

Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN TOSSICOLOGIA
Farmacologia e Farmacoterapia delle Tossicodipendenze
Ciclo XXIII

**ST1936, UN NUOVO AGONISTA DEI RECETTORI 5-HT₆: EFFETTI
SULLA TRASMISSIONE DOPAMINERGICA E SULLA DISTRIBUZIONE
DEL pERK NEL NUCLEO ACCUMBENS SHELL E CORE E NELLA
CORTECCIA PREFRONTALE DEL RATTO**

Settore scientifico disciplinare di afferenza
BIO/14 FARMACOLOGIA

Presentata da: Dott. Federico Ibba

Coordinatore Dottorato: Prof. Gaetano Di Chiara

Relatore: Prof. Gaetano Di Chiara

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

I miei ringraziamenti vanno innanzitutto al Prof. Di Chiara, tutor nel presente lavoro di ricerca e già relatore della tesi di laurea, per l'ampia guida scientifica, per la fiducia e le opportunità che mi ha offerto.

Un sincero ringraziamento va anche alla Dott.ssa Valentini per la disponibilità e l'importante collaborazione scientifica in quest'ultimo anno di ricerche, poiché ha contribuito significativamente ad alcuni dei risultati discussi in questa tesi.

Un grazie colmo di sincero affetto va alla Dott.ssa Vinci, alla Dott.ssa Pisanu e al Dott. Lecca che hanno contribuito inconsapevolmente alla mia maturazione scientifica, ma che considero più amici che semplici colleghi.

Un ringraziamento particolare va a Roberta per essermi stata sempre vicina e per dividere con me questa vita sregolata e incerta e per aver sempre sopportato i miei momenti di distimia in questi anni.

INDICE

Indice	pag. 5
Abstract	pag. 7
1. Introduzione	pag. 8
1.1. Sistema limbico	pag. 9
1.2. Trasmissione dopaminergica	pag. 11
1.2.1. I recettori dopaminergici	pag. 12
1.2.2. Nucleus accumbens	pag. 13
1.3. Trasmissione serotoninergica	pag. 15
1.3.1. I recettori serotoninergici	pag. 17
1.4. Interazione DA/5-HT	pag. 18
1.5. Il recettore 5-HT6	pag. 19
1.5.1. Recettore 5-HT6 e funzione dopaminergica	pag. 21
1.6. La pathway delle ERK	pag. 21
2. Scopo dello studio	pag. 28
3. Materiali e metodi	pag. 30
3.1. Animali	pag. 31
3.2. Farmaci	pag. 31
3.3. Microdialisi cerebrale	pag. 31
3.4. Self-Administration	pag. 33
3.5. Immunoistochimica	pag. 35
4. Analisi statistica	pag. 37
5. Risultati	pag. 39
5.1. Microdialisi cerebrale	pag. 40
5.2. Self-Administration	pag. 43
5.3. Immunoistochimica	pag. 44
Tabella 1. Effetto di ST1936 sulla immunoreattività di pERK nella PFCX e nel Acb del cervello di ratto e il ruolo dei recettori dopaminergici D1.	pag. 46
6. Discussione e conclusioni	pag. 47
7. Figure	pag. 50
Figura 1. Aree anatomiche del cervello di ratto in cui sono stati quantificati i neuroni pERK-positivi.	pag. 50
Figura 2. Effetto di ST1936 (5-10-20 mg/kg/ip) sul dializzato di DA, NA	

e 5-HT nella PFCX e antagonismo da parte di SB271046 o SB399885.	pag. 51
Figura 3. Effetto di ST1936 (5-10-20 mg/kg/ip) sul dializzato di DA, NA e 5-HT nella AcbSh e antagonismo da parte di SB271046 o SB399885.	pag. 52
Fig. 4 Effetto di ST1936 (5-10-20 mg/kg/ip) sui dializzato di DA, NA e 5-HT nel AcbC.	pag. 53
Figura 5. Esperimento I° di autosomministrazione di ST1936.	pag. 54
Figura 6. Esperimento II° di autosomministrazione di ST1936.	pag. 55
Figura 7. Effetto della somministrazione sistemica di ST1936 (20 mg/kg/ip) sulla fosforilazione delle ERK nella PFCX e effetto del pretrattamento con SCH39166, antagonista del recettore D1.	pag. 56
Figura 8. Effetto della somministrazione sistemica di ST1936 (20 mg/kg/ip) sulla fosforilazione delle ERK nel Acb e effetto del pretrattamento con SCH39166, antagonista del recettore D1.	pag. 57
Referenze e Bibliografia	pag. 58

Abstract

La funzione del recettore 5-HT6, uno fra gli ultimi scoperti della superfamiglia dei recettori serotonergici, è ampiamente sconosciuta e ciò è dovuto alla limitata conoscenza del loro meccanismo di trasduzione, alla mancanza di agonisti pieni attivi a livello centrale e all'inconsistenza degli effetti farmacologici e neurochimici degli antagonisti. Recentemente è stato reso disponibile un nuovo agonista pieno, ST1936, con affinità nanomolare per il recettore 5-HT6. Riportiamo l'effetto acuto di ST1936 sul dializzato di dopamina (DA) e noradrenalina (NA) nella corteccia prefrontale (PFCX), nel nucleus accumbens (Acb), shell e core, e sull'espressione di phospho-Extracellular signal Regulated Kinase (pERK) nelle stesse aree, come dimostrato con l'immunoistochimica. Riportiamo inoltre l'effetto di ST1936 quando somministrato in modo contingente da parte del ratto nel paradigma sperimentale di self-administration (SA). La somministrazione sistemica acuta di ST1936 aumenta in modo dose-dipendente il dializzato di DA, NA nella PFCX e nella AcbSh e in minor misura nel AcbC; questi effetti sono prevenuti per somministrazione sistemica di due diversi antagonisti del recettore 5-HT6. ST1936 aumenta anche il numero di neuroni pERK-positivi nella corteccia prelimbica (PrL) e nella porzione mediale e intermedia della AcbSh ma non nella corteccia infralimbica (IL) e nel AcbC. Questi effetti sono prevenuti per somministrazione sistemica dell'antagonista selettivo dei recettori D1 SCH39166. ST1936 risulta capace di sostenere nel ratto un comportamento di SA, per via endovenosa. La risposta di autosomministrazione è ridotta significativamente per pretrattamento sistemico con antagonisti del recettore 5-HT6. Queste proprietà di ST1936 suggeriscono che il recettore 5-HT6 controlli l'attività dei neuroni dopaminergici e noradrenergici che proiettano alla PFCX e al Acb.

1. Introduzione

1.1. Sistema limbico

Il sistema limbico è costituito da aree filogeneticamente antiche, sviluppatesi attorno alla funzione olfattoria e comprende formazioni telencefaliche e diencefaliche, l'ipotalamo, l'amigdala, il nucleo mediodorsale e il nucleo anteriore del talamo, l'ippocampo, il setto, l'Acb, la corteccia prefrontale (PFCX), la corteccia entorinale (Castano e Donato, 2001).

Il sistema limbico presiede a funzioni primordiali indispensabili per la sopravvivenza del singolo e della specie, regolando i comportamenti alimentari, di fuga e di attacco, di aggressività e di sottomissione, i comportamenti sessuali e l'istinto materno. Allo scopo di assicurare il realizzarsi di questi comportamenti, la selezione naturale ha fornito il cervello degli organismi superiori di centri sensibili agli stimoli esterni importanti per la sopravvivenza e anche della capacità di reagire a questi stimoli con una risposta emozionale, positiva o negativa, definita *valenza motivazionale* dello stimolo. Uno stimolo esterno può essere percepito positivamente o negativamente in maniera specie-specifica secondo parametri puramente istintivi o in modo condizionato attraverso processi di apprendimento. Il sistema limbico svolge, quindi, un ruolo importante nelle manifestazioni comportamentali relative alla gratificazione e all'avversione. Gli stimoli naturali indispensabili per la sopravvivenza (cibo, acqua, sesso) possiedono una *valenza motivazionale positiva* poiché producono effetti piacevoli, sono quindi considerati *stimoli appetitivi*. Qualunque stimolo riconosciuto come dannoso, spiacevole o doloroso, è interpretato come stimolo dotato di *valenza motivazionale negativa* e considerato *avversivo*. Nel caso di stimoli piacevoli, il comportamento sarà volto alla ricerca e all'avvicinamento degli stimoli stessi (comportamento motivato). Nel caso di stimoli spiacevoli o dolorosi, invece, saranno messe in atto strategie volte ad attenuarli o a estinguerli (comportamento avversivo).

È possibile che l'*emotività*, ossia la capacità stessa di provare sensazioni piacevoli o spiacevoli, derivi dalla necessità ancestrale di assicurare ai comportamenti primordiali, quelli cioè indispensabili per la sopravvivenza, una motivazione così forte da garantirne l'attuazione.

Esistono diversi stimoli naturali che producono un effetto gratificante, come il cibo, l'acqua e il sesso, i quali sono anche in grado di condizionare il comportamento motivato, perché dotati di proprietà incentive e funzionali (Bindra, 1976; Bolles, 1975). Le *proprietà incentive* sono essenziali per stimolare il comportamento indirizzato alla ricerca e al contatto con lo stimolo; le *proprietà funzionali*, invece, sono necessarie per la loro efficacia in termini biologici e fisiologici.

Il comportamento motivato, tradizionalmente, si distingue in tre fasi principali: *appetitiva*, *consumatoria* e *post-consumatoria* (Konorski, 1967). Nella fase appetitiva o incentiva l'organismo mette in atto comportamenti flessibili e generici di ricerca e approccio ai più diversi stimoli (cibo, acqua, sesso, madre, figlio, caldo etc.); nella fase consumatoria il comportamento si esprime invece secondo rigidi schemi legati alla natura dello stimolo e inoltre in tale fase, s'impiegano le proprietà funzionali dello stimolo. Infine, la fase *post-consumatoria* è caratterizzata dalla sazietà e dall'appagamento (Konorski, 1967; Woodworth, 1981).

Gli aspetti *incentivi* sono correlabili alle variazioni "ergotropiche" descritte da Hess (Hess, 1954), caratterizzate da un aumento dello stato di allerta, attivazione motoria e del sistema simpatico, rilascio di corticosteroidi a elevato catabolismo. Le *proprietà funzionali* sono responsabili degli effetti metabolici e/o fisiologici, che fanno seguito alla consumazione dello stimolo e che comportano variazioni "trofotropiche", come l'attivazione del sistema nervoso parasimpatico, anabolismo, sedazione e appagamento.

Ciascuna fase del comportamento motivato è piacevole ma la natura del piacere a essa associato è diversa. Nella fase appetitiva il piacere consiste in uno stato di euforia e di eccitazione che rafforza e sostiene il comportamento di ricerca e approccio all'oggetto del desiderio, nell'ambito di uno stato di edonia (*hedonia state*) che fa parte dell'eccitazione comportamentale (*incentive arousal*) (Di Chiara, 2005).

L'attivazione del sistema mesolimbico determina molte delle proprietà degli aspetti incentivi degli stimoli gratificanti naturali, stimola l'attenzione e il comportamento motorio mirato (orientamento); inoltre promuove l'acquisizione da stimoli ambientali neutri della risposta, indotta dagli stessi stimoli gratificanti naturali (rinforzi primari). La capacità di stimoli non primordiali di acquisire proprietà motivazionali è connessa alla stimolazione delle stesse aree cerebrali e degli stessi circuiti neuronali coinvolti nella gratificazione naturale. L'assunzione del farmaco d'abuso produce un effetto di appagamento, è quindi uno stimolo dotato di valenza positiva (*rinforzo positivo*) e negli animali da esperimento si manifesta come un aumento della probabilità di compiere un qualsiasi comportamento il cui fine sia la somministrazione del farmaco. In tal caso il comportamento è volto alla ricerca e all'avvicinamento del farmaco (stimolo) rinforzante stesso (*comportamento motivato*). I farmaci d'abuso attivando il sistema mesolimbico diventano capaci di condizionare il comportamento motivato e di facilitare i processi di apprendimento, fornendo agli stessi profondi significati motivazionali. I farmaci d'abuso possono essere considerati come surrogati di stimoli gratificanti naturali poiché, agendo sia in modo diretto sia indiretto,

provocano modificazioni neurofisiologiche tipiche degli stimoli fisiologici e interpretabili come gratificanti, mimando le proprietà incentive e funzionali degli stimoli naturali, primari. Questo fenomeno è evidenziato da studi farmacologici, condotti per mezzo della *microdialisi cerebrale* (Di Chiara, 1995).

I farmaci d'abuso mostrano proprietà comportamentali tipiche dell'aspetto incentivo degli stimoli gratificanti naturali e in particolare l'induzione dello stato di allerta, la locomozione mirata, l'apprendimento incentivo, ed hanno la caratteristica comune di attivare in modo preferenziale, anche se con meccanismi differenti, la trasmissione dopaminergica del sistema mesolimbico (Di Chiara et al. 1988; Mereu et al. 1987).

1.2. Trasmissione dopaminergica

La trasmissione dopaminergica svolge un ruolo importante nella modulazione fisiologica dell'attività psichica e motoria, nel tono dell'umore e in alcune processi cognitivi, è quindi coinvolta nella fisiopatologia di deficit senso motori, di disturbi affettivi e della tossicodipendenza.

I neuroni dopaminergici mesencefalici, responsabili della trasmissione dopaminergica, sono suddivisi in tre gruppi, A8, A9 e A10. I neuroni del gruppo A8 ne occupano la posizione più caudale, nell'area retrorubrale; il gruppo A9 si trova in direzione rostro mediale rispetto ad A8 ed è costituito da neuroni presenti nella substantia nigra (SN), mentre i neuroni A10 sono localizzati nell'area ventrale del tegmento (VTA), nella parte anteriore della formazione reticolare. Le efferenze di questi gruppi cellulari costituiscono le vie dopaminergiche mesolimbica, mesocorticale e nigrostriatale.

Nella zona A10 dell'area ventrale tegmentale (VTA) e nella parte mediale della SN origina il *sistema mesolimbico*, il quale innerva in nucleus accumbens (Acb), il tubercolo olfattorio e il nucleo interstiziale della stria terminalis. Dalla VTA origina anche il *sistema mesocorticale*, il quale innerva: ippocampo, lateral septum, amigdala, corteccia entorinale, PFCX, corteccia peririnale e corteccia piriforme. Dai neuroni A9 presenti nella substantia nigra pars compacta (SNc) origina il *sistema nigrostriatale*, le cui efferenze assionali arrivano principalmente al corpo striato (caudato e putamen); alcune collaterali innervano anche il nucleo subtalamico e il globus pallidus. I dendriti dei neuroni A9, invece, si ramificano nella substantia nigra pars reticulata (SNr) dove per rilascio di DA regolano l'attività delle terminazioni afferenti GABAergiche che originano dai gangli della base.

Il sistema mesolimbico è coinvolto nel controllo dell'attività motoria, nella regolazione del comportamento emozionale e di funzioni comportamentali complesse (Lindvall et al. 1984). Il sistema mesocorticale ha invece una notevole influenza sul tono dell'umore e sull'attenzione, rendendo l'individuo attivo verso l'ambiente esterno ed è inoltre coinvolto nella regolazione dei processi di gratificazione e di apprendimento incentivo (Simon et al. 1980). Il sistema nigrostriatale regola l'attività motoria extrapiramidale.

1.2.1. I recettori dopaminergici

Al momento si conoscono cinque tipi di recettori Dopaminergici (Missale et al. 1998); essi sono tutti accoppiati a proteine G (s/i) e appartenenti a due distinte classi farmacologiche: D1 e D2 (Sokoloff e Schwartz, 1995; Lachowicz e Sibley, 1997). Nell'uomo, i recettori D1 e D5 sono membri della classe definita D1 (nel ratto D1a e D1b), i recettori D2, D3 e D4, invece, appartengono alla classe farmacologica D2. Gli agonisti dei recettori dopaminergici D1 inducono un aumento dell'attività dell'adenilato ciclastasi (Dearry et al. 1990; Tiberi e Caron, 1994; Tiberi et al. 1991), attraverso proteina G_s (stimolatoria) GTP-dipendente, con aumento dei livelli intracellulari di AMPc (adenosina monofosfato ciclico) ed effetto eccitatorio sulla membrana postsinaptica. La stimolazione dei recettori dopaminergici D2 induce invece inibizione dell'adenilato ciclastasi (Chio et al. 1994a, 1994b) tramite proteina G_i (inibitoria) GTP-dipendente, con conseguente riduzione della concentrazione intracellulare di AMPc; ma anche soppressione delle correnti di Ca⁺⁺ intracellulare e attivazione di correnti di K⁺ che comportano iperpolarizzazione neuronale (Memo et al. 1987).

Studi sulla localizzazione dei recettori dopaminergici hanno evidenziato che i D1 sono distribuiti prevalentemente a livello postsinaptico e soltanto in alcune aree esiste una localizzazione presinaptica. I D2, invece, sono in gran parte localizzati nelle terminazioni presinaptiche, sia eterologhe (glutamatergiche, colinergiche, GABAergiche) che omologhe, nel qual caso svolgono la funzione di autorecettori a carattere inibitorio (Andersen et al. 1990; Dawson et al. 1988). Alcune evidenze sperimentali indicano la possibilità di un'interazione biochimica tra i recettori delle due classi, coesistenti a livello postsinaptico, in cui il recettore D2 avrebbe la capacità di modulare la risposta mediata dai D1 (Clark et al. 1987).

La DA media i propri effetti attraverso la stimolazione di recettori metabotropici, per cui tramite meccanismi di trasduzione abbastanza lenti, in accordo con la sua *funzione neuromodulatrice*. Infatti, una delle caratteristiche funzionali più interessanti della DA è di

attivazione neuronale delle aree cerebrali innervate, permettendo che le proprietà di membrana di questi elementi cellulari diventino tali da consentire loro una risposta più efficace nei confronti dei segnali mediati dagli altri neurotrasmettitori.

Nella terminazione dopaminergica, l'esocitosi è la conseguenza di un'attivazione a *burst-firing*; infatti, l'arrivo di gruppi di potenziali d'azione molto ravvicinati è responsabile della liberazione di un'elevata quantità di trasmettitore, con conseguente attivazione dei recettori D1 postsinaptici a bassa affinità (micromolare), nell'ambito di una trasmissione di tipo *fasico*.

Nella trasmissione di tipo *tonico*, al contrario, si ha la stimolazione dei recettori ad alta affinità (nanomolare), come conseguenza della liberazione di piccole quantità di DA per l'arrivo di singoli potenziali d'azione (*spike-firing*) (Grace, 2000). La stimolazione dei D2 (recettori ad alta affinità e a carattere inibitorio) consente alla DA di aumentare il rapporto tra segnale e rumore, impedendo che stimoli non rilevanti possano filtrare nelle diverse aree cerebrali effettrici, superando le sinapsi afferenti, facendo in modo che solo gli stimoli realmente significativi possano diventare efficaci nell'indurre una risposta cellulare.

1.2.2. Nucleus Accumbens

Numerose evidenze sperimentali indicano che le innervazioni dopaminergiche mesolimbiche del *nucleus accumbens* (Acb) sono direttamente coinvolte nel comportamento motivato da stimoli gratificanti naturali (acqua, cibo, sesso) (Wenkstern et al. 1993; Westerink et al. 1994; Bassareo and Di Chiara, 1997) e negli effetti gratificanti indotti dai farmaci d'abuso (Fibiger e Phillips, 1986; Wise e Bozarth, 1987; Koob, 1992; Wise, 1996; McBride et al. 1999; Pierce e Kumaresan, 2006). Il Acb, rappresentato in figura 1, è una regione eterogenea sia da un punto di vista anatomico che funzionale. Può essere suddiviso in almeno due subregioni definite per peculiari caratteristiche istochimiche, citoarchitettoniche e di connessione: una porzione medio-ventrale chiamata shell (AcbSh) e una dorso-laterale definita core (AcbC) (Heimer et al. 1991, Zahm e Brog, 1992; Brog et al. 1993; Jongen-Relo et al. 1993, 1994; Wright e Groenewegen, 1995). La AcbSh è suddivisibile a sua volta, in tre subregioni: la porzione dorsomediale (AcbSh MED), la porzione intermedia (AcbSh INT) e la porzione laterale (AcbSh LAT); per la diversa connettività neuronale che caratterizza queste suddivisioni. Mentre AcbSh MED riceve afferenze dalla porzione caudale parvocellulare dell'amigdala basale (Wright et al. 1996), dalla PFCX e dal nucleo paraventricolare (Wright e Groenewegen, 1995), la AcbSh INT riceve proiezioni dalla porzione caudale magnocellulare dell'amigdala basale e

dalla VTA laterale (Wright et al. 1996). La AcbSh MED manda proiezioni efferenti alla VTA mediale (Wright et al. 1996) e alla regione peribrachiale dei nuclei pontini, mentre sono aree di proiezione della AcbSh INT la sostanza grigia peri-acqueduttale ventrolaterale, la VTA laterale e la SNc (Wright et al. 1996). La definizione di AcbSh LAT rimane un finora tentativo, tuttavia sembra rappresentare una zona anatomica specifica (Wright et al. 1996). In alcuni studi sono evidenziate afferenze alla porzione laterale del Acb (Kita e Kitai, 1990; McDonald, 1991a, 1991b), di cui alcune alla shell (Brog et al. 1993), mentre si conosce poco delle sue precise efferenze. È per questo che la AcbSh LAT rimane una subregione ancora poco conosciuta (Wright et al. 1996).

AcbSh ha funzioni prettamente limbiche quali integrazione delle emozioni e della motivazione ed è correlabile al complesso dell'*amigdala estesa* (Alheid e Heimer, 1988; Heimer et al. 1991). Questo complesso include l'amigdala centrale, il nucleo del letto della stria terminale, la sostanza innominata sublenticolare, la massa grigia intercalata e corrisponde alla parte più antica del cervello, l'unica che non ha seguito grandi cambiamenti nel corso dell'evoluzione.

AcbC costituisce la porzione più ventrale del corpo striato, è dotato soprattutto di funzioni motorie (ruolo nell'iniziazione del movimento) (Di Chiara et al. 1993; Pontieri et al. 1995). Sarebbe deputato all'espressione motoria dei comportamenti motivati (Stolerman, 1992; Alheid e Heimer, 1988; Zahm e Brog, 1992; Groenewegen e Russchen, 1984; Heimer et al. 1991) e direttamente coinvolto negli aspetti direzionali e strumentali della motivazione (Corbit et al. 2001), nella risposta strumentale e nella sensitizzazione comportamentale. La perdita dei terminali dopaminergici in tale area determina, infatti, una riduzione della locomozione nel paradigma sperimentale della *conditioned place preference* (CPP) (Sellings e Clarke, 2003). Inoltre, negli animali da esperimento sensibilizzati agli psicostimolanti, si è osservato un aumento del rilascio di DA nel AcbC in risposta alla riesposizione agli stessi farmaci (Cadoni et al. 1999).

La DA esplica differenti azioni nei due compartimenti del Acb nell'ambito delle manifestazioni del comportamento motivato; infatti, il suo aumento nella AcbSh sarebbe importante per gli effetti correlati all'apprendimento associativo dello stimolo gratificante, mentre la sua stimolazione nel core, sarebbe necessaria per promuovere il comportamento motorio di approccio allo stimolo stesso (Di Chiara et al. 1999).

Studi di microdialisi cerebrale hanno dimostrato che le sostanze d'abuso stimolano preferenzialmente la trasmissione dopaminergica nel AcbSh, rispetto al AcbC, come dimostrato dall'aumento dei livelli extracellulari di DA, misurati attraverso la microdialisi

cerebrale (Di Chiara e Imperato, 1988; Carboni et al. 1989; Pontieri et al. 1996; Tanda et al. 1997). I meccanismi attraverso i quali le sostanze d'abuso sono in grado di aumentare le concentrazioni extracellulari di DA sono diversi secondo la classe farmacologica cui ciascuna sostanza appartiene. La capacità di stimolare la trasmissione dopaminergica nella AcbSh costituisce evidentemente una caratteristica fondamentale delle sostanze d'abuso ed è inoltre il substrato dei loro effetti euforizzanti (Di Chiara et al. 2004). A questa proprietà delle sostanze d'abuso è stata assegnata una funzione fondamentale, per i loro effetti sia in acuto sia a lungo termine, sulla genesi della tossicodipendenza.

La deplezione della DA nel Acb indotta da lesioni con 6-idrossiDA (6-OHDA) attenua gli effetti gratificanti di cocaina e amfetamina, valutabili mediante la *self-administration* (SA) in vena (Lyness et al. 1979; Roberts et al. 1980; Roberts e Koob, 1982; Pettit et al. 1984; Caine e Koob, 1994; Gerrits e Van Ree, 1996) e mediante l'impiego del modello della CPP (Spyraki et al. 1982a,b), entrambi importanti paradigmi sperimentali attraverso i quali è possibile studiare le azioni di rinforzo dei farmaci d'abuso. Quando l'amfetamina è direttamente infusa nel Acb, i ratti acquisiscono un comportamento di SA (Hoebel et al. 1983; Phillips et al. 1994) e induce lo sviluppo di CPP, anche per somministrazione intra-Acb di agonisti dopaminergici (Carr e White, 1983; Carr e White 1986). Anche morfina e nicotina inducono CPP. L'infusione di SCH 39166, antagonista selettivo dei recettori D₁, intra-AcbSh impedisce l'acquisizione della CPP da morfina e da nicotina, mentre risulta inefficace quando somministrato intra-AcbC (Fenu et al. 2006; Spina et al. 2006).

1.3. Trasmissione serotoninergica

Nel SNC la 5-HT è considerata un neurotrasmettitore modulatorio con effetti generali di tipo inibitorio. Essa gioca un ruolo importante nella regolazione di diversi processi psicobiologici. Lesioni del sistema serotoninergico portano (negli animali da laboratorio) a comportamenti aggressivi disinibiti e a perdita d'inibizione verso comportamenti vietati e puniti. Queste e altre osservazioni condotte su pazienti con tendenza a suicidio, suggeriscono che una funzione importante del sistema serotoninergico sia quella di sopprimere comportamenti eccessivamente aggressivi o altre attività psicomotorie che comportano conseguenze negative.

La 5-HT ha anche effetti inibitori sul comportamento sessuale (in parte dovuti alla modulazione della produzione di ormoni sessuali), sulla sensibilità al dolore e sull'appetito; ha influenze modulatorie sulla temperatura corporea, migliora il livello dell'umore e facilita il sonno; è

importante nel controllo del vomito. La varietà e l'importanza dei processi psicobiologici modulati dalla 5-HT, la rilevanza che farmaci attivi sul sistema serotoninergico hanno in psichiatria (in particolare gli inibitori della ricaptazione) e, infine, il fatto che diverse sostanze d'abuso interferiscono con la funzionalità di questo sistema hanno portato al convincimento che «non esista disturbo della sfera psichica nel quale non sia coinvolto, in modo più o meno esteso, il sistema serotoninergico» (tratto da Clementi F, Fumagalli G, Farmacologia Generale e Molecolare, UTET, Torino, 1996).

Sono stati utilizzati diversi sistemi citochimici per tracciare l'anatomia centrale dei neuroni contenenti 5-HT nelle diverse specie. Nel 1964, Dahlstrom e Fuxe, usando la tecnica d'istofluorescenza di Falck-Hillarp, osservarono che la maggioranza dei corpi serotoninergici si ritrova in gruppi di alcuni corpi cellulari, descritti precedentemente da Taber, Brodal e Walberg (1960) come il nucleo del Rafe.

NOTA - L'istofluorescenza di Falck-Hillarp è una tecnica istochimica che permette di identificare i nervi simpatici mediante la fluorescenza che emettono a seguito del trattamento dei tessuti con vapori di formaldeide. La fluorescenza da catecolammine si distingue da quella da 5-HT per il colore verde intenso delle prime rispetto al giallo pallido della seconda. Tuttavia, l'istofluorescenza non consente di distinguere il tipo di catecolamina prodotto da un certo sistema di neuroni, cioè se DA, NA o adrenalina. Tale distinzione è divenuta possibile con l'uso di altre tecniche, tra cui quella della immunostochimica.

Dahlstrom e Fuxe descrissero nove gruppi di corpi cellulari contenenti 5-HT, che denominarono da B1 fino a B9, localizzati sulla linea mediana del tronco cerebrale a livello di bulbo, ponte e mesencefalo, ove si ritrovano particolarmente concentrati appunto nei nuclei del rafe (Steinbusch e Mulder, 1984). I nuclei B1, B2 e B3 sono i nuclei bulbari, caratterizzati per le proiezioni discendenti midollari, denominati anche nucleo del Rafe pallido, Rafe oscuro e Rafe Magnus rispettivamente. I nuclei B4, B5 e B6 sono i nuclei pontini del Rafe. I grandi nuclei B7, B8 e B9 sono i nuclei mesencefalici e sono quindi le strutture più rostrali; i nuclei da B1 a B5 sono situati più caudalmente e contengono un numero ridotto di cellule serotoninergiche. Il gruppo più grande di cellule serotoninergiche è il gruppo B7 ed è contiguo a B6, gruppo più piccolo. B6 e B7 insieme costituiscono il nucleo dorsale del Rafe (DRN), di cui B6 è la sua estensione caudale. Il gruppo di corpi cellulari serotoninergici B8 corrisponde al nucleo mediale del Rafe (MRN), anche chiamato nucleo centrale superiore.

I nuclei rostrali del rafe innervano le regioni proencefaliche mentre i nuclei caudali del rafe proiettano all'interno del tronco encefalico e del midollo spinale con alcune sovrapposizioni. Il

MRN porta un notevole contributo all'innervazione del sistema limbico mentre il DRN apporta un contributo simile nell'innervazione di regioni corticali e neostriatali.

1.3.1. I recettori serotoninergici

Sebbene implicata nella regolazione di numerosi processi fisiologici e nella fisiopatologia delle loro disfunzioni, le modalità d'azione di 5-HT e i siti precisi su cui agisce sono tuttora poco definiti ed elusivi, probabilmente per il vasto numero di sottotipi recettoriali esistenti per 5-HT. Dalla prima dimostrazione dell'esistenza di almeno due tipi recettoriali serotoninergici, ottenuta da Gaddum e Picarelli nel 1957, si è giunti oggi alla identificazione di molti tipi e sottotipi recettoriali per 5-HT. I recettori serotoninergici sono, infatti, distinti in 7 classi, da 5-HT₁ a 5-HT₇, e suddivisi in sottoclassi per un totale di 14 diversi recettori. Questa suddivisione è basata su profilo farmacologico, sequenza primaria del recettore dedotta per clonazione di cDNA e meccanismi di trasduzione del segnale (Hoyer et al. 1994; Barnes e Sharp, 1999). Alcuni autori ritengono che esistano sottotipi recettoriali serotoninergici così numerosi perché la 5-HT è comparsa precocemente durante l'evoluzione del regno animale e vegetale (Peroutka e Howell, 1994).

La classe del recettore 5-HT₁ è costituita da 5 sottotipi recettoriali (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}) e nell'uomo, mostrano un'omologia di sequenza del 40-63%. Sono preferenzialmente, sebbene non esclusivamente, accoppiate a proteina G_{i/o} determinando una riduzione dei livelli intracellulari di cAMP. I 5-HT₂ sono un sottogruppo di recettori accoppiati a proteine G e collegati positivamente alla cascata d'idrolisi del fosfatidil inositolo e portano quindi ad un aumento della concentrazione intracellulare di calcio. Sono classificati in 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} (Boess e Martin, 1994; Hoyer et al. 1994; Barnes e Sharp, 1999). I recettori 5-HT_{2C} sono largamente diffusi in tutto il cervello ed è stato proposto come il principale mediatore degli effetti della 5-HT nel SNC (Boess e Martin, 1994; Hoyer et al. 1994; Barnes e Sharp, 1999). È interessante che fra topo, ratto e uomo esista un'elevata omologia di sequenza (>80%) nelle regioni transmembrinarie del recettore 5-HT_{2C} (Barnes e Sharp, 1999). Il 5-HT₃ è l'unico dei recettori serotoninergici a essere associato a un canale ionico (Yakel e Jackson, 1988; Derkach et al. 1989). La sua attivazione determina depolarizzazione ed eccitazione della cellula ospite per flusso netto di cationi verso l'interno della cellula stessa (Yakel e Jackson, 1988). Il recettore 5-HT₄ è accoppiato a proteina G_s, porta ad attivazione dell'adenilato ciclasi (Hoyer et al. 2002). La maggiore concentrazione del recettore 5-HT₄ nel SNC si trova in aree

limbiche correlate a funzioni cognitive (Eglen et al 1995). I recettori 5-HT₄ non sono localizzati su neuroni dopaminergici ma probabilmente su neuroni di proiezione GABAergici e possibilmente su interneuroni GABAergici e colinergici (Patel et al. 1995). La classe del recettore 5-HT₅ è costituita da due membri, 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B}. Il recettore 5-HT_{5A} è stato identificato nel topo, nel ratto e nell'uomo (Barnes e Sharp, 1999; Hoyer et al. 2002). Il recettore 5-HT_{5B} è espresso nel topo e nel ratto ma non nell'uomo. Entrambi i recettori hanno una distribuzione limitata al SNC. 5-HT_{5A} è accoppiato a proteina Gi/o e inibisce l'attività dell'adenilato ciclasi (Nelson, 2004). I recettori 5-HT₅ non sono stati ancora caratterizzati farmacologicamente in modo esteso. L'attivazione del recettore 5-HT₆ in sistemi di espressione artificiali (Ruat et al, 1993) e tessuto striatale (Boess et al. 1998) attiva l'adenilato ciclasi. Studi condotti mediante ibridazione *in situ* (Gerard et al, 1996) o immunisto chimica (Gerard et al. 1997) dimostrano che il recettore 5-HT₆ è abbondantemente espresso in aree di proiezione dopaminergica quali striato, Acb, ippocampo e corteccia frontale. L'attivazione del recettore 5-HT₇, accoppiato positivamente a proteina G, stimola la formazione di cAMP (Eglen et al. 1997). Studi d'ibridazione *in situ* e d'immunisto chimica mostrano una distribuzione di 5-HT₇ in ipotalamo e talamo, corteccia cerebrale, striato, bulbo olfattorio tubercolo olfattorio e amigdala (Ruat et al. 1993; Shen et al. 1993; Neumaier et al. 2001). La distribuzione del recettore 5-HT₇ in strutture talamiche e limbiche suggerisce un possibile ruolo nei comportamenti affettivi.

Mentre tutti i sottotipi recettoriali serotoninergici sono localizzati postsinapticamente su cellule target della 5-HT, i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} si trovano anche a livello presinaptico sui neuroni serotoninergici.

1.4. Interazione DA/5-HT

5-HT contribuisce alla regolazione di processi comportamentali che coinvolgono il sistema dopaminergico a livello limbico, corticale e striatale (Alex e Pehek, 2007; Di Matteo et al. 2001; Giorgetti e Tecott, 2004; Higgins e Fletcher, 2003; Jenck et al. 1998). Virtualmente tutte le parti del SNC ricevono innervazione da fibre serotoninergiche che originano dai corpi cellulari delle due principali suddivisioni mesencefaliche serotoninergiche, il DRN e il MRN. Le fibre serotoninergiche provenienti dal DRN sono distribuite significativamente alla SN e alla VTA e alle principali aree di proiezione dei sistemi dopaminergici nigrostriatale e mesolimbico: striato, globus pallidus, Acb, amigdala, tubercolo olfattorio e corteccia frontale.

Invece le fibre serotonergiche che originano dal MRN innervano la VTA ma non la SN (Di Giovanni et al. 2008, Di Matteo et al. 2008). I sistemi dopaminergico e serotonergico sono strettamente correlati nel SNC, la microscopia elettronica dimostra la presenza di contatti sinaptici tra terminazioni nervose marcate con [3H]5-HT con dendriti dopaminergici e non-dopaminergici in tutti i sub nuclei della VTA, nella SNC e nella SNr (Hervé et al. 1987; Kalivas, 1993; Moukhles et al. 1997).

Molta attenzione è stata rivolta al ruolo dei recettori della 5-HT nel controllo dell'attività delle vie dopaminergiche centrali, per le loro implicazioni nella fisiopatologia dei disturbi che interessano il sistema dopaminergico centrale: depressione, schizofrenia, malattia di Parkinson e *drug abuse*. Tuttavia quale sia la precisa natura dell'interazione tra DA e 5-HT è difficile da descrivere, per i ruoli sia inibitori sia eccitatori della 5-HT, per la distribuzione e i diversi ruoli funzionali delle molteplici classi di auto- ed etero- recettori serotonergici (Hoyer et al. 1994; Barnes e Sharp, 1999).

L'uso complementare di diverse tecniche d'indagine unitamente alla disponibilità di diversi ligandi ad alta affinità, permetteranno importanti scoperte nel complesso quadro delle interazioni reciproche.

1.5. Il recettore 5-HT₆

Il 5-HT₆ è uno dei recettori serotonergici identificati più di recente (Kohen et al. 2001; Monsma et al. 1993; Ruat et al. 1993; Plassat et al. 1993). Due peculiarità di questo recettore lo rendono particolarmente interessante: l'esclusiva localizzazione nel sistema nervoso centrale (SNC) e la distribuzione sovrapponibile a quella dei recettori per la DA (DA). Il recettore 5-HT₆ è particolarmente abbondante a livello striatale, limbico e in specifiche aree corticali. È stata evidenziata un'elevata espressione del recettore 5-HT₆ nel tubercolo olfattorio, nelle isole del Calleja, nella corteccia frontale ed entorinale, nel Acb (Acb), nel caudato-putamen e nell'ippocampo, come evidenziato concordemente da diversi gruppi di ricerca e con tecniche diverse: utilizzando [¹²⁵I]SB-258585, antagonista 5-HT₆ selettivo radiomarcato (Roberts et al. 2002), metodiche immunoistochimiche (Gerard et al. 1997; Hamon et al. 1999), ibridizzazione *in situ* per mezzo di *probe* radiomarcate di mRNA del recettore 5-HT₆ (Ward et al. 1995).

La densa concentrazione del recettore 5-HT₆ in aree prevalentemente dopaminergiche suggerisce che possa partecipare nel controllo delle funzioni motorie, dei comportamenti

correlati al livello dell'umore, delle psicosi, dei meccanismi di ricompensa, di motivazione e dei disordini ad essi correlati.

L'mRNA del recettore 5-HT₆ è espresso a livello postsinaptico da neuroni non-serotoninergici in aree di proiezione del sistema serotoninergico (Gerard et al. 1996). I recettori 5-HT₆ striatali sono localizzati su neuroni spinosi medi (Ward e Dorsa 1996). Lesioni del *medial forebrain bundle* (MFB) con 6-OHDA non riducono il *binding* ai recettori 5-HT₆, eccetto i recettori localizzati sui neuroni dopaminergici (Roberts et al. 2002).

La funzione dei recettori 5-HT₆ è largamente sconosciuta e ciò è dovuto alla limitata conoscenza dei suoi meccanismi di trasduzione, alla mancanza di agonisti selettivi attivi a livello centrale e l'inconsistenza degli effetti farmacologici e neurochimici degli antagonisti.

Infatti, sebbene inizialmente si sia pensato che i recettori 5-HT₆ agissero attraverso il sistema di trasduzione proteina Gs/adenilato ciclasi, è stata recentemente riportata in letteratura l'esistenza di ulteriori pathway di trasduzione del segnale (e.g., fyn-kinase e Jag-1) (Yun et al. 2007; Yun et al. 2010), sebbene sembra segua la cascata di trasduzione della proteinchinasi A (PKA) (Yun et al. 2007).

Poiché i recettori 5-HT₆ hanno un'elevata omologia con diversi altri recettori serotoninergici, per molti anni non sono stati disponibili agonisti e antagonisti selettivi, necessari per uno studio approfondito del loro ruolo fisiologico, sebbene siano comunemente noti diversi agonisti serotoninergici non-selettivi, quali LSD che si lega fortemente ai recettori 5-HT₆.

Sono disponibili solo alcuni agonisti selettivi per il recettore 5-HT₆: WAY 181187 e WAY 208466, LY-586713, EMDT (De Foubert et al. 2007; Glennon et al. 2000; Glennon, 2003; Schechter et al. 2004). È stato riportato in letteratura che WAY 181187 e WAY 208466, agonisti dotati di elevata affinità per il recettore 5-HT₆, mostrano effetti da agonista pieno sull'adenilato ciclasi (Beyer et al. 2005; Schechter et al. 2004, 2008), ma si sono rivelati agonisti parziali con un'attività intrinseca intorno a 0.5 in una procedura di accoppiamento con proteina G_{αs} (Dupuis et al. 2008) per mezzo della Scintillation Proximity Assay /antibody-immunocapture. Un altro agonista, LY-586713 (de Foubert et al. 2007) è stato testato in studi neurochimici *in vivo* ma la sua affinità, la sua attività intrinseca e la sua specificità sono sconosciuti.

In contrasto con la scarsa varietà di agonisti, sono disponibili un elevato numero di antagonisti, ma finora sono stati ottenuti risultati discordanti. Ad esempio, sia agonisti (Burnham et al. 2010) che antagonisti (Hatcher et al. 2005) del recettore 5-HT₆ sono facilitatori in esperimenti di *attentional set shifting*.

Tra gli antagonisti selettivi il primo identificato, Ro 04-6790, e il più studiato, SB271046, sono efficaci per via orale e sono quindi promettenti candidati per lo sviluppo farmacologico clinico (Bromidge et al. 1999), è possibile tuttavia che abbiano limitate capacità di attraversare la barriera ematoencefalica (Hirst et al. 2003).

Il fatto che la distribuzione centrale dei recettori 5-HT6 sia quasi sovrapponibile con quella dei recettori dopaminergici suggerisce che la 5-HT interagisca largamente con la DA proprio attraverso i recettori 5-HT6.

1.5.1. Recettore 5-HT6 e funzione dopaminergica

Parte dell'interesse rivolto al recettore 5-HT6 in questi anni è basata sulla scoperta che alcuni antipsicotici atipici come alcuni antidepressivi sono antagonisti relativamente potenti del recettore 5-HT6 (Monsma et al. 1993; Roth, 1994). Comunque, esiste una certa confusione su come l'antagonismo del recettore 5-HT6 possa influenzare la trasmissione dopaminergica, specialmente il *release* corticale. Recenti studi dimostrano che la somministrazione sistemica di antagonisti selettivi del recettore 5-HT6 non influenza i livelli basali di DA extracellulare in corteccia frontale laterale, caudato-putamen, Acb e ippocampo (Dawson et al. 2000; Dawson et al. 2001; Dawson e Li 2003). Il blocco dei recettori 5-HT6 tuttavia aumenta i livelli di DA dializzata, ma non di 5-HT, nella PFCX (Lacroix et al. 2004). Piuttosto, sembra che il blocco dei recettori 5-HT6 sia prono a potenziare la trasmissione dopaminergica data da psicostimolanti. Ad esempio, l'aumento della concentrazione di DA extracellulare indotto dalla somministrazione periferica di amfetamina è potenziato dall'antagonismo sui recettori 5-HT6, in corteccia, nel Acb (Frantz et al. 2002) e nello striato (Dawson et al. 2003). SB399885, antagonista selettivo del recettore 5-HT6, induce da solo un aumento di release di DA nell'ippocampo ma non nella PFCX (Li et al. 2007). D'altra parte, è stato riportato che gli agonisti WAY 181187 e WAY 208466 diminuiscono i livelli di DA dializzata nella corteccia laterale frontale e nello striato dorsale ma non in Acb (Schechter et al. 2008).

1.6. La pathway delle ERK

Le MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) sono una famiglia di serin-treonin chinasi espresse in tutte le cellule eucariotiche, nelle quali svolgono un ruolo fondamentale in

numerosi processi cellulari tra cui la proliferazione, il differenziamento cellulare, l'apoptosi e l'espressione genica. La loro funzione si è conservata durante l'evoluzione in tutti gli eucarioti, dagli organismi unicellulari all'uomo.

Le MAPK sono attivate in seguito a diversi stimoli extracellulari (citochine, fattori di crescita, neurotrasmettitori, ormoni, stress) per fosforilazione attraverso una cascata enzimatica costituita da un modulo di tre chinasi sequenziali:

1. MKKK (MAP Kinase Kinase Kinase), famiglia di serin-treonin chinasi
2. MKK (MAP Kinase Kinase), sono treonin-tirosin chinasi
3. MAPK, questi enzimi nella forma attiva fosforilano diversi substrati sia citoplasmatici sia nucleari.

MKK sono chinasi molto specifiche, infatti in seguito ad attivazione sono in grado di fosforilare in maniera esclusiva e specifica le MAPK.

La conservazione delle componenti che determinano l'attivazione di MAPK in diverse specie di eucarioti inferiori così come nei mammiferi, dimostra l'importanza di queste molecole nello sviluppo dell'organismo.

Al momento negli organismi multicellulari sono stati identificati 14 membri della famiglia MKKK, 7 membri della famiglia MKK e 12 membri appartenenti alla famiglia MAPK. Le MAPK sono ulteriormente suddivise in 3 gruppi, ciascuno con distinte funzioni biologiche:

- ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases; isoforme 1-8)
- JNK/SAPK (Jun NH₂-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase; sottogruppi, 1/2/3) e
- p38 (sottogruppi $\alpha/\beta/\gamma/\delta$).

JNK/SAPK e p38 sono presenti in diversi tipi cellulari e implicate nelle risposte a condizioni di stress ambientale, infiammazione e apoptosi. I membri di entrambe le famiglie sono attivate dai lipopolisaccaridi, citochine proinfiammatorie, TNF- α (Tumor Necrosis Factor), raggi ultravioletti e farmaci chemioterapici antitumorali.

ERK ma soprattutto le isoforme ERK1 ed ERK2, proteine con il 90% di identità della sequenza aminoacidica, sono ubiquitariamente espresse a livelli micromolecolari in tutte le cellule di mammifero, coinvolte nel differenziamento e nella proliferazione cellulare; stimulate da fattori di crescita o segnali extracellulari determinano l'attivazione di fattori di trascrizione e altre proteine chinasi.

Le MAPK sono attivate per duplice fosforilazione su una sequenza aminoacidica detta loop di attivazione, in cui è contenuto un motivo caratteristico per ciascun gruppo di MAPK: Thr-Glu-Tyr per ERK1 ed ERK2, Thr-Pro-Tyr per JNK/SAPK, Thr-Gly-Tyr per p38.

Nelle cellule nervose di mammifero il termine ERK è un nome collettivo per le isoforme ERK1

(MAPK di 44-kDa) ed ERK2 (MAPK di 42-kDa), per la loro attivazione è necessaria la fosforilazione di entrambi i residui Thr183 e Tyr 185, ma per le ERK (3-8) i residui e il loro ruolo non sono ancora stati chiariti (Girault et al. 2007). Un modello per l'attivazione di ERK1 ed ERK2 prevede l'iniziale fosforilazione del residuo di tirosina in posizione 185, seguita da una sostanziale riconfigurazione del loop (il residuo Tyr185 non fosforilato, nasconde Thr183) affinché possa essere fosforilato anche il residuo Thr183 da parte di MEK.

I tipici attivatori delle ERK sono i recettori ad attività tirosin-chinasica per i fattori di crescita ma possono essere anche il recettore tirosin-chinasico per neurotrofine Trk, recettori associati a proteine G e i canali per il Ca²⁺. Vari studi indicano come responsabile della loro attivazione tutta una serie di sistemi di secondi messaggeri come il Ca²⁺ intracellulare, cAMP, PKA, PKC e le chinasi calcio/calmodulina dipendenti (CaMK). Il meccanismo a cascata responsabile dell'attivazione delle ERK ha origine con l'attivazione di una proteina G che a sua volta attiva la proteina adattatrice Ras (p21Ras-GTP, forma attiva), la quale porta all'attivazione di Raf.

I membri della famiglia di proteine Raf sono serin-treonin chinasi appartenenti alla famiglia delle MKKK, coinvolti nella trasduzione del segnale dalla membrana citoplasmatica al nucleo e comprendono: A-Raf, B-Raf e Raf-1. B-Raf, proteina di 96kDa, è espressa soprattutto in cellule neuronali e neuroendocrine e sembra essere l'attivatore specifico di MEK nel SNC.

L'attivazione di Raf necessita oltre all'associazione con il complesso Ras-GTP (fondamentale per legare Raf a livello della membrana), di una fosforilazione. Questa può avvenire o a livello di diversi residui di serina (Ser43, Ser259, Ser499 o Ser621) da parte della PKC (Protein Kinase C) o a livello del residuo di tirosina-340 e tirosina-341, da parte di proteine tirosin chinasi, come Src, Fyn o JAK. In seguito all'attivazione Raf è in grado di esercitare la sua attività serin-treonin chinasica e di conseguenza fosforila e attiva le MKK. Raf può essere fosforilato dalla PKA (Protein Kinase dipendente dall'cAMP) a livello della serina 621, ciò inibisce l'attività di questo enzima: in seguito a tale fosforilazione, si osserva una riduzione dell'affinità di Raf per Ras-GTP. Questo meccanismo costituisce un possibile feedback inibitorio per l'attivazione di ERK1 ed ERK2.

MKK, detto anche MEK (MAP ERK Kinase) ha localizzazione citoplasmatica, comprende due isoforme MEK1 e MEK2 entrambe di 44-kDa. L'attivazione di MEK avviene per fosforilazione a livello della sequenza del loop di attivazione Ser218-Met-Ala-Asn-Ser222 e a differenza di ERK1 ed ERK2, MEK può essere attivato anche solo parzialmente, dopo fosforilazione di uno solo dei due residui di serina. In condizioni di riposo anche le ERK sono localizzate nel citoplasma poiché si trovano ancorate a MEK. Con l'arrivo del segnale e la conseguente

fosforilazione di entrambi i residui ser e thr, le ERK si staccano e traslocano nel nucleo dove regolano l'espressione genica, fosforilando sia direttamente sia indirettamente i fattori di trascrizione di geni precoci (target sono: MSK1, Elk-1, CREB, proteine del citoscheletro, enzimi regolatori, canali ionici di membrana) in determinate sequenze di ser-thr causando una risposta cellulare immediata o cambiamenti duraturi (Girault et al. 2007). Questi geni, tra cui il c-fos, inducono a loro volta la trascrizione di geni tardivi i cui prodotti sono responsabili della risposta cellulare. ERK1 e ERK2 successivamente saranno inattivate per defosforilazione da parte di specifiche fosfatasi e ritorneranno nella forma inattiva riassociata a MEK.

La specificità di legame tra i componenti della pathway è garantita dall'intervento di proteine dette "impalcatura" (scaffold proteins) (Whitmarsh e Davis, 1998) che creano un complesso multi enzimatico. In questo modo il complesso isola le proteine allo scopo di prevenirne la loro attivazione da parte di altri stimoli e per favorire la rapida trasmissione del segnale nella cascata.

Durante gli ultimi anni è stata dedicata molta attenzione a questa pathway poiché si è osservato che le ERK, i loro regolatori e le loro molecole bersaglio, sono espresse anche in neuroni già differenziati definitivamente. Che funzione ha la cascata delle MAPK, in cellule che non si replicano né si differenziano più?

È stato messo in evidenza che le ERK nei neuroni sono attivate anche in risposta a segnali eccitatori glutammatergici e questo ha suggerito che le MAPK, oltre ad essere di fondamentale importanza nella crescita e differenziazione cellulare, sono anche coinvolte nei processi cellulari riguardanti la plasticità neuronale (Thomas e Huganir, 2004; Sweatt, 2004).

Una riprova è data dall'osservazione che l'attivazione delle ERK regola il traffico e l'espressione dei recettori NMDA (Zhu et al. 2002), meccanismo ritenuto importante per la plasticità sinaptica. Una forma di plasticità è la long term potentiation (LTP) e rappresenta il principale candidato per le basi neuronali dell'immagazzinamento della memoria (Atkins et al. 1998; Thiels e Klann, 2001). È stato dimostrato che la stimolazione ad alta frequenza tipica della LTP, determina l'attivazione delle ERK (English e Sweatt, 1996). Questo coinvolgimento è stato ulteriormente evidenziato con l'utilizzo di inibitori specifici della cascata delle MAPK come PD98059, U0126 o SL327 (Dudley et al. 1995; Alessi et al. 1995), agiscono su MEK e ne impediscono l'attivazione da parte di Raf. L'inibizione della cascata delle MAPK blocca l'insorgenza della LTP (English e Sweatt, 1997) e della conseguente trascrizione genica, ritenuta fondamentale per l'instaurarsi di modificazioni a lungo termine (Girault et al. 2007), previene infatti la fosforilazione di CREB e Elk-1 e l'induzione di altri geni LTP-dipendenti (Davis et al. 2000).

Le ERK sono coinvolte sia nei fenomeni di plasticità di LTP precoce (early phase LTP), che fanno incrementare il potenziale postsinaptico poco dopo l'induzione, sia in quelli più tardivi (late phase LTP), che addirittura si rendono evidenti solo dopo diverse ore.

La plasticità a lungo termine per ripetute depolarizzazioni nei neuroni dell'ippocampo induce cambiamenti strutturali, si nota la formazione di nuove spine dendritiche e filopodi, oltre che l'attivazione delle ERK (Wu et al. 2001). Anche se quest'attivazione non è direttamente collegata col fenomeno di plasticità, esso si dimostra però indispensabile. La somministrazione di U0126, infatti, impedisce sia l'attivazione delle ERK, sia la crescita di nuove strutture. Uno studio complementare ha messo in luce un incremento dell'attività delle ERK e del numero di spine dendritiche, in seguito all'attivazione dei recettori NMDA (Goldin e Segal, 2003). La crescita delle spine è bloccata dagli inibitori di MEK ed è dipendente dalla sintesi proteica. Non si sa ancora quali siano i ruoli specifici delle ERK, sembra comunque che la sua influenza si manifesti rapidamente nelle regioni somatiche, dendritiche e nel nucleo. Le ERK potrebbero fosforilare direttamente le proteine sinaptiche, controllare la traslocazione degli mRNA dei dendriti, e indurre la trascrizione di geni che sono necessari per la rimodellazione strutturale.

Durante gli ultimi anni è stata rivolta molta attenzione sul ruolo di MAPK/ERK oltre che nei processi adattativi neuronali (English e Sweatt, 1997; Davis et al. 2000), anche in funzioni cognitive quali la formazione della memoria e l'apprendimento (Orban et al. 1999).

La memoria a lungo termine richiede nuovo mRNA e nuove proteine, mentre la memoria a breve termine sembra non implicare la sintesi di nuove proteine in quanto il processo è insensibile all'inibizione dei meccanismi di trascrizione e trasduzione proteica. La late phase LTP dipende quindi dalla sintesi di nuove proteine mentre la early phase LTP si verifica anche in assenza della sintesi di mRNA e di proteine (Kandel, 2001). Studi recenti hanno suggerito che la disregolazione delle ERK sia alla base di disordini dell'apprendimento e di neurofibromatosi associata a ritardo mentale (Sweatt, 2004). Modificazioni patologiche della plasticità sinaptica nel corpo striato, inoltre, sono all'origine dell'uso compulsivo di sostanze psicostimolanti e di altre sostanze d'abuso nelle fasi avanzate della tossicodipendenza, uno degli esempi più eclatanti di plasticità dipendente dall'esperienza (Robinson e Kolb, 2002).

Numerosi studi suggeriscono un ruolo fondamentale delle ERK nei processi di apprendimento sostenuti dalle sostanze d'abuso attraverso il manifestarsi delle loro proprietà motivazionali.

L'osservazione dell'attivazione delle ERK in risposta a sostanze d'abuso è stata per la prima volta effettuata nella VTA di ratti esposti per 5 giorni alla cocaina o alla morfina (Berhow et al. 1996). Le sostanze d'abuso agiscono modificando l'espressione e il segnale trasmesso dalle

ERK e s'ipotizza che questa capacità sia alla base degli effetti di ricompensa e adattativi a lungo termine derivanti dall'assunzione della sostanza (Zhai et al. 2008). Una risposta specifica delle sostanze d'abuso è, infatti, l'attivazione delle ERK in aree del sistema dopaminergico mesocorticolimbico, nel quale sono particolarmente abbondanti. Studi di mappatura cerebrale di phospho-Extracellular signal Regulated Kinase o phospho-ERK (pERK, forma attiva fosforilata di ERK) hanno rivelato l'attivazione di aree specifiche quali lo striato dorsale, la AcbSh e il AcbC, nuclei del complesso dell'amigdala estesa quali il nucleo del letto della stria terminale pars lateralis (BNSTL) e l'amigdala centrale (CeA), ma anche gli strati profondi della PFCX e della corteccia cingolata, in conseguenza di una somministrazione acuta non contingente di diverse sostanze d'abuso (Δ 9-THC, nicotina, cocaina e morfina)(Valjent et al. 2004). In queste aree l'attivazione delle ERK da parte di sostanze dotate di proprietà additive può essere bloccata dall'antagonista recettoriale D1, SCH 23390 (Valjent et al. 2004), mentre con il blocco dei recettori D2 si ha solo un effetto di parziale prevenzione della loro attivazione (Valjent et al. 2000, 2001). In contrasto, l'attivazione delle ERK in altre regioni cerebrali (regione CA1 dell'ippocampo, corteccia cingolata) è indipendente dai recettori dopaminergici (Valjent et al. 2004).

La forte attivazione delle ERK in queste aree sembra essere un'ulteriore caratteristica delle sostanze d'abuso. Queste osservazioni sono coerenti con le proprietà delle sostanze d'abuso di aumentare i livelli di DA extracellulare nel sistema mesocorticolimbico, soprattutto nella AcbSh e pertanto suggeriscono che le ERK possano essere coinvolte in alcuni effetti comportamentali a lungo termine di queste sostanze.

In modelli sperimentali di apprendimento incentivo, stimoli sensoriali che da soli sono incapaci di attivare le ERK, se associati ripetutamente alle sostanze d'abuso ne possono indurre l'attivazione; dopo l'acquisizione della SA di cocaina, la presentazione di stimoli associati alla sostanza aumenta la fosforilazione delle ERK in CeA, solo dopo un mese di astinenza (Lu et al. 2005). Il blocco delle ERK in queste aree critiche potrebbe essere di fondamentale importanza per la prevenzione delle anormali alterazioni a carico del SNC indotte dalle sostanze d'abuso. A supporto di questa tesi troviamo in letteratura numerosi studi sul blocco della cascata delle ERK mediante somministrazione sistemica o locale in Acb d'inibitori delle MEK (e.g., SL327), capaci di bloccare l'espressione delle proprietà di rinforzo (valutate tramite il paradigma della CPP) di cocaina, Δ 9-THC, amfetamina e MDMA (Valjent et al. 2000; Salzman et al. 2003; Gerdjikov et al. 2004; Mizoguchi et al. 2004). La somministrazione di SL327 influenza in modo molto moderato la risposta psicomotoria a varie sostanze d'abuso, mentre previene lo sviluppo (acquisizione) ma non l'espressione della

sensitizzazione comportamentale indotta da ripetute e intermittenti esposizioni a psicostimolanti (Valjent et al. 2006). Questi risultati indicano che la capacità di attivare le ERK in determinate regioni cerebrali è un passaggio importante per l'instaurarsi delle alterazioni comportamentali durature indotte dalle sostanze d'abuso (Valjent et al. 2006).

2. Scopo dello studio

Nel quadro generale delle premesse fatte, obiettivo dello studio è stato caratterizzare ulteriormente l'interazione tra recettore 5-HT6 e sistema dopaminergico approfittando della recente disponibilità di un nuovo agonista, ST1936.

Riportiamo l'effetto della somministrazione acuta non-contingente di diverse dosi di ST1936 sul dializzato di DA, noradrenalina (NA) e 5-HT nella PFCX, nella AcbSh e nel AcbC e l'effetto del blocco dei recettori 5-HT6, per somministrazione sistemica di SB271046 o SB399885, sui cambiamenti indotti da ST1936. Riportiamo inoltre l'effetto della somministrazione volontaria di ST1936 da parte del ratto nel paradigma sperimentale della self-administration (SA). Inoltre riportiamo l'effetto di ST1936 sulla fosforilazione delle ERK nelle stesse aree studiate con la microdialisi cerebrale e del blocco selettivo dei recettori dopaminergici D1 con SCH39166 sulle modificazioni indotte da ST1936, con un approccio immunostochimico.

3. Materiali e metodi

3.1. Animali

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley (Harlan Italy, S. Pietro al Natisone, Udine, Italia), del peso di 275-300 grammi. I ratti sono stati stabulati in gruppi di sei in gabbie in plexiglas, per almeno una settimana prima dell'inizio delle diverse pratiche sperimentali, in condizioni standard di temperatura (23°C) e umidità (60%), con acqua e cibo *ad libitum*, e con un ciclo artificiale luce-buio alternato di 12 ore (luce dalle 8:00 AM alle 8:00 PM). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con la legge italiana (D.L.: 27.01.1992, N° 116) e con le linee guida per l'utilizzo e la cura degli animali da esperimento della Comunità Economica Europea (n. 2007/526/CE). È stato fatto ogni sforzo possibile per ridurre al minimo dolore e disagio degli animali e per ridurre il numero dei soggetti sperimentali.

3.2. Farmaci

ST1936, 2-(5-cloro-2-metil-1H-indol-3yl)-N,N-dimetietammina (gentilmente donato dalla ditta Sigma-Tau, Pomezia, Italy), è stato disciolto in salina (0.9% NaCl) e somministrato per via intraperitoneale (ip) (3 ml/kg).

SB271046, 5-cloro-N-(4-metossi-3-piperazin-1-ylfenil)-3-metil-2-benzotiofenesulfonamide e SB399885, N-(3,5-dicloro-2-metossifenil)-4-(metossi)-3-(1-piperaziny)-benzenesulfonamide (Tocris) sono stati disciolti in acqua sterile e Tween 80 (0.5%) e somministrati ip o ev e ip rispettivamente.

SCH39166, (6aS-trans)-11-cloro-6,6a,7,8,9,13b-esaidro-7-metil-5H-benzo(d)naft(2,1-b)azepin-12-olidrobromide (Schering-Plough, Milan, Italy) è stato disciolto in salina (0.9% NaCl) e somministrato per via sottocutanea (sc) (1 ml/kg).

3.3. Microdialisi cerebrale

Preparazione del probe.

Probe concentrici per la dialisi (porzione dializzante 3.0 mm per PFCX o 1.5 mm per Acb) sono stati preparati con fibra da dialisi (310 mm o.d. 220 mm i.d. Hospal, Dasco, Italy) AN 69

(sodium methallyl sulfate copolymer) secondo il metodo di Di Chiara et al. (1993) come modificato da Tanda et al. (1996).

Chirurgia ed Esperimento.

I ratti sono stati anestetizzati con cloralio idrato (400 mg/4 ml/kg/ip) e posti sull'apparato stereotassico. Il cranio è esposto e si pratica un piccolo foro su un lato. Il probe è impiantato verticalmente nella PFCX (anteriorità 3.7; lateralità 0.8 dal bregma; verticalità -5.0 dalla dura), e nel AcbSh (anteriorità 1.9; lateralità 0.9 dal bregma; verticalità -7.8 dalla dura) o nel AcbC (anteriorità 1.6; lateralità 1.5 dal bregma; verticalità -7.5 dalla dura); secondo l'atlante di Paxinos & Watson (1998), e quindi fissato sul cranio con cemento dentale. Sotto l'effetto della stessa anestesia, a un gruppo di ratti è stato impiantato un catetere (Medical-Grade tubing; Silastic, Dow Corning, Michigan) nella vena giugulare destra. I ratti sono poi posti in semisfere in plexiglas con disponibilità di cibo e acqua. Gli esperimenti sono stati eseguiti sui ratti liberi di muoversi 24 ore dopo l'impianto del probe.

La soluzione di Ringer (147 mM, NaCl; 2.2 mM, CaCl₂; 4 mM, KCl), è spinta attraverso il probe per mezzo di una pompa a un flusso costante di 1 µl/min.

Procedura analitica.

I campioni di dializzato sono iniettati senza purificazione in un apparato HPLC equipaggiato con una colonna a fase inversa (C8 3.5µm, Waters, Mildford Massachusetts) e un detector coulombetrico (ESA Coulochem II, Bedford, MA) per la quantificazione simultanea di DA, NA e 5-HT. Il primo elettrodo è impostato a -90 mV e il secondo a +280 mV. La fase mobile è costituita da: NaH₂PO₄ 75 mM, EDTA 20 mM, sodiodecasolfato 1 mM, trietilamina 0.01% e metanolo 15% a pH 5.70 e è pompata con una pompa Jasco a un flusso costante di 0.6 ml/min.

Istologia.

Alla fine dell'esperimento sui ratti si esegue una perfusione transcardiaca con 100 mL di salina (0.9% NaCl) e 100 mL di formaldeide al 10%. I probe sono rimossi e cervelli estratti e tagliati con un vibratomo in sezioni coronali seriali secondo l'atlante di Paxinos & Watson (1998) per localizzare l'esatta posizione del probe.

3.4. Self-administration

I ratti sono sottoposti a chirurgia, previa anestesia con cloralio idrato (400 mg/kg/4 ml/ip), per l'impianto di un catetere cronico (Medical-Grade Tubing; Silastic, Down Corning MI, USA) nella vena giugulare destra. Il catetere cronico è stato fatto passare sotto la cute per essere poi fissato al centro della regione scapolare. Dopo la chirurgia, gli animali sono stati stabulati singolarmente e manipolati due volte al giorno per un periodo post-operatorio di 7-10 giorni durante il quale è stata effettuata una terapia antibiotica preventiva con 0,1 ml di gentamicina solfato (40 mg/kg/ml), soluzione fisiologica sterile ed eparina (250 U/ml in soluzione fisiologica sterile), per via endovenosa. Tutti gli esperimenti sono stati condotti tra le 10:00 AM e le 5:00 PM mediante l'impiego di gabbie acusticamente isolate (Coulburn Instruments, Allentown, NJ USA) munite di due fessure (*nose-pokes*) provviste di fotocellule, attivate dal muso dell'animale, poste alla distanza di 2 cm dal pavimento della gabbia. Uno dei due *nose-pokes*, illuminato tramite luce giallo-verde è stato definito attivo poiché per suo tramite l'animale è stato in grado di attivare la pompa d'infusione del farmaco collocata esternamente alla gabbia, mentre la fessura illuminata con luce rossa, tramite la quale il ratto non ha potuto esercitare alcun controllo sulla pompa d'infusione, è stata definita *nose-poke* inattivo. La differente illuminazione dei due *nose-pokes* ha costituito lo stimolo discriminativo. Prima che la sessione avesse inizio, il catetere cronico è stato lavato con 0,1 ml di soluzione fisiologica sterile e quindi gli animali posti nel sistema di SA.

La sessione di autosomministrazione è monitorata da un sistema computerizzato (Graphic State 2 software, Colbourn Instrument, PA, USA) e si divide nelle seguenti fasi:

- 1) **Ready phase**, attivazione della pompa d'infusione per 4 sec per il riempimento del catetere cronico con un volume morto di 50 μ l;
- 2) **Drug available phase**, durante la quale il comportamento di nose-poking attivo da parte dei ratti consente il passaggio alla fase successiva;
- 3) **Infusion phase**, costituita dall'iniezione endovena di 0,5 o 1 mg/Kg in 24 μ l di ST1936 in un tempo di 2 sec;

4) Time-out phase, successiva all'infusione del farmaco e della durata di 20 sec, nel corso della quale ogni *nose-poke* è registrato (ma non induce alcuna ulteriore infusione). Durante questo periodo la luce dell'abitacolo è accesa ed entrambi i *nose-pokes* sono illuminati con luce rossa. Al termine del time-out la disponibilità del farmaco è segnalata dallo spegnimento della luce nell'abitacolo e dalla illuminazione del *nose-poke* attivo da luce giallo-verde.

Al termine della sessione il catetere cronico è lavato con soluzione fisiologica eparinizzata e ogni animale è riposto nella propria gabbia.

[Esperimento I] I ratti sono stati allenati ad autosomministrarsi ST1936, per nove settimane consecutive e durante la seconda settimana hanno acquisito il comportamento di autosomministrazione di ST1936 alla dose di 1 mg/kg, poi dimezzata a 0.5 mg/kg per le successive settimane. Inizialmente è stata usata una schedula a rapporto fisso FR1, in cui per un *nose-poke* l'animale riceve una infusione di farmaco. Quando i ratti hanno mostrato una risposta stabile, la schedula è stata modificata a FR5, in cui sono necessari 5 *nose-pokes* per ottenere una sola iniezione di farmaco, e dopo cinque giorni riportata a FR1.

Dalla 24° sessione è stato testato l'effetto del pretrattamento con due antagonisti 5-HT₆: SB271046 (10 mg/kg/sc) somministrato 40 minuti prima della sessione di autosomministrazione, ST2546 (20 mg/kg/sc) e SB271046 (20 mg/kg/ip) somministrati 60 minuti prima.

[Esperimento II] I ratti sono stati allenati ad autosomministrarsi ST1936 per sei settimane consecutive. Inizialmente è stata usata una schedula FR1. Una volta raggiunti i criteri di acquisizione, la schedula di lavoro è stata modificata a FR2 in cui sono stati necessari 2 *nose-pokes* per ottenere una sola iniezione. Raggiunta una risposta stabile, i ratti sono stati pretrattati con l'antagonista SB271046 (20 mg/Kg/ip) un'ora prima della sessione di SA. Successivamente la schedula di lavoro è stata sostituita con una a rapporto progressivo (PR 9-4). Tale schedula di lavoro, proposta da Grasing e collaboratori (2003) in sostituzione alla PR 3-4 nella SA da eroina, prevede un aumento più graduale della risposta richiesta per una infusione (1-1-1, 2-2-2, 3-3, 4-4, 5-5, 6-6, 7-7, etc.). In questa condizione, la nona infusione segue in risposta a 4 *nose-pokes*. L'animale aumenta la sua risposta per ottenere il rinforzo. Quando però la risposta richiesta supera il valore di rinforzo della sostanza, l'animale estingue

il suo comportamento di autosomministrazione. Questo punto è chiamato breaking point (BP).

Durante gli esperimenti i ratti hanno ricevuto al termine di ciascuna sessione di SA, una razione controllata di cibo (18 g, corrispondenti a 4 barrette). Al termine dell'intero esperimento i ratti sono stati sacrificati mediante somministrazione endovenosa di una soluzione satura di cloralio idrato per verificare la reale efficienza del catetere.

3.5. Immunoistochimica

Prima dell'esperimento agli animali è stata somministrata salina per tre giorni consecutivi. Il giorno dell'esperimento, dopo un periodo di adattamento nelle semisfere di plexiglass, gli animali sono stati trattati con salina (1 ml/kg sc) o con SCH39166 (SCH) (McQuade et al. 1991) (50 µg/kg sc) 10 min prima di ST1936 (20 mg/kg/ip) o salina (controlli) (3 ml/kg/ip). Trenta minuti dopo la somministrazione di salina o ST1936 i ratti sono stati anestetizzati profondamente per iniezione di cloralio idrato (400 mg/kg/ip) prima della perfusione trans cardiaca con PBS (phosphate buffered saline: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) ghiacciato e paraformaldeide (PFA) al 4%. Come discusso in precedenti studi (Acquas et al. 2007; Ibba et al. 2009), l'intervallo tra il trattamento col farmaco in studio e l'anestesia per la perfusione è stato scelto sulla base del tempo necessario per l'effetto di picco della quantità di DA extracellulare osservato negli esperimenti di microdialisi cerebrale. I cervelli dei ratti sono rimossi e post-fissati *overnight* nella stessa soluzione fissativa, quindi sezionati mediante vibratomo (Leica VT1000S, Leica Microsystems, Milano, Italy). Le sezioni coronali, dello spessore di 40 µm, ottenute in accordo con l'atlante del cervello del ratto di Paxinos e Watson (1998), sono conservate a -20°C in una soluzione crioprotettiva contenente 30% di etilen glicole, 30% di glicerolo e 40% di PBS, prima di essere processate per la colorazione immunoistochimica seguendo un protocollo su fettine flottanti. **Giorno 1:** le sezioni vengono lavate una volta in TBS (Trizma Buffered Saline; 0.1 M TRIZMA cloridrato e 0,9% NaCl), due volte in TBS-Tx (TBS contenente lo 0,1% di Triton x-100) quindi incubate per 30 min in una soluzione all'1% di H₂O₂ in TBS. Le sezioni sono poi lavate tre volte per 10 min ciascuna in TBS-Tx e a seguire poste in una soluzione di incubazione contenente 3% BSA (bovine serum albumin) e 5% NGS (normal goat serum) per un'ora, quindi lavate tre volte per 10 min ciascuna in TBS-Tx. Si procede con l'incubazione delle sezioni in una soluzione

contenente l'anticorpo primario, eseguita *overnight* a 4°C in leggera agitazione. L'anticorpo anti-pERK è di tipo policlonale e si lega a ERK1/2 nella loro forma doppiamente fosforilata sui residui Thr202 e Tyr204 di ERK1, Thr185 e Tyr187 di ERK2 (anti phospho-p44/p42 MAPK, Cell Signaling Technology, Beverly, MA). La diluizione utilizzata è [1:300]. Sono stati fatti appropriati controlli negativi utilizzando una soluzione di BSA 3% in TBS-Tx senza l'anticorpo anti-pERK. **Giorno 2:** dopo tre lavaggi in TBS-Tx di 10 min ciascuno, le sezioni sono messe in incubazione con l'anticorpo secondario biotinitato in concentrazione [1:800](Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Dopo lavaggi, le sezioni sono poste in incubazione con una soluzione detta ABC, contenente il complesso avidina-biotina-perossidasi (Vecstatin Elite ABC kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) preparata secondo le specifiche del produttore. Le sezioni sono lavate tre volte per 10 min ciascuna in TBS-Tx e quindi poste in una soluzione contenente 3,3'-diaminobenzidina (0,7 mg/ml), urea perossido d'idrogeno (0,17 mg/ml) e Tris Buffer 0,06 M (Sigma Fast™ 3,3'-diaminobenzidine Tablets, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Dopo lavaggi le sezioni sono montate su vetrini portaoggetti (26 mm x 76 mm x 1 mm), disidratate attraverso una scala alcolica a gradazione crescente e l'ultimo passaggio si effettua in xilene per un'analisi al microscopio in campo chiaro.

I neuroni pERK-positivi sono stati ricercati in diverse aree cerebrali secondo l'atlante del cervello del ratto di Paxinos e Watson (1998): in PFCX (AP +3.72 mm dal bregma), nelle regioni PrL e IL, analizzando di entrambe sia gli strati profondi (*deep layers*) sia gli strati superficiali (*superficial layers*), in Acb (AP +2,04 mm dal bregma), nelle subregioni AcbC e AcbSh, di cui sono state analizzate tre suddivisioni dette AcbSh MED, AcbSh INT e AcbSh LAT. I neuroni pERK-positivi sono identificati in entrambi gli emisferi di ogni ratto, ad un ingrandimento 10X, con un microscopio Zeiss Axio Scope A.1 accoppiato con una telecamera digitale (Lumenera's INFINITY3-1 camera, 1.4 Megapixel, Lumenera Corporation, Ottawa, ON, Canada) gestita per mezzo di un software (Lumenera INFINITY CAPTURE, Lumenera Corporation, Ottawa, ON, Canada). Il numero totale di neuroni pERK-positivi è misurato, utilizzando il software ImageJ unitamente all'applicazione per analisi d'immagine "Cell Counter".

4. Analisi statistica

Microdialisi cerebrale

L'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute è stata applicata ai dati ottenuti dalla quantificazione seriale di DA, NA e 5-HT dopo ogni trattamento. I risultati che mostrano cambiamenti complessivi significativi sono sottoposti all'analisi del post-hoc secondo Tukey con significatività statistica per $p < 0.05$. I valori basali sono la media di tre campioni consecutivi che differiscono per meno del 10%.

Self-administration

I risultati ottenuti durante ogni sessione di SA sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie, utilizzando il numero cumulativo di *nose-pokes* (attivi vs inattivi) come fattori, e i giorni come misure ripetute.

Immunoistochimica

La media \pm l'errore standard della media (SEM) del numero dei neuroni pERK-positivi è stata utilizzata per una comparazione statistica tra soggetti utilizzando l'ANOVA. L'analisi del post-hoc secondo Tukey è stata applicata per le comparazioni multiple con significatività statistica fissata a $p < 0.05$.

5. Risultati

5.1. Microdialisi cerebrale

Nella PFCX i valori basali (media \pm SEM) sono 23 ± 1.8 ; 36.4 ± 2.6 e 12.0 ± 1.25 fmoles/20ml rispettivamente di DA, NA e 5-HT. Nella AcbSh i valori basali sono 109.88 ± 14.03 ; 13.8 ± 1.04 e 12.33 ± 0.88 fmoles/20ml; nel AcbC 112.8 ± 8.1 ; 9.36 ± 1.18 e 10.0 ± 4.0 fmoles/20ml rispettivamente di DA, NA e 5-HT. I risultati sono calcolati come variazione percentuale del valore basale.

Effetto di ST1936 sul dializzato di DA, NA e 5-HT nella PFCX.

La somministrazione acuta di ST1936 (5-10-20 mg/kg/ip) aumenta in modo dose-dipendente i livelli di DA e NA extracellulare nella PFCX. Così, come mostrato in figura 2, ST1936 aumenta la DA dializzata alla dose di 10 (picco: 186%) e 20 mg/kg/ip (348%). In modo analogo ST1936 aumenta la NA dializzata alla dose di 10 (picco: 200%) e 20 mg/kg/ip (411%) ma non alla dose di 5 mg. Non sono stati osservati cambiamenti significativi sui livelli di 5-HT. Il pretrattamento con SB271046 alle dosi di 10 e 20 mg/kg/ip, somministrato a 60 min, previene in modo dose-dipendente l'effetto di 20 mg di ST1936 sul *release* di DA e NA. Inoltre SB271046 (10 mg/kg/iv), somministrato a 30 min, produce un effetto simile. Anche il pretrattamento con SB399885 alla dose di 5mg/kg riduce l'effetto di 20 mg di ST1936 sul *release* di DA e NA.

Dopamina: L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di ST1936 a diverse dosi mostra un effetto significativo della dose ($F_{3,17}=25.2$; $p<0.05$), del tempo ($F_{9,153}=46.2$; $p<0.05$) e dell'interazione dose x tempo ($F_{27,153}=17.5$; $p<0.05$).

L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di SB271046 (10-20 mg/kg/ip o 10 mg/kg/iv) + di ST1936 (20 mg/kg/ip) mostra un effetto significativo del trattamento ($F_{2,14}=7.3$; $p<0.05$) e ($F_{1,14}=13.05$; $p<0.05$), del tempo ($F_{12,168}=41.9$; $p<0.05$) e ($F_{9,126}=40.9$; $p<0.05$) e dell'interazione trattamento x tempo ($F_{24,168}=6.1$; $p<0.05$) e ($F_{9,126}=7.0$; $p<0.05$), rispettivamente.

L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di SB399885 (5 mg/kg/ip) + ST1936 (20 mg/kg/ip) mostra un effetto significativo del trattamento ($F_{1,9}=10.4$; $p<0.05$), del tempo ($F_{12,108}=34.8$; $p<0.05$) e dell'interazione trattamento x tempo ($F_{12,108}=9.7$; $p<0.05$).

Noradrenalina: L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di ST1936 a diverse dosi mostra un effetto significativo della dose ($F_{3,15}=7.4$; $p<0.05$), del tempo ($F_{9,135}=17.1$; $p<0.05$) e dell'interazione dose x tempo ($F_{27,135}=7.3$; $p<0.05$).

L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di SB271046 (10-20 mg/kg/ip o 10 mg/kg/iv) + di ST1936 (20 mg/kg/ip) mostra un effetto significativo del trattamento ($F_{2,12}=5.9$; $p<0.05$) e ($F_{1,10}=6.9$; $p<0.05$), del tempo ($F_{12,144}=19.4$; $p<0.05$) e ($F_{9,90}=32.9$; $p<0.05$) e dell'interazione trattamento x tempo ($F_{24,144}=6.1$; $p<0.05$) e ($F_{9,90}=5.5$; $p<0.05$), rispettivamente.

L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di SB399885 (5 mg/kg/ip) + ST1936 (20 mg/kg/ip) mostra un effetto significativo del tempo ($F_{12,108}=20.8$; $p<0.05$) e dell'interazione trattamento x tempo ($F_{12,108}=4.4$; $p<0.05$).

Effetto di ST1936 sul dializzato di DA, NA e 5-HT nella AcbSh.

L'effetto della somministrazione acuta di ST1936 (5-10-20 mg/kg/ip) sul dializzato di DA, NA e 5-HT è mostrato in figura 3. La dose 20 mg/kg aumenta i livelli di DA e la NA dializzata (picco: 341% e 332% rispettivamente), mentre la dose 10 mg/kg è risultata efficace solo sulla DA dializzata (188%). Non sono stati osservati cambiamenti significativi sui livelli di 5-HT con tutte le dosi testate.

Come per la PFCX, il pretrattamento con SB271046 alle dosi di 10 e 20 mg/kg/ip, somministrato 60 min, previene totalmente l'effetto di 20 mg di ST1936 sul *release* di DA e NA. Inoltre SB271046 (10 mg/kg/ev), somministrato a 30 min, produce un effetto simile. Anche il pretrattamento con SB399885 alla dose di 5mg/kg riduce l'effetto di 20 mg di ST1936 sul *release* di DA e NA.

Dopamina: L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di ST1936 a diverse dosi mostra un effetto significativo della dose ($F_{3,13}=8.04$; $p<0.05$), del tempo ($F_{9,117}=11.4$; $p<0.05$) e dell'interazione dose x tempo ($F_{27,117}=6.53$; $p<0.05$).

L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di SB271046 (10-20 mg/kg/ip or 10 mg/kg/ev) + ST1936 (20 mg/kg/ip) mostra un effetto significativo del trattamento ($F_{2,14}=5.3$; $p<0.05$) e ($F_{1,7}=7.1$; $p<0.05$), del tempo ($F_{12,168}=26.5$; $p<0.05$) e ($F_{9,63}=15.7$; $p<0.05$) e dell'interazione trattamento x tempo ($F_{24,168}=4.6$; $p<0.05$) e ($F_{9,63}=5.0$; $p<0.05$), rispettivamente.

L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di SB399885 (5 mg/kg/ip) + ST1936 (20 mg/kg/ip) mostra un effetto significativo del tempo ($F_{12,72}=16.9$;

p<0.05).

Noradrenalina: L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di ST1936 a diverse dosi mostra un effetto significativo della dose (F_{3,12}=39.2; p<0.05), del tempo (F_{9,108}=15.9; p<0.05) e dell'interazione dose x tempo (F_{27,108}=11.8; p<0.05).

L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di SB271046 (10-20 mg/kg/ip o 10 mg/kg/iv) + di ST1936 (20 mg/kg/ip) mostra un effetto significativo del trattamento (F_{2,13}=5.23; p<0.05) e (F_{1,5}=39.4; p<0.05), del tempo (F_{12,156}=28.46; p<0.05) e (F_{9,45}=18.8; p<0.05) e dell'interazione trattamento x tempo (F_{24,156}=3.48; p<0.05) e (F_{9,45}=5.8; p<0.05), rispettivamente.

L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di SB399885 (5 mg/kg/ip) + ST1936 (20 mg/kg/ip) mostra un effetto significativo del trattamento (F_{1,5}=63.7; p<0.05), del tempo (F_{12,60}=32.02; p<0.05) e dell'interazione trattamento x tempo (F_{12,60}=16.4; p<0.05), rispettivamente.

Effetto di ST1936 sul dializzato di DA, NA e 5-HT nel AcbC.

La somministrazione acuta di ST1936 (5-10-20 mg/kg/ip) aumenta i livelli extracellulari di DA e NA nel AcbC. Come mostrato in figura 4, la dose 10 mg/kg aumenta la DA dializzata (picco: 179%) mentre la dose più alta aumenta sia la DA sia la NA dializzata (201% e 231%, rispettivamente). La dose di 5 mg/kg non produce alcun effetto. Non sono stati osservati cambiamenti significativi sui livelli di 5-HT.

Dopamina: L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di ST1936 a diverse dosi mostra un effetto significativo della dose (F_{3,15}=9.9; p<0.05), del tempo (F_{9,135}=6.1; p<0.05) ma non dell'interazione dose x tempo (p>0.05).

Noradrenalina: L'analisi ANOVA a due vie dei risultati ottenuti dalla somministrazione di ST1936 a diverse dosi mostra un effetto significativo della dose (F_{3,12}=19.0; p<0.05), del tempo (F_{9,108}=6.9; p<0.05) e dell'interazione dose x tempo (F_{27,108}=4.0; p<0.05).

5.2. Self-Administration

[1° esperimento] La figura 5 mostra il numero di *nose-pokes* attivi ed inattivi effettuati, per nove settimane consecutive, da parte dei ratti allenati ad autosomministrarsi ST1936 e il relativo consumo (*intake*) quotidiano di ST1936, espresso come mg/kg. Durante la seconda settimana i ratti hanno acquisito il comportamento di SA di ST1936 (1 mg/kg/inf), poi dimezzato (0.5 mg/kg/inf) per le successive settimane. Quando i ratti hanno mostrato una risposta stabile, la schedula è stata modificata a FR5 e successivamente riportata a FR1 dopo cinque giorni. A partire dalla 24° sessione è stato testato l'effetto di due antagonisti 5-HT6. La somministrazione di SB271046 (10 mg/kg/sc) 40 min prima della sessione non ha ridotto in maniera significativa la risposta di autosomministrazione, mentre la somministrazione di ST2546 (20 mg/kg/sc) e SB271046 (20 mg/kg/ip) 60 min. prima rispettivamente riduce e blocca completamente la risposta di SA. L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per i fattori *nose-poke* ($F_{1,16}=30.8$, $p<0.01$) e sessione ($F_{41,656}=7.3$, $p<0.01$) e una interazione significativa *nose-poke* x sessione ($F_{41,656}=5.4$, $p<0.01$). Il test del post-hoc LSD ha evidenziato che il numero dei *nose-pokes* attivi è stato significativamente più alto rispetto a quello degli inattivi dalla 9° alla 33° sessione e dopo antagonista dalla 39° alla 42° sessione. In figura 5 è rappresentata anche l'autosomministrazione di soluzione fisiologica sostituita, dalla 43° sessione, all'ST1936. L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per i fattori *nose-poke* ($F_{1,16}=9.1$, $p<0.05$) e sessione ($F_{4,64}=10.6$, $p<0.01$) e una interazione significativa *nose-poke* x sessione ($F_{4,64}=3.4$, $p<0.05$). Il test del post-hoc LSD ha evidenziato che il numero dei *nose-pokes* attivi si è mantenuto significativamente più alto nelle prime due sessioni di estinzione per poi diminuire drasticamente fino a sovrapporsi a quello degli inattivi.

[2° esperimento] La figura 6 mostra il numero di *nose-pokes* attivi ed inattivi effettuati da parte dei ratti allenati ad autosomministrarsi ST1936 per sei settimane consecutive e il relativo *intake* di ST1936, espresso come mg/kg.. I ratti hanno acquisito il comportamento di autosomministrazione di ST1936 dalla seconda settimana con la dose di 0.5 mg/kg/inf (fino al 11° giorno) e di 1 mg/kg/inf, secondo una schedula FR1, poi modificata a FR2. L'ANOVA a due vie ha mostrato un effetto significativo per i fattori *nose-poke* ($F_{1,16}=66.5$, $p<0.05$) e giorno ($F_{32,512}=5.3$, $p<0.05$) e per l'interazione *nose-poke* x giorni ($F_{32,512}=4.11$, $p<0.05$). Il test LSD ha evidenziato come il numero dei *nose-pokes* attivi è stato significativamente più alto

rispetto a quello degli inattivi dal 10° fino al 33° giorno e che il pretrattamento con l'antagonista ha completamente abolito l'effetto di autosomministrazione (giorno 25°). Dalla 29° sessione, con la schedula di lavoro PR 9-4 gli animali hanno proseguito il loro comportamento di autosomministrazione mantenendo una schedula di lavoro pari a 4 (breaking point). L'ANOVA ad una via ha mostrato un effetto significativo per il fattore giorno ($F_{27,216}=10.8$, $p<0.05$). Dopo la fase di acquisizione, gli animali hanno mantenuto un consumo stabile di ST1936 per tutta la fase del mantenimento.

5.3. Immunoistochimica

Effetto di ST1936 sulla immunoreattività della pERK nella PFCX e effetto del pretrattamento con SCH39166

La tabella 1 e la figura 7 mostrano l'effetto di ST1936 e del pretrattamento con SCH39166 sul numero di neuroni pERK-positivi nei *deep* e nei *superficial layers* della PrL e IL, suddivisioni della PFCX. L'analisi ANOVA a tre vie dei risultati della somministrazione di ST1936 (20 mg/kg) e di SCH (50 µg/kg) non mostra un effetto del pretrattamento ($F_{1,112}=0,03$; NS) né del trattamento ($F_{1,112}=3,65$; NS) ma un significativo effetto principale dell'area ($F_{3,112}=102,39$; $p<0,00001$); una interazione pretrattamento x trattamento ($F_{1,112}=40,88$; $p<0,00001$) e pretrattamento x trattamento x area ($F_{3,112}=11,99$; $p<0,00001$), ma non pretrattamento x area ($F_{3,112}=2,34$; NS). Il test di Tukey ($p<0,05$) ha dimostrato che ST1936 aumenta il numero dei neuroni pERK-positivi nei *deep* e nei *superficial layers* della PrL ma non della IL e che il pretrattamento con SCH previene questi effetti sia nei *deep* sia nei *superficial layers* della PrL.

Effetto di ST1936 sulla immunoreattività della pERK nella AcbSh e nel AcbC e effetto del pretrattamento con SCH39166

La tabella 1 e la figura 8 mostrano l'effetto di ST1936 e del pretrattamento con SCH39166 sul numero di neuroni pERK-positivi nella AcbSh e nel AcbC. L'analisi ANOVA a tre vie dei risultati della somministrazione di ST1936 (20 mg/kg) e di SCH (50 µg/kg) sul numero di neuroni pERK-positivi nella AcbSh e nel AcbC mostra un effetto principale del trattamento ($F_{1,56}=34,84$; $p<0,000001$), del pretrattamento ($F_{1,56}=53,23$; $p<0,000001$) e dell'area ($F_{1,56}=21,35$; $p<0,0001$). Inoltre rivela un effetto significativo dell'interazione pretrattamento x trattamento ($F_{1,56}=27,29$; $p<0,00001$), pretrattamento x area

($F_{1,56}=12,05$; $p<0,01$), trattamento x area ($F_{1,56}=9,81$; $p<0,01$), e pretrattamento x trattamento x area ($F_{1,56}=12,05$; $p<0,01$).

Il test di Tukey ($p<0,05$) ha dimostrato che ST1936 aumenta il numero dei neuroni pERK-positivi nella AcbSh ma non nel AcbC e che il pretrattamento con SCH previene questi aumenti.

L'analisi ANOVA a tre vie dei risultati della somministrazione di ST1936 (20 mg/kg) e di SCH (50 μ g/kg) sul numero di neuroni pERK-positivi in AcbSh MED, AcbSh INT e AcbSh LAT (vedi figura 1) mostra un effetto principale significativo del trattamento ($F_{1,84}=21,76$; $p<0,000001$), del pretrattamento ($F_{1,84}=32,13$; $p<0,000001$) e dell'area ($F_{2,84}=22,28$; $p<0,0001$). Inoltre rivela un effetto significativo dell'interazione pretrattamento x trattamento ($F_{1,84}=20,15$; $p<0,0001$), pretrattamento x area ($F_{2,84}=8,36$; $p<0,001$), trattamento x area ($F_{2,84}=5,00$; $p<0,01$), pretrattamento x trattamento x area ($F_{2,84}=4,64$; $p<0,05$). Il test di Tukey ($p<0,05$) ha dimostrato che ST1936 aumenta il numero dei neuroni pERK-positivi nella AcbSh MED e nella AcbSh INT ma non nella AcbSh LAT e che il pretrattamento con SCH previene questi aumenti.

Aree cerebrali	Neuroni pERK-positivi				
	Pretrattamento	saline	SCH39166	saline	SCH39166
	Trattamento	saline	saline	ST1936	ST1936
		(n = 6)	(n = 8)	(n = 8)	(n = 8)
Prelimbic cortex (PrL)					
deep layers		74,0 ± 8,4	109,8 ± 14,1 (+48,3%)	184,6 ± 18,8 * (+149,5%)	97,4 ± 7,5 § (+31,6%)
superficial layers		74,0 ± 12,3	141,8 ± 18,6 (+91,6%)	153,9 ± 17,2 * (+107,9%)	103,4 ± 7,2 § (+39,7%)
Infralimbic cortex (IL)					
deep layers		21,2 ± 2,8	36,6 ± 4,7 (+73%)	33,0 ± 2,5 (+55,9%)	31,1 ± 2,9 (+47%)
superficial layers		27,3 ± 3,3	34,1 ± 3,1 (+24,8%)	26,8 ± 5,0 (-2,1%)	28,0 ± 3,6 (+2,4%)
Nucleus accumbens (Acb)					
Core		25,2 ± 2,6	13,4 ± 2,4 (-46,9%)	57,1 ± 8,0 (+127%)	20,1 ± 3,3 (-20%)
Shell		30,5 ± 4,8	23,3 ± 2,0 (-23,8%)	154,6 ± 23,8 * # (+407%)	25,5 ± 3,6 § (-16,4%)
Shell dorsomediale		25,5 ± 4,4	14,8 ± 2,2 (-42,2%)	89,5 ± 19,6 * (+251%)	14,3 ± 3,1 § (-44,1%)
Shell intermedia		5,0 ± 1,8	7,3 ± 0,9 (+45%)	61,1 ± 14,7 * (+1122,5%)	10,3 ± 2,8 § (+105%)
Shell laterale		1,7 ± 0,4	1,3 ± 0,4 (-25%)	4,0 ± 1,2 (+140%)	1,0 ± 0,3 (-40%)

Tabella 1. Effetto di ST1936 sulla immunoreattività di pERK nella PFCX e nel Acb del cervello di ratto e il ruolo dei recettori dopaminergici D1.

Il numero dei neuroni pERK-positivi, quantificato come descritto nella sezione “Materiali e metodi”, è espresso come media ± SEM, i (valori %) esprimono la variazione percentuale rispetto al gruppo di trattamento con salina nella stessa area anatomica. * p<0.05 quando sono comparati i gruppi trattati con salina e con ST1936; # p<0,05 vs Core, stesso trattamento; § p < 0,05 quando sono comparati i gruppi trattati con SCH39166 e con salina.

6. Discussione e conclusioni

Questo studio mette in evidenza che la somministrazione di ST1936 aumenta in modo dose-dipendente i livelli di DA e NA dializzata nella AcbSh e nella PFCX e in misura minore nel AcbC; questi effetti sono prevenuti dalla somministrazione sistemica dei due antagonisti del recettore 5-HT6 e sono quindi coerenti con osservazioni *in vitro* (Borsini et al. 2008) che ST1936 lega con affinità nano molare i recettori 5-HT6, comportandosi da agonista pieno nel saggio dell'adenilato ciclasi. ST1936 aumenta anche il numero dei neuroni pERK-positivi nelle parti intermedia e mediale della AcbSh ma non del AcbC; inoltre, ST1936 aumenta il numero dei neuroni pERK-positivi nei *deep* e nei *superficial layers* della PrL ma non nella IL, porzioni della PFCX. L'aumento del numero dei neuroni pERK-positivi indotto da ST1936 è completamente abolito nella sia nella AcbSh sia nella PrL dal pretrattamento con SCH39166, antagonista selettivo dei recettori dopaminergici D1. Queste osservazioni suggeriscono che la pERK sia l'espressione trasduzionale della proprietà di ST1936 di indurre il *release* di DA nelle aree cerebrali prese in esame. Il meccanismo che porta a questi effetti probabilmente non è dovuto al blocco del trasportatore della DA (DAT) o del trasportatore della NA (NET) poiché ST1936 non si lega a questi trasportatori; potrebbe essere invece correlato all'attivazione dell'attività di *firing* neuronale dopaminergico e noradrenergico (Borsini et al, dati non pubblicati). È noto che agonisti del recettore 5-HT1A aumentano la DA extracellulare nella PFCX (Tanda et al. 1994; Arborelius et al. 1993). Comunque, questi agonisti diminuiscono la 5-HT extracellulare come risultato dell'attivazione degli autorecettori 5-HT1A somatodendritici. ST1936 non influenza i livelli di 5-HT extracellulare e questo potrebbe escludere un ruolo dei recettori 5-HT1A nella sua proprietà di stimolazione della DA. Nonostante la sua azione DA-stimolante, ST1936 non causa attività motoria né induce stereotipie in queste condizioni sperimentali. Comunque, ST1936 induce CPP e *conditioned saccharin aversion* (CSA)(Fenu et al, in preparazione) e nei ratti sostiene un comportamento di autosomministrazione (Valentini et al, in preparazione). Queste proprietà sono coerenti con l'azione DA-stimolante di ST1936 e in particolare con le azioni stimolanti sulla AcbSh. Così sostanze con proprietà di rinforzo hanno in comune la caratteristica di stimolare la trasmissione dopaminergica che si manifesta con aumenti dei livelli di DA extracellulare, preferenzialmente nella AcbSh piuttosto che nel AcbC (Di Chiara et al. 2004). Il quadro complessivo degli effetti *in vivo* di ST1936 differisce da quello prodotto da WAY 181187, agonista parziale ad alta affinità del recettore 5-HT6 (è stato riportato che riduce la DA e la 5-HT extracellulare nella corteccia frontale ma risulta privo di effetto su NA in Acb e corteccia frontale e su DA in Acb)(Schechter et al. 2008). Comunque, Schechter e colleghi nel loro studio

non distinguono tra le subregioni shell e core del Acb e le aree corticali oggetto del loro studio sono caudali rispetto alla PFCX studiata in questo lavoro. Questo rende inattuabile una comparazione diretta tra i risultati mostrati in questa tesi e quelli di Schechter et al. (2008). Un'altra differenza tra gli effetti di ST1936 e quelli di WAY181187 è il loro decorso temporale. In fatti gli effetti neurochimici di ST1936 sono rapidi, danno un picco dopo 40 minuti e poi diminuiscono verso i valori basali. Invece WAY181187 arriva all'effetto massimale circa 200/300 minuti dopo somministrazione sistemica (Schechter et al. 2008). Queste differenze suggeriscono che, oltre alle differenze farmacodinamiche, i due agonisti del recettore 5-HT6 sono dotati di differenti permeabilità a livello encefalico, le proprietà di ST1936 sono coerenti con un rapido attraversamento della barriera ematoencefalica e rapido riequilibrio tra sangue e aree cerebrali (Borsini et al. dati non pubblicati). Le conseguenze comportamentali della stimolazione della trasmissione dopaminergica da parte di ST1936 rimangono poco chiare. ST1936 non causa stimolazione locomotoria ma sostiene un comportamento di autosomministrazione (Valentini et al, in preparazione), inoltre, ST1936 induce in modo blando CPP e CSA, effetti che possono essere giustificati per la sua abilità di facilitare la trasmissione dopaminergica nella AcbSh (Fenu et al, in preparazione). Ulteriori effetti giustificabili per l'abilità di ST1936 di facilitare la trasmissione dopaminergica sono le sue proprietà antianedoniche (Demontis et al, dati non pubblicati).

7. Figure

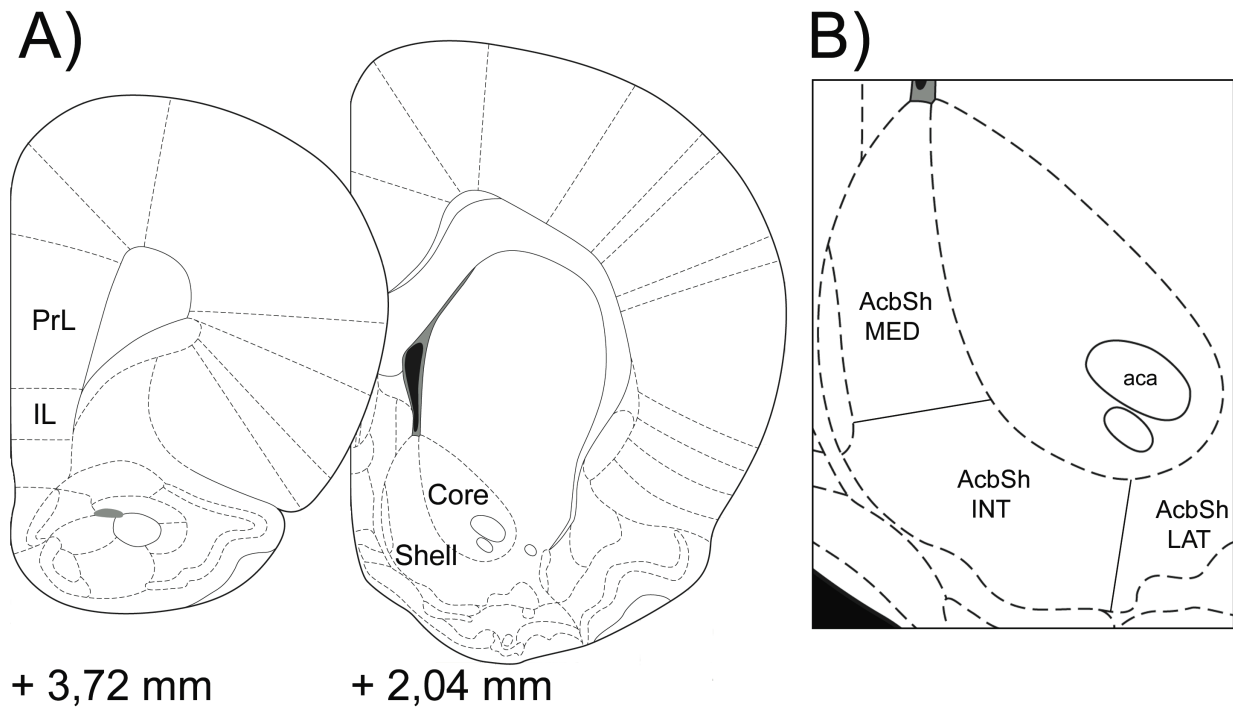


Figura 1. Aree anatomiche del cervello di ratto in cui sono stati quantificati i neuroni pERK-positivi.

Il pannello A) indica i livelli, espressi come distanza (antero-posteriorità) in mm dal bregma, ai quali sono state prelevate le sezioni per la colorazione immunostochimica. Nella emisezione coronale sinistra si è analizzata la PFCX, nelle sue subregioni PrL e IL, mentre nella emisezione coronale destra si è analizzato il nucleus accumbens, nelle sue subregioni Shell e Core. Il pannello B) rappresenta le tre subregioni in cui è stata suddivisa la Shell: dorsomediale, intermedia e laterale (come descritto nella sezione "Materiali e Metodi"). Le immagini sono tratte da Paxinos and Watson (1998), "The rat brain in stereotaxic coordinates". **PrL**, corteccia prelimbica; **IL**, corteccia infralimbica; **AcbSh MED**, porzione dorsomediale della Shell; **AcbSh INT**, porzione intermedia della Shell; **AcbSh LAT**, porzione laterale della Shell; **aca**, commissura anteriore.

PREFRONTAL CORTEX

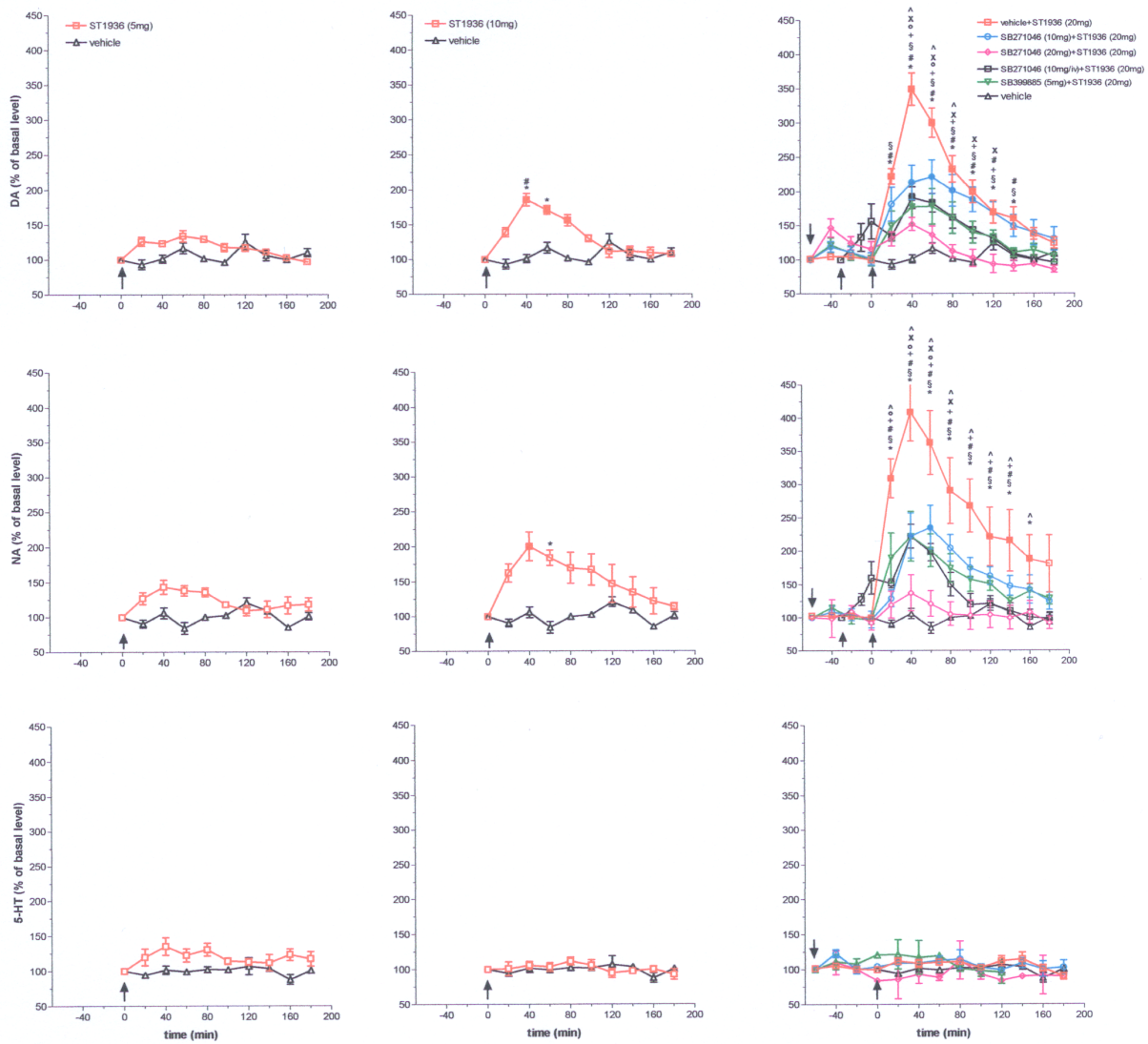


Figura 2. Effetto di ST1936 (5-10-20 mg/kg/ip) sul dializzato di DA, NA e 5-HT nella PFCX e antagonismo da parte di SB271046 o SB399885.

Simboli pieni: $p < 0.05$ vs valori basali; * $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del trattamento con salina; § $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del trattamento con ST1936, dose 10 mg; # $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del trattamento con ST1936, dose 5 mg; + $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del gruppo pretrattato (SB271046 20 mg); ° $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del gruppo pretrattato (SB271046 10 mg); ^ $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del gruppo pretrattato (SB271046 10 mg/iv); x $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del gruppo pretrattato (SB399885 5 mg) (Tukey-test).

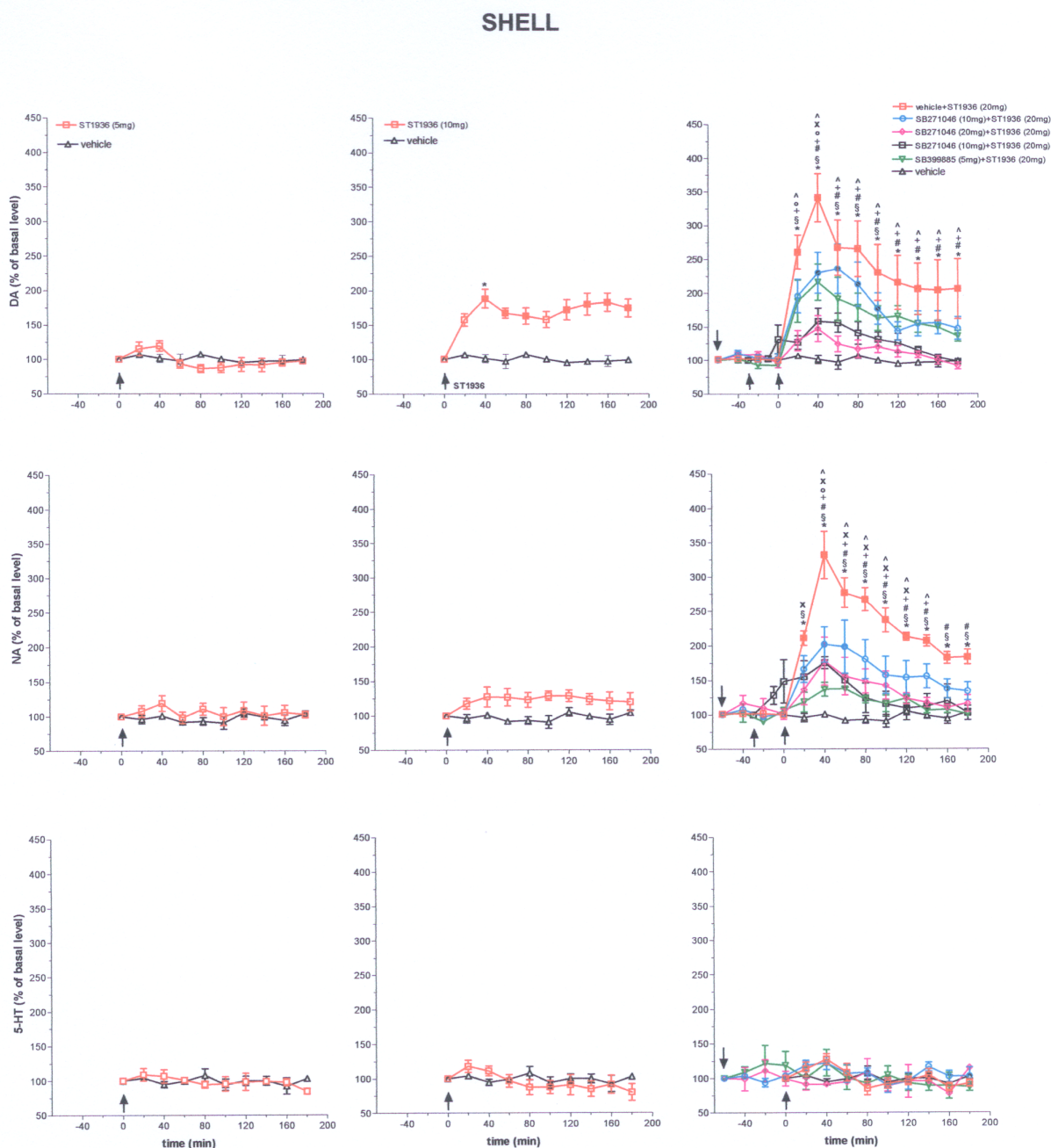


Figura 3. Effetto di ST1936 (5-10-20 mg/kg/ip) sul dializzato di DA, NA e 5-HT nella AcbSh e antagonismo da parte di SB271046 o SB399885.

Simboli pieni: $p < 0.05$ vs valori basali; * $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del trattamento con salina; § $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del trattamento con ST1936, dose 10 mg; # $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del trattamento con ST1936, dose 5 mg; + $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del gruppo pretrattato (SB271046 20 mg); ° $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del gruppo pretrattato (SB271046 10 mg); ^ $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del gruppo pretrattato (SB271046 10 mg/iv); x $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del gruppo pretrattato (SB399885 5 mg) (Tukey-test).

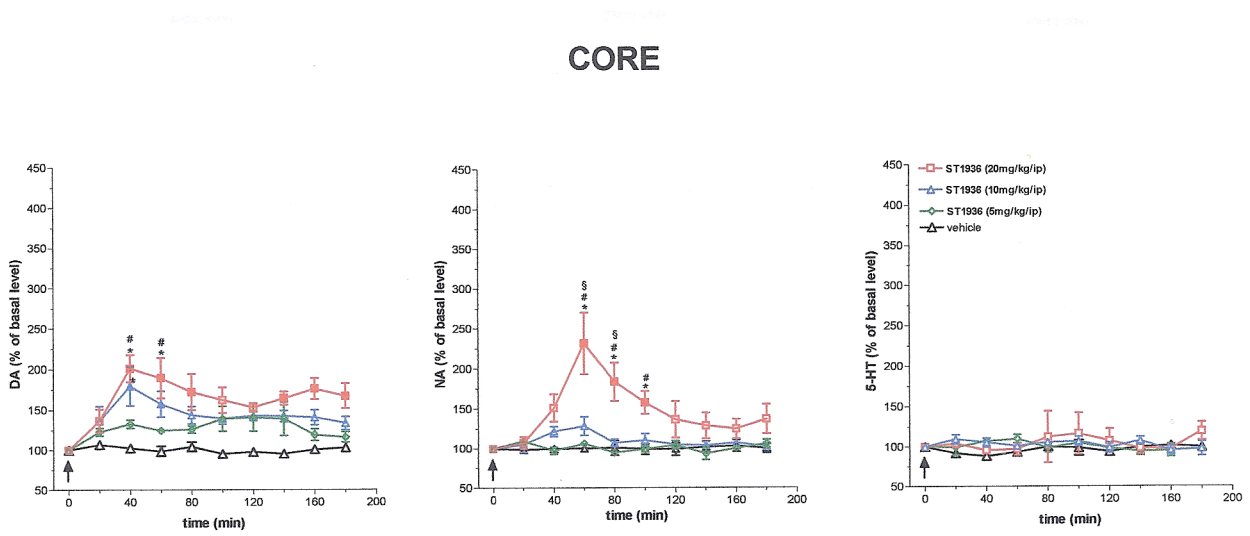


Fig. 4 Effetto di ST1936 (5-10-20 mg/kg/ip) sui dializzato di DA, NA e 5-HT nel AcbC.

Simboli pieni: $p < 0.05$ vs valori basali; * $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del trattamento con salina; § $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del trattamento con ST1936, dose 10 mg; # $p < 0.05$ vs il corrispondente time-point del trattamento con ST1936, dose 5 mg (Tukey-test).

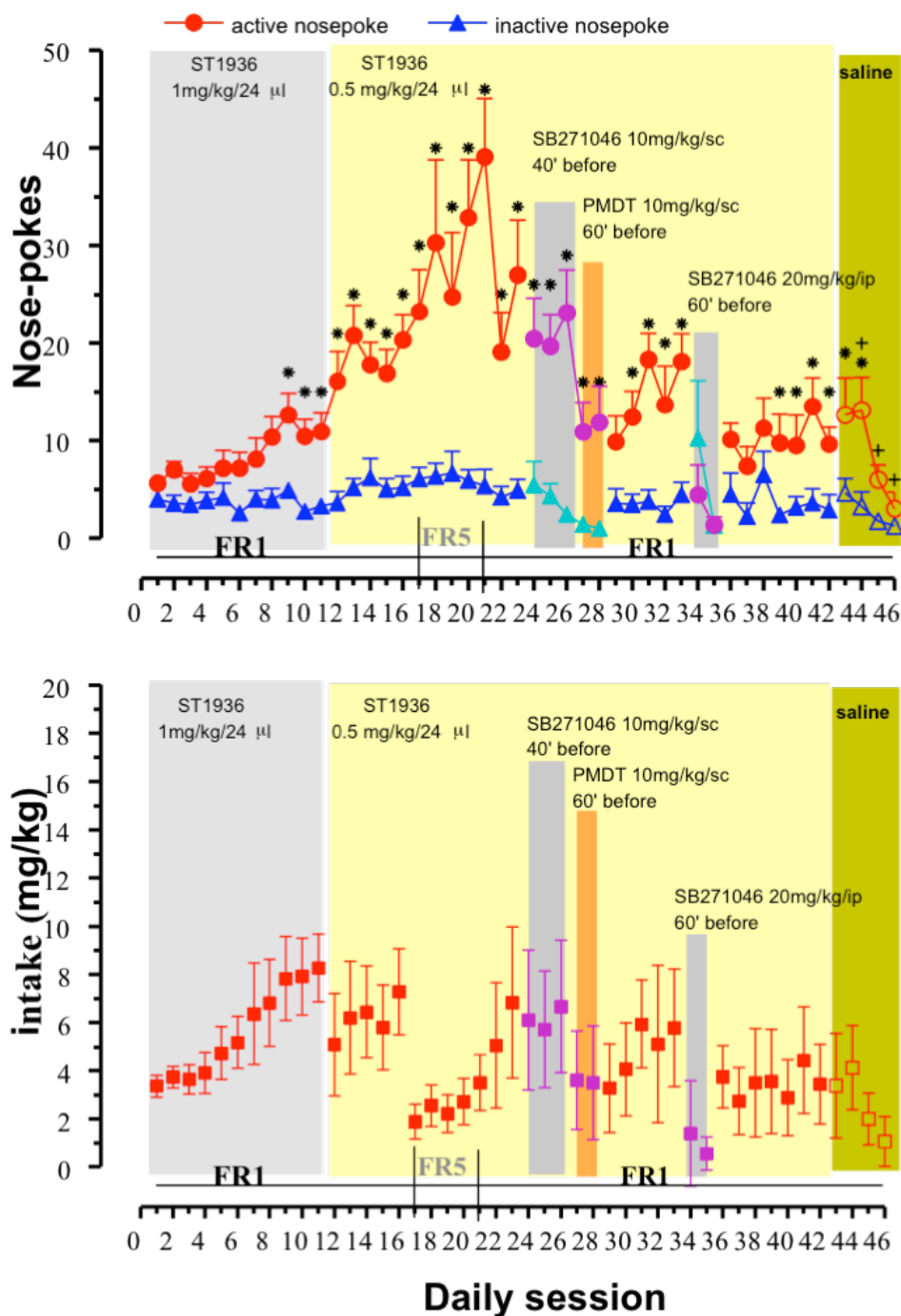


Figura 5. Esperimento I° di autosomministrazione di ST1936.

Nel pannello superiore sono riportate le risposte cumulative (*nose-pokes*) durante il periodo di AS di ST1936. I risultati sono espressi come media \pm SEM dei *nose-pokes* attivi (pallini) ed inattivi (triangoli) registrati durante ciascuna sessione. *: $p < 0.05$ vs il corrispondente valore di *nose-pokes* inattivi; +: $p < 0.05$ vs il corrispondente valore di *nose-pokes* attivi dalla 42° sessione. Nel pannello inferiore è riportato l'intake quotidiano di ST1936 e di soluzione fisiologica durante la fase di estinzione (dalla 42° sessione). L'assunzione di ST1936 è espressa come mg/kg, durante ciascuna sessione di SA di ST1936. alle dosi indicate (simboli pieni), previo trattamento con antagonisti 5-HT6 (simboli viola), e durante la fase di estinzione (simboli vuoti). **FR1**, un *nose-poke* per una infusione; **FR5**, cinque *nose-pokes* per una infusione.

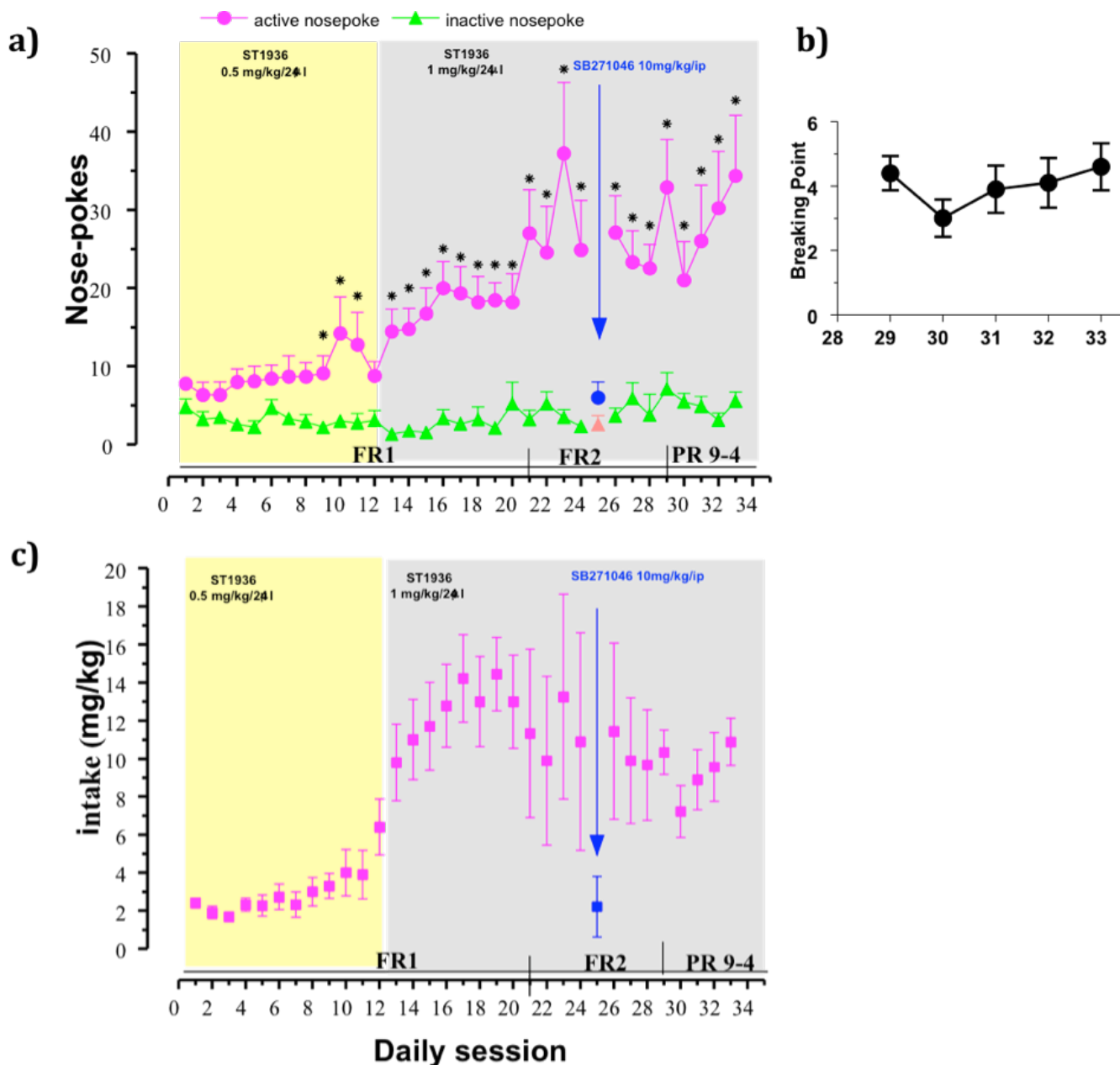


Figura 6. Esperimento II° di autosomministrazione di ST1936.

Nel pannello **a)** sono riportate le risposte cumulative (*nose-pokes*) durante il periodo di AS di ST1936. I risultati sono espressi come media \pm SEM dei *nose-pokes* attivi (pallini) ed inattivi (triangoli) registrati durante ciascuna sessione. *: $p < 0.05$ vs il corrispondente valore di *nose-pokes* inattivi. Nel pannello **b)** è mostrato breaking point del comportamento di SA di ST1936 nella fase di PR 9-4. Nel pannello **c)** è riportato l'intake quotidiano di ST1936. L'assunzione di ST1936 è espressa come mg/kg, durante ciascuna sessione di SA di ST1936.

FR1, un *nose-poke* per una infusione; **FR2**, due *nose-poke* per una infusione; **PR 9-4**, rapporto progressivo *nose-poke* di necessari per una infusione (come descritto nella sezione "Materiali e metodi").

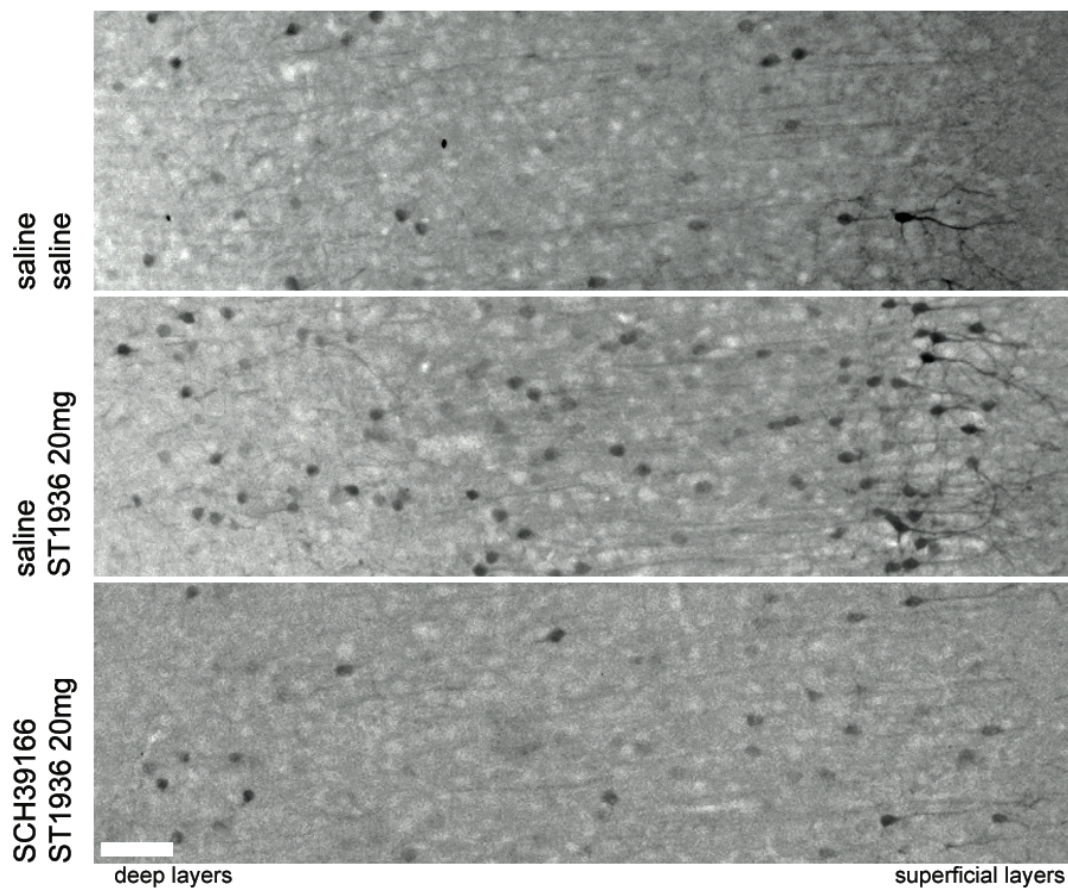


Figura 7. Effetto della somministrazione sistemica di ST1936 (20 mg/kg/ip) sulla fosforilazione delle ERK nella PFCX e effetto del pretrattamento con SCH39166, antagonista del recettore D1.

La colorazione immunoistochimica per phospho-extracellular signal regulated kinase (pERK) è stata eseguita con uno specifico anticorpo e rilevata con un microscopio in campo chiaro. In figura sono mostrate immagini ad ingrandimento 10X rappresentative dell'effetto del trattamento farmacologico sull'immunoreattività di pERK negli strati profondi (sinistra, *deep layers*) e superficiali (destra, *superficial layers*) della PFCX del ratto. Il pannello superiore mostra l'effetto del trattamento salina-salina, il pannello centrale l'effetto del trattamento acuto con ST1936 (20 mg/kg/ip) e il pannello inferiore riporta l'effetto del pretrattamento con SCH39166 (50 µg/kg/sc)(scale bar, 100µm).

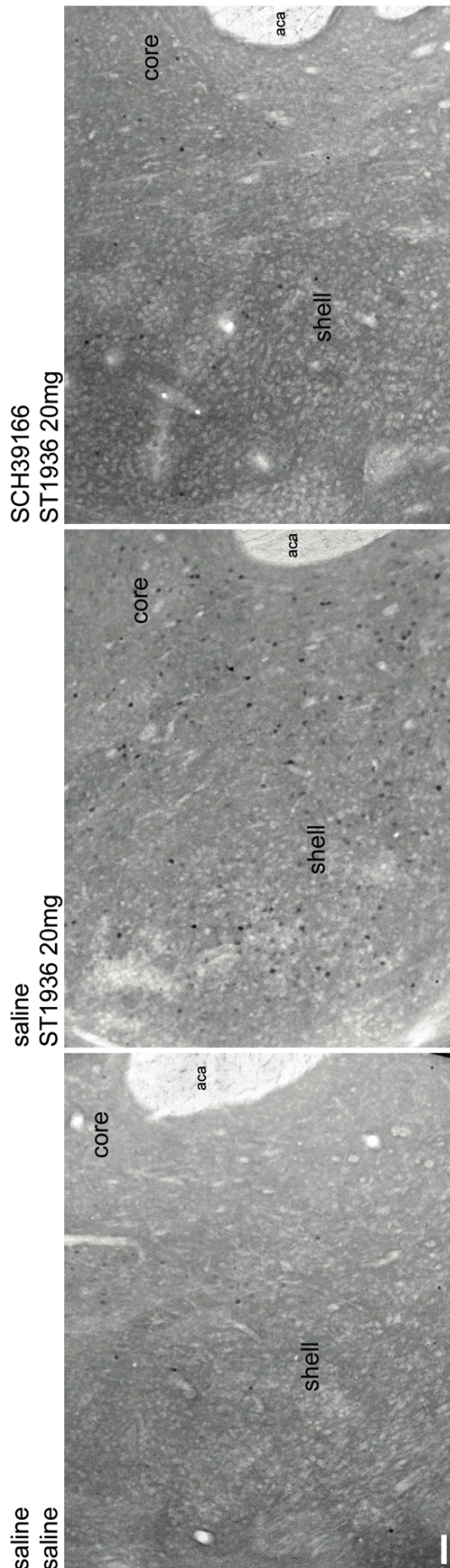


Figura 8. Effetto della somministrazione sistemica di ST1936 (20 mg/kg/ip) sulla fosforilazione delle ERK nel Acb e effetto del pretrattamento con SCH39166, antagonista del recettore D1.

La colorazione immunohistochemica per pERK è stata eseguita con uno specifico anticorpo e rilevata con un microscopio in campo chiaro. In figura sono mostrate immagini ad ingrandimento 10X rappresentative della colorazione per pERK nel Acb, in entrambe le subregioni shell e core, dell'effetto del trattamento con salina o ST1936 e del pretrattamento con SCH39166.

(scale bar, 100µm). *aca*, anterior commissure.

Referenze e Bibliografia

- Acquas E, Pisanu A, Spiga S, Plumitallo A, Zernig G, Di CG (2007). Differential effects of intravenous R,S-(+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) and its S(+)- and R(-)-enantiomers on dopamine transmission and extracellular signal regulated kinase phosphorylation (pERK) in the rat nucleus accumbens shell and core. *J Neurochem* 102: 121-132.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* Nov 17;270(46):27489-94.
- Alex KD, Pehek EA (2007). Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther.* Feb;113(2):296-320. Epub 2006 Oct 17. Review.
- Alheid GF, Heimer L (1988). New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27(1): 1-39.
- Andersen HP, Gingrich JA, Bates DM, Dearry A, Falardeau P, Senogles SE, Caron MG (1990). Dopamine receptors subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Tips* 11: 231-236.
- Arborelius L, Nomikos GG, Hacksell U, Svensson TH (1993). (R)-8-OH-DPAT preferentially increases dopamine release in rat medial prefrontal cortex. *Acta Physiol Scand* 148: 465-466.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci.* 1(7):602-9.
- Barnes NM, Sharp T (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* Aug;38(8):1083-152.
- Bassareo V, Di Chiara G (1997). Differential influence of associative and non associative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 17: 851-861.
- Berhow M.T., Hiroi N., Nestler E.J. (1996). Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J. Neurosci.* 16(15):4707-15.
- Beyer CE, Smith DL, Zhang G, Li P, Lin Q, Stock JR, et al. (2005). WAY-181187: neurochemical profile of a novel and selective 5-HT6 receptor agonist. *Annual Meeting Society of Neuroscience* 567.13.
- Bindra D (1976). A theory of intelligent behavior. John Wiley and Sons, New York.
- Boess FG, Martin IL (1994). Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology.* Mar-Apr;33(3-4):275-317.
- Boess FG, Riemer C, Bos M, Bentley J, Bourson A, Sleight AJ (1998). The 5-hydroxytryptamine6 receptorselective radioligand [3H]Ro 63-0563 labels 5-hydroxytryptamine receptor binding sites in rat and porcine striatum. *Molecular Pharmacology*;54:577-583.
- Bolles RC (1975). Theory of motivation. Harper and Row, New York.
- Borsini F, Stasi MA, Minetti P, Riccioni T, Mennini T (2008). Effect of ST1936, a 5HT6 ligand, on rodent adenylate cyclase and forced swimming test. *CINP Biennial International Congress 2008 Munich* P-01.109.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell of the "accumbens" part of the rat ventral

- striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* 338:255-278.
- Bromidge SM, Brown AM, Clarke SE, Dodgson K, Gager T, Grassam HL, Jeffrey PM, Joiner GF, King FD, Middlemiss DN, Moss SF, Newman H, Riley G, Routledge C, Wyman P (1999). 5-Chloro-N-(4-methoxy-3-piperazin-1-yl-phenyl)-3-methyl-2-benzothiophenesulfonamide (SB-271046): a potent, selective, and orally bioavailable 5-HT6 receptor antagonist. *J Med Chem* 42, 202-205.
- Burnham KE, Baxter MG, Bainton JR, Southam E, Dawson LA, Bannerman DM, et al. (2010). Activation of 5-HT(6) receptors facilitates attentional set shifting. *Psychopharmacology (Berl)* 208: 13-21.
- Cadoni C, Solinas M, Di Chiara G (1999). Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. *Eur J Pharmacol* 388: 69-76.
- Caine SB, Koob GF (1994). Effects of dopamine D1 and D2 antagonists on cocaine self-administration under different schedules of reinforcement in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 270(1): 209-218.
- Carboni E, Imperato A, Perezzi L, Di Chiara G (1989). Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 28: 653-661.
- Carr GD, White NM (1983). Conditioned place preference from intra-accumbens but not intra-caudate amphetamine injections. *Life Sci* 33: 2551-2557.
- Carr GD, White NM (1986). Anatomical disassociation of amphetamine's rewarding and aversive effects: an intracranial microinjection study. *Psychopharmacology (Berl)* 89: 340-346.
- Castano P, Donato RF. (2001). Anatomia dell'uomo. Edi Ermes, Milano, 361-362.
- Chio CL, Drong RF, Reily DT, Gill GS, Slingtom JL, Huff RM (1994a). D4 dopamine receptor-mediated signaling events determined in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 269: 1813-11819.
- Chio CL, Lajiness ME, Huff RH (1994b). Activation of heterologously expressed D3 dopamine receptors: comparison with D2 dopamine receptors. *Mol Pharmacol* 45: 51-60.
- Clark D, White FJ (1987). D1 dopamine receptor-the search for a function: a critical evaluation of the D1/D2 dopamine receptor classification and its functional implications. *Synapse* 1: 347-388.
- Corbit LH, Muir JL, Balleine BW (2001). The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J Neurosci* 1;21(9): 3251-60.
- Dahlström A, Fuxe K (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. Jul 15;20(7):398-9.
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*. 20(12):4563-72.
- Dawson TM, Barone P, Sidhu A and Chase TN (1988). The D1 dopamine receptor in the rat brain: quantitative autoradiographic localization using iodinated ligand. *Neurosci* 26: 83-100.
- Dawson LA, Li P (2003). Effects of 5-HT(6) receptor blockade on the neurochemical outcome of antidepressant treatment in the frontal cortex of the rat. *J Neural Transm* 110: 577-590.
- Dawson LA, Nguyen HQ, Li P (2000). In vivo effects of the 5-HT(6) antagonist SB-

- 271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. *Br J Pharmacol* 130:23-26.
- Dawson LA, Nguyen HQ, Li P (2001). The 5-HT(6) receptor antagonist SB-271046 selectively enhances excitatory neurotransmission in the rat frontal cortex and hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 25: 662-668.
- Dawson LA, Nguyen HQ, Li P (2003). Potentiation of amphetamine-induced changes in dopamine and 5-HT by a 5-HT(6) receptor antagonist. *Brain Res Bull.* Feb 15;59(6):513-21.
- Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr Bates MD, Caron MG (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347: 72-76.
- de Foubert G., O'Neill MJ, Zetterstrom TS (2007). Acute onset by 5-HT(6)-receptor activation on rat brain brain-derived neurotrophic factor and activity-regulated cytoskeletal-associated protein mRNA expression. *Neuroscience* 147: 778-785.
- Derkach V, Surprenant A, North R (1989). 5-HT3 Receptors are Membrane Ion Channels. *Nature.* 339:706-709.
- Di Chiara G (1995). The role of dopamine in drug of abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend* 38: 95-137.
- Di Chiara G. (2005). Dopamine, Motivation and Reward in *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol. 21: Dopamine. Elsevier, Amsterdam.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 47: 227-241.
- Di Chiara G, Imperato (1988). A Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5274-5278.
- Di Chiara G, Tanda G, Bassareo V, Pontieri FE, Acquas E, Fenu S, Cadoni C, Carboni E (1999). Drug addiction as a disorder of associative learning. Role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. *Ann NY Acad Sci* 877: 461-485.
- Di Chiara G., Tanda G, Frau R, Carboni E (1993). On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes. *Psychopharmacology (Berl)* 112: 398-402.
- Di Matteo V, De Blasi A, Di Giulio C, Esposito E. (2001). Role of 5-HT(2C) receptors in the control of central dopamine function. *Trends Pharmacol Sci.* May;22(5):229-32. Review.
- Di Matteo V, Di Giovanni G, Pierucci M, Esposito E (2008). Serotonin control of central dopaminergic function: focus on in vivo microdialysis studies. *Prog Brain Res.* 2008;172:7-44. Review.
- Di Giovanni G, Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E (2008). Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res.* 2008;172:45-71. Review.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 15;92(17):7686-9.
- Dupuis DS, Mannoury la CC, Chaput C, Verrielle L, Lavielle G, Millan MJ (2008). Actions of novel agonists, antagonists and antipsychotic agents at recombinant rat 5-HT6 receptors: a comparative study of coupling to G alpha s. *Eur J Pharmacol* 588: 170-177.

- Eglen RM, Wong EH, Dumuis A, Bockaert J (1995). Central 5-HT4 receptors. *Trends Pharmacol Sci. Nov*;16(11):391-8.
- Eglen RM, Jasper JR, Chang DJ, Martin GR (1997). The 5-HT7 receptor: orphan found. *Trends in Pharmacological Sciences* ;18:104-107.
- English JD, Sweatt JD (1996). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem.* 1996 Oct 4;271(40):24329-32.
- English JD and Sweatt JD (1997). A Requirement for the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade in Hippocampal Long Term Potentiation. *The Journ. Biol. Chem.* 31:19103-19106.
- Fenu S, Spina L, Rivas E, Longoni R, Di Chiara G (2006). Morphine-conditioned single-trial place preference: role of nucleus accumbens shell dopamine receptors in acquisition, but not expression. *Psychopharmacology (Berl)*. Aug;187(2):143-53.
- Fibiger HC, Phillips AG (1986). Reward, motivation, cognition: psychobiology of mesotelencephalic dopamine systems. In: *Handbook of physiology, Vol 4, The nervous system (Mountcastle VB, BloomFE, Geiger SR, eds), pp 647-675. Bethesda, MD: American Physiologica Society.*
- Frantz KJ, Hansson KJ, Stouffer DG, Parsons LH (2002). 5-HT(6) receptor antagonism potentiates the behavioral and neurochemical effects of amphetamine but not cocaine. *Neuropharmacology.* Feb;42(2):170-80.
- Gaddum JH, Picarelli ZP (1957). Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother.* Sep;12(3):323-8.
- Gerard C, el Mestikawy S, Lebrand C, Adrien J, Ruat M, Traiffort E, Hamon M, Martres MP (1996). Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT6 receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *Synapse* 23: 164-173.
- Gerard C, Martres MP, Lefevre K, Miquel MC, Verge D, Lanfumey L, Doucet E, Hamon M, el Mestikawy S. (1997). Immunolocalization of serotonin 5-HT6 receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res* 746: 207-219.
- Gerdjikov TV, Ross GM, Beninger RJ (2004). Place preference induced by nucleus accumbens amphetamine is impaired by antagonists of ERK or p38 MAP kinases in rats. *Behavioural Neuroscience* 118(4):740-750.
- Gerrits MA, Van Ree JM (1996). Effects of nucleus accumbens dopamine depletion on motivational aspects involved in initiation of cocaine and heroin self-administration in rats. *Brain Res* 713: 114-124.
- Giorgetti M, Tecott LH (2004). Contributions of 5-HT(2C) receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur J Pharmacol.* Mar 19;488(1-3):1-9. Review.
- Girault JA, Valjent E, Caboche J, Hervé D (2007). ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol.* Feb;7(1):77-85.
- Glennon RA (2003). Higher-end serotonin receptors: 5-HT(5), 5-HT(6), and 5-HT(7). *J Med Chem.* Jul 3;46(14):2795-812. Review
- Glennon RA, Lee M, Rangisetty JB, Dukat M, Roth BL, Savage JE, McBride A, Rauser L, Hufeisen S, Lee DK (2000). 2-Substituted tryptamines: agents with selectivity for 5-HT(6) serotonin receptors. *J Med Chem.* Mar 9;43(5):1011-8.
- Goldin M, Segal M (2003). Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* Jun;17(12):2529-39.
- Grace AA (2000). The tonic/phasic model of dopamine. System regulation and its implications for understanding alcohol

- and psychostimulant craving. *Addiction* 95 (Suppl 2), S119-S128.
- Grasing K, Li N, He S, Parrish C, Delich J, Glowa J (2003). A new progressive ratio schedule for support of morphine self-administration in opiate dependent rats. *Psychopharmacology* (Berl). Aug;168(4):387-96.
- Groenewegen HJ, Russchen FT (1984). Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic structures: a tracing and immunohistochemical study in the cat. *J Comp Neurol* 223(3): 347-67.
- Hamon M, Doucet E, Lefevre K, Miquel MC, Lanfumey L, Insausti R, et al. (1999). Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT6 receptors. *Neuropsychopharmacology* 21:68S-76S.
- Hatcher PD, Brown VJ, Tait DS, Bate S, Overend P, Hagan JJ, et al. (2005). 5-HT6 receptor antagonists improve performance in an attentional set shifting task in rats. *Psychopharmacology* (Berl) 181: 253-259.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41(1): 89-125.
- Hervé D, Pickel VM, Joh TH, Beaudet A (1987). Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. *Brain Res.* 1987 Dec 1;435(1-2):71-83.
- Hess WR (1954). *Diencephalon: autonomic and extrapyramidal function.* New York: Grune & Stratton.
- Higgins GA, Fletcher PJ (2003). Serotonin and drug reward: focus on 5-HT2C receptors. *Eur J Pharmacol.* Nov 7;480(1-3):151-62. Review.
- Hirst WD, Abrahamsen B, Blaney FE, Calver AR, Aloj L, Price GW, Medhurst AD (2003). Differences in the central nervous system distribution and pharmacology of the mouse 5-hydroxytryptamine-6 receptor compared with rat and human receptors investigated by radioligand binding, site-directed mutagenesis, and molecular modeling. *Mol Pharmacol* 64, 1295-1308.
- Hoebel BG, Monaco AP, Hernandez L, Aulisi EF, Stanley BG, Lenard L (1983). Self-infusion of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology* 81: 158-163.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* Jun;46(2):157-203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* Apr;71(4):533-54.
- Ibba F, Vinci S, Spiga S, Peana AT, Assaretti AR, Spina L, et al. (2009). Ethanol induced extracellular signal regulated kinase: role of dopamine D1 receptors. *Alcohol Clin Exp Res* 33: 858-867.
- Jenck F, Bös M, Wichmann J, Stadler H, Martin JR, Moreau JL. (1998). The role of 5-HT2C receptors in affective disorders. *Expert Opin Investig Drugs.* Oct;7(10):1587-99.
- Jongen-Reÿo A, Groenewegen HJ, Voorn P (1993). Evidence for a multicompartmental histochemical organization of the nucleus accumbens in the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* Volume 337, Issue 2, pages 267-276.
- Jongen-Reÿo AL, Voorn P, Groenewegen HJ (1994). Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat. *Eur J Neurosci* 6(8): 1255-64.

- Kalivas PW (1993). Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev.* 1993 Jan-Apr;18(1):75-113. Review.
- Kandel E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep.* 21(5):565-611.
- Kita H, Kitai ST (1990). Amygdaloid projections to the frontal cortex and striatum in the rat. *J Comp Neurol* 298:40-49.
- Kohen R, Fashingbauer LA, Heidmann DE, Guthrie CR, Hamblin MW (2001). Cloning of the mouse 5-HT6 serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Brain Res Mol Brain Res* 90: 110-117.
- Konorski J (1967). Integrative activity of the brain. Chicago University of Chicago press.
- Koob GF (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13:177-184.
- Lachowicz JE, Sibley DR (1997). Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors. *Pharmacol Toxicol* 81: 105-113.
- Lacroix LP, Dawson LA, Hagan JJ, Heidbreder CA (2004). 5-HT6 receptor antagonist SB-271046 enhances extracellular levels of monoamines in the rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 51: 158-164.
- Li Z, Huang M, Prus AJ, Dai J, Meltzer HY (2007). 5-HT6 receptor antagonist SB-399885 potentiates haloperidol and risperidone-induced dopamine efflux in the medial prefrontal cortex or hippocampus. *Brain Res.* Feb 23;1134(1):70-8.
- Lindvall O, Bjorklund A (1984). Dopamine and norepinephrine containing neuron systems their anatomy in the rat brain. In: *Chemical Neuroanatomy*, Emson P.C. (ed), Raven Press, New York, 229-255.
- Lu L, Hope BT, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, Shaham Y (2005). Central amygdala ERK signaling pathway is critical to incubation of cocaine craving. *Nat Neurosci.* 8(2):212-9.
- Lyness WH, Friedle NM, Moore KE (1979). Destruction of dopaminergic nerve terminals in nucleus accumbens: effect on D-amphetamine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 11: 553-556.
- McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S (1999). Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res* 101: 129-152.
- McDonald AJ (1991a). Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience* 44:1-14.
- McDonald AJ (1991b). Topographic organization of amygdaloid projections to the caudate putamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience* 44:15-33.
- McQuade RD, Duffy RA, Anderson CC, Crosby G, Coffin VL, Chipkin RE, et al. (1991). (3H)SCH 39166, a new D1-selective radioligand: in vitro and in vivo binding analyses. *J Neurochem* 57: 2001-2010.
- Memo M, Castelletti L, Missale C, Spano PF (1987). Stimulation of dopamine D2 receptors increases potassium permeability in mammothrophs. *Eur J Pharmacol* 133: 231-362.
- Mereu G, Yoon K-WP, Boi V, Gessa GL, Naes L, Westfall TC (1987). Preferential stimulation of ventral tegmental area dopaminergic neurons by nicotine. *Eur J Pharmacol* 141: 395-399.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M and Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189-225.
- Mizoguchi H., Yamada K., Mizuno T., Nitta A., Noda Y., and Nabeshima T. (2004).

- Regulations of methamphetamine reward by extracellular signal-regulated kinase 1/2/ets-like gene-1 signaling pathway via the activation of dopamine receptors. *Mol. Pharmacol.* 65:1293-1301.
- Monsma FJ, Jr., Shen Y, Ward RP, Hamblin MW, Sibley DR (1993). Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol Pharmacol* 43: 320-327.
- Moukhles H, Bosler O, Bolam JP, Vallée A, Umbriaco D, Geffard M, Doucet G (1997). Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interactions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience.* 1997 Feb;76(4):1159-71.
- Nelson DL (2004). 5-HT5 receptors. *Current drug targets CNS and neurological disorders*;3:53-58.
- Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M (2001). Localization of 5-HT(7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *Journal of Chemical Neuroanatomy*;21:63-73.
- Orban PC, Chapman PF, Brambilla R (1999). Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation? *Trends Neurosci* 22:38-44.
- Patel S, Roberts J, Moorman J, Reavill C (1995). Localization of serotonin-4 receptors in the striatonigral pathway in rat brain. *Neuroscience.* Dec;69(4):1159-67.
- Paxinos G., Watson C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, Sydney.
- Peroutka SJ, Howell TA (1994). The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology.* Mar-Apr;33(3-4):319-24.
- Pettit HO, Ettenberg A, Bloom FE, Koob GF (1984). Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 84: 167-173.
- Phillips GD, Howes SR, Whitelaw RB, Robbins TW, Everitt BJ (1994). Isolation rearing impairs the reinforcing efficacy of intravenous cocaine or intra-accumbens D-amphetamine: impaired response to intra-accumbens D1 and D2/D3 dopamine receptor antagonists. *Psychopharmacology* 115: 419-429.
- Pierce RC, Kumaresan V (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 30: 215-238.
- Plassat JL, Amlaiky N, Hen R (1993). Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 44: 229-236.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995). Intravenous cocaine, morphine and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12304-12308.
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G (1996). Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 382: 255-257.
- Roberts DC, Koob GF (1982). Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 17: 901-904.
- Roberts DC, Koob GF, Klonoff P, Fibiger HC (1980). Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 781-787.
- Roberts JC, Reavill C, East SZ, Harrison PJ, Patel S, Routledge C, Leslie RA (2002). The distribution of 5-HT(6) receptors in rat brain: an autoradiographic binding study

- using the radiolabelled 5-HT(6) receptor antagonist ((125)I)SB-258585. *Brain Res* 934: 49-57.
- Robinson T.E. and Kolb B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47:33-46.
- Roth BL (1994). Multiple serotonin receptors: clinical and experimental aspects. *Annals of Clinical Psychiatry*; 6:67-78.
- Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Leurs R, Schwartz JC (1993). A novel rat serotonin (5-HT6) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 268-276.
- Salzmann J, Marie-Claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F (2003). Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br. J. Pharmacol.* 140(5):831-828.
- Schechter LE, Lin Q, Smith DL, Zhang G, Shan Q, Platt B, Brandt MR, Dawson LA, Cole D, Bernotas R, Robichaud A, Rosenzweig-Lipson S, Beyer CE (2008). Neuropharmacological profile of novel and selective 5-HT6 receptor agonists: WAY-181187 and WAY-208466. *Neuropsychopharmacology* 33: 1323-1335.
- Schechter LE, Smith DL, Li P, Lin Q, Rosenzweig-Lipson S, Robichaud A, et al. (2004). Pharmacological profile of a novel and selective 5-HT6 receptor agonist: WAY-466. Annual Meeting Society of Neuroscience 394.11.
- Sellings LH, Clarke PB (2003). Segregation of amphetamine reward and locomotor stimulation between nucleus accumbens medial shell and core. *J Neurosci* 23: 6295-6303.
- Shen Y, Monsma FJ Jr, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW, Sibley DR (1993). Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine7 serotonin receptor subtype. *J Biol Chem.* Aug 25;268(24):18200-4.
- Simon H, Scatton B, Le Moal M (1980). Dopaminergic A10 neurones are involved in cognitive functions. *Nature (Lond.)* 286: 150-151.
- Sokoloff P, Schwartz JC (1995). Novel dopamine receptors half a decade later. *TIPS* 16: 270-275.
- Spina L, Fenu S, Longoni R, Rivas E, Di Chiara G (2006). Nicotine-conditioned single-trial place preference: selective role of nucleus accumbens shell dopamine D1 receptors in acquisition. *Psychopharmacology (Berl)*. Mar;184(3-4):447-55.
- Spyraki, C, Fibiger HC, Phillips AG (1982a). Dopaminergic substrates of amphetamine-induced place preference conditioning. *Brain Res* 253: 185-193.
- Spyraki C, Fibiger HC, Phillips AG (1982b). Cocaine-induced place preference conditioning: lack of effects of neuroleptics and 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 253(1-2): 195-203.
- Steinbusch H, Mulder AH (1984). Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In, *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 3 (Björklund A, Hökfelt T, and Kuhar M eds.) Amsterdam, Elsevier, pp 101-125
- Stolerman I (1992). Drugs of abuse: behavioural principles, methods and terms. *Trends Pharmacol Sci* 13(5): 170-6.
- Sweatt JD (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14(3):311-317.
- Taber E, Brodal A, Walberg F (1960). The raphe nuclei of the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion. *J Comp Neurol.* Apr;114:161-87.
- Tanda G, Carboni E, Frau R, Di CG (1994).

- Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology (Berl)* 115: 285-288.
- Tanda G, Frau R, Di CG (1996). Chronic desipramine and fluoxetine differentially affect extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 127: 83-87.
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu opioid receptor mechanism. *Science* 276: 2048-2050.
- Thiels E, Klann E (2001). Extracellular signal-regulated kinase, synaptic plasticity, and memory. *Rev. Neurosci.* 12(4):327-45.
- Thomas GM, Huganir RL (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* Mar;5(3):173-83.
- Tiberi M, Caron MG (1994). High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *J Biol Chem* 269: 27925-27931.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot M, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT Jr, Caron MG (1991). Cloning, molecular characterization and chromosomal assignment of a gene coding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1a receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 7491-7495.
- Valjent E., Corvol J.C., Pages C., Besson M.J., Maldonado R., Caboche J. (2000). Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.* 20(23):8701-8709.
- Valjent E., Corvol J.C., Trzaskos J.M., Girault J.A., Hervé D. (2006). Role of ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci.* 7:20.
- Valjent E., Pages C., Herve D., Girault J.A., 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., Pages C., Rogard M., Besson M.J., Maldonado R., Caboche J. (2001). Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur. J. Neurosci.* 14(2):342-352.
- Ward RP, Dorsa DM (1996). Colocalization of serotonin receptor subtypes 5-HT2A, 5-HT2C, and 5-HT6 with neuropeptides in rat striatum. *J Comp Neurol* 370:405-414.
- Ward RP, Hamblin MW, Lachowicz JE, Hoffman BJ, Sibley DR, Dorsa DM (1995). Localization of serotonin subtype 6 receptor messenger RNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 64: 1105-1111
- Wenkstern D, Pfaus JG, Fibiger HC (1993). Dopamine transmission increases in the nucleus accumbens of male rats during their first exposure to sexually receptive female rats. *Brain Res* 618(1): 41-6.
- Westerink BH, Teisman A, de Vries JB (1994). Increase in dopamine release from the nucleus accumbens in response to feeding: a model to study interactions between drugs and naturally activated dopaminergic neurons in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 349(3): 230-5.
- Whitmarsh A.J., Davis R.J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* 23(12):481-5.
- Wise RA (1996). Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 6: 243-251.
- Wise RA, Bozarth MA (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94: 469-492.

Woodworth RS (1981). *Dynamic psychology*. New York: Columbia University press.

Wright CI, Beijer AV, Groenewegen HJ (1996). Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J Neurosci* 16(5):1877-1893.

Wright CI, Groenewegen HJ (1995). Patterns of convergence and segregation in the medial nucleus accumbens of the rat: relationships of prefrontal cortical, midline thalamic, and basal amygdaloid afferents. *J Comp Neurol* 361:383-403.

Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW (2001). Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat Neurosci*. Feb;4(2):151-8.

Yakel JL, Jackson MB (1988). 5-HT₃ Receptors Mediate Rapid Responses in Cultured Hippocampus and a Clonal Cell Line. *Neuron*; 1:615-621.

Yun HM, Baik JH, Kang IS, Jin C, Rhim H (2010). Physical interaction of Jab1 with human serotonin 6 G-protein-coupled receptor and their possible roles in cell survival. *J Biol Chem*. Mar 26;285(13):10016-29.

Yun HM, Kim S, Kim HJ, Kostenis E, Kim JI, Seong JY, Baik JH, Rhim H (2007). The novel cellular mechanism of human 5-HT₆ receptor through an interaction with Fyn. *J Biol Chem* 282: 5496-5505.

Zhai H, Li Y, Wang X, Lu L (2008). Drug-induced Alterations in the Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway: Implications for Reinforcement and Reinstatement. *Cell Mol Neurobiol*. 28(2):157-72.

Zahm DS, Brog JS (1992). On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* 50(4): 751-67.

Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*. Aug 23;110(4):443-55.