare l'attività dell' cAMP (Spano et al.,1978). I membri delle due sottofamiglie di recettori D₁ e D₂ possiedono distinte proprietà farmacologiche. Infatti quelli appartenenti al gruppo dei D₁ attivano la stimolazione di cAMP e si trovano in neuroni post-sinaptici dopaminocettivi come i MSNs dello striato, mentre i recettori della classe D₂ si accoppiano a

famiglie di proteine G che inducono l' inibizione dell' adenilato ciclasi e si trovano sia nei neuroni DA-ergici pre-sinaptici che in quelli dopamino-cettivi post-sinaptici (Usiello et al., 2000; De Mei et al.,2009). In base al tipo di recettore che esprimono e in relazione alle loro proiezioni i MSNs sono divisi principalmente in due gruppi. Quelli che esprimono il recettore D₁ proiettano al globo pallido mediale ed alla SNr mentre, i MSNs che proiettano al globo pallido laterale selettivamente esprimono recettori D₂ formando la via indiretta striato-pallido. Questa via raggiunge indirettamente la SNr attraverso il globo pallido e i nuclei subtalamicici. Oltre a questi, esistono popolazioni di MSNs che esprimono entrambi questi recettori ma la loro percentuale è relativamente bassa almeno nello striato dorsale (5-15%) (Valjent et al., 2009). Nello striato, i recettori D₁ sono espressi in circa il 50% dei MSNs (Gerfen,1992) e sono localizzati soprattutto nelle spine, nei rami dendritici e meno comunemente nel soma (Levey et al.,1993; Bergson et al.,1995). Al contrario, i recettori D₅ sono localizzati soprattutto nel tronco dendritico (Bergson et al.,1995), dove peraltro si trovano la maggioranza delle sinapsi GABAergiche. Questa segregazione topografica dei D₁ e dei D₅ suggerisce che questi recettori medino distinte funzioni eccitatorie e inibitorie rispettivamente.

I recettori D₂ postsinaptici sembrano essere disposti in un profilo post-sinaptico sovrapponibile ai recettori D₁.

Un importante sottoinsieme di spine sono innervate simultaneamente da terminali DA-ergici e GLU-ergici (Freund et al.,1984; Goldman-Rakic et al.,1989). Qui il cosiddetto “ microcircuito striatale” o “ triade sinaptica” (Freund et al.,1984; Carr e

Seasack,1996) è caratterizzato da una doppia e reciproca interazione tra gli afferenti DA e GLU. Mentre i primi producono contatti sinaptici con il collo delle spine, i secondi raggiungono la testa delle stesse (Freund et al.,1984) dove sono contenuti entrambi i recettori. Questi recettori, fisicamente confinati nella parte apicale delle spine possono condizionarne le proprietà biofisiche in relazione a vari processi cognitivi e motivazionali che vengono mediati.

Spine dendritiche

Le spine dendritiche sono il maggior sito delle sinapsi eccitatorie nel sistema nervoso centrale dei mammiferi (Harris and Kater,1994; Nimchisky et al.,2002). La maggior parte delle spine mature sono costituite da una testa connessa al tronco dendritico da un sottile collo. Queste strutture sono molto importanti per l'efficienza e la funzione neuronale, infatti, ricevendo ed elaborando il segnale, migliorano la connettività e l'associatività tra i neuroni aumentando enormemente la quantità di membrana a disposizione del neurone. Nel cervello dei mammiferi adulti, le spine dendritiche sono strutture estremamente dinamiche e soggette a cambiamenti fisiologici rapidi sia in numero, forma e dimensioni svolgendo una importante funzione di formazione, mantenimento e rimodellamento delle sinapsi (Harris and Kater, 1994). Come delle vere e proprie unità funzionali e strutturali le spine dendritiche contengono materiale flocculante e reticolo endoplasmatico liscio. Inoltre possono essere presenti l'apparato del Golgi, mitocondri, endosomi, proteosomi e filamenti di actina.

Esaminando le spine al microscopio, è immediatamente evidente la grande eterogeneità di forme e dimensioni che queste presentano. Possono quindi essere classificate in diverse maniere ad esempio in “spine grandi” e “spine piccole” oppure, in relazione alla presenza o assenza di microtubuli in “spine mature” o “immature”. Peters e Kaiserman-Abramof nel 1969 proposero un tipo di classificazione che riprendesse sia la forma (presenza o meno della testa) che le dimensioni: Long thin (spine grandi e mature con un collo lungo e una testa ben evidente), mushroom (spine grandi e mature con una grossa testa e un collo corto) e le stubby (spine piccole e immature con collo e testa non distinguibili). A queste sono state recentemente aggiunte i filopodia (spine immature lunghe e sottili con testa non distinguibile) (Jones and Powell, 1996).

Nonostante questa classificazione tenti di mettere un po' di ordine, è probabile che queste differenti forme non siano altro che diversi gradi di sviluppo, le spine sono quindi in grado di trasformarsi rapidamente ad es. da immature a mature, da long thin a mushroom e viceversa a seconda delle esigenze. La loro formazione, eliminazione e morfologia sono regolate sia durante lo sviluppo che l'accrescimento dell'individuo attraverso l'esperienza sensoriale (Alvarez and Sabatini, 2007). Grazie allo studio della corteccia cerebrale di topi si è potuto dimostrare che le spine dendritiche grandi sono più stabili di quelle piccole e riescono a persistere per mesi (Trachtenberg et al., 2002; Grutzendler et al., 2002; Matsuzaki et al., 2001, 2004; Kasai et al., 2003). La dinamicità e la forma delle spine possono essere implicate in due fondamentali fenomeni quali l'apprendimento e la memoria (Kasai et al., 2003). Le spine grandi e

mature (mushroom), formando connessioni sinaptiche più stabili rappresenterebbero la traccia fisica della memoria a lungo termine, mentre le spine sottili (long thin), più mobili e instabili e formando connessioni più deboli, dovrebbero essere coinvolte nell'apprendimento (Holtmaat et al., 2005).

Rispetto a tutto ciò, un aspetto importante riguarda le dimensioni della testa e del collo. Infatti, il volume della testa pare essere direttamente proporzionale alla dimensione della densità postsinaptica (Freire, 1978) di cui parleremo in seguito, al numero di recettori post-sinaptici, alle dimensioni del terminale presinaptico (Spacek and Hartmann, 1983; Peters, 1987), al numero presinaptico di vescicole, e quindi alla quantità di neurotrasmettitori prontamente rilasciabile (Spacek and Hartmann, 1983; Harris and Stevens, 1988; Nusser et al., 1998; Schikorski and Stevens, 2001). Studi recenti hanno dimostrato che anche il numero dei recettori AMPA glutamatergici è direttamente correlato con le dimensioni della testa (Matsuzaki et al., 2001.; Kasai et al., 2003) e di come questa correlazione influisce sul fenomeno del potenziamento a lungo termine. Anche le dimensioni del collo sono estremamente importanti, infatti la sua presenza (Koch and Zador 1993) renderebbe possibile la formazione di un microambiente biochimicamente isolato dal resto della cellula, rallentando la diffusione dei metaboliti all'interno della spina. In tal modo le spine possono funzionare come compartimenti biochimici separati e a sé stanti. Nondimeno, in questa zona della spina, risiedono probabilmente meccanismi funzionali, in grado di stabilire un controllo attivo sulla trasmissione dell'impulso.

Esistono diverse ipotesi sulla nascita e la morte delle spine dendritiche (Jones and Powell,1969) e alcune di queste si incentrano sui filopodia. Queste formazioni sottili e immature sono infatti dotate di una notevole mobilità e sono capaci di apparire e scomparire in pochi minuti (Dailey and Smith, 1996). Esistono almeno due tipi di filopodia, quelli posizionati apicalmente al ramo dendritico, implicati nella ramificazione e nella modellazione dell'albero dendritico, e quelli distribuiti lungo il ramo dendritico, implicati nella sinaptogenesi (Yuste and Bonhoeffer,2004; Dailey and Smith 1996; Sotelo,1978; Miller and Peters 1981; Yuste and Bonhoeffer, 2004; Konur and Yuste, 2004).

Post synaptic density

La più importante specializzazione ultrastrutturale delle spine è la post-synaptic-density (PSD), un organello a forma di disco, elettrondenso, localizzato giusto al di sotto della membrana della testa delle spine. Questa è un assemblaggio macromolecolare contenente 400-500 proteine (Jordan et al.,2004; Peng et al., 2004) tra le quali si trovano, canali ionici, proteine chinasi, fosfatasi, componenti citoscheletriche, proteine coinvolte nel trafficking membranale, recettori GLU-ergici (Jordan et al.,2004; Peng et al.,2004) e non di rado i recettori DA-ergici (Yamauchi, 2002). Tutto ciò è tenuto insieme in una complessa intelaiatura formata da un gruppo di proteine come la post-synaptic-density 95(PSD-95) (Kennedy,2000; Kim and Sheng,2004). Quindi si pensa che la PSD possa essere una collezione di elaboratori di

segnale associati al mantenimento e alla plasticità delle funzioni sinaptiche (Peng et al.,2004). La composizione e l'organizzazione della PSD non è statica ma subisce elaborazioni dinamiche (Ehlers, 2003) che possono essere alla base dell'attività della sinapsi e della plasticità strutturale delle spine (Alvarez and Sabatini,2007).

Scopo della ricerca

Alla luce delle informazioni e delle considerazioni fatte nella parte introduttiva,nel presente lavoro, abbiamo tentato di investigare le possibili alterazioni prodotte dall'astinenza da etanolo sulla trasmissione mesocorticolimbica, analizzando due elementi critici la cui presenza è strettamente correlata rispettivamente con la funzione DA-ergica e GLU-ergica: le fibre positive alla tirosina idrossilasi (TH) e la Post Synaptic Density-95 (PSD-95). La PSD-95 è presente nelle sinapsi GLU-ergiche e interagisce direttamente con i recettori NMDAR specialmente durante lo sviluppo delle sinapsi. Inoltre, la densità e morfologia delle spine in MSN della shell del Nacc è stato studiato per ottenere intuizioni strutturali negli elementi pre e post sinaptici della triade sinaptica simultaneamente. Sebbene sia stato considerato impossibile fino a poco tempo fa (Lee et al., 2006) abbiamo sviluppato un nuovo metodo (Spiga et al.,2011) che ci ha permesso di visualizzare i più piccoli dettagli morfologici dei neuroni spinosi (Golgi-Cox staining) assieme agli elementi neuronali immunofluorescenti studiati. Sfruttando questo approccio siamo stati in grado di visualizzare (nella stessa sezione), la morfologia delle spine dendritiche, le

fibre positive alla TH- e gli elementi positivi alla PSD-95 per raccogliere informazioni sulla trasmissione DA-ergica e GLU-ergica, rispettivamente.

MATERIALI E METODI

Il nostro studio è stato eseguito in conformità alla legge italiana DL 116, 1992, che consente la sperimentazione su animali da laboratorio solo dopo la presentazione e l'approvazione di un progetto di ricerca da parte del Ministero della Salute (Roma, Italia), e in stretto accordo con le direttive del Consiglio Europeo (n. 2007/526/ CE). Ogni procedura è stata eseguita con l'obiettivo di minimizzare la sofferenza ed il disagio degli animali e di ridurre il più possibile il numero degli animali utilizzati.

Animali

Per il nostro studio abbiamo utilizzato 25 ratti Wistar maschi (Harlan, Udine, Italia), del peso di 125-155 g, all'inizio del trattamento, sono stati alloggiati individualmente in gabbie di plexiglas e alimentati con una dieta liquida, continuamente disponibile, preparata come segue: 910-970 ml latte intero fresco di vacca, (CoaPla, Italy), 5000 IU/l vitamina A e 17 g zucchero. Questa miscela fornisce 1000.7 kcal/l, ed è preparata giornalmente secondo il metodo di Uzbay e colleghi (Uzbay et al 1995). Le condizioni ambientali sono state monitorate e tenute sotto controllo (temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$; umidità 60-65%) con un ciclo luce/buio nell'arco delle 12h .

Induzione della dipendenza da etanolo

La dipendenza da etanolo è stata indotta alimentando i ratti con una dieta liquida (Uzbay et al 1995). La dieta è stata progressivamente arricchita con 2.4%, 4.8% e 7.2% di etanolo e somministrata per 20 giorni. Il peso dei ratti è stata registrato ogni giorno, così come l'assunzione del liquido, espressa in ml. L'assunzione di etanolo giornaliera è stata misurata ed espressa in g per kg. Anche i ratti di controllo (CTRL) (n = 8) sono stati alimentati con la dieta liquida. Dopo la sospensione della dieta arricchita con l'etanolo, a 12 ore dalla sua sospensione, sono stati osservati per 5 minuti in una camera di osservazione i segni di astinenza, compresi i tremori del corpo, rigidità della coda, irritabilità al tatto (vocalizzazione) e retrazione degli arti ventro-mediale (VmLR). I segni di astinenza sono stati segnati utilizzando una scala di valutazione adattata da Macey e colleghi (Macey et al.,1996) come segue: 0 = nessun segno, 1 = moderato, 2 = severo. Per misurare le risposte di ansia-simile, è stata utilizzato il test elevated plus maze (EPM). L'apparecchiatura consiste di 2 braccia aperte in Plexiglass grigie (passerelle) e 2 braccia chiuse nere (gallerie con pareti alte 40 cm), disposte a croce in modo tale che i rispettivi bracci siano opposti l'uno all'altro. Il test è durato 5 minuti ed è iniziato quando l'animale è stato posto al centro della croce, con il muso rivolto verso un braccio aperto. Per misurare lo stato d'ansia dei vari gruppi è stata analizzata, la percentuale di tempo trascorso nelle braccia aperte e il numero degli accessi alle braccia aperte (Cruz et al.,1994).

Istologia

Golgi-Cox e immunofluorescenza (Spiga et al.,2011)

Dopo gli esperimenti comportamentali, gli animali sono stati trattati nel seguente modo: i ratti sono stati profondamente anestetizzati con cloralio idrato e perfusi intracardialmente con 0.9% di soluzione salina (400 ml) seguita da 4% di paraformaldeide (pH 7.4) (200 ml). I cervelli sono stati accuratamente rimossi dal cranio e post fissati nello stesso fissativo per una notte at 4 C° e poi lavati in 0.4 M Sorenson's Phosphate Buffer (PBS) per almeno due ore (tre cambi 20 minuti ciascuno) per eliminare ogni traccia di fissativo e conservati in 20 ml di soluzione Golgi-Cox (Spiga et al 2011). Successivamente sono stati tagliati in fette coronali spesse 50 µm utilizzando un criostato (Microm Cryo-Star HM 560, Walldorf, Germany). Le fette sono state sviluppate utilizzando la procedura descritta da Kolb e McClimans (1986). Al termine della procedura di Golgi-Cox sopra indicata, le fette sono state raccolte in PB per la successiva immunocolorazione free floating. Le fette sono state lavate in PBS (3 x10 min). Per evitare legame non specifico, le fette sono state pre-incubate in 5% normal goat serum (NGS) containing 5% bovine serum albumin (BSA) and 1% Triton X-100 in PBS per una notte at 4 C°. Le fette sono state poi incubate con anticorpi primari in due combinazioni di protocolli: cocktail di polyclonal rabbit Anti-TH (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Inc), e monoclonal mouse anti PSD-95 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) in PBS per 48 h at 4° C. Tutte le sezioni sono state lavate 3 x 10 min in PBS, e incubate in biotinylated goat anti-mouse (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA) in PBS per 4h at RT. Dopo

questo step, le fette sono state incubate in un cocktail di anticorpi secondari in PBS, Fluorescein-Streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (1:200) e anti-rabbit Alexa Fluor 546 (1:200, Molecular Probes) per 3h at RT e dopo lavate 3 x 10 min in PBS e chiuse con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Classificazione delle spine dendritiche

Abbiamo classificato la tipologia delle spine usando i seguenti criteri (Fig.1):

Stubby : nessuna testa chiaramente distinguibile , lunghezza totale inferiore a 1 μm .

Mushrooms: diametro della testa $>$ del diametro del collo (testa ben visibile) e diametro del collo \leq della sua lunghezza.

Long: diametro della testa $>$ del diametro del collo (testa ben visibile) e il diametro del collo $>$ della sua lunghezza.

Filopodia: diametro della testa almeno uguale al diametro del collo (testa non apprezzabile) lunghezza totale più grande di 1 μm .

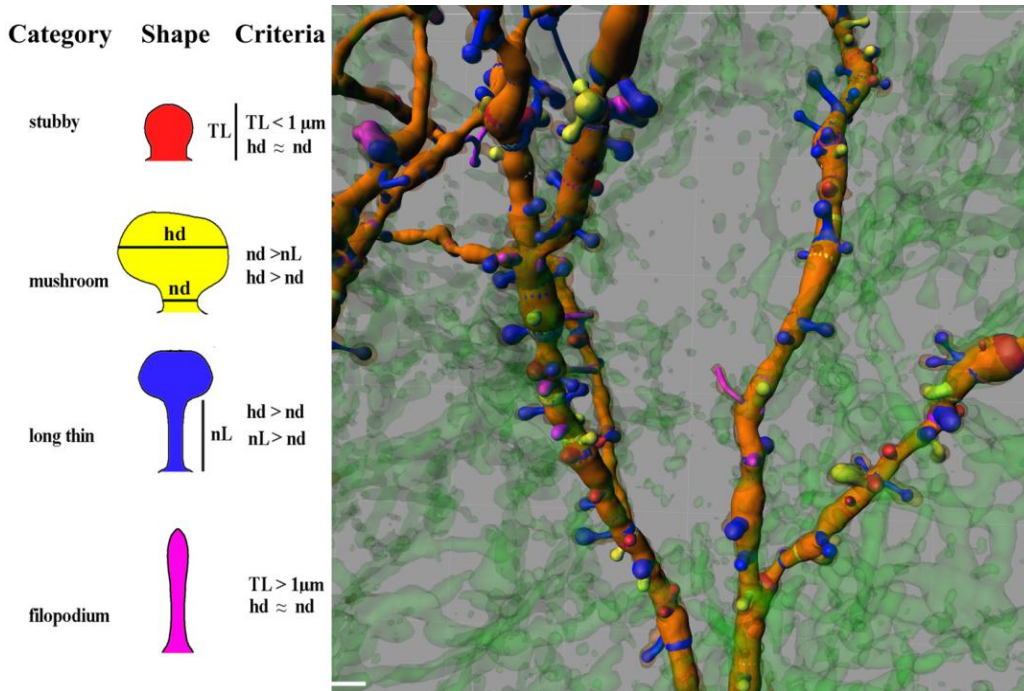


Fig.1. Criterio di classificazione delle spine dendritiche. Nel pannello di sinistra si può notare un esempio di conta automatica

Conte, TH, PSD-95 densità delle spine.

Per le conte, sono state realizzate immagini al confocale, ottenute 24h dopo le procedure di immunofluorescenza. Il volume della TH e della PSD-95 è stato determinato come segue: Per ciascun dataset ($x = 102.4 \mu m$; $y = 102.4 \mu m$; $z=35-40 \mu m$), composto da tre canali separati (fluorescein, rhodamine and reflection), sono state utilizzate quattro aree scelte casualmente di grandezza standard $x= 40 \mu m$; $y= 40 \mu m$; $z=10$ (ROI) (Fig.2). Per ciascuna ROI, selezionando gli oggetti attraverso la soglia di intensità, sono stati creati degli oggetti ed è stato calcolato il loro volume/ROI ($n=120$). Per valutare la densità delle spine, sono stati utilizzati $n=120$ segmenti dendritici (lunghi almeno $20 \mu m$), dei MSNs della shell. Le spine sono

state contate sia manualmente (optimas bioscan v 6.5.1) che automaticamente (filament tool Bitplane Imaris 7.4) (fig 1) . I dendriti primari, i più vicini al soma, non sono stati considerati in quanto innervati principalmente da inputs di origine intrinseca.

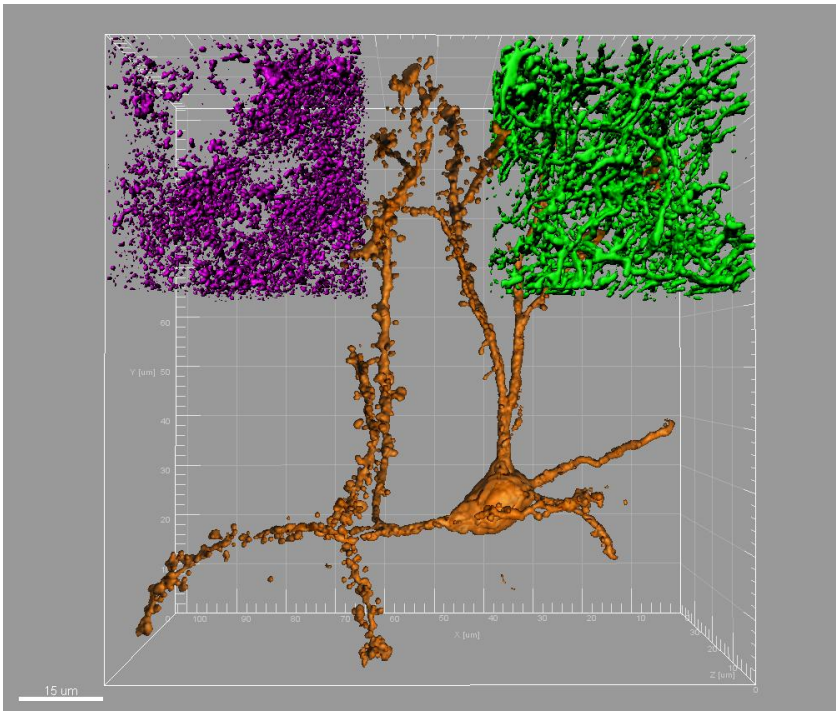


Fig.2. Tipico esempio di ricostruzione 3-D di un MSN impregnato col metodo di Golgi-Cox. In verde e in magenta sono indicati due esempi, rispettivamente di fibre TH-positive e PSD-95.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stata usata l'analisi della varianza (ANOVA) a una e a due vie, seguita dal test post hoc di Tukey o Student *t*. I quattro differenti segni di astinenza (Vocalization, Tail Rigidity, Body Tremors and VmLR) sono stati assegnati individualmente dopo 12 ore usando test non parametrici Mann-Whitney U-test. Tutti i valori sono espressi come media \pm SEM.

RISULTATI

Induzione della dipendenza da etanolo.

Il consumo giornaliero di etanolo (da 2.4 a 7.2%) era compreso tra 11.33 ± 0.26 e 18.76 ± 1.01 g/kg. Il test ANOVA a una via ha confermato un aumento significativo del consumo di etanolo durante l' esposizione [$F_{1,32} = 5.23$, $p < 0.0001$].

L' U-Mann-Whitney test, utilizzato per comparare i cambiamenti comportamentali (scores) durante l' astinenza da etanolo, tra i gruppi EtOH-W contro EtOH-CHR e CTRL dopo 12 ore, ha rivelato significativi segni di astinenza ($p < 0.001$). L' ANOVA a due vie ha indicato differenze significative nel test open arms tra i gruppi EtOH-W rispetto ai gruppi EtOH-CHR e CTRL ($F_{2,22} = 9.86$, $p < 0.001$).

Densità delle spine e immunoreattività della TH e della PSD-95 .

La visualizzazione simultanea dei terminali positivi alla TH, gli antigeni positivi alla PSD-95 e i MSN impregnati (Fig. 2) ci ha permesso di studiare le relazioni qualitative (Fig. 3) e quantitative (Fig.4) tra questi elementi.

Le fibre positive alla TH ,che corrono in direzione caudale-rostrale stabiliscono stretti contatti (*en passant*) con il collo delle spine dendritiche e il tronco dendritico dei

MSNs come atteso (Carr and Sesack,1996). La PSD-95 colocalizzata nei MSNs impregnati, è distribuita, soprattutto nella testa delle spine mature come long thin e mushroom (Fig. 3, b), mentre nelle stubby e nei filopodia la colocalizzazione della PSD-95 è largamente assente.

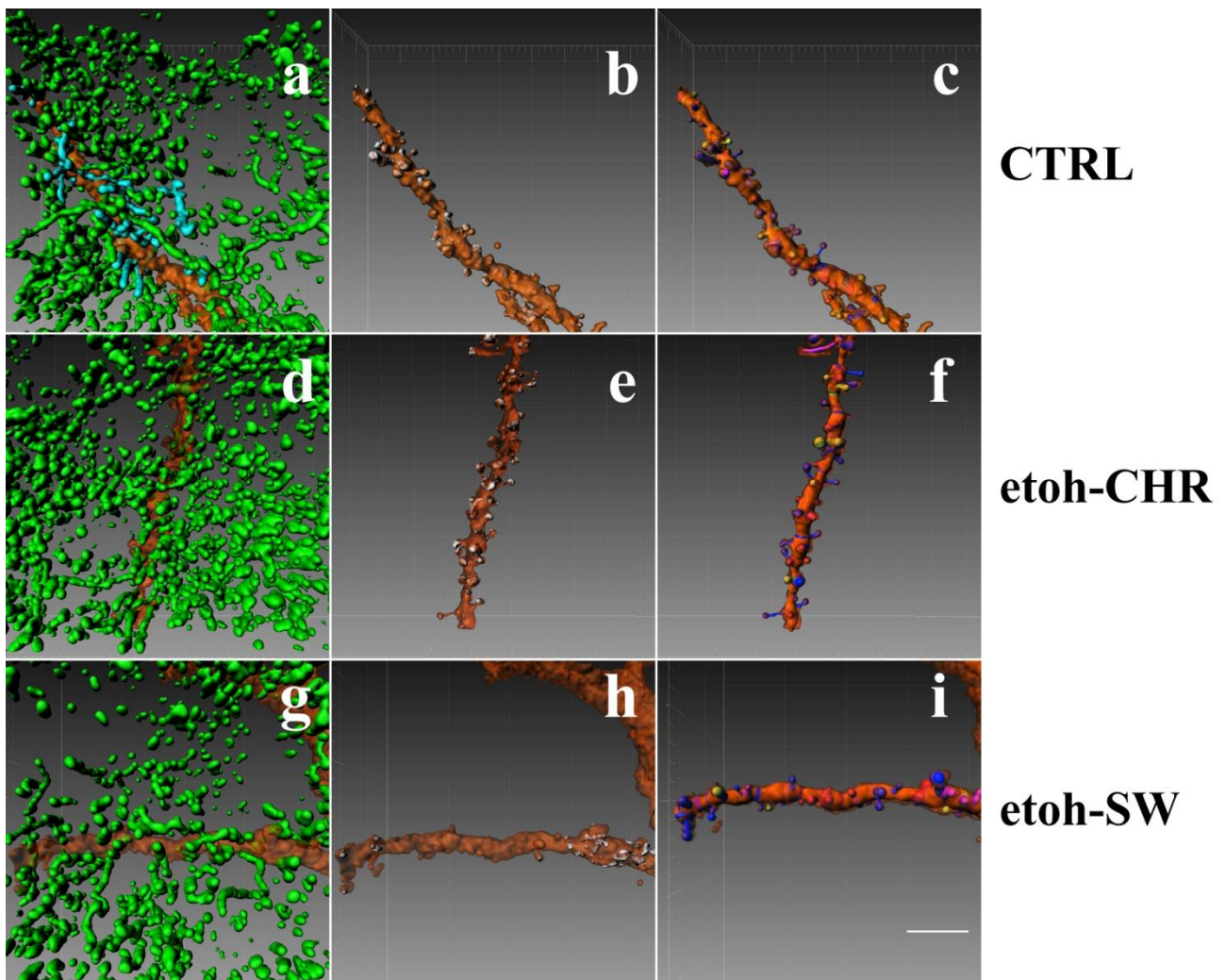


Fig 3. Tronchi dendritici dei MSN (arancio) circondati dalle fibre TH-positive (verde) (colonna A), che contraggono contatti *en passant* (fibre blu mostrate solo nel pannello A CTRL) e la PDS-95 colocalizzata all'interno della testa delle spine dendritiche (bianco) (colonna B). La colonna C mostra un esempio rappresentativo della classificazione delle spine durante i trattamenti (short stubby = rosso; filopodia = rosa ; long-thin=blue; mushroom-like=giallo. Imaris 7.4)

Come mostrato nelle figure 3 and 4, nel gruppo EtOH-W la densità delle fibre positive alla TH e l'immunoreattività della PSD-95 sono risultate entrambe diminuite rispettivamente del 50.7% e 61.2% rispetto al CTRL. In particolare, l'ANOVA calcolata sia per la TH ($F_{170}= 49.97$; $p < 0.0001$) che per la PSD-95 ($F_{128}= 36.89$; $p < 0.0001$) ha rilevato differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali considerati.

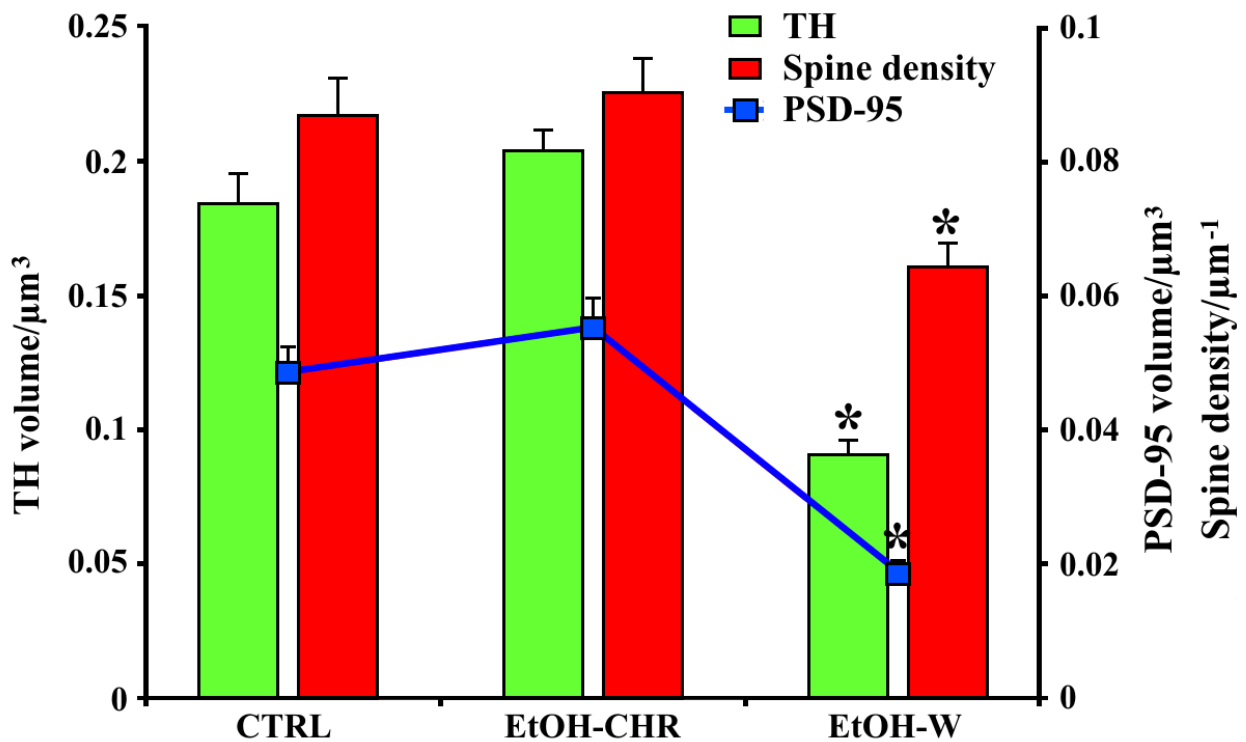


Fig. 4. L'istogramma rappresenta le medie \pm SEM della quantità in TH e PSD-95 (density/volume) e della densità delle spine dendritiche (numero di spine/1 μm nei dendriti di secondo ordine) dei dendriti dei MSN nella shell del Nacc. L'asterisco indica i valori di significatività dell'analisi *post hoc* student *t*-test.

L'analisi *Post hoc* ha mostrato una riduzione selettiva della densità della TH ($t=7.42$; $P<0.0001$) e della PSD-95 ($t=7.01$; $p<0.0001$) nei gruppi EtOH-W rispetto al CTRL. Tuttavia la quantità di fluorescenza della TH e della PSD-95 appare aumentata rispettivamente del 10/13%, al contrario, nessun cambiamento statisticamente rilevante sia per la TH ($t=1.39$; $p=0.17$) che per la PSD-95 è stato riscontrato nel gruppo CHR rispetto al CTRL (Fig. 4). Coerentemente, la densità delle spine dei dendriti di secondo ordine dei MSNs ha mostrato differenze significative tra i gruppi sperimentali ($F_{119}=10.01$; $p<0.0001$). Attraverso l'analisi *Post hoc* si è visto che esiste una riduzione selettiva della densità delle spine in EtOH-W ($t_{78}=3.52$; $P=0.0007$) ma non nel gruppo EtOH-CHR rispetto al CTRL ($t_{78}=0.612$; $P=0.54$) (Fig. 4).

Conta dettagliata della densità delle spine.

Le analisi al confocale del materiale impregnato ha rivelato che le spine long thin sono le spine più comuni nei MSNs dei ratti del gruppo di controllo rappresentando più del 52 % del totale, mentre, le corte ($<1 \mu\text{m}$) spine stubby raggiungono il 27.2%, le spine mushroom l' 11.8 % e i filopodia l' 8.9% di tutte le spine viste (Fig. 5). L'astinenza cronica da etanolo, come mostrato in fig. 5, mostra sostanziali cambiamenti solo nelle spine long thin ($F_{118}=13.3$; $p<0.0001$). In particolare, non sono state trovate differenze statisticamente significative nelle spine stubby ($F_{118}=2.33$; $p=$

0.1), mushroom ($F_{118} = 0.73$; $p = 0.48$) e filopodia ($F_{118} = 0.48$; $p = 0.61$) tra i gruppi trattati. L'analisi Post hoc ha svelato inoltre una riduzione selettiva nella densità delle spine nei ratti EtOH-W rispetto al gruppo CTRL ($t_{78} = 4.78$; $p < 0.0001$).

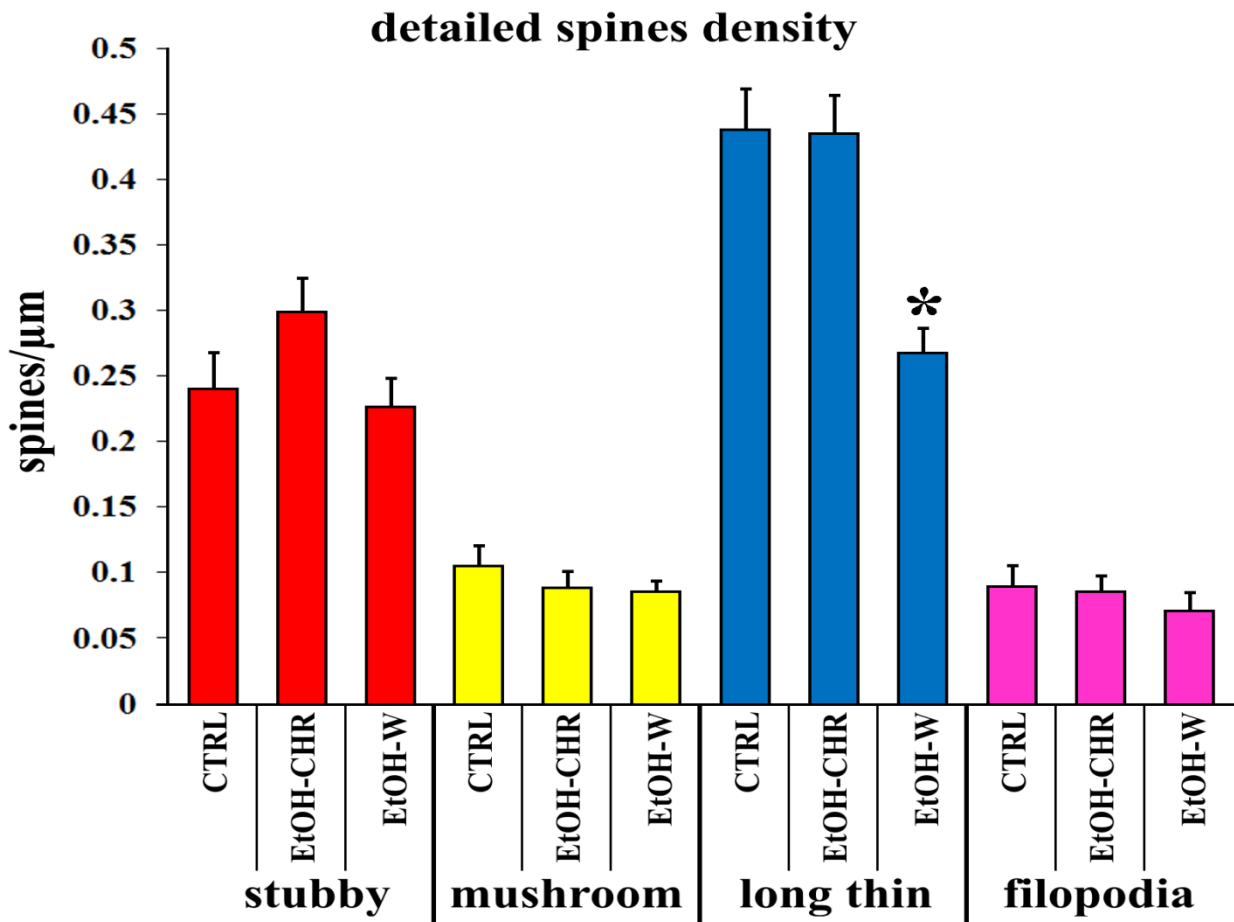


Fig. 5. L'istogramma rappresenta la media \pm SEM della densità delle spine dendritiche classificata per tipo (numero di spine / $1 \mu\text{m}$) dei dendriti di secondo ordine dei MSN della shell del Nacc. l'asterisco indica i valori di significatività dell'analisi *post hoc* student *t*-test.

DISCUSSIONE

Allo scopo di studiare le modificazioni anatomiche che intervengono in alcuni neuroni della via mesolimbica durante le fasi di assunzione cronica e astinenza da etanolo, gli animali sono stati sottoposti all'esposizione di etanolo per 20 giorni e in alcuni di essi (ETOH-W) si è operata una sospensione dell'etanolo stesso inducendo una tipica sindrome di astinenza, come chiaramente indicato dai segni somatici affiancati da comportamenti ansiosi- simili (riduzione in *open arm entries*). Il presente lavoro si basa sulla visualizzazione contemporanea delle spine dendritiche, impregnate con il metodo di Gogli-cox, dell'immunoreattività dalla TH, supponendo la sua presenza nella maggior parte delle fibre dopaminergiche di origine mesencefalica e della PSD-95 che dovrebbe rilevare, in larga parte la presenza di sinapsi prevalentemente glutinergiche nei MSNs della shell del Nacc. L'utilizzo di scansioni al confocale e metodi di impregnazione, che consentono un grande dettaglio, ci ha inoltre permesso di studiare, con un buon grado di precisione, i rapporti anatomici intercorsi tra questi elementi e, utilizzando sistemi morfometrici, anche di classificare le spine dendritiche con un buon grado di precisione. Questa precisione è stata essenziale ad es. nella valutazione delle spine mature. Ciò è stato fatto sia utilizzando le informazioni di tipo morfometrico che studiando i rapporti di colocalizzazione tra le teste delle spine e la PSD-95. Infatti come già detto nell'introduzione, solo le spine mature possiedono

entrambe le condizioni. La scelta della Shell del Nacc è derivata dal fatto che questa piccola porzione dello striato possiede caratteristiche anatomiche e fisiologiche peculiari. Intanto possiede praticamente un solo tipo di neuroni comunque facilmente distinguibile dai pochi Giant Aspinny Neurons. Ciò facilita l'interpretazione della quantificazione della PSD-95 in quanto non può trovarsi in neuroni diversi da quelli considerati se non in misura abbondantemente trascurabile e la sua innervazione DAergica è prevalentemente proveniente dalla VTA. E' stato quindi possibile distinguere i diversi sottotipi di spine col Golgi-Cox e i rapporti che queste stabiliscono con la PSD-95 e le fibre positive alla TH. Nella prima fase di questo lavoro si è operata una semplice conta di densità delle spine dendritiche, del volume della TH e della PSD-95. Ciò ha immediatamente mostrato come l'astinenza sia una fase cruciale dell'intero ciclo della tossicodipendenza da etanolo. Infatti, selettivamente nei ratti che avevano subito una privazione di etanolo si è potuto riscontrare una contemporanea riduzione sia della densità dendritica dei MSNs che del volume della TH e della PSD-95 rispetto ai ratti di controllo. Al contrario i ratti trattati cronicamente non mostravano cambiamenti significativi in nessuno dei parametri osservati. L'astinenza da etanolo è quindi in grado, al pari di altre sostanze d'abuso (Spiga et al., 2003;2005;2010) di produrre effetti di plasticità sinaptica aberrante. La diminuzione delle spine dendritiche non ci ha sorpreso in quanto era già stata osservata svariate volte nei modelli di tossicodipendenza nei roditori (Robinson and Kolb, 1996; Spiga et al., 2003;2005;2010). Anche la riduzione dei marcatori sinaptici, come la PSD-95 era attesa come conseguenza della perdita delle spine che

erano, precedentemente alla loro scomparsa, impegnate in sinapsi. Ugualmente, la perdita di terminali positivi alla TH potrebbe, anche se non è chiara la causa, spiegare in parte la perdita di dopamina extracellulare nel Nacc osservata durante la sindrome di astinenza da etanolo tramite esperimenti di micro dialisi in vivo (Rossetti et al.,1999; Zao et al., 2006). La contemporanea perdita di terminali DAergici indica che esiste un rapporto, forse di causa ed effetto, tra tutti questi elementi presi contemporaneamente. A supporto di questa ipotesi vi sono i numerosi studi che mimando la malattia di Parkinson, utilizzano la 6- idrossi-dopamina nei ratti, e nei quali si è osservata una riduzione nella densità delle spine dendritiche nei MSNs dello striato come probabile conseguenza della deinervazione DAergica. Nella seconda fase di questo lavoro si è provveduto, con qualche difficoltà, alla classificazione delle spine dendritiche dei MSNs durante i trattamenti. Le difficoltà non sono state soltanto di carattere tecnico (scarso potere di risoluzione paragonato alle grandezze in questione) ma soprattutto dovute alla scarsità di dati in letteratura sulla densità dei vari tipi di spine nei MSNs, dati peraltro abbondanti per altre aree del cervello come l'ippocampo e la neocorteccia. Questi dati, perlopiù di carattere prettamente descrittivo, sono stati ottenuti in genere mediante l'utilizzo della microscopia elettronica (TEM), mezzo assolutamente idoneo alla morfologia ma meno pratico quando si debbano elaborare una grande mole di dati. Per questo motivo abbiamo scelto l'utilizzo del CLSM e l'impregnazione di Golgi-Cox per colorare i neuroni. Le spine son state classificate con un sistema semi automatico, utilizzando le loro differenti caratteristiche morfologiche. In pratica si è valutata la

presenza o l'assenza della testa e il rapporto tra il diametro e la lunghezza del collo. La minor precisione delle conte, rispetto al TEM, è stata compensata con una grande quantità di dati elaborati statisticamente. Non ci ha sorpreso che in cellule come i MSNs, in un'area a vocazione prevalentemente limbica, le spine più abbondanti fossero mature e poco stabili come le long thin, mentre le spine mature più stabili come le mushroom sono in numero nettamente inferiore. Queste osservazioni sono in linea con quanto ipotizzato sulla diversa funzione delle spine mature "instabili" e "stabili" o detto con altre parole spine di "apprendimento" e spine di "memoria". Sempre in relazione al ruolo che questi neuroni svolgono in un'area limbica non stupisce che le spine immature, specialmente le stubby siano relativamente in gran numero. Quindi quando abbiamo notato una drammatica e selettiva riduzione delle spine long thin durante l'astinenza da etanolo non siamo rimasti molto sorpresi. Anche la contemporanea scomparsa della PSD-95 conferma il dato precedentemente discusso, infatti questa proteina viene normalmente associata alle spine mature, in quanto è necessaria per la stabilizzazione delle sinapsi cioè per la trasformazione da long thin a mushroom, ed è quindi ragionevole pensare che questa scompaia durante un processo contrario. Anche se ragionevole, resta comunque da dimostrare una diretta relazione tra diminuzione di terminali TH- positivi e la riduzione delle spine long thin. Per questo motivo abbiamo condotto un ulteriore esperimento su topi naive che prevedeva la de-nervazione DAergica mediante somministrazione di MPTP per 5 sett. Anche in questo caso si è osservata, nello striato dorsale (via nigro-striatale) una perdita simile di terminali TH positivi e una riduzione della densità delle spine

dendritiche come probabile diretta conseguenza. Anche in questo caso la classificazione delle spine ha mostrato una riduzione perfettamente sovrapponibile a quella osservata durante l'astinenza da etanolo. Ovviamente quest'ultimo esperimento di per se non è sufficiente a stabilire un certo rapporto di causa ed effetto, ma offre interessanti spunti di riflessione. E' comunque ragionevole pensare che questa riduzione di terminali DAergici non può che riflettersi pesantemente sul delicato rapporto stabilito con i terminali GLUergici in un equilibrio di eccitazione-inibizione tipico delle spine dendritiche in questo distretto anatomico, producendo fenomeni di plasticità aberrante. Un possibile meccanismo che spieghi i dati del nostro studio dovrebbe quindi necessariamente comprendere un certo grado di compromissione del segnale DA con conseguente diminuzione della DA extracellulare (condizione ipodopaminergica), conseguente all'astinenza improvvisa dall'etanolo. Questo sbilanciamento potrebbe quindi alterare il rilascio Glu-ergico da parte dei terminali cortico-striatali sulla testa delle spine long thin, favorendo i cambiamenti nella morfologia delle spine, la loro contrazione veloce e infine il loro collasso. Nell'insieme, queste modificazioni architettoniche nelle connessioni sinaptiche che coinvolgono i tre principali attori della fisiologia del Nacc, possono essere alla base del comportamento aberrante dell'abuso/dipendenza da alcool. Quindi, il ripristino della funzionalità dopaminergica e/o glutammatergica può contribuire a ristabilire la fisiologia delle spine e offrire le basi per nuove possibilità terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez VA, Sabatini BL (2007) Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 30:79–97.
2. Anden NE, Carlsson A, Dahlstroem A, Fuxe K, Hillarp NA, and Larsson K (1964) Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci* 3:523–530.
3. Andersen PH, Gingrich JA, Bates MD, Dearry A, Falardeau P, Senogles SE, and Caron MG (1990) Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol Sci* 11:231–236.
4. Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS(1995) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15:7821–36.
5. Carlsson A, Lindqvist M, and Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.
6. Carlsson A. (2001) A paradigm shift in brain research. *Science*;294:1021–24.

7. Carr D-B, Sesack S-R (1996) Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J Comp Neurol* 369(1):1-15.
8. Cyr M, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, and Caron MG (2006) Dopamine enhances motor and neuropathological consequences of polyglutamine expanded huntingtin. *Faseb J* 20:2541–2543.
9. Creese I, Burt DR, and Snyder SH (1976) Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192: –483.
10. Crews, F. T., Morrow, A. L., Criswell, H. and Breese, G. (1996) 'Effects of ethanol on ion channels'. *Int Rev Neurobiol*, 39, 283-367.
11. Cruz A-P, Frei F, Graeff F-G (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49(1):171-176.
12. Di Chiara G and Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7:69–76.
13. De Mei C, Ramos M, Iitaka C, and Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9:53–58.
14. Dailey, M.E., Smith, S.J., 1996. The dynamics of dendritic structures in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* 16, 2983–2994.

15. Dahlstrom A and Fuxe G (1964), Localization of monoamines in the lower brain stem *experimentia* 15; 20 (7): 398-9.
16. Ehlers MD (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitinproteasome system. *Nat Neurosci* 6:231–42.
17. Ehringer H and Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]. *Klin Wochenschr* 38:1236–1239.
18. Fadda, F. and Rossetti, Z. L. (1998) 'Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration' in *Prog Neurobiol*, England: 385-431.
19. Floresco S-B, Todd C-L, Grace A-A (2001a) Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci* 21(13):4915-4922.
20. Floresco S-B, Blaha C-D, Yang C-R, Phillips A-G (2001b) Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: cellular mechanisms of input selection. *J Neurosci* 21(8):2851-2860.
21. Freire, M., 1978. Effects of dark rearing on dendritic spines in layer IV of the mouse visual cortex. A quantitative electron microscopical study. *J. Anat.* 126, 193–201.
22. Freund T-F, Powell J-F, Smith A-D (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral

- neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13(4): 1189-1215.
23. Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci.* 15:285-320.
24. Gizer IR, Ficks C, and Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126:51–90.
25. Goldman-Rakic PS, Leranth C, Williams SM, Mons N, Geffard M (1989) Dopamine synaptic complex with pyramidal neurons in primate cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9015–9.
26. Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, Siever LJ, and Williams GV (2004) Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology* 174:3–16.
27. Grutzendler, J., Kasthuri, N., Gan, W.B., 2002. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420, 812–816.
28. Harris, K.M., Stevens, J.K (1988) In: Lasek, R.J., Black, M.M. (Eds.), Study of dendritic spines by serial electron microscopy and three-dimensional reconstruction. *Intrinsic determinants of neuronal form and function*. Liss, New York, pp. 179–199.
29. Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:341–71.

30. Heimer L, de Olmos J, Alheid GF, Záborszky L (1991) "Perestroika" in the basal forebrain: opening the border between neurology and psychiatry. *Prog Brain Res.* 87:109-65.
31. Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KK, Bolam JP, Ince E, Yi H, Levey AI (1995) Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci* 15:5222–37.
32. Holtmaat, A.J., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G., Svodoba, K (2005) Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45, 279–291.
33. Hyman SE, Malenka RC, and Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565–598.
34. Jakel RJ and Maragos WF (2000) Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci* 23:239–245.
35. Javitt D-C, Schoepp D, Kalivas P-W, Volkow N-D, Zarate C, Merchant K, Bear M-F, Umbricht D, Hajos M, Potter W-Z, Lee C-M (2011) Translating glutamate: from pathophysiology to treatment *Sci Transl Med* 3(102):102mr2.
36. Jones, E.G., Powell, T.P (1969) Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *J. Cell Sci.* 5, 509–529.
37. Jordan BA, Fernholz BD, Boussac M, Xu C, Grigorean G, Ziff EB, Neubert TA (2004) Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Mol Cell Proteomics* 3:857–71.

38. Kalivas P-W, Brady K (2012) Getting to the core of addiction: hatching the addiction egg. *NatMed* 18(4):502-503.
39. Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H (2003) Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26, 360–368.
40. Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290:750–4.
41. Kim E, Sheng M(2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771–81.
42. Koch, C., Zador, A (1993) The function of dendritic spines – devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J. Neurosci.* 13, 413–422.
43. Koob e Wolkov (2010). Neurocircuitry of Addiction. Larkum ME, Zhu JJ, Sakmann BA new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *Nature* 398:338-41.
44. Kolb B, Mc Climans J (1986) Cryostat sectioning of Golgi-Cox tissue. *Stain Technol* 61(6):379-380.
45. Konur, S., Yuste, R (2004) Imaging motility of dendritic protrusions and axon terminals: roles in axon sampling and synaptic competition. *Mol. Cell Neurosci.* 27 (4), 427–440.

46. Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ, et al (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8861–5.
47. Macey D-J, Schulteis G, Heinrichs S-C, Koob G-F (1996) Time-dependent quantifiable withdrawal from ethanol in the rat: effect of method of dependence induction. *Alcohol* 13(2):163-170.
48. Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., Kasai, H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 1086–1092.
49. Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., Kasai, H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766.
50. Melis M, Spiga S, Diana M (2005) The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int Rev Neurobiol* 63:101-154.
51. Miller M, Peters A (1981) Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol.* 20;203(4):555-73.
52. Mink JW (2006) Neurobiology of basal ganglia and Tourette syndrome: basal ganglia circuits and thalamocortical outputs. *Adv Neurol* 99:89–98.

53. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189–225.
54. Nicola S-M, Surmeier J, Malenka R-C (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.
55. Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313–53.
56. Niznik HB and Van Tol HH (1992) Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *J Psychiatry Neurosci* 17:158–180.
57. Nusser, Z., Lujan, R., Laube, G., Roberts, J., Molnar, E., Somogyi, P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21, 545–559.
58. Peng J, Kim MJ, Cheng D, Duong DM, Gygi SP, Sheng M (2004) Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279:21003–11.
59. Peters, A., (1987) Synaptic specificity in the cerebral cortex. In: Edelman, G.M., Gall, W.E., Cowan, W.M. (Eds.), *Synaptic Function*. John Wiley, New York, pp. 373–397.
60. Peters, A., Kaiserman-Abramof, I.R (1969) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines. *Z. Zellforsch.* 100, 487–506.

61. Robinson, T-E, Kolb, B (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* 17:8491-8497.
62. Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, and Wong K (1976) Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261:717–719.
63. Sibley DR and Monsma FJ, Jr. (1992) Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13:61–69.
64. Schikorski, T., Stevens, C.F.,(2001) Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat. Neurosci.* 4, 391–395.
65. Snyder SH, Taylor KM, Coyle JT, and Meyerhoff JL (1970) The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry* 127:199–207.
66. Sotelo, C., (1978) Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines. *Prog. Brain Res.* 48, 149–170.
67. Spacek, J., Hartmann, M., (1983) Three-dimensional analysis of dendritic spines. I. Quantitative observations related to dendritic spine and synaptic morphology in cerebral and cerebellar cortices. *Anat. Embryol.* 167, 289–310.
68. Spano PF, Govoni S, and Trabucchi M (1978) Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19:155–165.

69. Spiga S, Serra G-P, Puddu M-C, Foddai M, Diana M (2003) Morphine withdrawal-induced abnormalities in the VTA: confocal laser scanning microscopy. *Eur J Neurosci* 17(3):605-612.
70. Spiga S, Puddu M-C, Pisano M, Diana M (2005) Morphine withdrawal-induced morphological changes in the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 22(9):2332-2340.
71. Spiga S, Lintas A, Migliore M, Diana M (2010) Altered architecture and functional consequences of the mesolimbic dopamine system in cannabis dependence. *Addict Biol* 15(3):266-276.
72. Spiga S, Acquas E, Puddu M-C, Mulas G, Lintas A, Diana M (2011) Simultaneous Golgi-Cox and immunofluorescence using confocal microscopy. *Brain Struct Funct* 216(3):171-182.
73. Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, Lanphear B, Stefanatos GA, Volkow N, Taylor E, Casey BJ, Castellanos FX, and Wadhwa PD (2007) Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol Rev* 17:39–59.
74. Trachtenberg, J.D., Chen, B.E., Knott, G.W., Fen, G., Sanes, J.R., Welker, E., Svoboda, K., (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent

- synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420 (6917), 788–794.
75. Usiello A, Baik JH, Rouge´-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, and Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408:199–203.
76. Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Herve´ D, Fisone G, and Girault JA (2009) Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci* 32:538–547.
77. Vallone D, Picetti R, and Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24:125–132.
78. Xu TX, Sotnikova TD, Liang C, Zhang J, Jung JU, Spealman RD, Gainetdinov RR, Yao WD (2009) Hyperdopaminergic tone erodes prefrontal long-term potential via a D2 receptor-operated protein phosphatase gate. *J Neurosci* 29:14086–14099.
79. Yamauchi T (2002) Molecular constituents and phosphorylation-dependent regulation of the post-synaptic density. *Mass Spectrom Rev* 21(4):266-86.
80. Yuste, R., Bonhoeffer, T (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Neurosci. Rev.* 5, 24–34.