



Università degli Studi di Cagliari

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

Ciclo XXIV

**IL NUCLEO ROSTROMEDIALE DEL TEGMENTO:
CARATTERIZZAZIONE ELETTROFISIOLOGICA E RUOLO NELLA
NEUROBIOLOGIA DELLE SOSTANZE D'ABUSO**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

BIO/14 - Farmacologia

Presentata da:	Salvatore Lecca
Coordinatore Dottorato	Prof.ssa Alessandra Concas
Tutor/Relatore	Prof. Marco Pistis

Esame finale anno accademico 2010 - 2011

SOMMARIO

PREMESSA	4
1 INTRODUZIONE	6
1.1 Ruolo del sistema dopaminergico nei processi di gratificazione	6
1.1.1 I neuroni dopaminergici dell'Area Ventrale del Tegmento e le loro risposte a stimoli appetitivi e aversivi	8
1.2 Il ruolo dell'Abenula Laterale nella codifica del segnale ai neuroni DAergici del mesencefalo	13
1.3 La scoperta del nucleo Rostromediale del Tegmento: l'interfaccia inibitoria tra la LHb e la VTA	17
1.3.1 Aspetti anatomo-funzionali del RMTg	20
1.3.2 Risposte dei neuroni del RMTg a stimoli aversivi e gratificanti	23
1.3.3 Il RMTg: target per le sostanze d'abuso?	26
2 MATERIALI E METODI	28
2.1 Soggetti e procedure	28
2.2 Registrazioni elettrofisiologiche in vivo	28
2.2.1 Esperimenti nel RMTg	28
2.2.2 Esperimenti nella VTA	30
2.3 Istologia	31
2.4 Induzione di Fos nel RMTg	32
2.5 Farmaci	33
2.6 Analisi statistica	33
3 RISULTATI	34
3.1 Caratterizzazione elettrofisiologica dei neuroni del RMTg e della loro azione inibitoria sulle cellule DAergiche della VTA	34
3.1.1 Caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni del RMTg	34
3.1.2 Risposte dei neuroni del RMTg ad uno stimolo nocicettivo	35
3.1.3 Risposte dei neuroni del RMTg alla stimolazione elettrica della LHb	35
3.1.4 Induzione dell'espressione della proteina Fos nel RMTg tramite pre- trattamento con metamfetamina	37
3.1.5 Effetti della stimolazione elettrica del RMTg sull'attività spontanea dei neuroni DAergici della VTA	39
3.1.6 Correlazione tra l'attività di scarica spontanea dei neuroni DAergici e la durata dell'inibizione evocata dalla stimolazione del RMTg	42

3.1.7	Codifica dello stimolo nocicettivo: risposte al pinzettamento dei neuroni DAergici della VTA inibiti dal RMTg	44
3.2	Effetto delle sostanze d'abuso sull'attività neuronale del RMTg e sulle sue sinapsi inibitorie nei neuroni DAergici della VTA	45
3.2.1	La morfina decresce la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg e riduce il loro potere inibitorio sui neuroni DAergici della VTA.....	46
3.2.2	L'agonista sintetico dei recettori CB1, WIN55212,2 decresce la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg e sopprime la loro azione inibitoria sui neuroni DAergici della VTA.....	50
3.2.3	La cocaina riduce la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg senza effetto modulatorio sulle sinapsi RMTg-VTA.....	53
3.2.4	La somministrazione in acuto di nicotina potenzia fortemente la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg senza variare la durata della loro azione inibitoria sui neuroni DAergici della VTA	55
4	DISCUSSIONE	58
4.1	Un quadro riassuntivo dei principali risultati	58
4.2	L'attività di scarica dei neuroni del RMTg e il loro tono inibitorio sulle cellule DAergiche della VTA.....	58
4.2.1	Il RMTg riceve proiezioni eccitatorie dalla LHb e invia proiezioni inibitorie alla VTA	59
4.2.2	Il RMTg controlla l'attività di scarica dei neuroni DA della VTA	61
4.2.3	RMTg-VTA: via preferenziale per la codifica degli stimoli avversivi?	61
4.3	L'espressione della proteina c-Fos nel RMTg	62
4.4	RMTg-VTA: un nuovo target per le sostanze d'abuso.....	63
4.4.1	Osservazioni tecniche e scelta delle cellule.....	63
4.4.2	Morfina.....	64
4.4.3	WIN55212-2.....	65
4.4.4	Cocaina	66
4.4.5	Nicotina.....	66
4.5	Conclusioni.....	68
	RINGRAZIAMENTI	71
	BIBLIOGRAFIA	72
	APPENDICE	85

PREMESSA

L'importanza della scoperta di nuove aree cerebrali, nel campo delle neuroscienze, porta con sé nuovi sviluppi e direzioni in settori specifici della ricerca. Di fatto, la storia ci insegna come la meticolosa descrizione di nuove strutture cerebrali, sia capace di potenziare le conoscenze su complesse funzioni neurali e su quei disordini che mirano alla loro normale efficienza. Inoltre, tali scoperte possono fornire nuovi target neuroanatomici per il trattamento di specifiche patologie cerebrali.

In questo particolare contesto, si colloca la recente identificazione del Nucleo Rostromediale del Tegmento (RMTg), conosciuto anche come Coda dell'Area Ventrale del Tegmento (o VTA *tail*). Il crescente interesse dei ricercatori verso questa struttura, deriva principalmente dal forte controllo inibitorio che essa esercita sul sistema dopaminergico del mesencefalo. Va sottolineato che l'attenzione verso quest'area è cresciuta negli anni. Di fatto, dalle pubblicazioni dei primi quattro articoli nel 2009, a fine 2011 si registrano ben nove contributi alla voce RMTg. Questa crescita esponenziale di interesse (vedi grafico I) ha notevolmente ampliato le conoscenze sull'anatomia e sulla funzionalità del RMTg.

I neuroni contenenti acido γ aminobutirrico (GABA) di quest'area, controllando l'attività dopaminergica, possono essere implicati nell'etiologia, nei sintomi e nei trattamenti di tutte le patologie cerebrali, psichiatriche e non, per le quali è stato chiamato in causa il sistema dopaminergico. Tra queste citiamo la schizofrenia, i disturbi dell'umore, il morbo di Parkinson e i disturbi derivati all'abuso di sostanze psicoattive.

In particolare, in questo lavoro, illustrerò l'importanza del RMTg nella codifica degli effetti delle principali sostanze d'abuso, evidenziando il possibile ruolo di questa nuova area, in patologie complesse come la dipendenza. Il lavoro qui esposto, dal quale sono state tratte due pubblicazioni su una rivista internazionale *peer reviewed* (Lecca *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, in press), vuole essere un contributo alla conoscenza del ruolo funzionale del RMTg con particolare focus sull'influenza che esso esercita nei circuiti cerebrali atti alla codifica di stimoli appetitivi e avversivi.

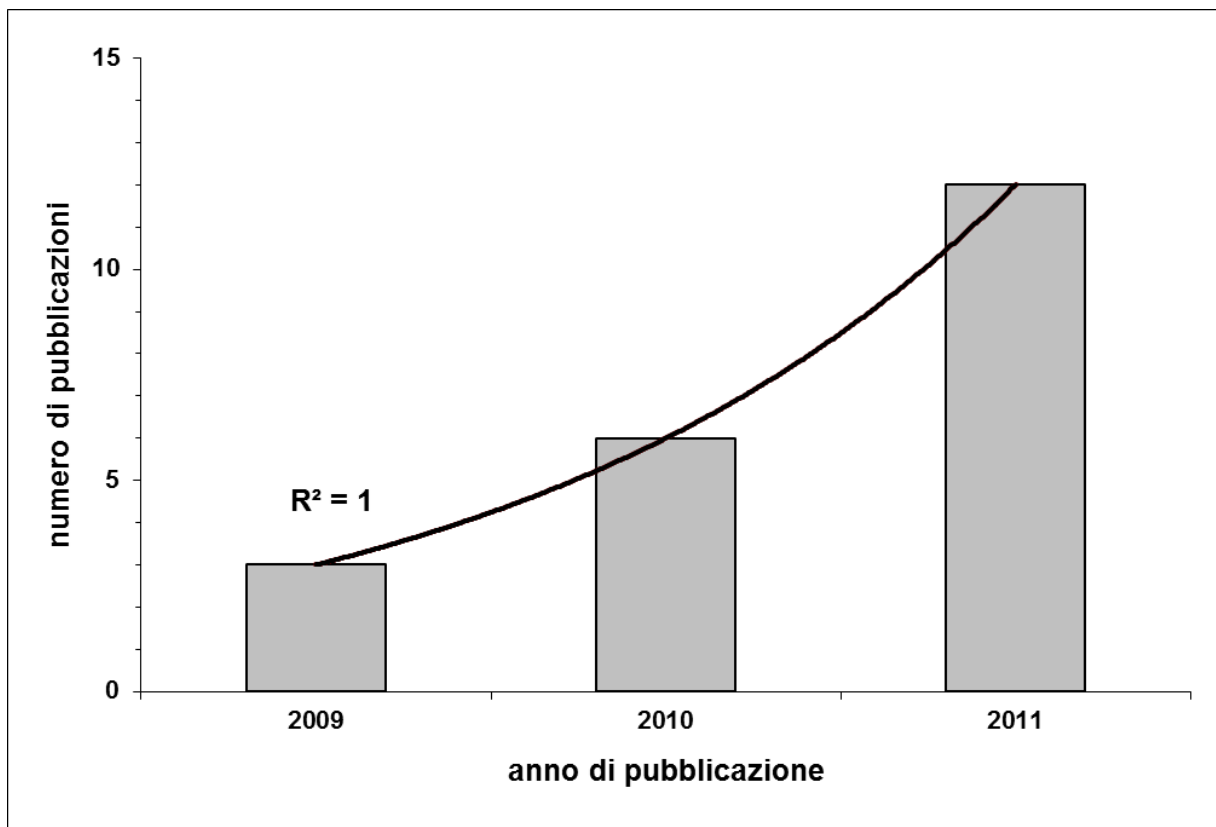


Figura I Crescita esponenziale delle produzioni scientifiche sul nucleo rostromediale del tegmento. Il grafico a barre in figura, riporta il numero di pubblicazioni alla voce RMTg indicizzate su *Pubmed* negli ultimi tre anni. Dai primi tre articoli pubblicati nel 2009 si sono registrate ben dodici pubblicazioni sull'argomento a fine 2011.

Capitolo Primo

1 INTRODUZIONE

1.1 Ruolo del sistema dopaminergico nei processi di gratificazione

L'evoluzione delle specie animali superiori, si accompagna allo sviluppo di funzioni sempre più sofisticate, mirate a migliorarne le condizioni di vita generali. Funzioni che si configurano come soddisfacimento di quei bisogni e necessità primari al fine del benessere, della riproduzione e della sopravvivenza. Tra queste, enorme rilievo è senza dubbio occupato dalla gratificazione che si configura come capacità di ricoprire di significato edonico informazioni derivanti da oggetti, come anche situazioni ed eventi, nell'ambiente esterno. In base alle reazioni meramente comportamentali che elicitano, questi oggetti si configurano come appetitivi (che si accompagnano a gratificazioni) o nocivi (che portano ad avversione e quindi evitamento). Le informazioni derivate dall'esterno assumono un significato gratificante grazie all'intervento del nostro cervello. Infatti l'informazione giunge al sistema nervoso centrale in maniera multisensoriale e da esso viene elaborata e ricoperta di significato che implica apprendimento e azione.

Ma quali sono le aree cerebrali atte alla codifica di questi stimoli?

Uno dei principali sistemi neuronali chiamati in causa nel processare la gratificazione-avversione è il sistema dopaminergico. In particolare, i neuroni dopaminergici (DAergici) del mesencefalo residenti nell'area ventrale del tegmento (VTA) e nella *substantia nigra pars compacta* (SNc), che inviano le loro proiezioni a differenti aree, incluse lo striato e la corteccia pre-frontale, sembrano essere primariamente coinvolte nel processare stimoli appetitivi e avversivi (vedi figura 1.1). Vi è ampio accordo tra gli studiosi, sul ruolo chiave giocato da questi neuroni nella codifica di stimoli a stretto connotato edonico come il cibo, il sesso, o la sete (Wise, 2004). Vi sono forti evidenze a supporto di un duplice ruolo della dopamina (DA) sia sul versante dell'apprendimento che su quello prettamente comportamentale. Di fatto, quando essa viene rilasciata nello striato, promuove la

plasticità sinaptica e i comportamenti diretti ad ottenere una ricompensa (Phillips *et al.*, 2003; Wise, 2004). Un altro esempio, della sua importanza, deriva dal ruolo che essa gioca nella corteccia prefrontale, dove favorisce il consolidamento della memoria di lavoro (Wang *et al.*, 2004). L'importanza dei neuroni DAergici e delle loro proiezioni, viene rimarcata dagli studi dove si è proceduto ad una lesione selettiva di componenti del sistema (Annett *et al.*, 1989; Cole & Robbins, 1989; Robbins *et al.*, 1989), alla somministrazione di agonisti ed antagonisti, diretti ed indiretti dei recettori dopaminergici (Wise & Hoffman, 1992), agli studi di auto stimolazione elettrica (Fibiger *et al.*, 1987).

Risulta primario il coinvolgimento della DA in fenomeni edonici derivanti da stimoli appetitivi non propriamente naturali, né necessari alla sopravvivenza della specie come nel caso dell'abuso di sostanze (Bonci *et al.*, 2003; Carlezon & Thomas, 2009; Chen *et al.*, 2010). Interessanti studi dimostrano come la somministrazione sistemica di sostanze d'abuso nell'animale provochi un aumento del rilascio di DA in aree di proiezione come lo striato (Di Chiara & Imperato, 1988). Inoltre, è stato dimostrato come scimmie e ratti siano propensi alla auto somministrazione di sostanze d'abuso in aree circoscritte del circuito della gratificazione (Ikemoto, 2010).

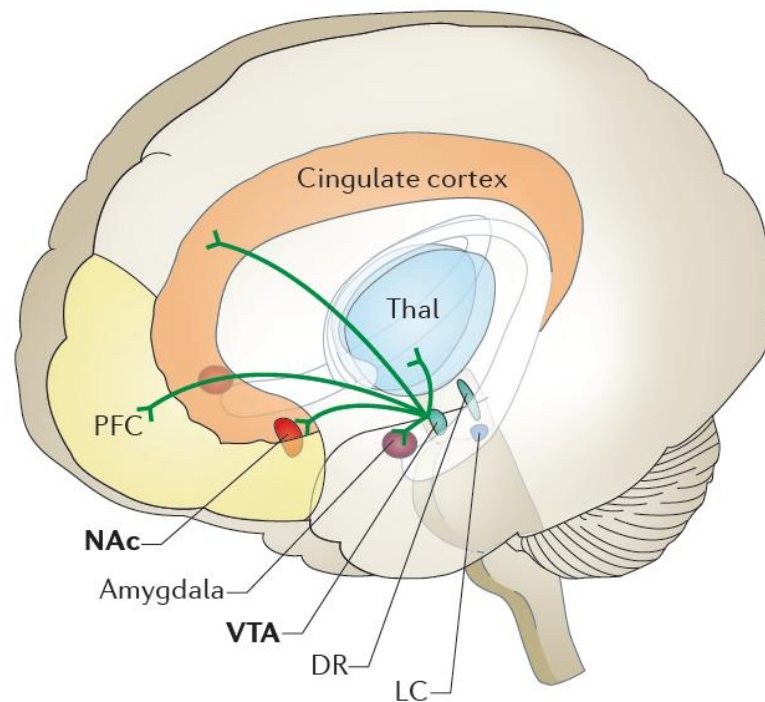


Figura 1.1 I circuiti cerebrali della gratificazione. La rappresentazione del cervello umano mostra le principali vie del sistema dopaminergico che origina dall'area ventrale del tegmento (VTA) e proietta in regioni come il *nucleus accumbens* (NAc) e la corteccia prefrontale (PFC). Le sostanze d'abuso alterano questo circuito attraverso meccanismi complessi, responsabili in ultima istanza dei fenomeni di dipendenza (Robison & Nestler, 2011).

1.1.1 I neuroni dopaminergici dell'Area Ventrale del Tegmento e le loro risposte a stimoli appetitivi e avversivi

Vi è generale accordo tra i ricercatori sul fatto che i neuroni DAergici giochino un ruolo prominente nei processi di gratificazione. La nozione per la quale i neuroni DAergici sono coinvolti nella gratificazione, affonda le sue radici in numerose specifiche ipotesi susseguitesesi nel corso degli anni (per una rassegna vedi Wise, 2004). Tuttavia, recentemente una parte della ricerca sull'argomento ha portato alla luce interessanti scoperte che minano alla teoria generale (Spanagel & Weiss, 1999). In tale sede, proveremo a districarci tra queste nuovissime scoperte per fornire un'eshaustiva panoramica dello stato dell'arte sulle risposte fisiologiche dei neuroni DAergici nella codifica di stimoli appetitivi e nocivi.

Studi neurofisiologici mostrano come le cellule DAergiche presentano rapide e brevi risposte eccitatorie nell'ordine dei 100-500 ms (aumentando la loro

frequenza di scarica e il numero di potenziali d'azione in treni di potenziali, dette *bursts*) in concomitanza con uno stimolo gratificante inaspettato o con uno stimolo che predice una gratificazione (Schultz, 1998; 2002; Bayer & Glimcher, 2005). In contrasto, se una gratificazione, per esempio sotto forma di ricompensa, è attesa, non si registrano variazioni significative nell'attività di scarica del neurone DAergico. Ma, se una gratificazione aspettata viene omessa, i neuroni DAergici rispondono con un'inibizione (vedi figura 1.2). Questi studi mettono in luce come i neuroni DAergici codificano il segnale di errore di predizione di una ricompensa (dato dallo scarto tra una gratificazione reale ed una aspettata). Specificatamente, nel primo caso (figura 1.2, in alto), il neurone codifica l'errore positivo di predizione della gratificazione. Nel caso dell'omissione di una ricompensa attesa (figura 1.2, in basso), il neurone segnala invece, l'errore negativo di predizione di una ricompensa. Questi segnali, a connotato fortemente motivazionale, sono alla base del rinforzo dei comportamenti atti al raggiungimento di una gratificazione attesa (Montague *et al.*, 1996; Schultz, 2002). In accordo con queste conclusioni, recenti studi di voltammetria ciclica a scansione rapida, mostrano come una ricompensa inaspettata, evochi un rilascio di DA nel *nucleus accumbens* che le gratificazioni attese non sono in grado di elicitare (Roitman *et al.*, 2004). In un'ottica d'insieme, queste scoperte rivelano come la gratificazione e gli eventi ad essa correlati producano variazioni nell'attività elettrica di scarica dei neuroni DAergici. Queste evidenze secondo Schultz e i suoi collaboratori (Mirenowicz & Schultz, 1996; Schultz, 1998; 2002), mettono in luce un dato indiscutibile: i neuroni DAergici sono preferenzialmente attivati da stimoli a valenza appetitiva.

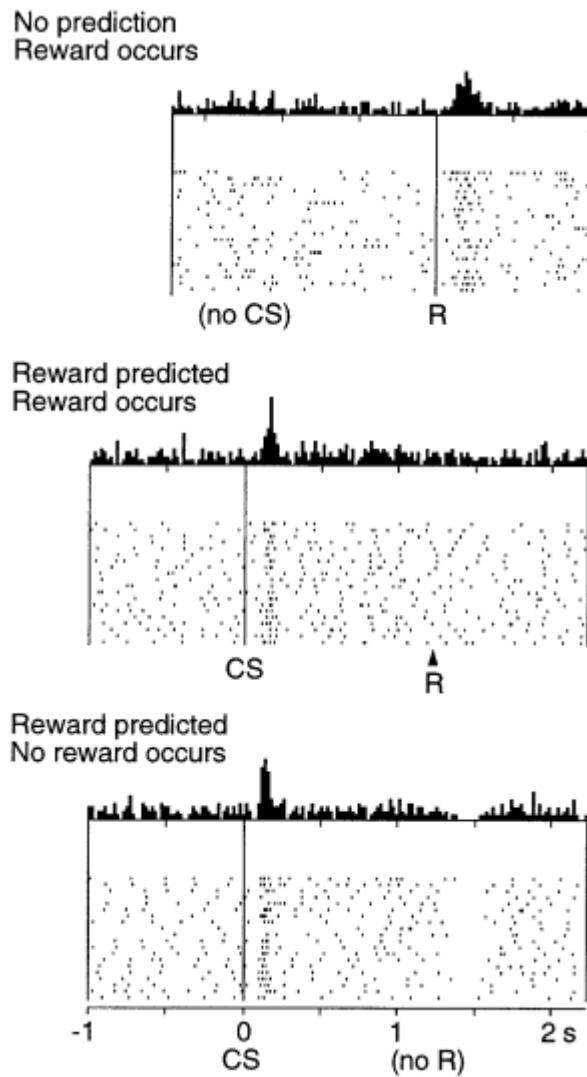


Figura 1.2. I neuroni DAergici codificano l'errore di predizione di una ricompensa. In alto: esempio di risposta di un neurone DAergico ad una ricompensa non attesa. La ricompensa (R) in questo caso rappresenta un errore positivo di predizione di gratificazione. Nel mezzo: uno stimolo condizionato (CS), in questo esempio, predice la R. Il neurone DAergico risponde con un'eccitazione in corrispondenza dello CS, ma non mostra variazioni significative al momento della R. In questo caso non si registra nessun errore di predizione della ricompensa. In basso: in questo esempio, lo CS predice una R che viene omessa. Come visibile dall'istogramma di frequenza, l'attività del neurone DAergico decresce in concomitanza della R attesa ma omessa. La mancata ricompensa rappresenta l'errore negativo nella predizione di gratificazione. Schultz *et al.*, (1997)

Tuttavia questo ragionamento viene messo in discussione da tre principali scoperte. La prima di queste riguarda l'attivazione dei neuroni DAergici a seguito dell'esposizione a stimoli sensoriali salienti ma che non hanno nessuna relazione apparente con la gratificazione (Ljungberg *et al.*, 1992; Feenstra & Botterblom, 1996; Horvitz *et al.*, 1997). Il secondo nodo cruciale riguarda la risposta eccitatoria di una sub-popolazione di neuroni DAergici a stimoli avversivi (in contrasto con la generale risposta inibitoria agli stessi) (Brischoux *et al.*, 2009; Ungless *et al.*, 2010). Il terzo e ultimo punto di discussione, deriva dall'aumentato rilascio di DA nelle aree di proiezione a seguito di stimoli nocicettivi (Budygin *et al.*, 2011).

Come suggerisce Ungless (2004), il fatto che i neuroni DAergici siano attivati da stimoli salienti in generale, può essere una dicotomia apparente più che reale. L'autore argomenta questo punto sostenendo che le attivazioni DAergiche possono dipendere sia da generalizzazioni di stimoli associati a gratificazioni (Mirenowicz & Schultz, 1996), sia dalla novità dello stimolo stesso, che può essere gratificante per l'animale (Hughes, 1968; Kakade & Dayan, 2002). Come evidenzia sempre Ungless (2004), quando una gratificazione attesa viene omessa il neurone DAergico risponde con un'inibizione e questo avviene nonostante l'evento saliente sia accompagnato da una valenza motivazionale, ma non gratificante. Quest'ultima osservazione asserisce chiaramente che i neuroni DAergici non sono attivati da tutti gli stimoli salienti. Per una maggiore comprensione può essere utile riportare un esempio pratico. Tobler, Dickinson e Schultz (Tobler *et al.*, 2003), usando un sofisticato protocollo di inibizione condizionata mostrano come uno stimolo sonoro, abbinato ad una mancata ricompensa, induca un'inibizione nella frequenza di scarica dei neuroni DAergici testati. Quest'esperimento dimostra come eventi salienti, come stimoli visivi o sonori, con significato motivazionale per l'animale, che però non alludono a gratificazione, non portano necessariamente ad un'eccitazione della cellula DAergica.

Sono quindi i neuroni DAergici selettivamente attivati da stimoli che richiamano alla gratificazione?

Alcuni autori (Redgrave *et al.*, 1999; Redgrave & Gurney, 2006), suggeriscono che i neuroni DAergici sono attivati solo da stimoli che prevedono un cambiamento nel campo del comportamento e dell'attenzione del soggetto.

Secondo gli stessi, i protocolli precedenti, sull'omissione di una ricompensa attesa, non soddisfano queste condizioni. Una classe di stimoli che comprende queste caratteristiche, e allo stesso tempo non ha relazioni con la gratificazione, è rappresentata dagli eventi avversivi, come un semplice pinzettamento meccanico o uno shock elettrico.

Come rispondono i neuroni DAergici a questi stimoli?

L'assunzione per la quale i neuroni DAergici della VTA e della SNc sono uniformemente non responsivi o inibiti da uno stimolo nocicettivo (Schultz, 1998; Montague *et al.*, 2004; Ungless, 2004), e che il rilascio di DA decresce nelle aree terminali a seguito di eventi a stretto connotato avversivo (Roitman *et al.*, 2008), viene oggi seriamente messa in discussione (Redgrave *et al.*, 1999; Redgrave *et al.*, 2008; Anstrom *et al.*, 2009; Budygin *et al.*, 2011). Recentemente, uno studio di elettrofisiologia su ratti anestetizzati, ha messo in evidenza differenze tra popolazioni DAergiche della VTA nella risposta ad un breve (4 secondi) shock elettrico della zampa (Brischoux *et al.*, 2009). Gli autori in questione, dimostrano che i neuroni DAergici, identificati a posteriori con tecniche di immunocolorazione (*juxtacellular*), rispondono in base alla loro localizzazione topografica. In conciso, i neuroni localizzati nella VTA dorsale vengono inibiti, mentre quelli siti nella parte ventrale, rispondono con un'eccitazione fasica. Uno studio recente in topi liberi di muoversi (Wang & Tsien, 2011), mostra come una sub-popolazione di neuroni presumibilmente DAergici viene attivata da eventi elicитanti paura. Questi studi, ed altri ancora (Zweifel *et al.*, 2011), dimostrano chiaramente l'esistenza di una differenza nella codifica di stimoli avversivi da parte di distinte sub-popolazioni neuronali DAergiche del mesencefalo. Risulta pertanto ardua impresa, alla luce di questi recentissimi dati, sposare in toto quelle ipotesi che affermano un ruolo esclusivo dei neuroni DAergici nella mediazione degli stimoli correlati al piacere. Oggi si afferma sempre più l'idea di un'organizzazione complessa del sistema DAergico, con sub-popolazioni neuronali aventi distinta organizzazione topografica (diverse innervazioni e proiezioni in aree target diverse) atte a distinte codificazioni di stimoli esterni appetitivi e avversivi. Di riflesso, in conformità a queste evidenze, l'attenzione della ricerca si è spostata in quelle aree che direttamente o indirettamente influenzano il sistema DAergico al fine di chiarire l'origine delle differenze nelle risposte a questi stimoli. Tra le aree di influenza

prese in considerazione, l'Abenula Laterale (LHb) risulta riscuotere un particolare interesse tra i ricercatori.

1.2 Il ruolo dell'Abenula Laterale nella codifica del segnale ai neuroni

DAergici del mesencefalo

L'abenula è una struttura costituita da due distinti nuclei facenti parte dell'epitalamo. Nei vertebrati, l'abenula è suddivisa in abenula mediale (MHb) e abenula laterale (LHb). Negli ultimi anni si è registrato un crescente interesse da parte dei ricercatori verso questa struttura. In particolare una vasta mole di studi ha concentrato la propria attenzione nella LHb. Di fatto, la LHb è un'ottima candidata, quale sorgente del segnale correlato a gratificazioni nei neuroni DA del mesencefalo. Essa riceve informazioni dal sistema limbico e le convoglia nel mesencefalo (vedi figura 1.3).

La LHb è costituita da due distinti sub-nuclei che formano la parte mediale (mLHb) e la parte laterale (lLHb) del complesso (Andres *et al.*, 1999; Stephenson-Jones *et al.*, 2012). La mLHb riceve principalmente afferenze da regioni limbiche, direttamente o indirettamente innervate dalla corteccia cerebrale: l'area ipotalamica laterale, l'area preottica laterale, il pallido ventrale, la *substantia innominata*, parti distinte dell'amigdala, inclusi i nuclei della stria terminale (Herkenham & Nauta, 1977; Hikosaka, 2007b; Geisler & Trimble, 2008). Riceve anche modeste proiezioni dai neuroni DAergici della VTA anteriore (Gruber *et al.*, 2007).

La lLHb è principalmente innervata dai gangli della base, in particolare il globo pallido e il nucleo entopeduncolare, che ricevono input dalla corteccia per intervento dello striato. In un'ottica d'insieme, queste connessioni fanno della LHb un punto di convergenza per i segnali veicolati dal sistema limbico e dai gangli della base. Le efferenze principali della LHb sono, appunto, costituite dal mesencefalo (VTA e SNc) e dai nuclei del rafe. Questi nuclei sono origine di due importanti sistemi monoaminergici: quello DAergico residente in VTA e SNc e quello serotoninergico dei nuclei del rafe. Per questo motivo la LHb sembra poterne regolare l'attività. A prova di quest'ultimo dato, la stimolazione elettrica della LHb è in grado di inibire l'attività sia dei neuroni DAergici del mesencefalo

(Christoph *et al.*, 1986; Ji & Shepard, 2007), che dei neuroni serotoninergici del rafe (Wang & Aghajanian, 1977).

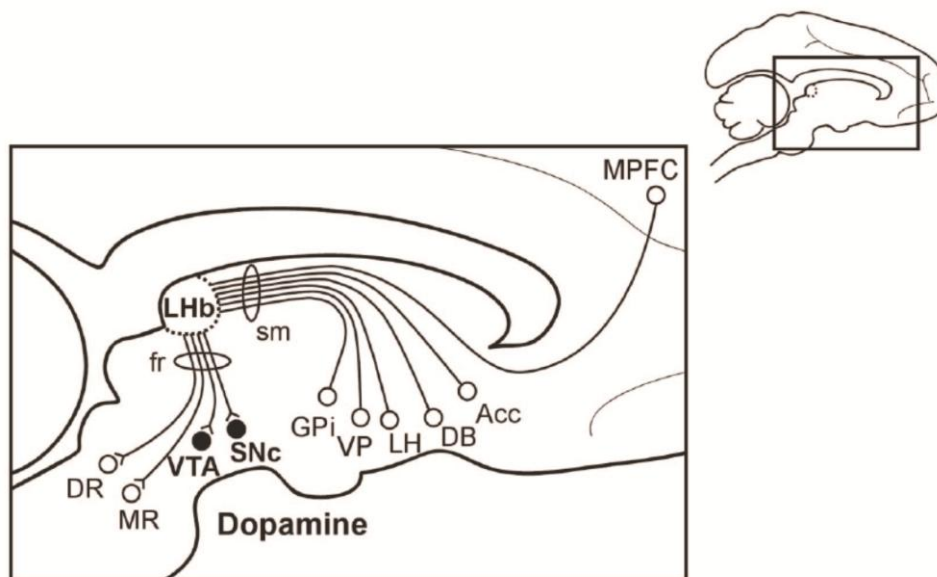


Figura 1.3 Lo schema mostra le principali afferenze ed efferenze della LHB, nel cervello di macaco. Acc, *nucleus accumbens*; DB, banda diagonale di Broca; DR, rafe dorsale; fr, fascicolo retroflesso; GPi, segmento interno del globo pallido LH, ipotalamo laterale; LHB, abenuola laterale; MPFC, corteccia mediale pre-frontale; MR, rafe mediale; sm, stria medullaris; SNc, *substantia nigra pars compacta*; VP, pallido ventrale; VTA, area ventrale del tegmento. (Matsumoto & Hikosaka, 2007).

In linea con le evidenze anatomiche, la LHB è stata implicata in alcune importanti funzioni sia emotive che cognitive. Una compromissione del suo normale funzionamento è stata chiamata in causa in patologie inerenti ansia, umore, stress, apprendimento, attenzione e processi di gratificazione (Hikosaka *et al.*, 2008).

In questa sede, tralasciando le altre importanti funzioni della LHB, ci concentreremo sui dati a sostegno del suo prominente ruolo nel veicolare i segnali correlati alla gratificazione nei neuroni DAergici del mesencefalo.

L'influenza inibitoria della LHB sui neuroni DAergici risulta essere importante nel controllo motorio dei comportamenti motivati da ricompense. I neuroni DAergici inviano segnali necessari ad intraprendere l'azione. Come anticipato nel precedente paragrafo, questi neuroni possono codificare la rappresentazione dell'errore di predizione di una ricompensa. Questo segnale è alla base del rinforzo dei comportamenti atti al raggiungimento di una gratificazione attesa.

In un elegante studio su scimmie, Matsumoto e Hikosaka (Matsumoto & Hikosaka, 2007) suggeriscono un ruolo istruttivo da parte della LHb nel selezionare azioni basate sul raggiungimento di una ricompensa. In questo studio le scimmie venivano istruite a compiere rapidi movimenti oculari su oggetti, ma l'entità della ricompensa dipendeva dalla posizione degli oggetti. I neuroni della LHb erano quasi uniformemente inibiti dall'oggetto che rappresentava una ricompensa, viceversa venivano eccitati dall'oggetto che non prevedeva una ricompensa. Le risposte avvenivano solo quando la gratificazione non era attesa. Queste risposte erano esattamente opposte a quelle dei neuroni DAergici del mesencefalo. L'analisi temporale ha messo in evidenza che l'eccitazione dei neuroni della LHb ad una mancata ricompensa avveniva prima rispetto all'inibizione dei neuroni DAergici.

Gli autori, in linea con studi su ratti anestetizzati (Christoph *et al* 1986; Ji e Shepard 2007), hanno dimostrato che la stimolazione elettrica della LHb inibisce un cospicuo numero di neuroni DAergici. Questi risultati suggeriscono un ruolo chiave della LHb nel trasmettere i segnali negativi correlati a gratificazioni ai neuroni DAergici. A sostegno di questa tesi, lesioni selettive della LHb inducono un aumento del turnover di DA nelle principali aree di proiezione (Lisoprawski *et al.*, 1980; Nishikawa *et al.*, 1986; Lecourtier *et al.*, 2008). Inoltre, uno studio di risonanza magnetica funzionale (fMRNi) su volontari ha messo in evidenza il ruolo della LHb nei circuiti neurali atti alla rappresentazione di un risultato negativo (Ullsperger & von Cramon, 2003).

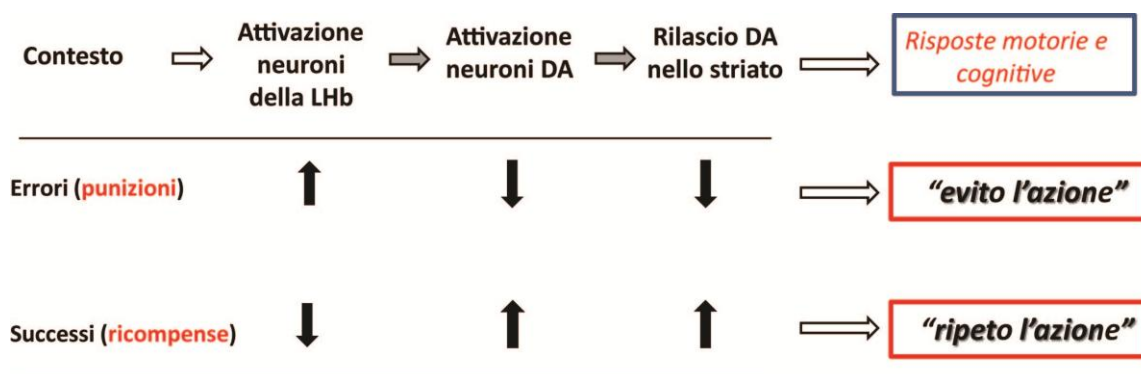


Figura 1.4. Ipotesi esemplificativa su come la LHb potrebbe controllare le azioni. Lo schema riassume eventi che si succedono in ordine da sinistra a destra. Le frecce all'insù indicano incrementi, quelle nel verso opposto indicano decrementi. Schema esemplificativo adattato da Hikosaka *et al.*, 2008.

Ricapitolando, la figura 1.4 mostra come la LHb può influenzare i comportamenti motori e cognitivi attraverso la sua azione sui neuroni DAergici. I neuroni della LHb sono prontamente attivati da stimoli non gratificanti come anche da punizioni (Matsumoto & Hikosaka, 2007; 2008; 2009). Questo causerebbe un'inibizione dei neuroni DAergici della VTA e della SNc ed una diminuzione dei livelli di DA nello striato. Questa riduzione potrebbe portare alla soppressione di azioni cognitive e comportamentali attraverso fenomeni di plasticità sinaptica, come la depressione a lungo termine (LTD) (Lecourtier *et al.*, 2006; Nakamura & Hikosaka, 2006; Hikosaka, 2007a; Kreitzer & Malenka, 2008). Tale meccanismo è alla base di un principio fondamentale del comportamento: se un'azione conduce ad un esito indesiderato, in futuro eviterò quell'azione.

D'altro canto invece le risposte inibitorie della LHb a stimoli gratificanti potrebbero diminuirne l'influenza inibitoria sul sistema DAergico favorendo il rilascio di trasmettitore nello striato (Lecourtier *et al.*, 2008). In questo caso meccanismi di potenziamento a lungo termine (LTP) (Reynolds & Wickens, 2002) potrebbero promuovere un altro principio fondamentale del comportamento: se un'azione porta ad un esito desiderato, ripeterò quell'azione.

Uno dei nodi cruciali nella comprensione dell'influenza inibitoria della LHb sulla VTA e sulla SNc risiede nella natura stessa dei neuroni della LHb. Le proiezioni dalla LHb alla VTA sono state dimostrate da numerosi studi con traccianti (Herkenham & Nauta, 1979; Araki *et al.*, 1988; Geisler & Zahm, 2005; Geisler *et al.*, 2007; Kim, 2009). Dati sul fenotipo neuronale indicano che la maggior parte dei neuroni della LHb sono glutamatergici, quindi eccitatori (Kalen *et al.*, 1985; Matsuda & Fujimura, 1992; Herzog *et al.*, 2004). Come suggeriscono Ji e Shepard (2007) l'influenza inibitoria della LHb sui neuroni DA, mediata dal recettore dell'acido γ -aminobutirrico (GABA) di tipo A, prevedrebbe un meccanismo polisinpatico, presumibilmente costituito da innervazioni selettive sugli interneuroni GABA mesencefalici che attraverso i loro collaterali inibirebbero i neuroni DAergici (Johnson & North, 1992b; Omelchenko & Sesack, 2009). Tuttavia studi con traccianti e marcatori per i neuroni DAergici e GABAergici (Omelchenko *et al.*, 2009) mostrano che le proiezioni glutamatergiche della LHb innervano scarsamente ed in numero pressoché simile, i neuroni DAergici e quelli GABAergici della VTA. Queste evidenze hanno posto come primaria la necessita

di identificare l'interfaccia inibitoria tra la LHb e i neuroni DAergici del mesencefalo.

Il paradosso di un'inibizione proveniente da fibre eccitatorie, oggi è stato risolto grazie alla scoperta di un nuovo nucleo GABAergico, sito caudalmente rispetto alla VTA, che riceve afferenze eccitatorie dalla LHb e proietta nei neuroni DAergici del mesencefalo: il nucleo Rostromediale del Tegmento (RMTg). Vi è oramai completo accordo sul ritenere il RMTg l'interfaccia inibitoria tra i neuroni glutamatergici della LHb e i neuroni DAergici della VTA e della SNc.

1.3 La scoperta del nucleo Rostromediale del Tegmento: l'interfaccia inibitoria tra la LHb e la VTA

Le prime evidenze verso la scoperta di un'area inibitoria di mediazione tra la LHb e il complesso DAergico VTA/SNc arrivano dagli studi preliminari di Jhou e dei suoi collaboratori (l'autore in questione nei primi *abstract* pubblicati appariva col nome Chou), che rivelano l'esistenza di un cluster di cellule contenenti un alto grado di mRNA per il GAD67, che proiettano sia alla VTA che alla SNc, ed influenzano le risposte elicitate da paura (Chou *et al.*, 2004). In precedenza, alcuni autori hanno messo alla luce come le proiezioni dei neuroni della LHb terminano solo parzialmente nel mesencefalo. Di fatto, il loro impatto maggiore risiede in una posizione caudale rispetto alla VTA e alla SNc (Herkenham & Nauta, 1979; Araki *et al.*, 1988). In un successivo *abstract*, Jhou e Gallagher (Jhou & Gallagher, 2007) mostrano che questi neuroni sono attivati da stimoli avversivi. I lavori definitivi (Jhou *et al.*, 2009a; Jhou *et al.*, 2009b), rivelano chiaramente come questa struttura denominata nucleo mesopontino rostromediale del tegmento (RMTg) sia un nucleo a sé stante, prevalentemente contenente neuroni GABAergici, i quali ricevono forti innervazioni dalla LHb e proiettano alla VTA e alla SNc (vedi figura 1.5).

Successivamente, in un altro laboratorio, Barrot con i suoi collaboratori (Kaufling *et al.*, 2009; Kaufling *et al.*, 2010a) hanno identificato un cluster particolare di neuroni residente sempre posteriormente rispetto alla VTA, che esprimeva una variante della proteina FosB (deltaFosB) a seguito di esposizione cronica dell'animale sia all'amfetamina che alla cocaina (Kaufling *et al.*, 2010).

Quest'area, anch'essa contenente neuroni GABA e proiettante in VTA, è stata definitivamente nominata coda della VTA (*VTA tail*).

Oggi, vi è ampio accordo tra gli autori succitati sul fatto che il RMTg e la *VTA tail* sono la medesima area. Tuttavia, i due differenti gruppi di ricerca si sono concentrati nella caratterizzazione anatomica di due porzioni differenti del nucleo. Come argomenta lo stesso Jhou (2009a), le sue ricerche si sono concentrate maggiormente nella parte caudale della RMTg/-*VTA tail* (da questo punto definiremo l'area unicamente con l'acronimo RMTg), mentre gli studi della Kaufling si sono focalizzati nella parte rostrale dell'area. Il RMTg per le caratteristiche appena descritte si configura come struttura di conversione dell'input eccitatorio della LHb in output inibitorio sui neuroni DAergici del mesencefalo (Ikemoto, 2010; Hong *et al.*, 2011; Lavezzi & Zahm, 2011).

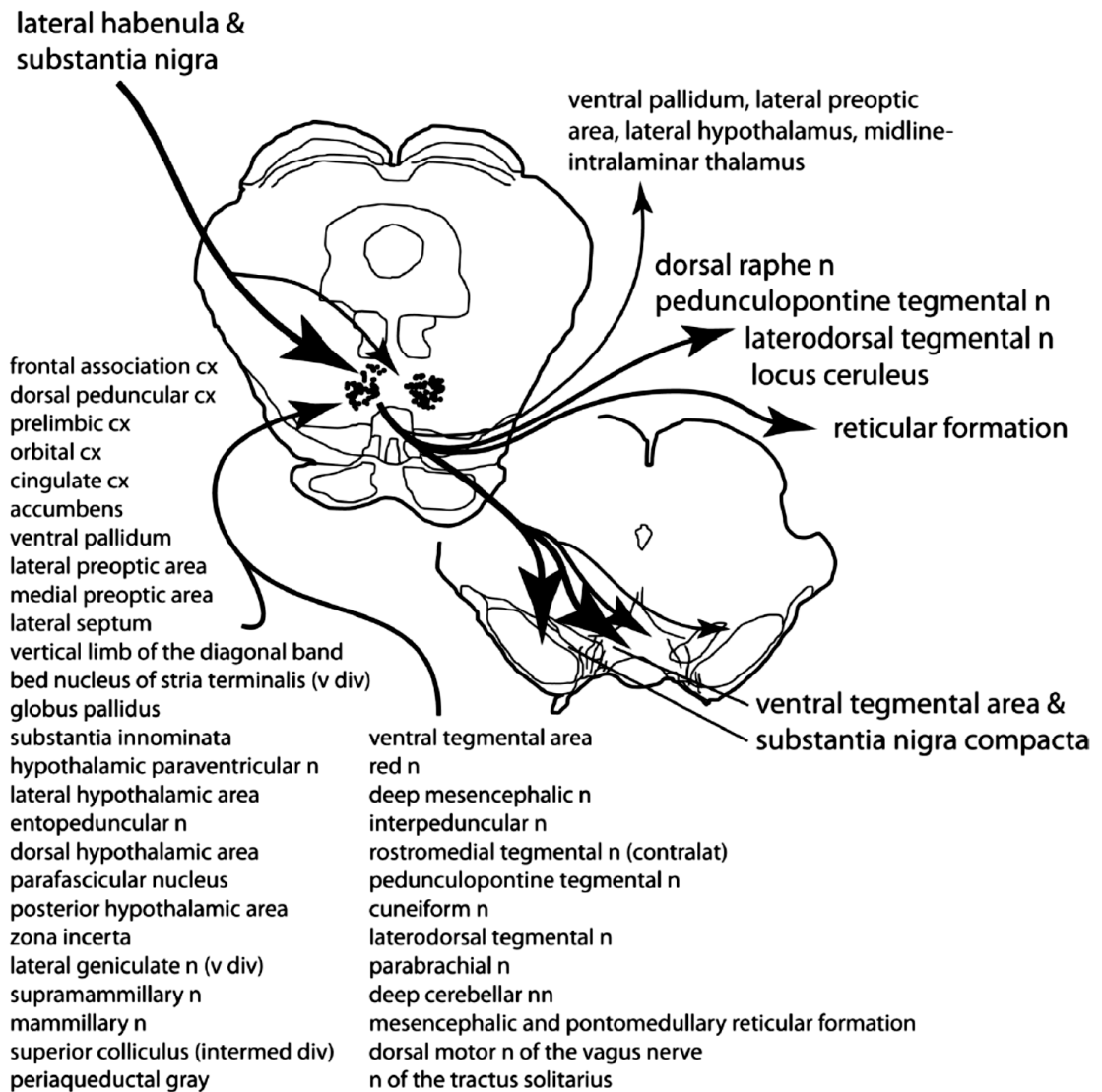


Figura 1.5 Diagramma riassuntivo che illustra input ed output del RMTg. Le afferenze principali sono elencate alla sinistra della figura, mentre le proiezioni più importanti sono riportate a destra. Lo spessore delle linee e la grandezza delle frecce vuole rappresentare la robustezza delle connessioni. Contralat, controlaterale; cx, corteccia; div, divisione; intermed, intermedia; n, nucleo; nn, nuclei. (Jhou *et al.*, 2009b)

1.3.1 Aspetti anatomo-funzionali del RMTg

Attualmente vi è ampio accordo nell'utilizzare alcuni criteri guida di identificazione dei neuroni del RMTg al fine di definirne l'area. Questi criteri comprendono

- a) un'importante input eccitatorio dalla LHb;
- b) le proiezioni al complesso VTA/SNc;
- c) numero prevalente di neuroni a fenotipo GABA;
- d) alta espressione di alcune varianti della proteina Fos a seguito di esposizione a psicostimolanti o stimoli avversivi (vedi figura 1.6).

Seguendo questi criteri è stata identificata un'area che si estende dalla parte più caudale della VTA sino all'angolo compreso tra il lemisco mediale e il nucleo interpenduncolare per poi spostarsi latero-dorsalmente, nella sua estensione caudale, tra le fibre del peduncolo superiore cerebellare, in una posizione laterale rispetto ai nuclei del rafe mediale (vedi figura 1.6,E).

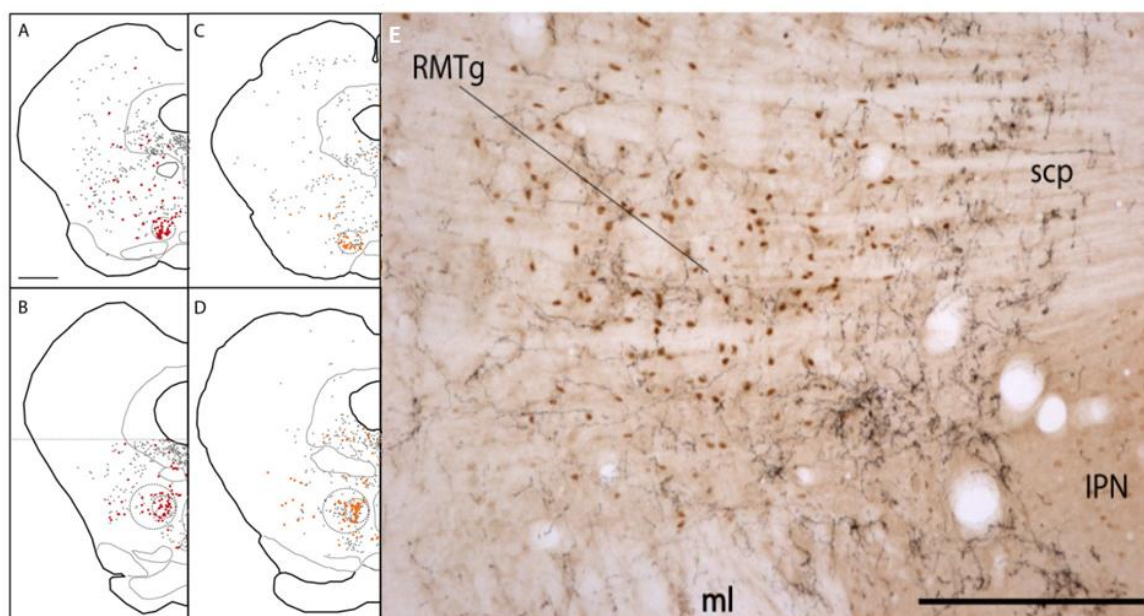


Figura 1.6 Localizzazione del RMTg. (A-B) Le rappresentazioni di sezioni coronali che includono il RMTg, mostrano un alta concentrazione di neuroni positivi al GAD 67, marcati dal tracciante retrogrado iniettato in VTA (pallini rossi). Come ben visibile in B le marcature si concentrano in quella che Jhou definisce *core* del RMTg (cerchio piccolo tratteggiato) Neuroni positivi alla doppia marcatura sono presenti anche nella periferia del RMTg (cerchio grande tratteggiato). Le sezioni coronali C-D, speculari ad A-B mostrano inoltre come specificatamente nella *core* vi sia un addensamento di neuroni che esprimono Fos (pallini arancioni) a seguito di uno shock elettrico. (E) La microfotografia ad alta risoluzione di una sezione coronale comprendente il RMTg mostra la caratteristica espressione di Fos indotta da pre-trattamento con metamfetamina. Come ben visibile dalla figura la concentrazione di Fos (pallini castani) si addensa selettivamente nel RMTg. Scala: 200 μ m. Immagine adattata da Jhou *et al.*, 2009a (A-D) e da Lavezzi & Zham 2011 (E).

La maggior parte degli studi ha descritto gli aspetti anatomo-funzionali dell'area. In particolar modo iniettando traccianti retrogradi in VTA, Jhou (Jhou *et al.*, 2009b) ha dimostrato che circa il 70% dei neuroni del RMTg, che vengono marcati dal tracciante, contengono mRNA per il GAD67. In particolare con questo metodo l'autore ha distinto due differenti porzioni dell'area (vedi figura 1.6): una "core", posizionata medialmente rispetto all'intero nucleo, caratterizzata da un alto numero di cellule contenenti GABA e marcate dal tracciante retrogrado iniettato in VTA; ed una "periferia", situata lateralmente rispetto alla "core", caratterizzata da marcature retrograde meno dense.

Sulla stessa linea la Kaufling (Kaufling *et al.*, 2010a) stima che il 92% dei neuroni che esprimono la variante Δ della proteina FosB dopo somministrazione di cocaina, contengono GABA. Inoltre, altra caratteristica peculiare di questi neuroni, risulta dall'alta espressione di immunoreattività contro il recettore μ -oppioide (Jhou *et al.*, 2009b) A conferma di questo dato, un recente studio ha mostrato un'elevata presenza di questo recettore nel RMTg (Jalabert *et al.*, 2011).

Le proiezioni del RMTg sono state descritte grazie all'ausilio di traccianti anterogradi come il PHA-L (Jhou *et al.*, 2009b). Le efferenze più importanti del RMTg sono quelle nel complesso VTA/SNc. Tali proiezioni sembrano essere organizzate topograficamente: ovvero la porzione mediale del RMTg invia proiezioni alla VTA, mentre la parte laterale dell'area proietta maggiormente alla SNc (Jhou *et al.*, 2009b; Goncalves *et al.*, 2011). Balcita-Pedicino e collaboratori (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011) confermano che l'81% delle innervazioni del RMTg nel mesencefalo sono su neuroni positivi alla tirosina idrossilasi (TH+).

Altre efferenze importanti del RMTg sono state identificate nel nucleo peduncolo pontino del tegmento (nella pars dissipata), nella sostanza grigia periaqueduttale, nei nuclei dorsali del rafe e nella formazioni reticolari pontine e medullare. Moderate innervazioni sono state osservate in diverse altre strutture, come il pallido ventrale, regioni laterali preottiche, ipotalamo laterale, nuclei talamici parafascicolari, nuclei profondi mesencefalici e nucleo laterodorsale del tegmento, per citarne solo alcune (vedi figura 1.5 per un riepilogo). Sempre per quel che riguarda le proiezioni del RMTg, uno studio recente (Lavezzi *et al.*, 2011) mostra come le efferenze dei neuroni GABAergici del RMTg possono avere degli assoni collaterali. Gli autori in questione identificano due popolazioni di

neuroni del RMTg che si avvalgono dei collaterali: una che proietta sia alla VTA che al rafe dorsale (DR), e l'altra che proietta sia alla VTA che al nucleo peduncolo pontino nella pars dissipata (PPTg-d). Considerando che DR e PPTg-d inviano input a loro volta sui neuroni DAergici del mesencefalo, questa particolare organizzazione andrebbe maggiormente indagata con futuri studi per capirne il significato funzionale.

Le afferenze al RMTg sono state ampiamente descritte tramite traccianti retrogradi come fluoro-gold (Jhou *et al.*, 2009b) o CT β (Kaufling *et al.*, 2010a). Come largamente anticipato, le efferenze eccitatorie provenienti dalla LHb rappresentano l'input principale al RMTg. Queste proiezioni sono state identificate sia con traccianti anterogradi in LHb che con traccianti retrogradi in RMTg (Jhou *et al.*, 2009b; Goncalves *et al.*, 2011). Anche in questo caso tali proiezioni seguono un'organizzazione topografica precisa. Il contributo maggiore della LHb al RMTg parte dalla porzione laterale dell'area (lLHb). Di converso la mLHb sembra inviare le sue afferenze principalmente alla VTA (Goncalves *et al.*, 2011). Uno studio di microscopia elettronica ha quantificato che i neuroni GABAergici del RMTg innervati dalla LHb sono il 53% del totale (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011). Altri input, meno importanti, al RMTg si sono registrati in diverse aree. In particolare nella *substantia nigra* sia reticolata che *compacta* (Jhou *et al.*, 2009 b), suggerendo un possibile feedback tra il RMTg e i neuroni del mesencefalo. Recentemente Zahm e collaboratori (Lavezzi *et al.*, 2011) hanno riportato l'esistenza di consistenti proiezioni dall'area preottica al RMTg. La natura di tali proiezioni è ancora da determinare. Risulta comunque interessante rimarcare come l'area preottica invii importanti afferenze glutamatergiche alla LHb (Kowski *et al.*, 2008).

Attualmente le afferenze ed efferenze del RMTg succitate, sembrano essere le principali (vedi figura 1.5 per un riassunto). In tale sede è utile sottolineare l'importanza delle connessioni LHb-RMTg-VTA. Diversi studi, con l'ausilio di doppi traccianti (Jhou *et al.*, 2009b; Balcita-Pedicino *et al.*, 2011; Goncalves *et al.*, 2011) mostrano come le efferenze eccitatorie della LHb formino preferenzialmente connessioni sinaptiche con i neuroni del RMTg che proiettano nella VTA (vedi figura 1.7). Questo dato conferma il ruolo di mediazione giocato dal RMTg tra i neuroni glutamatergici della LHb e le cellule DAergiche del mesencefalo.

Tuttavia, i limiti intrinseci all'uso di traccianti, non permettono tutt'ora una chiara e distinta caratterizzazione delle proiezioni e degli input di questo nucleo.

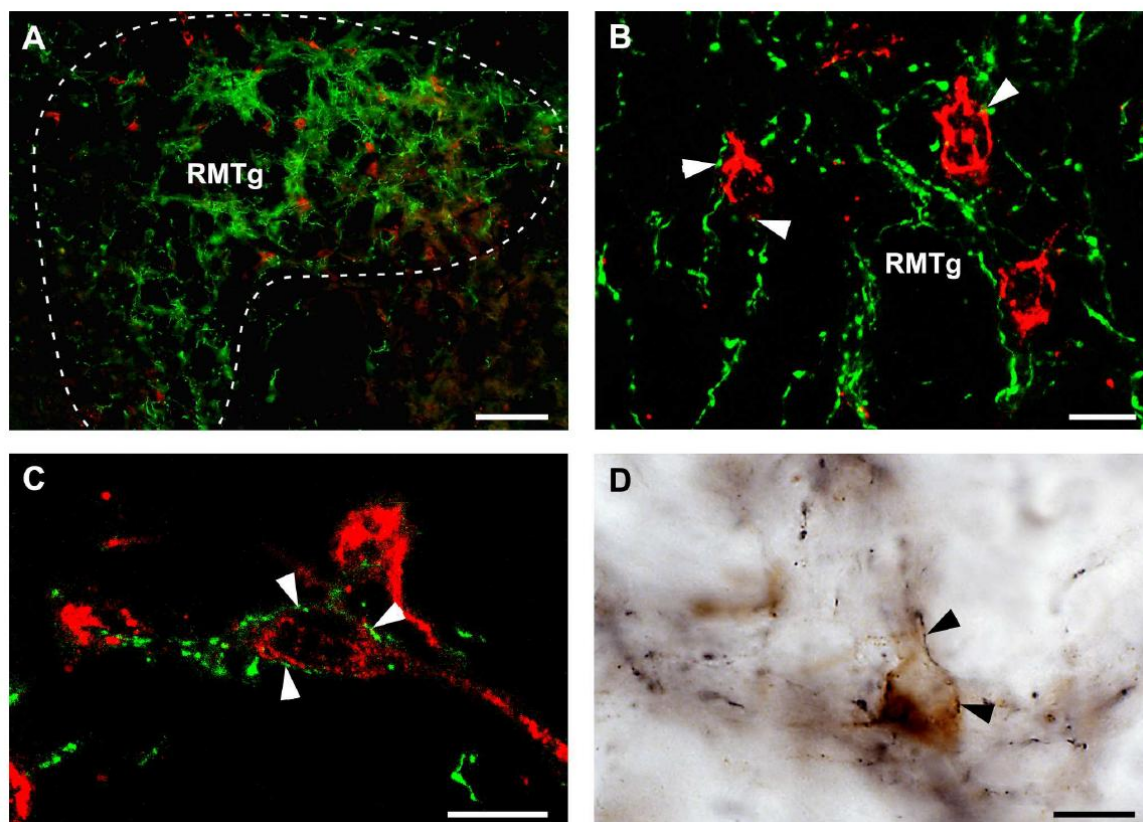


Figura 1.7. Le connessioni LHB-RMTg-VTA. Le microfotografie ad alta risoluzione mostrano le doppie marcature in RMTg ottenute con i traccianti PHA-L (che appare verde in A-C e nero in D) e CTb (che appare rosso in A-C e castano in D). Le marcature ottenute col tracciante anterogrado derivano da iniezioni nella LHB. La marcatura con CTb risulta da iniezioni della sostanza nella VTA (esattamente nel nucleo parabranchiale). Le figure B e C mostrano come i terminali della LHB (in verde) si trovano nelle vicinanze dei neuroni del RMTg che proiettano in VTA (in rosso). Le frecce indicano le sinapsi formate dai terminali della LHB sui neuroni del RMTg. Scala: 100 μ m in A; 10 μ m in B-D. Da Goncalves *et al.*, 2011

1.3.2 Risposte dei neuroni del RMTg a stimoli aversivi e gratificanti

Come discusso nei precedenti paragrafi, i neuroni della LHB aumentano la loro frequenza di scarica in risposta a stimoli aversivi o ad omissione di ricompensa (Matsumoto & Hikosaka, 2007), in una maniera opposta alle risposte che gli stessi stimoli elicitano nei neuroni DAergici del mesencefalo (Schultz *et al.*, 1998). Questo rapporto tra LHB e neuroni DAergici, come appena messo in evidenza, sembra mediato in parte dall'intervento del RMTg. Forti evidenze in questa direzione sono state messe alla luce da Jhou e collaboratori (2009a) attraverso l'analisi dell'espressione della proteina Fos nei neuroni GABAergici del RMTg che proiettano alla VTA, principalmente concentrati nella *core* (vedi figura 1.6, B,D).

Essi registrano un incremento dell'espressione di tale proteina a seguito di uno shock incondizionato della zampa (46% di incremento) o condizionato da un avviso sonoro (30% di incremento). Un aumento significativamente maggiore della stessa proteina si registra in ratti deprivati da cibo (32%) rispetto a ratti a regime alimentare normale (18%). Gli stessi autori hanno registrato l'attività elettrica dei neuroni del RMTg in ratti liberi di muoversi (Jhou *et al.*, 2009a). I dati prodotti mostrano che il 55% dei neuroni (presumibilmente contenenti GABA) del RMTg rispondevano a stimoli capaci di predire uno shock o una ricompensa (saccarosio). Un numero maggiore di questi neuroni (72%) veniva eccitato dallo stimolo associato allo shock. Il 67% dei neuroni del RMTg inoltre coerentemente venivano eccitati dallo shock e inibiti dal saccarosio. Vi è comunque una subpopolazione di neuroni del RMTg che vengono attivati da stimoli che richiamano alla gratificazione. Studi su primati (Hong *et al.*, 2011) supportano i dati ottenuti dalle registrazioni elettrofisiologiche sui ratti. I neuroni del RMTg nella scimmia sono eccitati da stimoli che preludono ad una punizione e inibiti da stimoli che anticipano una ricompensa. Inoltre gli autori forniscono dati a sostegno del ruolo dei neuroni del RMTg nel segnalare alle cellule DAergiche l'errore negativo di predizione di una ricompensa. Infatti, i neuroni del RMTg aumentano la loro frequenza in risposta a stimoli associati a una ricompensa di entità inferiore rispetto ad un'altra. Nonostante si evidenzia una particolare eterogeneità dei neuroni del RMTg nella codifica degli stimoli a stretto connotato gratificatorio o avversivo, possiamo affermare una predilezione degli stessi ad essere eccitati da stimoli condizionati o incondizionati legati all'avversione e rispondere con un'inibizione a quegli stimoli legati ad una ricompensa. Questo particolare pattern di risposte, come riporta la figura 1.8, è simile a quello registrato nei neuroni glutamatergici della LHb e contrario alle risposte riportate nei neuroni DAergici della VTA (Matsumoto & Hikosaka, 2007; 2009).

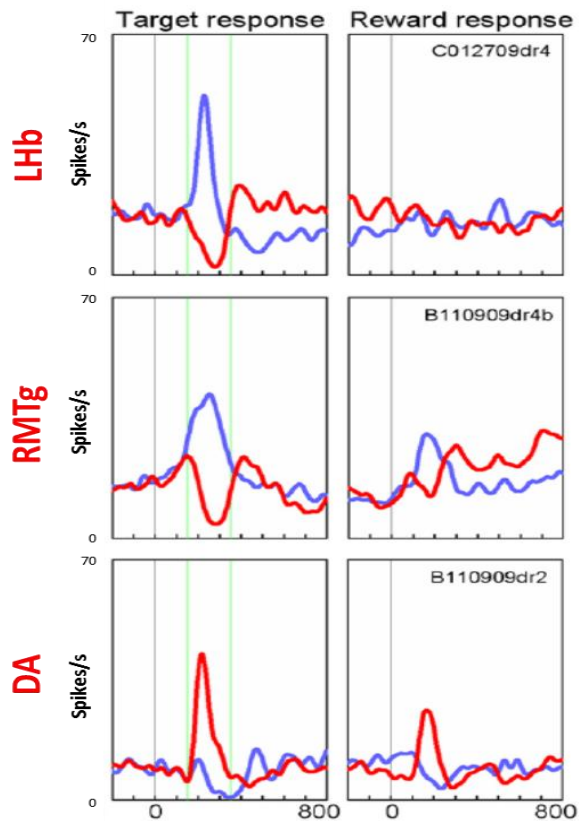


Figura 1.8 Risposte medie dell'attività di scarica dei neuroni della LHb, del RMTg e della VTA a stimoli che prevedono ricompense (in rosso) e stimoli che alludono a punizioni (in blu). I grafici mostrano chiaramente come i neuroni del RMTg (nel mezzo) codifichino positivamente gli stimoli avversivi, in maniera simile ai neuroni della LHb (in alto) e opposta a quella dei neuroni DA (in basso). Immagine modificata da Hong *et al.*, 2011.

In un'ottica d'insieme, queste scoperte, associate alla particolare anatomia del RMTg, fanno presumere la possibilità di un ruolo basilare di quest'area nei circuiti della gratificazione. Di conseguenza, una miglior comprensione delle sue funzioni può aiutarci a capire maggiormente i meccanismi che si instaurano nella compromissione dei normali processi gratificatori. Tra queste compromissioni, una mole importante di ricerca si è soffermata sull'abuso di sostanze e l'instaurarsi della dipendenza. Di seguito riporteremo alcune importanti evidenze su un possibile coinvolgimento del RMTg negli effetti mediati dall'assunzione di sostanze d'abuso.

1.3.3 Il RMTg: target per le sostanze d'abuso?

La comprensione dell'attività dei neuroni del RMTg e delle loro connessioni inibitorie in VTA può aiutare a far ulteriore luce sui processi di gratificazione e avversione. Processi che sono bersaglio primario delle sostanze d'abuso. Una delle caratteristiche principali di queste sostanze risiede sia nella capacità d'attivazione dei meccanismi generanti piacere, sia nella soppressione delle vie che mediano l'avversione. Questa particolare porzione del circuito della gratificazione, sembra riflettere caratteristiche interessanti che ne fanno possibile bersaglio per l'azione di queste sostanze. Alcune evidenze sperimentali in tal senso sono state prodotte.

Come anticipato nel paragrafo 1.3.1, una delle caratteristiche principali dei neuroni GABAergici del RMTg è la loro capacità di esprimere un'alta concentrazione della proteina Fos e dei suoi derivati a seguito di esposizione a sostanze psicostimolanti (Jhou *et al.*, 2009a; Kaufling *et al.*, 2009; Kaufling *et al.*, 2010a; Kaufling *et al.*, 2010b). Le preliminari evidenze riportate da Jhou attraverso il pre-trattamento con metamfetamina (Jhou *et al.*, 2009a) e contemporaneamente dalla Kaufling attraverso iniezioni croniche di cocaina (Kaufling *et al.*, 2009) sono state confermate ed ampliate ad altre sostanze. La Kaufling, in un lavoro definitivo (2010b), ha messo in luce la selettività dell'espressione del FosB e della sua variante Δ nel RMTg a seguito di trattamento con diversi psicostimolanti. Infatti sia la metamfetamina, la cocaina, l'ecstasy, il metilfenidato e la caffeina, hanno incrementato i livelli della proteina in area. Sempre nello stesso studio la somministrazione di sostanze diverse da psicostimolanti, come morfina, nicotina, THC, etanolo, ketamina, fenciclidina, non hanno avuto alcun effetto sui livelli di FosB/ Δ FosB nel RMTg. Quest'ultimo dato suggerisce un ruolo preponderante dei neuroni GABAergici del RMTg nella mediazione degli effetti da sostanze con proprietà psicostimolanti. Tuttavia, un ruolo dei neuroni del RMTg negli effetti mediati dalle altre sostanze d'abuso non è da escludere (Lavezzi & Zahm, 2011)

Sempre seguendo i criteri di identificazione dell'area in questione, sappiamo che i neuroni del RMTg mostrano un'alta immunoreattività per il recettore oppioide μ . In linea con questo dato i ratti sono propensi ad auto-somministrarsi in loco l'agonista per i recettori μ oppioidi, endorfina-1, quando la cannula è posizionata nel RMTg rispetto a localizzazioni adiacenti (Jhou *et al.*, 2009c). Recentemente è

stata dimostrata un'alta concentrazione dei recettori μ sui corpi cellulari e sulle terminazioni dei neuroni GABAergici del RMTg (Jalabert *et al.*, 2011).

Partendo da queste evidenze il seguente studio si propone di studiare su ratto anestetizzato, attraverso la metodica di registrazione dell'attività elettrica extracellulare, l'effetto di quattro diversi composti d'abuso: la morfina, l'agonista dei recettori per i cannabinoidi di tipo 1 (CB1) WIN55212-2, la cocaina e la nicotina sulla risposta dei neuroni del RMTg e sul loro potere inibitorio sui neuroni DAergici della VTA .

A tal fine, in un primo momento, verranno analizzate le principali caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni virtualmente contenenti GABA del RMTg, così come il loro effetto inibitorio sui neuroni DAergici della VTA. Nella seconda parte dello studio, verranno testati gli effetti della somministrazione in acuto delle sostanze su riportate, sia sulla frequenza di scarica spontanea dei neuroni del RMTg sia sul loro potere inibitorio sui neuroni DAergici della VTA.

Capitolo Secondo

2 MATERIALI E METODI

2.1 Soggetti e procedure

Per il presente studio sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley (Harlan Nissan, Italia) del peso di 250-300 g. Gli animali sono stati stabulati in numero da 3 a 6 per gabbia e mantenuti ad un regolare ciclo giorno/notte di 12h in condizioni ambientali standard ($T 21 \pm 1$ °C, umidità 60%), con libero accesso a cibo ed acqua. I protocolli sperimentali sono stati approvati dal Comitato etico dell'Università degli Studi di Cagliari, e condotti secondo la normativa CEE per l'uso degli animali da esperimento (CEE N°86/609). Sono state seguite tutte le procedure al fine di ridurre al minimo dolore, sofferenza e numero di animali utilizzati.

I ratti, anestetizzati con uretano (1300 mg/kg i.p.), sono stati sottoposti ad un intervento di microchirurgia finalizzato all'inserimento di un catetere nella vena femorale per la somministrazione endovenosa dei farmaci ed ulteriori dosi di anestetico. Per le fasi successive dell'esperimento gli animali sono stati posizionati sullo strumento stereotassico (Kopft, Tujunga CA, USA) per la localizzazione delle aree cerebrali di registrazione e stimolazione. La temperatura dei ratti è stata mantenuta costante a 37 ± 1 °C tramite l'ausilio di un tappetino riscaldante.

2.2 Registrazioni elettrofisiologiche in vivo

Al fine di studiare il ruolo del RMTg e delle sue proiezioni alla VTA nell'effetto indotto dalle sostanze d'abuso, sono state sviluppate sessioni sperimentali in acuto in entrambe le aree.

2.2.1 Esperimenti nel RMTg

La ricerca e la registrazione dei neuroni sono avvenute per mezzo di un elettrodo registrante, inserito nella *core* del RMTg (7.0-7.4 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.8-1 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 6.5-7.5 mm ventralmente

rispetto alla corteccia cerebrale). In tutti gli esperimenti è stato inserito un elettrodo bipolare stimolante (diametro della punta: 250 μ m) nella LHb (3.4 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.7 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 4.4 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebrale). Le strutture cerebrali in questione sono state identificate in riferimento alle coordinate fornite dall'atlante cerebrale per ratto (Paxinos & Watson, 2007). L'attività delle cellule è stata registrata extracellularmente mediante una micropipetta in vetro riempita con 2% di *Pontamine Sky Blue* (PsB) disciolto in 0.5M di Acetato di Sodio (con impedenza stimata tra i 5-10 M Ω). I neuroni del RMTg, virtualmente contenenti GABA, sono stati isolati ed identificati in accordo con le caratteristiche elettrofisiologiche descritte in letteratura (Jhou *et al.*, 2009a): frequenza di scarica spontanea superiore ai 10 Hz ed un potenziale d'azione bifasico ad insorgenza negativa e di breve durata (< 1.5 ms).

Una volta selezionata una cellula, si procedeva alla verifica della risposta ortodromica alla stimolazione elettrica della LHb. Brevemente, lo stimolo consisteva in un pulso singolo monofasico e rettangolare con durata di 0.5 ms e intensità pari a 0.5 mA. La frequenza dello stimolo è stata fissata ad 1 Hz. Per ogni neurone registrato è stata valutata la risposta alla stimolazione della LHb mediante l'analisi del *peri-stimulus time histogram* (PSTH) generato on-line (Spike2 software, CED, Cambridge, UK). Un neurone veniva considerato eccitato dalla stimolazione della LHb quando il numero di potenziali d'azione/bin nei 20 ms successivi allo stimolo era significativamente maggiore (ANOVA ad una via per misure ripetute) rispetto ai 20 ms antecedenti lo stesso (basale). Solo i neuroni con una risposta eccitatoria localizzata in un intervallo compreso tra i 2 e gli 8 ms sono stati scelti per questo studio. Le cellule che mostravano una risposta con latenza maggiore di 8 ms sono state scartate poiché potevano esibire una componente polisinfaptica.

Il segnale neuronale, registrato extracellularmente, è stato filtrato (passa banda: 1-3000 Hz), amplificato (Neurolog System, Digitimer, Hertfordshire, UK), visualizzato su un oscilloscopio digitale (TDS 3012, Tektronix, Marlow, UK) ed infine acquisito tramite computer connesso ad un interfaccia di conversione analogico-digitale CED 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) e visualizzato per mezzo del software Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

La frequenza di scarica spontanea dei neuroni del RMTg è stata registrata per 2-3 minuti al fine di poter stabilire una frequenza media basale. Oltre alla frequenza sono stati considerati anche parametri qualitativi della modalità di scarica: gli intervalli tra

potenziali (*interspike intervals*) e il coefficiente di variazione espresso in percentuale (CV% dato dal rapporto tra la deviazione standard degli *interspike intervals* e la media degli stessi).

Le sostanze sono state somministrate in *bolo* i.v. (1 ml/kg del peso corporeo dell'animale). Le variazioni nella frequenza e nella regolarità del pattern sono stati calcolati mediando gli effetti della droga ogni 2 minuti, dopo la somministrazione della stessa, comparati al periodo pre-somministrazione (basale).

2.2.2 Esperimenti nella VTA

Al fine di valutare l'influenza delle proiezioni inibitorie del RMTg sui neuroni DAergici, sono state condotte sessioni sperimentali nella VTA. L'elettrodo registrante è stato inserito alle coordinate relative alla VTA (5.4-5.8 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.4-0.6 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 7.0-8.0 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebrale). Al fine di testare le risposte dei neuroni DAergici all'attivazione del RMTg, un elettrodo stimolante è stato posizionato nel RMTg (7.2 mm posteriormente rispetto al bregma; 0.8 mm lateralmente rispetto alla vena sagittale; 6.5 mm ventralmente rispetto alla corteccia cerebrale). L'attività dei neuroni DAergici è stata acquisita utilizzando gli stessi strumenti descritti precedentemente eccezion fatta per i filtri (passa-banda: 0.1-10000 Hz) e per l'impedenza degli elettrodi (stimata tra i 2.5-5 M Ω). L'identificazione dei neuroni DAergici è stata effettuata seguendo i criteri presenti in letteratura (Grace & Bunney, 1983; 1984a; b): frequenza di scarica ≤ 10 Hz e durata del potenziale d'azione ≥ 2.5 ms. Solo quando la cellula rispondeva a questi criteri, veniva registrata. Dopo 2 minuti di registrazione dell'attività spontanea del neurone, si procedeva a testare la risposta dello stesso alla stimolazione del RMTg (0,5 mA, 0.5 ms, 1 Hz). Per ogni neurone è stata valutata la risposta alla stimolazione grazie all'ausilio dell'oscilloscopio e mediante l'elaborazione immediata del PSTH. La registrazione dei 2 minuti di attività spontanea permetteva di stabilire i principali parametri dell'attività di scarica della cellula DAergica: la frequenza di scarica, la percentuale di potenziali in *bursts* e il coefficiente di variazione espresso in percentuale. Inoltre per ogni neurone è stata analizzata la modalità di scarica tramite l'analisi degli autocorrelogrammi (con un pari a bin 10 ms su intervalli d'analisi di 2 s) al fine di classificare i neuroni in tre distinte categorie: regolari, irregolari e *bursting* (Hyland et

al., 2002; Fabricius *et al.*, 2010). Un autocorrelogramma con tre o più picchi ad intervalli regolari è distintivo dei neuroni regolari. Un picco immediato che scema nel tempo per poi risalire è tipico dei neuroni in *bursts*. Le cellule classificate come irregolari invece mostrano caratteristiche che non portano alle classificazioni precedenti (vedi figura 3.4B).

Dopo i 2 minuti di registrazione dell'attività spontanea della cellula, è stata testata la sua risposta alla stimolazione del RMTg. I PSTH sono stati costruiti ogni 100 pulsii (coincidenti con 100 secondi di registrazione, considerato che lo stimolo aveva frequenza pari ad 1 Hz) e visualizzati usando un bin pari a 1 ms. Una cellula è stata considerata inibita o eccitata quando il numero di potenziali d'azione/bin nei 50 ms successivi allo stimolo è stato rispettivamente inferiore o superiore ai 50 ms precedenti ad esso (ANOVA ad una via per misure ripetute). La durata dell'inibizione evocata dallo stimolo è stata definita come tempo di completa cessazione dell'attività di scarica immediatamente successivo allo stimolo. I cambiamenti nella durata dell'inibizione evocata dalla stimolazione del RMTg sono stati calcolati analizzando il PSTH ogni 100 s mediando gli effetti della sostanza nei periodi (100 s) successivi la somministrazione e comparati con la media del periodo precedente alla stessa (basale).

2.3 Istologia

Al termine della sessione sperimentale il sito di registrazione è stato marcato con *Pontamine Sky Blue* (PsB) iniettato elettroforeticamente dall'elettrodo registrante mediante il passaggio di corrente continua (15 mA) per 5 minuti. La marcatura del sito di stimolazione è stata effettuata tramite il passaggio di corrente continua (30 μ A) per 1 minuto attraverso l'elettrodo stimolante. Il cervello è stato quindi rimosso e fissato in una soluzione di paraformaldeide al 4%. La posizione degli elettrodi è stata identificata microscopicamente in sezioni seriali-coronali del cervello (40 μ) colorate con Rosso Neutro.

2.4 Induzione di Fos nel RMTg

In una serie separata di esperimenti gli animali sono stati dapprima operati per le registrazioni *in vivo* seguendo le procedure sopra riportate. Due ore prima del sacrificio, i ratti hanno subito un'iniezione intraperitoneale di (+) metamfetamina idrocloruro (10 mg/kg in 0.9% di salina; 1 ml/kg) al fine di indurre l'espressione della proteina Fos nel RMTg, come descritto da Jhou *et al.* (2009a). La marcatura del sito di registrazione è stata effettuata seguendo le procedure precedentemente descritte (istologia). In seguito, gli animali sono stati perfusi per via cardiaca con 4% di paraformaldeide in 0.1 M di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS, pH 7.4). I cervelli sono stati subito rimossi e conservati per 24 ore nella stessa soluzione. Dopo ripetuti lavaggi in 0.1 M PBS, i cervelli sono stati crioprotetti per 48 ore in una soluzione di saccarosio al 30% in PBS. Tramite l'ausilio del criostato sono state preparate sezioni coronali del cervello (40 μ) contenenti il RMTg, conservate e disposte per le procedure di immunocolorazione.

Il pre-blocco di sezioni di tessuto è stato realizzato con il 10% di siero normale di capra, 1% di siero albumina bovino (BSA) e 0.1% di Triton X-100 in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. Le sezioni sono state incubate tutta la notte a 4 °C con anticorpo policlonale anti c-Fos di coniglio (Ab 2, 1:250, Calbiochem, Darmstadt, Germany). Dopo lavaggio in PBS-0.1% Triton X-100, le sezioni sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anti-coniglio biotinilato di capra IgG (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). In seguito, le sezioni sono state incubate con Avidin Alexa FluorR 488 per 1 ora al buio a temperatura ambiente, per poi venire risciacquate e montate su vetrini *Superfrost* con soluzione *antifading*. Gli esperimenti standard di controllo eseguiti con l'omissione degli anticorpi primari o secondari non hanno rivelato nessuna immunofluorescenza.

In accordo con l'atlante cerebrale per ratto Paxinos e Watson (2007) la sezione riportata in figura 3.2 corrisponde al RMTg (AP -7.44). Tutte le osservazioni si sono verificate grazie all'ausilio di un microscopio Olympus IX 61 equipaggiato con obiettivi planacromatici con risoluzione di 2, 4, 10, 20 e 40x. Le immagini sono state acquisite con una telecamera a 12 bit F View II (Olympus, Hamburg, Germany). La risoluzione digitale ottenuta con l'obiettivo a 40x era pari a 0.16 μ m/pixel. Le composizioni dei colori sono state realizzate utilizzando le immagini ottenute con

ogni singolo anticorpo come canali RGB. Dopo essere state acquisite dal computer le immagini venivano analizzate usando il software Cell P AnalySIS®.

2.5 Farmaci

La morfina e la cocaina (idroclore) sono state acquistate rispettivamente dalla S.a.l.a.r.s (Como, Italy) e dalla Akzo Pharmadivision Diosynth (Oss, Netherlands). La nicotina ((-) Nicotina Tartrato), la mecamilamina e la (+)-metamfetamina (idroclore) sono state comprate dalla Sigma (Milano, Italia). La nicotina è stata tamponata (pH 6-7) con idrossido di sodio (NaOH 2.5 M).

Il WIN55212-2 è stato acquistato dalla Tocris (Bristol, UK). Il naloxone è stato comprato dalla RBI (Natick, MA, USA). Il rimonabant (SR141716A) è stato fornito come donazione dalla Sanofi-Aventis Recherche (Montpellier, France). Per la somministrazione in acuto, il WIN55212-2 e il rimonabant sono stati portati in soluzione con salina ed 1% Tween 80. Tutte le altre sostanze sono state diluite in salina.

2.6 Analisi statistica

I dati una volta raccolti ed elaborati (Spike2), sono stati sottoposti ad analisi statistica. A seconda dei casi sono stati utilizzati differenti test statistici. L'ANOVA a due vie per misure ripetute, al fine di analizzare le differenze tra 2 gruppi. L'ANOVA ad una via o il test t di Student, per misure ripetute e non, nei casi appropriati. I test di Bonferroni, Dunnett e Tuckey sono stati utilizzati come *post hoc*. In alcuni casi è stato adoperato anche il test del Chi quadro. L'analisi correlazionale è stata elaborata mediante il test di Pearson. Tutte le analisi in questione sono state sviluppate mediante il software Graphpad Prism (La Jolla, CA). Per quanto concerne le variazioni indotte dalle sostanze d'abuso i valori sono stati espressi in percentuale rispetto ad un valore basale (coincidente con il 100%). Il livello di significatività è stato fissato a $p < 0.05$.

Capitolo Terzo

3 RISULTATI

3.1 Caratterizzazione elettrofisiologica dei neuroni del RMTg e della loro azione inibitoria sulle cellule DAergiche della VTA

3.1.1 Caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni del RMTg

Attraverso le registrazioni nel RMTg sono stati selezionati ed isolati 41 neuroni presumibilmente GABAergici su 9 ratti anestetizzati con uretano.

L'elevata attività di scarica spontanea e la breve durata del potenziale d'azione bifasico delle cellule da noi registrate erano in linea con le caratteristiche dei neuroni registrati nel RMTg in ratti liberi di muoversi (Jhou *et al.*, 2009a). La forma del potenziale d'azione risultava essere a rapida insorgenza, negativa e di breve durata (vedi figura 3.1A) con media pari a 1.26 ± 0.04 ms (range 0.90 – 1.49 ms, n=41). La durata del potenziale d'azione comunque, risultava maggiore rispetto a quella riportata da Jhou e collaboratori, probabilmente a causa delle differenti condizioni (animali anestetizzati vs animali liberi di muoversi) e del sistema di amplificazione e filtraggio del segnale. In generale, i neuroni del RMTg scaricavano regolarmente ad una frequenza media di 15.5 ± 1.0 Hz (n=41). La maggiore o minore regolarità del pattern di scarica è stata quantificata dall'analisi del CV dell'intervallo tra potenziali (vedi materiali e metodi per dettagli sul CV). I neuroni da noi registrati risultavano scaricare in maniera alquanto regolare (vedi figura 3.1A) essendo il CV inferiore al 50% ($36.8 \pm 3.3\%$). A conferma di questo dato nella figura 3.1A (in basso) è riportato un esempio rappresentativo dell'istogramma dell'intervallo tra potenziali di un neurone del RMTg. L'istogramma mostra la tipica distribuzione unimodale dei potenziali d'azione di un neurone GABAergico.

3.1.2 Risposte dei neuroni del RMTg ad uno stimolo nocicettivo

Recenti risultati sperimentali (Jhou *et al.*, 2009a; Hong *et al.*, 2011), hanno dimostrato come stimoli avversivi inducano l'espressione della proteina Fos nei neuroni della RMTg proiettanti nella VTA oltre che evocare un aumento fasico dell'attività elettrica di un numero consistente di neuroni del RMTg registrati su ratti liberi di muoversi (Jhou *et al.*, 2009a) e primati (Hong *et al.*, 2011). Al fine di valutare il ruolo di questi neuroni nella codifica di uno stimolo avversivo, è stato applicato un breve (~ 2-4 secondi) pinzettamento meccanico alla zampa posteriore dell'animale, ipsilateralmente all'emisfero di registrazione. Dopo 2-3 minuti di registrazione dell'attività basale del neurone, lo stimolo nocicettivo è stato applicato per ~2-4 secondi e la risposta analizzata durante i 5 secondi successivi allo stimolo. Il 73.2% dei neuroni testati (30/41) hanno risposto con un aumento fasico della loro frequenza di scarica immediatamente dopo il pinzettamento (vedi figura 3.1B). Le altre cellule testate non hanno mostrato alcuna variazione significativa nella loro attività spontanea in concomitanza con lo stimolo nocicettivo. Nella figura 3.1B (basso) è riportata la risposta media della popolazione neuronale in questione che raggiunge un picco d'attività massimo 2 secondi dopo l'inizio dello stimolo ($237.3 \pm 40.9\%$ rispetto al basale; $n=12$; $F_{13,43}=6.7$; $p<0.0001$; ANOVA ad una via e test di Dunnett).

3.1.3 Risposte dei neuroni del RMTg alla stimolazione elettrica della LHb

Recenti evidenze anatomiche (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011; Goncalves *et al.*, 2011; Lavezzi *et al.*, 2011) hanno rivelato come le proiezioni eccitatorie della LHb innervino preferenzialmente i neuroni GABAergici del RMTg. Al fine di identificare, con il minor margine d'errore possibile, i neuroni del RMTg, è stato scelto di testare le loro risposte alla stimolazione elettrica della LHb. Dopo 2-3 minuti di registrazione dell'attività basale della cellula, è stata testata la risposta alla stimolazione elettrica della LHb (0.5 mA; 0.5 ms; 1.0 Hz). Per ogni neurone, è stato elaborato on-line il PSTH della risposta a 100 pulsus di stimolazione (pari a 100 s di registrazione). L'analisi per mezzo dell'ANOVA ad una via per misure ripetute, ha permesso di verificare se il numero di potenziali d'azione/bin (durata bin=1ms) nei 20 ms successivi alla stimolazione eccedesse in maniera significativa dai valori basali (20 ms antecedenti lo stimolo).

Il 46.3% (19/41) dei neuroni testati ha risposto alla stimolazione della Lhb ad una latenza d'insorgenza variabile tra i 2 e gli 8 ms (5.5 ± 0.3 ms). Per questi neuroni, la consistente risposta eccitatoria avveniva, come visibile dalla figura 3.1C, immediatamente dopo lo stimolo, in linea con un meccanismo d'azione monosinaptico. Cellule con risposte alla stimolazione della Lhb che eccedevano gli 8 ms di latenza non sono state considerate, in quanto potevano esibire una componente polisinfaptica. La maggior parte dei neuroni responsivi all'attivazione della Lhb (15/19) reagivano con un'eccitazione anche al test del pinzettamento.

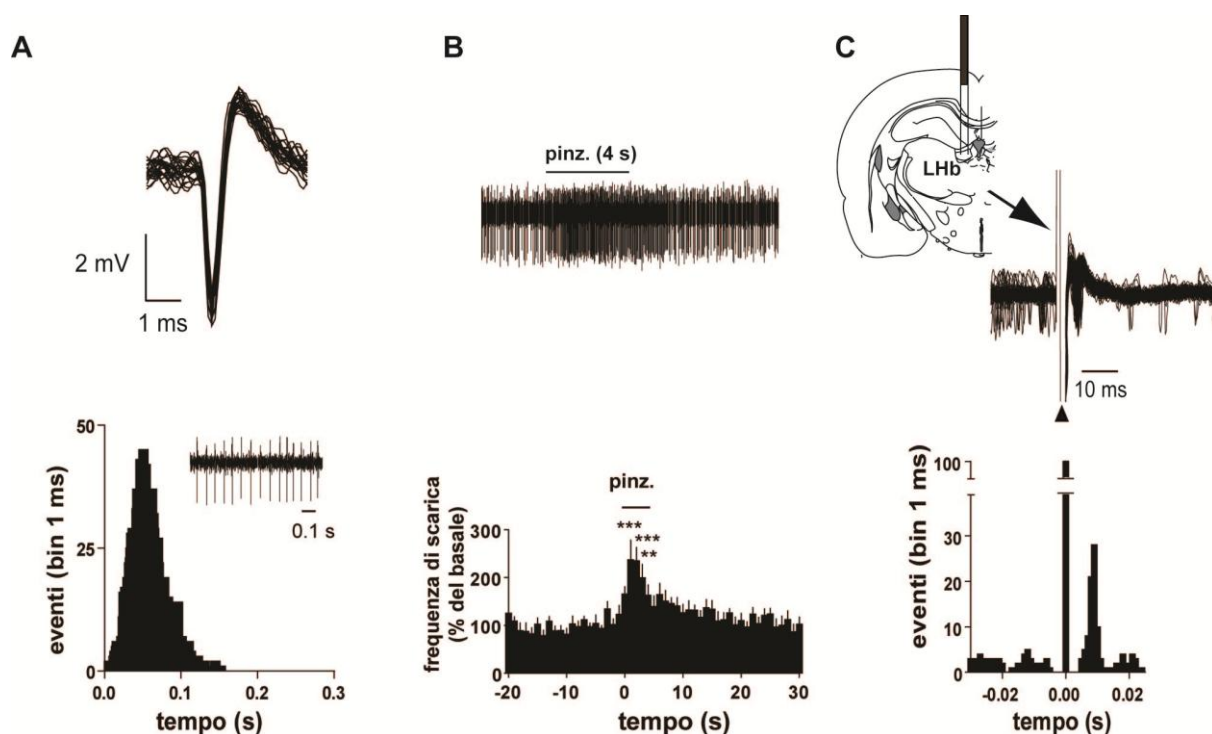


Figura 3.1 Caratterizzazione dei neuroni del RMTg. **(A)** La traccia in alto illustra i caratteristici potenziali d'azione sovrapposti di un neurone del RMTg registrato nell'animale anestetizzato. La forma del potenziale mostra una iniziale fase negativa a rapida insorgenza seguita da una fase positiva meno marcata. In basso, l'istogramma degli intervalli tra potenziali e il tracciato acquisito all'oscilloscopio (riquadro) della stessa cellula, rivelano il caratteristico andamento di scarica regolare ad alta frequenza. **(B)** I neuroni del RMTg esibiscono una risposta eccitatoria fasica con latenza breve ad uno stimolo nocicettivo. In alto è riportato un tracciato di una registrazione di un neurone del RMTg che aumenta la frequenza di scarica a seguito del pinzettamento della zampa dell'animale. In basso, l'istogramma di frequenza medio ($n=12$; 1 ms bin), conferma che la risposta avviene immediatamente in concomitanza con il pinzettamento. **(C)** In alto, le tracce sovrapposte acquisite dall'oscilloscopio digitale rivelano la risposta ortodromica di un neurone del RMTg alla stimolazione della Lhb. Sempre in alto è riportata la sezione coronale del sito di registrazione. Il PSTH della stessa cellula (in basso) evidenzia come la risposta avvenga immediatamente dopo lo stimolo. $***p < 0.0001$, $**p < 0.001$; ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett

3.1.4 Induzione dell'espressione della proteina Fos nel RMTg tramite pre-trattamento con metamfetamina

Il RMTg, essendo un'area di recente identificazione, non è stata ancora esattamente definita nella sua anatomia. Vi sono, infatti, dati contrastanti riguardo la reale estensione dell'area (Goncalves *et al.*, 2011), anche se vi è accordo completo riguardo l'alta espressione della proteina Fos da parte dei neuroni del RMTg a seguito di pre-trattamento con psicostimolanti (Kaufling *et al.*, 2010b). Sebbene nei nostri esperimenti la selezione delle cellule è stata messa in pratica in base a rigidi criteri elettrofisiologici, la corretta localizzazione del sito di registrazione necessitava ulteriori verifiche. Per questo, al fine di verificare se i siti di registrazione marcati con PsB, risultassero essere nella *core* del RMTg, in un gruppo distinto di animali abbiamo indotto sperimentalmente l'espressione di Fos nell'area. A tal fine, seguendo le procedure precedentemente descritte (Jhou *et al.*, 2009a), dopo aver svolto l'esperimento e marcato il sito di registrazione con PsB (vedi capitolo 2, Materiali e Metodi), abbiamo trattato l'animale con una singola dose di metamfetamina (10 mg/kg, i.p., 2 ore prima di sacrificare il ratto). La metamfetamina a queste dosi è in grado di indurre l'espressione della proteina Fos (Jhou *et al.*, 2009a). Come illustrato in figura 3.2, le cellule immunoreattive alla proteina Fos erano localizzate in alta concentrazione entro un'area circoscritta, coincidente con il RMTg, che risiede con pochi margini d'errore entro e al di sotto della decussazione cerebrale superiore (xscp). Come si può osservare dalla figura 3.2, i neuroni Fos-positivi si trovano in una zona simmetricamente opposta (nell'emisfero sinistro) al sito di registrazione marcato con PsB (nell'emisfero destro). Va di fatto specificato che la lesione iontoforetica, effettuata al fine di marcare il sito di registrazione con PsB (che nella figura appare rossa grazie ai filtri che settano la lunghezza d'onda a 594-617 nm), ha creato un danno al tessuto cerebrale circostante rendendo impossibile l'espressione di Fos. Per questo motivo l'immunoreattività è stata valutata, specularmente al sito di registrazione, nell'emisfero opposto.

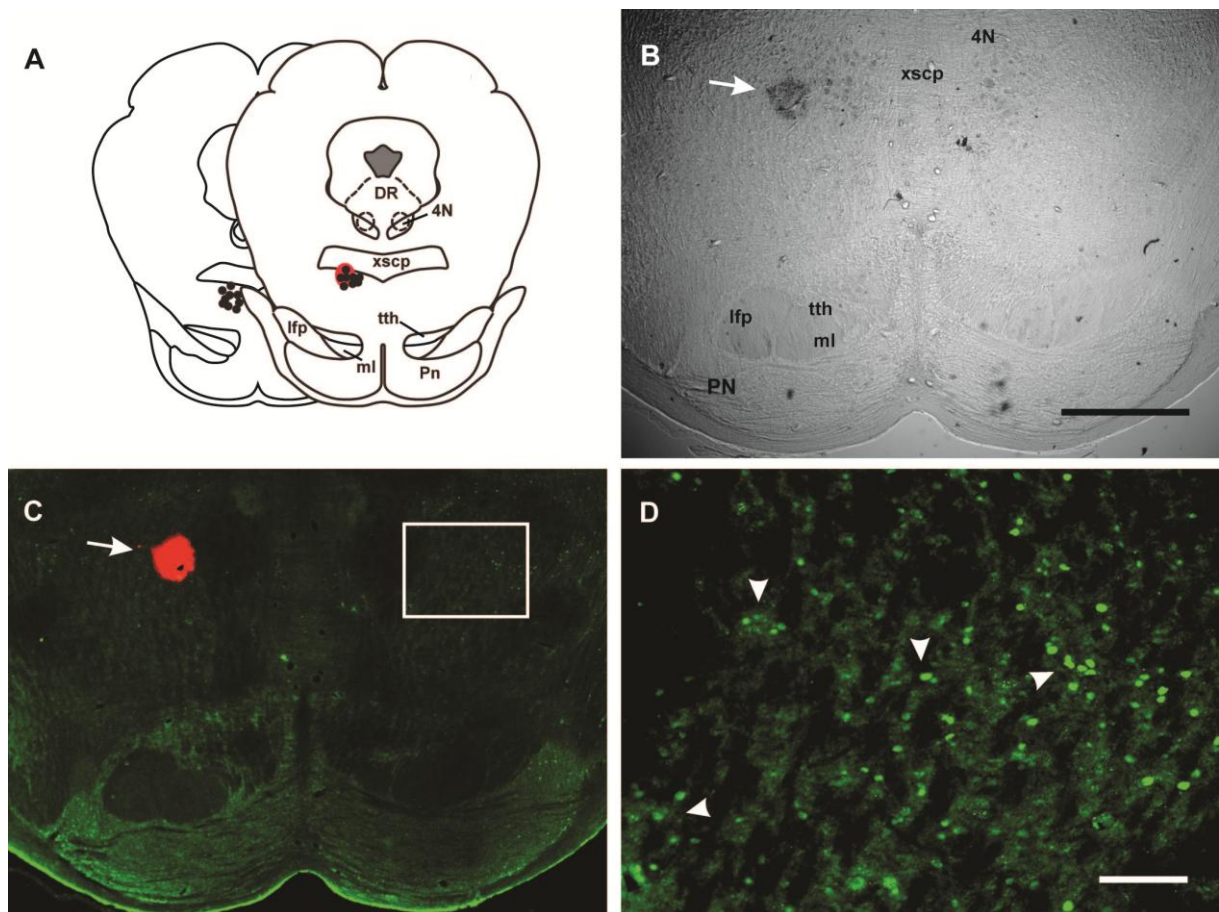


Figura 3.2 Il pre-trattamento con metamfetamina induce l'espressione della proteina Fos nel RMTg. (A) La figura, adattata dall'atlante Paxinos e Watson (2007), riporta le sezioni coronali che includono il RMTg (AP -7.2 e -7.4), con i siti di registrazione marcati con PsB (pallini neri). (B) La microfotografia di una sezione coronale mostra il sito di marcatura (freccia) ottenuto con PsB. (C) La figura rivela l'immunocolorezione di Fos (in verde) e il sito di registrazione (che appare rosso ad una lunghezza d'onda di 594-617 nm). (D) L'ingrandimento dell'area contrassegnata da una quadrato bianco in (C) mostra i nuclei positivi alla proteina Fos in RMTg (freccie). 4N, nucleo trocleare; DR, rafe dorsale; lfp, fascicolo longitudinale del ponte; ml, lemnisco mediale; Pn, nucleo pontino; tth, tratto trigemino talamico; xscp, decussazione del penduncolo cerebellare superiore; scala (barra) 1000 μ m in (B) e (C). 100 μ m in (D).

3.1.5 Effetti della stimolazione elettrica del RMTg sull'attività spontanea dei neuroni DAergici della VTA

Una serie crescente di studi anatomici hanno mostrato come i neuroni GABAergici del RMTg proiettino massicciamente al mesencefalo, formando sinapsi inibitorie sui neuroni DAergici della VTA e della SNc (Balcita-Pedicino et al., 2011). È stato provato che la maggior parte di questi neuroni ricevono selettivamente innervazioni dai neuroni glutamatergici della LHb (Goncalves et al., 2011). In questa sede, è utile evidenziare ancora una volta il rapporto tra la LHb e i neuroni DAergici della VTA. Infatti è stato dimostrato che la stimolazione elettrica della LHb inibisce circa il 97% dei neuroni DAergici nella VTA attraverso un meccanismo mediato dal recettore GABA-A (Ji & Shepard, 2007). Oggi sappiamo che lo stretto rapporto tra le due aree è mediato in gran parte dai neuroni GABAergici del RMTg (Barrot & Thome, 2011; Hong *et al.*, 2011).

Al fine di verificare il reale apporto inibitorio di questi neuroni alla VTA, abbiamo stimolato elettricamente l'area e registrato l'attività spontanea dei neuroni DAergici. L'attività elettrica spontanea di 60 neuroni DAergici è stata registrata nella VTA posteriore (6 ratti). I neuroni sono stati selezionati in base alle loro caratteristiche (vedi figura 3.3) e distinti in base al loro pattern (vedi figura 3.4B). Tutte le cellule registrate erano localizzate entro la porzione laterale dei nuclei pigmentati parabrachiali della VTA. Sebbene recenti lavori suggeriscano un alto livello di eterogeneità per quel che riguarda i neuroni della VTA (Yamaguchi *et al.*, 2007; Lammel *et al.*, 2008; Margolis *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2011), la regione di registrazione da noi scelta contiene un'alta densità di neuroni positivi alla tirosina idrossilasi (TH+) rispetto a regioni più mediali della VTA (Yamaguchi *et al.*, 2011). Dopo 2 minuti di registrazione dell'attività spontanea del singolo neurone, abbiamo testato la risposta alla stimolazione elettrica del RMTg (1 Hz, 0.5 ms, 0.5 mA) (figura 3.3). Una cellula veniva considerata inibita o eccitata, quando il numero di potenziali d'azione/bin (durata bin=1ms) nei 50 ms dopo lo stimolo era rispettivamente più basso o più alto (ANOVA ad una via per misure ripetute) del livello basale (calcolato 50 ms prima dello stimolo). La stimolazione del RMTg produceva un'inibizione temporanea e completa dell'attività spontanea del 53.3% dei neuroni DAergici testati (32 su 60). La figura 3.3B mostra un esempio di un PSTH rappresentativo della risposta inibitoria evocata dalla stimolazione del RMTg. A causa della vicinanza tra le

due aree, non è stato possibile calcolare e visualizzare la latenza di questa risposta poiché se dovessimo assumere, per questi assoni, una velocità di conduzione pari circa a 2m/s, tipica dei neuroni GABAergici ad alta frequenza di scarica (Jones *et al.*, 1999), la latenza di risposta varierebbe tra 0.6 e 1 ms e potrebbe quindi cadere a cavallo dell'artefatto dello stimolo. Il brevissimo intervallo, che intercorre tra lo stimolo e la risposta inibitoria, è in linea con le innervazioni dirette RMTg-VTA messe alla luce dagli studi anatomici (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011). La risposta inibitoria dei neuroni DA persisteva mediamente per 82.5 ± 6.12 ms (range, 28-250 ms; n=32) (vedi figura 3.3B). Delle 28 cellule DAergiche non inibite alla stimolazione del RMTg, 3 risultavano essere stimulate (5%) e le restanti 25 (42%) non rispondevano. Al fine di escludere possibili errori sperimentali dovuti al protocollo di stimolazione e alla vicinanza delle 2 aree in questione, in una serie separata di esperimenti (4 ratti) l'elettrodo stimolante è stato inserito in un area adiacente al RMTg. Esattamente 1 mm più laterale rispetto alle coordinate di riferimento del RMTg (-7.2 mm posteriormente rispetto al bregma; 1.8 mm dalla linea mediana; 6.5 mm ventralmente rispetto alla superficie corticale). Stimolando a queste coordinate, la risposta dei neuroni DAergici risultava essere notevolmente differente ($p < 0.0001$, test del Chi quadro). Infatti solo 1 cellula su 19 veniva inibita (5.2%), mentre il 52.6% risultavano stimulate (10/19) e le rimanenti 8 (su 19, 42.1%) non responsive.

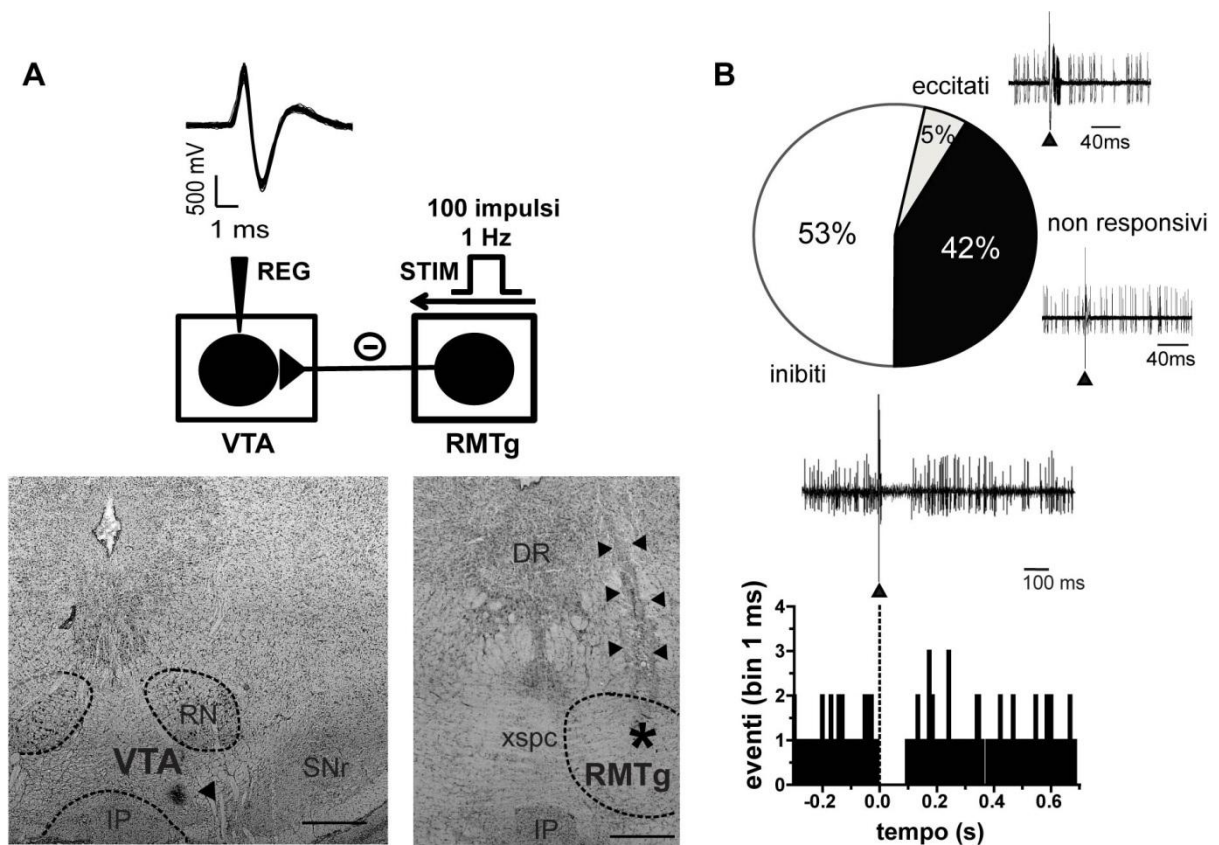


Figura 3.3 La stimolazione del RMTg induce un'inibizione nell'attività di scarica spontanea dei neuroni DAergici della VTA. **(A)** La traccia (in alto) mostra la tipica forma del potenziale d'azione di un neurone DAergico registrato nella VTA. Lo schema, in basso, riassume il protocollo di stimolazione seguito (1 Hz, 0.5ms, 0.5mA). La freccia nella sezione coronale in basso a sinistra mostra il sito di registrazione nella VTA posteriore, marcato con PsB. La porzione a destra riporta un esempio di una sezione coronale che include la traccia (vedi frecce) dell'elettrodo stimolante posizionato nel RMTg (asterisco). DR, rafe dorsale; IP, nucleo interpenduncolare; RN, nucleo rosso; SNr *substantia nigra pars reticulata*; xspc, decussazione del penduncolo cerebellare superiore. Barra=0.5 mm. **(B)** Percentuale delle differenti risposte dei neuroni DAergici alla stimolazione del RMTg. Le tracce acquisite dall'oscilloscopio digitale mostrano esempi di cellule DAergiche eccitate, inibite e non responsive alla stimolazione del RMTg. Il PSTH di una cellula DAergica inibita mostra che la stimolazione del RMTg produce una cessazione completa nell'attività di scarica che perdura per circa 90 ms. La risposta inibitoria avviene immediatamente dopo lo stimolo (freccia).

3.1.6 Correlazione tra l'attività di scarica spontanea dei neuroni DAergici e la durata dell'inibizione evocata dalla stimolazione del RMTg

Considerando l'alta variabilità registrata nella durata della risposta inibitoria dei singoli neuroni DAergici all'attivazione elettrica del RMTg (range, 28-250 ms), ci siamo chiesti se vi fosse una qualche relazione tra essa e l'attività di scarica spontanea delle cellule DAergiche. A tal fine, sono state analizzate 69 cellule DAergiche inibite dal RMTg. In linea con precedenti studi effettuati su ratti anestetizzati con uretano (Kelland *et al.*, 1990; Pistis *et al.*, 2004), i neuroni DAergici registrati scaricavano spontaneamente ad una frequenza media pari a 3.7 ± 0.2 Hz presentando un $18.5 \pm 2.8\%$ di potenziali in *bursts* (n=69). Il CV dell'intervallo tra potenziali risultava pari a $62.4 \pm 3.4\%$, indicando un andamento medio irregolare dei neuroni DAergici registrati nella VTA. Va sottolineato che le caratteristiche basilari delle cellule DAergiche inibite dal RMTg non si discostavano da quelle della popolazione generale dell'area in questione.

In effetti, come illustrato in figura 3.4A, i nostri dati hanno evidenziato una forte correlazione inversa tra la durata dell'inibizione e la frequenza di scarica spontanea dei neuroni DAergici ($F_{1,67}=66.71$; $r=-0.71$; $p<0.0001$, test di Pearson), ed una relazione sempre negativa, ma meno importante, con la percentuale di potenziali in *bursts* (dati non mostrati, $F_{1,67}=4.05$; $r=-0.24$; $p<0.05$, test di Pearson). I due istogrammi di frequenza rappresentativi ed i relativi PSTH (costruiti dopo 100 s di stimolazione) riportati in figura 3.4A (destra) mostrano due differenti esempi: una cellula ad alta e una a bassa frequenza di scarica spontanea. I neuroni con una bassa frequenza spontanea venivano inibiti per un tempo maggiore rispetto alle cellule che scaricavano spontaneamente ad alte frequenze. Nessuna correlazione è stata registrata per quel che concerne il CV % ($F_{1,67}=1.83$; $r=0.16$; $p>0.05$; test di Pearson).

Grazie alla costruzione di autocorelogrammi, per ogni cellula registrata siamo stati in grado di classificare i neuroni in base al loro pattern di scarica: regolari, irregolari o *bursting* (figura 3.4B). La distribuzione delle cellule in base al pattern ha confermato che la maggior parte dei neuroni mostravano un andamento irregolare (49.3%, 34/69), mentre i rimanenti sono stati classificati come regolari (14/69, 20.3%) e in *bursts* (30.4%, 21/69). Come evidenziato in figura 3.4B, le cellule classificate come irregolari esibivano una risposta inibitoria alla stimolazione del RMTg mediamente

più duratura (103.2 ± 9.4 ms) rispetto alle cellule regolari (61.21 ± 5.9 ms) e a quelle con un pattern puramente in *bursts* (63.0 ± 9.7 ms) ($F_{2,66}=6.48$; $p<0.01$, ANOVA ad una via e test di Tukey).

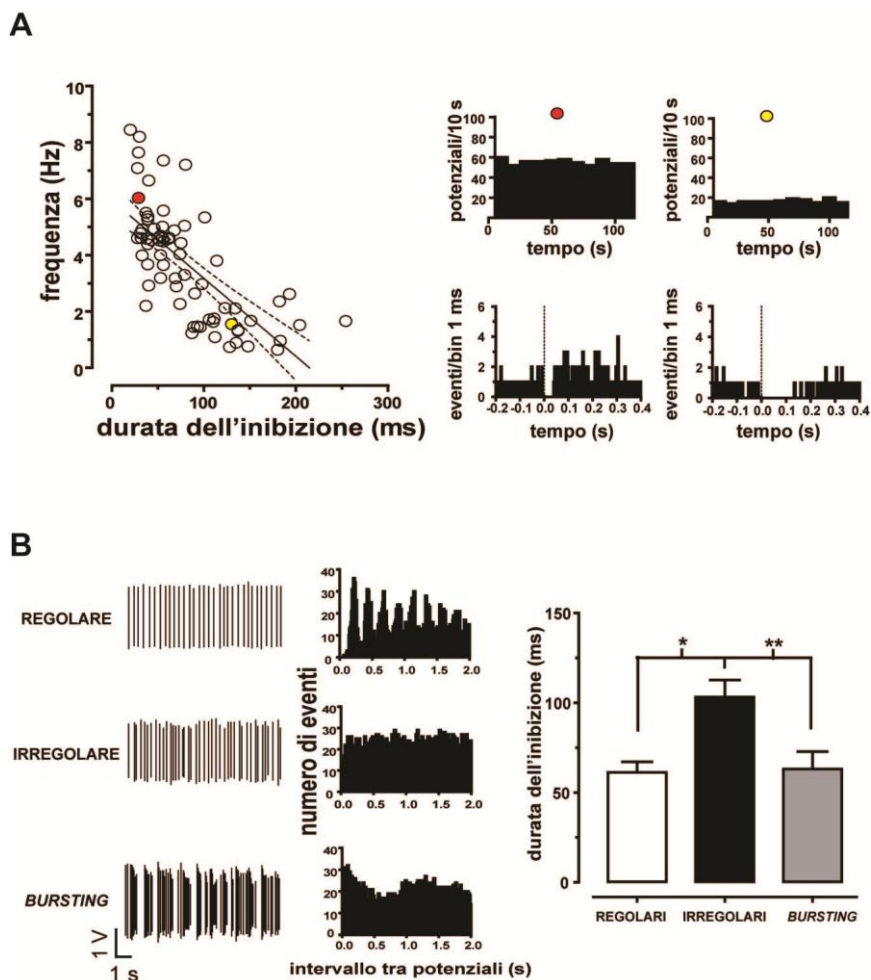


Figura 3.4 La durata dell'inibizione evocata dalla stimolazione del RMTg mostra una correlazione negativa con l'attività di scarica spontanea dei neuroni DAergici della VTA. **(A)** Il grafico a sinistra illustra la correlazione inversa tra la frequenza di scarica spontanea e la durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg (le linee tratteggiate rappresentano $\pm 95\%$ dell'intervallo di confidenza). Gli istogrammi di frequenza (in alto a destra) e i PSTH (in basso a destra) di due distinte cellule DAergiche, mostrano come i neuroni ad alta frequenza (pallino rosso) sono inibiti per un tempo inferiore rispetto ai neuroni che scaricano spontaneamente a basse frequenze (pallino giallo). **(B)** Gli autocorrelogrammi dei neuroni DAergici hanno permesso la classificazione del loro pattern di scarica spontaneo in regolare (in alto), irregolare (in mezzo) e *bursting* (in basso). L'istogramma a barre (destra) mostra come i neuroni irregolari esibiscano una risposta inibitoria più duratura rispetto ai neuroni classificati come regolari o *bursting* (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, ANOVA ad una via e test di Tukey).

3.1.7 Codifica dello stimolo nocicettivo: risposte al pinzettamento dei neuroni DAergici della VTA inibiti dal RMTg

Considerando, da una parte, il prominente ruolo dei neuroni del RMTg nella codifica dell'avversione, evidenziato dalla loro risposta eccitatoria ad uno stimolo nocicettivo (Jhou *et al.*, 2009a) e dall'altra, la risposta eterogenea dei neuroni della VTA ai medesimi stimoli (Brischoux *et al.*, 2009) ci siamo chiesti se quest'ultima potesse dipendere dalle differenti innervazioni delle cellule DAergiche. Per questo motivo, abbiamo diviso le cellule in base alla loro risposta alla stimolazione del RMTg, confrontando quelle inibite e quelle non responsive. Seguendo un protocollo simile a quello descritto precedentemente nel RMTg (vedi al punto 3.1.2), un breve (2 s) pinzettamento è stato applicato alla zampa posteriore dell'animale. In totale, è stata registrata la risposta di 20 neuroni, 12 dei quali inibiti dal RMTg e 8 insensibili alla stimolazione dell'area inibitoria in questione. Per mettere in luce rapidi cambiamenti nella frequenza di scarica abbiamo scelto di utilizzare istogrammi di frequenza con bin pari a 0.5 s (figura 3.5). La frequenza di scarica è stata analizzata nei 5 secondi successivi all'inizio del pinzettamento (10 bins) e comparata con la media del periodo precedente il pinzettamento. Come dimostrano gli istogrammi di frequenza medi in figura 3.5, le due popolazioni da noi selezionate mostravano una differente risposta al pinzettamento, risultando (sempre a livello medio) solo le cellule DAergiche inibite dal RMTg a loro volta anche inibite in maniera netta dallo stimolo nocicettivo (frequenza di scarica media post-pinzettamento: $78.4 \pm 5.6\%$ rispetto al basale, $n=12$, $F_{10,110}=2.06$, $p=0.03$; ANOVA ad una via e test di Dunnett). I neuroni che non hanno risposto alla stimolazione del RMTg, hanno mostrato una risposta non significativa al pinzettamento (frequenza di scarica media post-pinzettamento: $85.2 \pm 5.2\%$ rispetto al basale, $n=8$, $F_{10,70}=0.80$, $p=0.58$; ANOVA ad una via e test di Dunnett). Sempre osservando l'istogramma di frequenza relativo alle cellule inibite dal RMTg (figura 3.5A) possiamo notare come il decremento di frequenza avvenga immediatamente dopo il pinzettamento prolungandosi per tutti e due i secondi dell'applicazione dello stesso, e tornando ad una situazione basale dopo il rilascio. I neuroni DAergici non responsivi mostravano, invece, una leggera deflessione della frequenza di scarica dopo il pinzettamento (figura 3.5B).

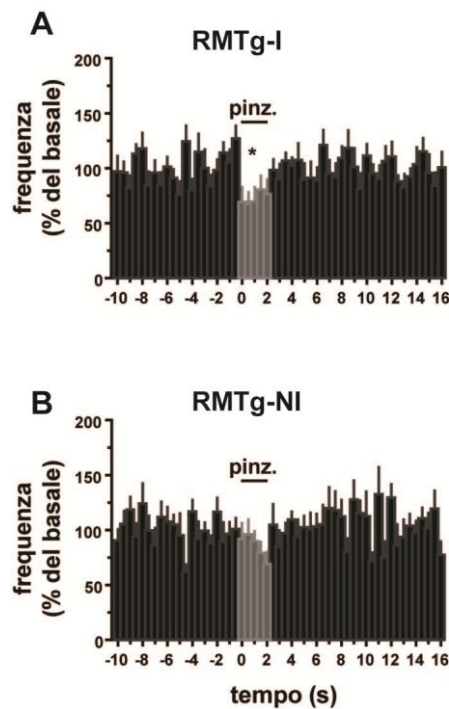


Figura 3.5 La popolazione dei neuroni DAergici inibiti dal RMTg, mostra un significativo decremento della frequenza di scarica a seguito di uno stimolo nocicettivo. **(A)** L'istogramma di frequenza medio (bin 0.5 ms) rappresentativo della popolazione dei neuroni DAergici (n=12) inibiti dal RMTg (RMTg-I) illustra chiaramente come questi siano significativamente inibiti dal pinzettamento della zampa dell'animale **(B)** In contrasto, le cellule DAergiche (n=8) non inibite dal RMTg (RMTg-NI) non mostrano alcuna variazione significativa nella frequenza di scarica successiva allo stimolo avversivo. (* $p < 0.05$; ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett).

3.2 Effetto delle sostanze d'abuso sull'attività neuronale del RMTg e sulle sue sinapsi inibitorie nei neuroni DAergici della VTA

I neuroni GABAergici del RMTg sono capaci di codificare in maniera opposta stimoli gratificanti e avversivi. La loro frequenza di scarica decresce quando sono esposti ad uno stimolo che predice una ricompensa, e aumenta quando uno stimolo predice una punizione (Jhou *et al.*, 2009a). Partendo da questo dato, ci siamo chiesti se, ed eventualmente come, i neuroni di questa particolare area del mesencefalo, con influenza diretta sui circuiti adibiti alla codifica della gratificazione (VTA), potessero rispondere all'esposizione a sostanze d'abuso. In un secondo momento, ci siamo focalizzati sull'analisi dell'effetto di queste sostanze sull'inibizione dei neuroni DAergici della VTA indotta dall'attivazione elettrica del RMTg. A tal fine, sono stati testati gli effetti di quattro differenti composti (la morfina, l'agonista sintetico dei recettori di tipo 1 per i cannabinoidi WIN55212-2, la cocaina e la nicotina) sull'attività spontanea dei neuroni del RMTg e sull'inibizione indotta dalla loro stimolazione

elettrica sui neuroni DAergici della VTA. Tutti i neuroni del RMTg sono stati selezionati sia per la loro risposta alla stimolazione della LHb, sia per la loro eccitazione al pinzettamento. Per quanto concerne gli esperimenti nella VTA, solo le cellule inibite dalla stimolazione elettrica del RMTg sono state scelte per questo studio. A livello dei basali, non sono state registrate differenze nelle diverse sezioni sperimentali, sia per quanto riguarda la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg ($p > 0.05$; $F_{6,32} = 8.43$; ANOVA ad una via e test di Tukey), sia per quel che concerne la durata dell'inibizione dei neuroni DAergici evocata dalla stimolazione del RMTg ($p > 0.05$; $F_{7,42} = 12.64$; ANOVA ad una via e test di Tukey). Sono incluse solo cellule per le quali è stata confermata, tramite prove istologiche a posteriori, la corretta localizzazione in area.

3.2.1 La morfina decresce la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg e riduce il loro potere inibitorio sui neuroni DAergici della VTA

Uno dei criteri principali per la corretta identificazione del RMTg è la sua caratteristica immunoreattività al recettore μ per gli oppioidi (Jhou *et al.*, 2009b). Recentemente, è stata confermata un'alta presenza di questi recettori sui corpi cellulari e sulle terminazioni dei neuroni GABAergici del RMTg (Jalabert *et al.*, 2011). In accordo con questo dato, in un protocollo di auto somministrazione intracerebrale, i ratti sono propensi a somministrarsi l'agonista per i recettori μ , endomorfina 1, direttamente nel RMTg in maniera più robusta rispetto ad aree adiacenti (Jhou *et al.*, 2009c). Partendo da queste evidenze ci siamo proposti in un primo momento di verificare se le proprietà elettriche dei neuroni presunti GABAergici del RMTg fossero influenzate dalla somministrazione in acuto di morfina (4mg/kg iv).

A tal fine, sono stati selezionati 7 neuroni del RMTg eccitati dal pinzettamento e dalla stimolazione della LHb. La somministrazione endovenosa dell'agonista per i recettori μ oppioidi (morfina), ha inibito fortemente la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg ($49.7 \pm 8.6\%$ rispetto al livello basale; $n=7$; $F_{5,30}=13.02$, $p < 0.0001$; ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett) (figura 3.6A,C). Questo effetto implicava un'attivazione del recettore μ per gli oppioidi, dal momento che la somministrazione dell'antagonista naloxone (0.1 mg/kg i.v), 4 minuti prima dell'iniezione di morfina, che non ha mostrato nessun effetto significativo per sé, è

stata in grado di bloccare l'inibizione indotta da morfina, sulla frequenza di scarica dei neuroni del RMTg ($103.5 \pm 7.2\%$ rispetto al livello basale; $n=4$; $F_{1,45}=14.55$; $p<0.01$ vs morfina; ANOVA a due vie e test di Bonferroni) (figura 3.6B,C). La morfina, nonostante il suo effetto sulla frequenza di scarica dei neuroni virtualmente contenenti GABA del RMTg, non incideva sulla regolarità di scarica degli stessi (CV basale: $45.1 \pm 9.8\%$; CV morfina: $46.3 \pm 7.2\%$; $p>0.05$, test t di Student).

Considerando l'effetto eccitatorio della morfina sulla frequenza di scarica dei neuroni DAergici, ci siamo chiesti in un secondo momento, quale ruolo potrebbero avere le sinapsi inibitorie provenienti dal RMTg nella mediazione di quest'effetto. L'ipotesi largamente accettata infatti attribuisce l'eccitazione DAergica come risultato di un'azione disinibitoria della morfina, effettuata inibendo gli interneuroni GABAergici della VTA (Johnson & North, 1992a). In accordo con quest'ipotesi, la morfina è in grado di ridurre, *in vivo*, la frequenza di scarica dei neuroni GABAergici della VTA (Steffensen *et al.*, 2006), in maniera simile ai neuroni del RMTg, come appena riportato. Considerando che le afferenze del RMTg in VTA esercitano un tono inibitorio sulle cellule DAergiche (Ikemoto, 2010), abbiamo scelto di verificare se la morfina avesse un effetto su queste sinapsi. A tal fine abbiamo studiato l'effetto del farmaco sull'inibizione evocata dall'attivazione elettrica del RMTg (0.5 mA, 0.5 ms, 1 Hz) sui neuroni DAergici della VTA. La somministrazione di morfina (4.0 mg/kg iv) era preceduta (200 s) o da veicolo (1 ml/kg iv, $n=7$) o dall'antagonista μ oppioide, naloxone (0.1 mg/kg iv, $n=6$). La morfina quando è stata iniettata dopo il veicolo, riduceva notevolmente la durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg sui neuroni DAergici della VTA ($54.0 \pm 10.7\%$ del basale; $n=7$; $F_{5,30}=12.39$; $p<0.0001$; ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett) (figura 3.6D,E). Quando, invece, alla morfina veniva fatta precedere l'iniezione di naloxone, l'effetto inibitorio è stato completamente bloccato ($100.7 \pm 5.4\%$ rispetto al livello basale; $n=6$; $F_{1,55}=13.6$; $p=0.0036$ vs morfina; ANOVA a due vie e test di Bonferroni) (vedi figura 3.6E). Anche in questo caso, come messo in evidenza dal grafico E nella figura 3.6, non si sono riscontrate differenze tra veicolo e naloxone. In una serie separata di esperimenti ($n=5$), la somministrazione di naloxone, 5 minuti dopo quella di morfina, era capace di riportare la durata dell'inibizione a livello basale (Figura 3.6D,F). Per questi esperimenti il confronto è avvenuto tra il basale normalizzato (100%), l'effetto della morfina e quello del naloxone (entrambi a 300 s dall'iniezione delle sostanze)

ed ha mostrato una differenza significativa ($n=5$, $F_{2,8}=13.56.47$, $p=0.0027$, ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Tukey).

Questi risultati, rivelano che la morfina agisce su questa particolare porzione del circuito della gratificazione sia riducendo la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg, sia deprimendo la loro azione inibitoria sulle cellule DAergiche della VTA, attraverso l'attivazione del recettore μ per gli oppioidi.

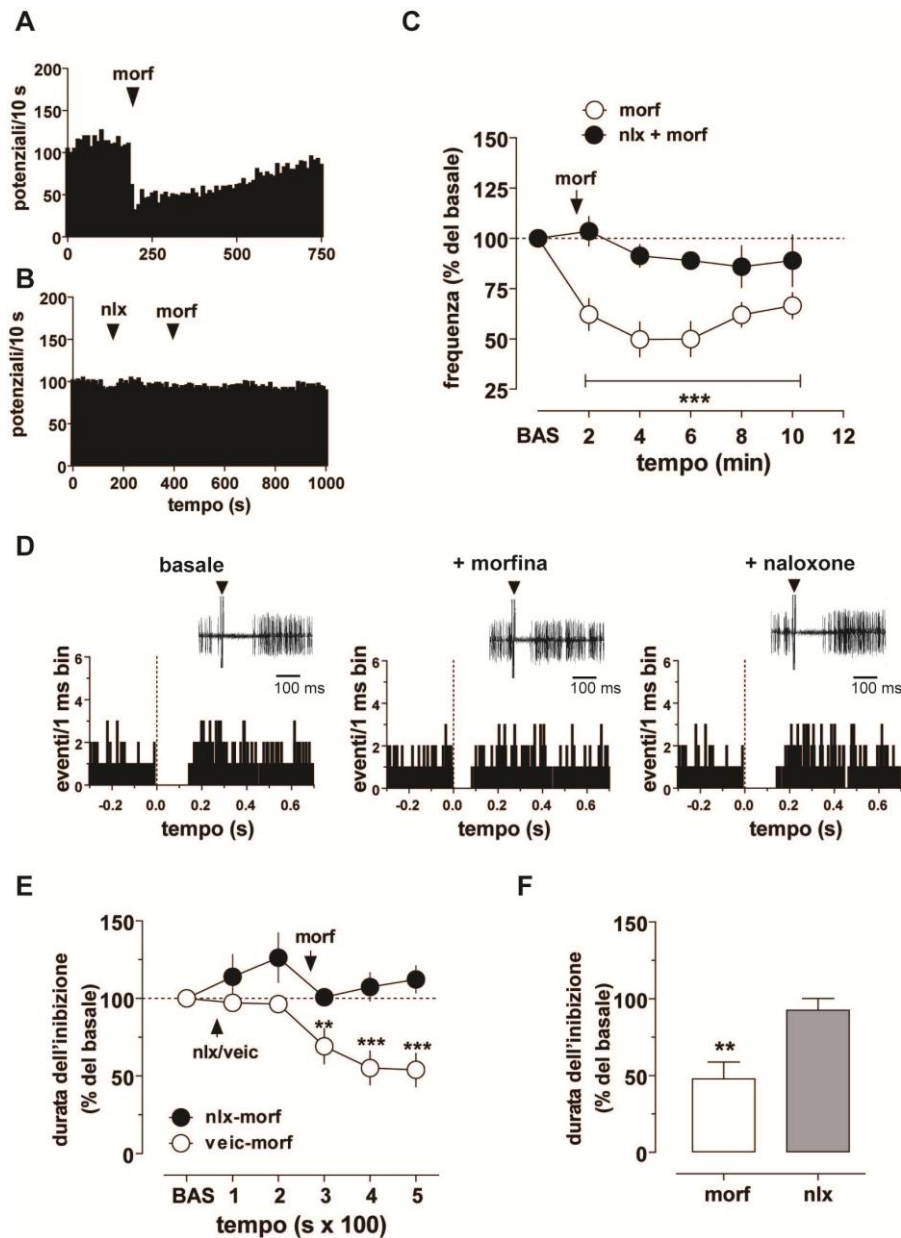


Figura 3.6 Gli effetti della morfina sui neuroni del RMTg e sull'inibizione indotta dalla loro stimolazione nelle cellule DAergiche della VTA. **(A)** L'istogramma di frequenza di un neurone del RMTg evidenzia la risposta inibitoria a seguito di somministrazione di morfina (morf, 4.0 mg/kg iv). **(B)** L'istogramma di frequenza mostra come il naloxone (nlx, 0.1 mg/kg iv), iniettato 4 minuti prima della morfina, sia in grado di prevenire completamente l'effetto inibitorio della stessa su un neurone del RMTg. **(C)** Il grafico illustra la *time-course* degli effetti della morfina sulla frequenza media di scarica dei neuroni del RMTg con, o senza (n=7), pre-trattamento con naloxone (n=4). **(D)** I PSTH e le relative tracce sovrapposte acquisite all'oscilloscopio (riquadro) rappresentative di una cellula DAergica, mostrano la risposta inibitoria della stessa in tre differenti condizioni: a livello basale (sinistra), a seguito di iniezione di morfina (nel mezzo) e successivamente all'iniezione di naloxone (destra). Come visibile dal PSTH la morfina riduce la durata dell'inibizione e il naloxone iniettato dopo la morfina ristabilisce l'inibizione a livello basale. **(E)** Il grafico riproduce la *time-course* dell'effetto della morfina sulla durata dell'inibizione indotta dall'attivazione del RMTg sui neuroni DAergici della VTA, in presenza o non (n=7) dell'antagonista μ -oppiode naloxone. L'effetto della morfina è completamente bloccato dal pre-trattamento con naloxone (n=6). **(F)** Il grafico a barre mostra la riduzione esercitata dalla morfina sulla durata dell'inibizione indotta dal RMTg e la capacità del naloxone (iniettato 5 m dopo morfina) di riportare la stessa ai valori basali (n=5). I risultati sono riportati come medie e SEM (barre verticali) espressi come percentuale del basale. Le frecce rappresentano il tempo delle iniezioni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs basale; ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett.

3.2.2 L'agonista sintetico dei recettori CB1, WIN55212,2 decresce la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg e sopprime la loro azione inibitoria sui neuroni DAergici della VTA

I recettori CB1 sono abbondantemente distribuiti in diverse regioni cerebrali, principalmente sui terminali presinaptici (Freund *et al.*, 2003), modulando l'attività inibitoria ed eccitatoria, in quelle popolazioni neuronali atte alla codifica di stimoli sia appetitivi che avversivi (Moreira & Lutz, 2008). In questa sede, è utile sottolineare l'effetto che i composti CB1 hanno sui neuroni DAergici della VTA. Questi ultimi sono eccitati dall'esposizione a cannabinoidi probabilmente tramite meccanismi indiretti che potrebbero coinvolgere i neuroni GABAergici (French, 1997; Gessa *et al.*, 1998). Partendo da queste evidenze, ci siamo proposti di indagare l'effetto dell'agonista CB1 WIN55212-2 (WIN) sia sulla frequenza di scarica dei neuroni GABAergici del RMTg, sia sull'inibizione imposta dalla loro attivazione elettrica sulle cellule DAergiche della VTA.

A tale scopo sono stati selezionati 7 neuroni del RMTg, identificati come riceventi afferenze dalla LHb ed eccitati al pinzettamento. In maniera del tutto simile alla morfina, come visibile dalla figura 3.7 (A,C), la somministrazione di WIN (0.5 mg/kg iv) induceva una forte e persistente inibizione dell'attività di scarica dei neuroni del RMTg ($46.9 \pm 6.7\%$ del basale; $n=7$; $F_{5,30}=19.44$; $p<0.0001$; ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett) (figura 3.7 A,C). Il CV delle cellule, in risposta alla somministrazione di WIN, invece, restava invariato (CV basale: $31.0 \pm 5\%$; CV WIN: $38.5 \pm 3.6\%$; $p>0.05$; test t di Student). Per chiarire il reale coinvolgimento del recettore CB1 sull'effetto inibitorio di WIN in questi neuroni abbiamo deciso di somministrare l'antagonista CB1 SR141716A (rimonabant, 0.5 mg/kg iv), 4 minuti prima di WIN ($n=4$). L'iniezione in acuto di rimonabant, come mostra la figura 3.7B, non aveva effetto per se, ma era in grado di prevenire l'inibizione della frequenza di scarica delle cellule del RMTg indotta dall'agonista CB1 WIN ($102.6 \pm 3.1\%$ del basale; $n=4$; $F_{1,45}=16.8$; $p<0.01$; ANOVA a due vie e test di Bonferroni).

L'inibizione dell'attività dei neuroni GABAergici del RMTg ad opera di WIN ci ha portato ad indagare l'eventuale risvolto funzionale sulla sinapsi inibitoria RMTg-VTA. Ovvero, ci siamo chiesti se la connessione inibitoria RMTg-VTA potesse essere coinvolta nell'effetto eccitatorio dei cannabinoidi sul neurone DAergico della VTA. A tal fine, sono stati selezionati neuroni DAergici della VTA inibiti dall'attivazione

elettrica del RMTg. Dopo 2 minuti di registrazione dell'attività spontanea della cellula, abbiamo acceso lo stimolatore e registrato 100 secondi di risposta inibitoria basale. La somministrazione di WIN (0.5 mg/kg iv) era preceduta (200 s) dall'iniezione di rimonabant (n=6, 0.5 mg/kg iv) o di veicolo (n=7, 1 ml/kg iv). Come mostrato nei pannelli D e F della figura 3.7, WIN iniettato dopo il veicolo sopprimeva quasi completamente l'inibizione indotta da stimolazione del RMTg sul neurone DAergico della VTA ($29.7 \pm 12.4\%$ rispetto al basale; n=7; $F_{5,30}=26.08$; $p<0.0001$; ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett). Quest'effetto, si manifestava immediatamente dopo la somministrazione (entro i primi 100 s), persisteva per circa 20 minuti e richiedeva l'attivazione del recettore CB1. Infatti, la somministrazione di rimonabant, che, anche in questo caso, non ha mostrato effetti per sé, è stata in grado di prevenire l'effetto di WIN ($97.2 \pm 4.6\%$ rispetto al basale; n=6; $F_{1,55}=17.42$; $p=0,0016$ vs WIN; ANOVA a due vie per misure ripetute e test di Bonferroni) (figura 3.7 F). In alcuni esperimenti (n=5), abbiamo iniettato rimonabant 5 minuti dopo WIN, verificando così la capacità dell'antagonista non solo di prevenire, ma anche di bloccare l'effetto di WIN e ripristinare le condizioni basali (n=5, $F_{2,8}=16.32$, $p=0.0015$, ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Tukey) (vedi figura 3.7 D,F). In particolare, l'analisi *post hoc* ha dimostrato che l'effetto di rimonabant differisce significativamente dall'effetto di WIN ($p<0.01$, test di Tukey) senza discostarsi però dall'inibizione basale pre-WIN ($p>0.05$, test di Tukey).

In un'ottica d'insieme, questi dati mettono in luce l'azione dei cannabinoidi sia a livello dell'attività di scarica dei neuroni del RMTg, sia nella modulazione del potere inibitorio di questi ultimi sulle cellule DAergiche della VTA.

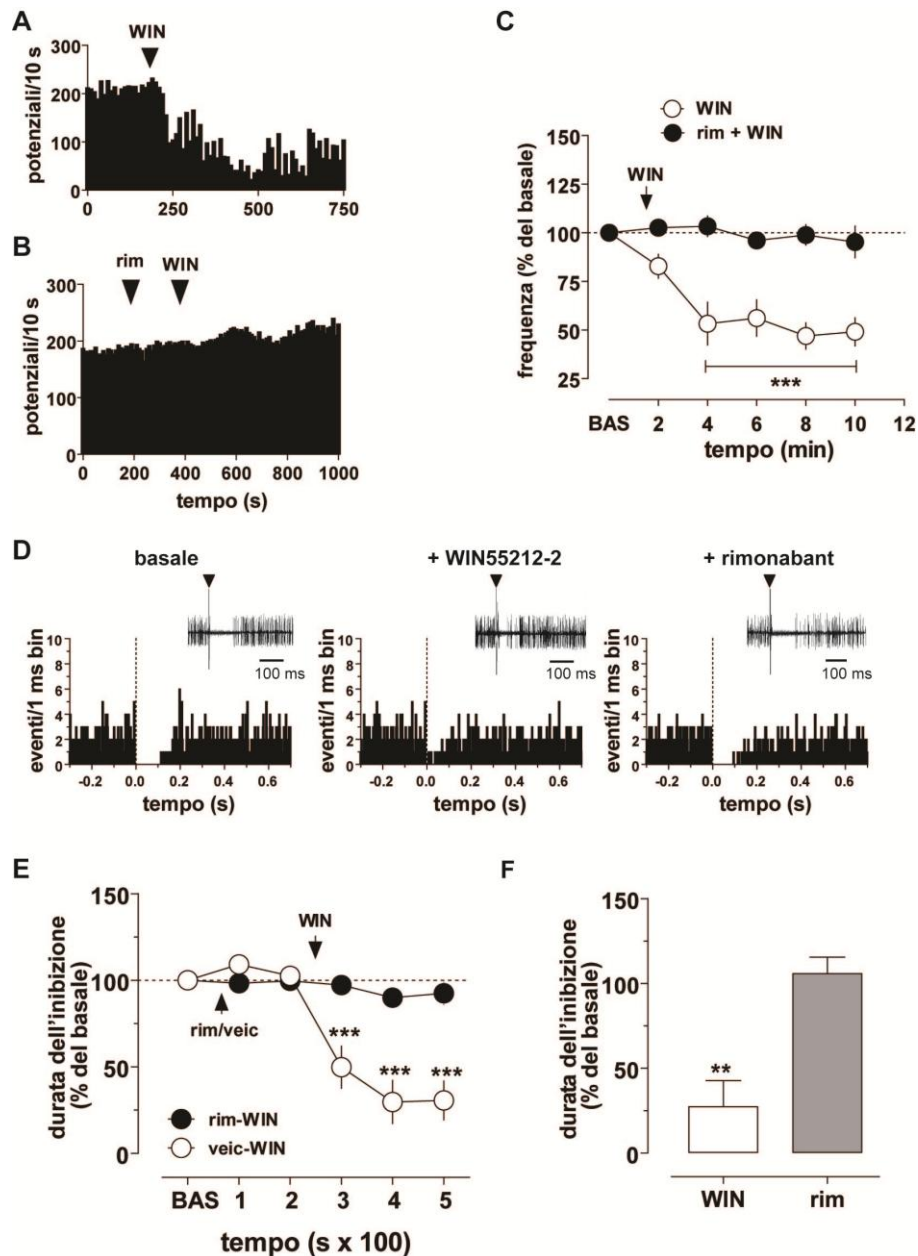


Figura 3.7 Gli effetti esercitati dall'agonista CB1 WIN55212-2 sull'attività di scarica dei neuroni del RMTg e sul loro input inibitorio sulle cellule DAergiche della VTA. **(A)** L'istogramma di frequenza riporta l'esempio della risposta inibitoria di un neurone del RMTg alla somministrazione di WIN (0.5 mg/kg iv). **(B)** Il rimonabant (rim, 0.5 mg/kg iv, somministrato 4 m prima del WIN) è in grado, come dimostra l'istogramma di frequenza, di bloccare l'effetto inibitorio dell'agonista CB1 sull'attività di scarica della cellula del RMTg. **(C)** Il grafico mostra la *time-course* dell'effetto di WIN in presenza, o non (n=7), dell'antagonista CB1 rimonabant (n=4). **(D)** Le tracce acquisite all'oscilloscopio (riquadri) e i relativi PSTH di un neurone DAergico inibito dalla stimolazione elettrica del RMTg indicano come la somministrazione di WIN sia in grado di ridurre drasticamente la durata dell'inibizione e come la successiva somministrazione di rimonabant sia capace di riportarla a livelli basali. **(E)** La *time-course* degli effetti di WIN in presenza di pre-trattamento con veicolo (n=7) o di rimonabant (n=6) sulla durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione elettrica del RMTg. L'antagonista CB1 somministrato 200 s prima di WIN è in grado di bloccare completamente l'azione inibitoria dello stesso. **(F)** Il grafico a barre riassume l'effetto di WIN e la capacità dell'antagonista CB1, quando somministrato 5 m dopo WIN (n=5) di riportare la durata dell'inibizione alle condizioni basali. I risultati sono medie con le barre verticali a rappresentare il SEM. I valori sono espressi in percentuale. Le frecce segnalano il momento dell'iniezione. **p<0.001, ***p<0.0001; ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett.

3.2.3 La cocaina riduce la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg senza effetto modulatorio sulle sinapsi RMTg-VTA

Differenti studi (Perrotti *et al.*, 2005; Colussi-Mas *et al.*, 2007; Geisler *et al.*, 2008; Jhou *et al.*, 2009a; Kaufling *et al.*, 2010a; Kaufling *et al.*, 2010b), hanno evidenziato una forte attivazione della proteina Fos, c-Fos, Fos B e Δ FosB in seguito ad esposizione sia acuta che cronica a sostanze psicostimolanti nei neuroni GABAergici del RMTg. Questo dato suggerisce un potenziale ruolo dell'area in questione, nella modulazione degli effetti di questa categoria di sostanze. Partendo da tali evidenze, ci siamo posti come obiettivo di indagare l'effetto della somministrazione in acuto di cocaina sia sulla frequenza di scarica dei neuroni del RMTg, sia sulla risposta inibitoria derivante dall'attivazione di quest'ultimo, sui neuroni DAergici della VTA.

A tal fine, sono state selezionate 7 cellule del RMTg positive ai due test di identificazione da noi scelti: la risposta eccitatoria al pinzettamento della zampa e alla stimolazione elettrica della LHB. In questi neuroni, come visibile dai pannelli A e B della figura 3.8, l'iniezione di cocaina (1 mg/kg iv) ha provocato una leggera e transitoria, ancorché significativa, inibizione della loro frequenza di scarica ($82.1 \pm 6.0\%$ del basale; $n=7$; $F_{5,30}=2.58$; $p<0.05$; ANOVA ad una via e test di Dunnett). Come ben visibile dal grafico B, l'effetto inibitorio della cocaina sulla frequenza di questi neuroni risultava molto meno marcato rispetto alle precedenti sostanze (morfina e WIN). Anche per quel che riguarda la cocaina, non sono state registrate differenze significative nella regolarità del pattern prima e dopo l'iniezione (CV basale: $30.9 \pm 4.6\%$; CV cocaina: $34.3 \pm 6.2\%$; $p>0.05$, test t di Student).

Al fine di verificare se la somministrazione in acuto di cocaina potesse avere ripercussioni anche a livello sinaptico, abbiamo selezionato 7 neuroni DAergici inibiti dalla stimolazione del RMTg. In questo caso contrariamente a quanto registrato per morfina e WIN, l'iniezione in acuto di cocaina (1mg/kg iv) non aveva alcun effetto sulla durata dell'inibizione del neurone DAergico, evocata dall'attivazione elettrica del RMTg ($101.7 \pm 12.4\%$ rispetto al basale; $n=7$, $F_{5,30}=0.6889$, $p=0.6356$, ANOVA ad una via per misure ripetute).

Riassumendo i risultati ottenuti con l'iniezione acuta di cocaina, è possibile evidenziare come a discapito di un effetto della sostanza a livello della frequenza di

scarica delle cellule del RMTg non vi siano dirette ripercussioni sulla loro influenza inibitoria nella VTA.

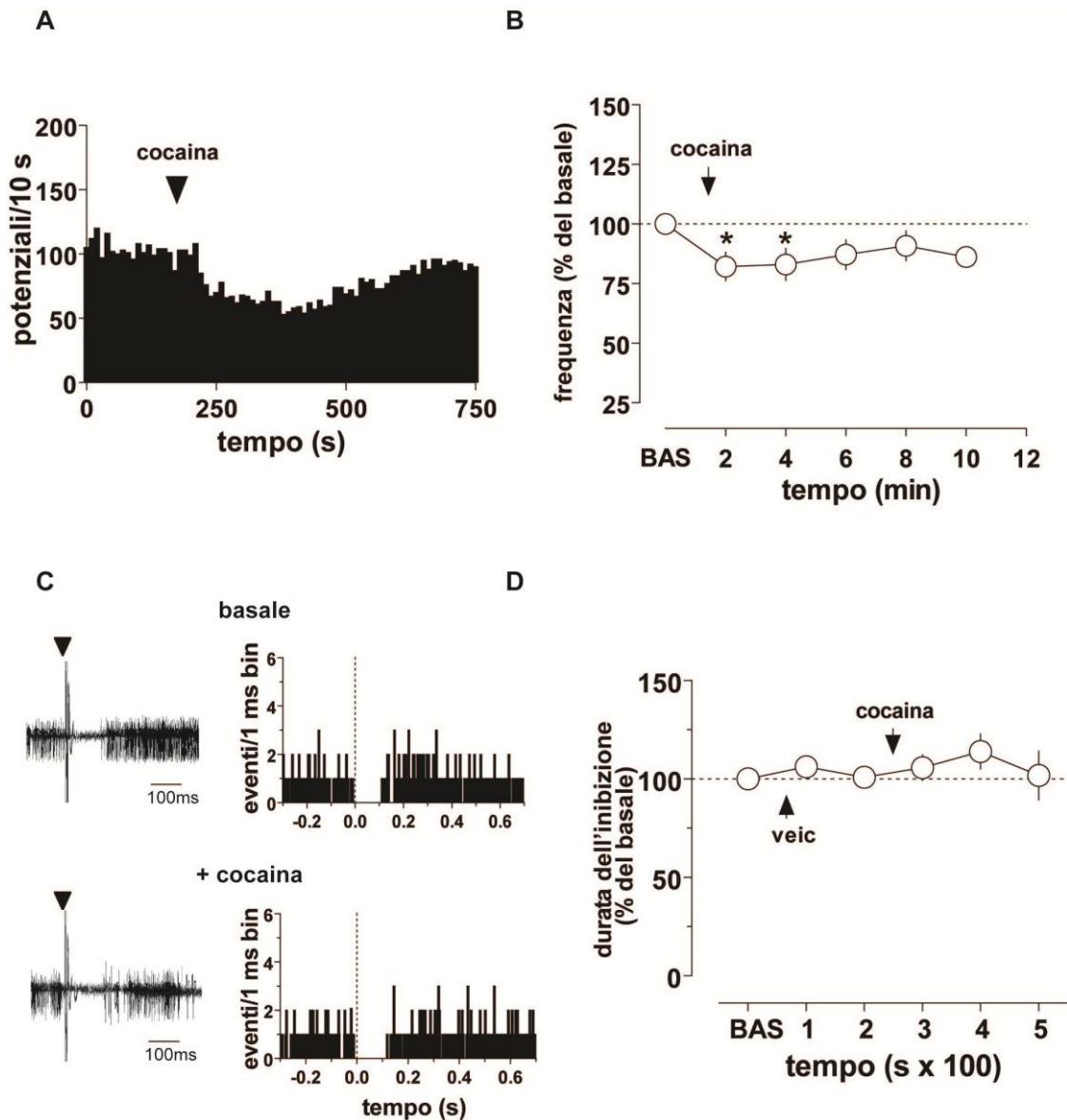


Figura 3.8 L'azione della cocaina sulla frequenza di scarica dei neuroni del RMTg e sulle loro sinapsi inibitorie con i neuroni DAergici della VTA. **(A)** L'istogramma di frequenza rappresentativo di un neurone del RMTg inibito dall'iniezione di cocaina (1 mg/kg iv). **(B)** Il grafico mostra l'azione temporale dell'effetto di cocaina su 7 neuroni presumibilmente GABAergici del RMTg. In questo caso l'effetto inibitorio risulta meno marcato rispetto a quello ottenuto con WIN e morfina. **(C)** L'esempio riporta le tracce acquisite all'oscilloscopio (sinistra) e i relativi PSTH (destra) di un neurone DAergico inibito dal RMTg prima e dopo l'iniezione di cocaina. Come ben visibile dai PSTH la cocaina non produce variazioni nella durata dell'inibizione. **(D)** La *time-course* dell'effetto di cocaina sulla durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg sui neuroni DAergici (n=7) conferma l'assenza di effetto della stessa. I risultati sono medie con relativo SEM (barre verticali) riportati come percentuali rispetto al basale. Le frecce indicano l'istante dell'iniezione. * $p < 0.05$, ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett.

3.2.4 La somministrazione in acuto di nicotina potenzia fortemente la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg senza variare la durata della loro azione inibitoria sui neuroni DAergici della VTA

Per quanto riguarda la nicotina, tutt'oggi non vi sono informazioni sulla sua azione a livello del RMTg. Va comunque sottolineata, a seguito di somministrazione di nicotina, la presenza di un'alta concentrazione della proteina c-Fos in neuroni non-DAergici della VTA posteriore del ratto (Pang *et al.*, 1993). A conferma di questo dato, in studi di auto-somministrazione di nicotina, gli animali sono più propensi ad iniettarsi agonisti dei recettori nicotinici per l'acetilcolina (nAChRs) nella VTA posteriore rispetto a quella anteriore (Ikemoto *et al.*, 2006). Qui di seguito riporteremo i dati inerenti le risposte alla somministrazione di nicotina, sui neuroni del RMTg e sull'inibizione delle cellule DAergiche imposta dalla stimolazione elettrica del RMTg.

In una prima fase sperimentale sono stati registrati 7 neuroni del RMTg eccitati sia dalla stimolazione della Lhb sia dal pinzettamento della zampa posteriore dell'animale. Dopo la registrazione di 2-3 minuti di attività spontanea del singolo neurone si è proceduto all'iniezione di nicotina (0.2 mg/kg iv). L'agonista dei nAChRs, in netto contrasto con le precedenti sostanze, ha aumentato in maniera robusta e duratura la frequenza di scarica dei neuroni GABAergici del RMTg ($198.8 \pm 29.2\%$ rispetto al basale; $n=7$; $F_{5,30}=6.63$; $p<0.001$, ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett) (figura 3.9 A,C). L'effetto in questione terminava quando veniva somministrato l'antagonista aspecifico dei nAChRs, mecamilamina alla dose di 2 mg/kg (iv) ($100.7 \pm 10.7\%$ rispetto ai livelli basali; $n=4$; $F_{1,45}=18.98$; $p<0.01$ ANOVA a due vie e test di Bonferroni) (figura 3.9 B,C). Questo dato supporta il ruolo del recettore nAChR nell'effetto eccitatorio della nicotina su questi neuroni. L'analisi del CV anche nel caso della nicotina non ha portato alla luce differenze significative tra i livelli basali (CV: $34.1 \pm 3.8\%$) e quelli post-nicotina (CV: $33.0 \pm 3.8\%$).

A questo punto ci siamo chiesti se l'iniezione di nicotina avesse ripercussioni dirette sull'inibizione che il RMTg esercita sui neuroni DAergici della VTA. A tal fine sono stati registrati 7 neuroni inibiti dalla stimolazione elettrica del RMTg. Come nel caso della cocaina anche la nicotina non variava significativamente la durata dell'inibizione sul neurone DAergico ($96.3 \pm 6.4\%$ rispetto a livello basale; $n=7$, $F_{5,30}=1.439$,

$p=0.2392$; ANOVA ad una via per misure ripetute). Dalla figura 3.9D, E, si può vedere l'assenza d'effetto della nicotina sulla durata dell'inibizione.

Quindi ricapitolando, possiamo assurgere un forte effetto stimolante della nicotina sulla frequenza di scarica dei neuroni del RMTg innervati dalla LHb ed eccitati dallo stimolo nocicettivo (pinzettamento). Detto questo, spostandoci agli esperimenti in VTA, la nicotina non è stata capace di modificare la forza del controllo inibitorio esercitato dal RMTg sul neurone DAergico della VTA.

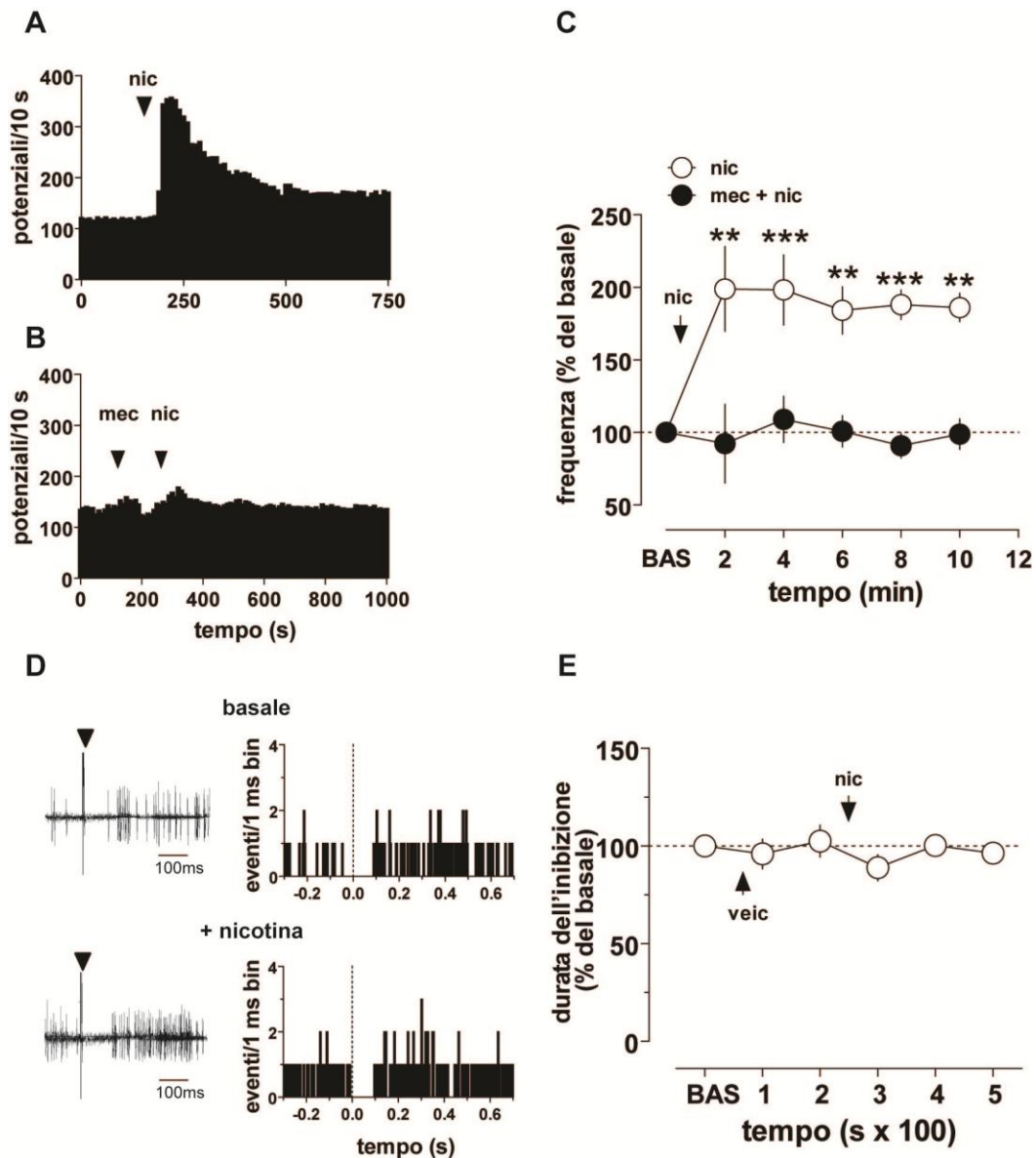


Figura 3.9 Gli effetti dell'iniezione sistemica di nicotina sulla frequenza di scarica dei neuroni del RMTg e sul loro potere inibitorio esercitato nei neuroni DAergici della VTA. **(A)** L'istogramma di frequenza illustra l'azione stimolante della nicotina (nic, 0.2 mg/kg, iv) sull'attività di un neurone del RMTg **(B)** L'esempio riportato nell'istogramma di frequenza riporta l'azione preventiva esercitata dalla mecamilamina (mec, 2 mg/kg, iv), iniettata 4 m prima della nicotina) sulla stimolazione indotta dalla nicotina. **(C)** Il grafico illustra l'effetto temporale della nicotina sulla frequenza di scarica dei neuroni del RMTg (n=7). Il pre-trattamento con l'antagonista non selettivo dei recettori nAChR blocca completamente la stimolazione indotta dalla nicotina. **(D)** Le tracce acquisite all'oscilloscopio (sinistra) e i relativi PSTH illustrano l'assenza di effetto della nicotina su un neurone DAergico inibito dalla stimolazione elettrica del RMTg. **(E)** La *time-course* mostra l'assenza d'effetto della nicotina sulla durata dell'inibizione evocata dall'attivazione del RMTg sui neuroni DAergici (n=7). I risultati sono riportati come medie e relativi SEM (barre verticali), espressi in percentuale rispetto al basale. Le frecce indicano il tempo delle iniezioni. **p<0.001, ***p<0.0001; ANOVA ad una via per misure ripetute e test di Dunnett.

Capitolo Quarto

4 DISCUSSIONE

4.1 Un quadro riassuntivo dei principali risultati

In questo lavoro abbiamo dimostrato che, nell'animale anestetizzato con uretano, i neuroni del RMTg sono eccitati dalla stimolazione della LHb e da uno stimolo nocicettivo, quale il pinzettamento meccanico della zampa. Inoltre, i nostri dati forniscono la prima prova elettrofisiologica dell'influenza monosinaptica inibitoria del RMTg sui neuroni DAergici della VTA, e del rapporto tra l'attività di scarica spontanea di questi ultimi e la forza di tale sinapsi. Altro dato interessante da noi ottenuto deriva dalle differenze registrate tra i neuroni DAergici inibiti e non dalla stimolazione del RMTg, nella codifica dello stimolo avversivo. Di fatto solo la popolazione neuronale DAergica inibita dalla stimolazione del RMTg è inibita dal pinzettamento della zampa. Come premessa del nostro lavoro, il RMTg, per la sua conformazione anatomo-funzionale e in particolare per la sua influenza inibitoria sui neuroni DAergici della VTA, si candida come possibile target d'azione per le sostanze d'abuso. I nostri dati hanno confermato quest'ipotesi dimostrando come, da un lato, la morfina e l'agonista sintetico per i cannabinoidi WIN55212-2 agiscono deprimendo sia l'attività di scarica dei neuroni del RMTg, sia la loro forza inibitoria sui neuroni DA della VTA. D'altro canto, la cocaina e la nicotina operano ad un solo livello ed in maniera opposta: la prima decrescendo e la seconda incrementando la frequenza di scarica dei neuroni del RMTg, senza produrre nessuna variazione a livello della sinapsi inibitoria RMTg-VTA.

4.2 L'attività di scarica dei neuroni del RMTg e il loro tono inibitorio sulle cellule DAergiche della VTA

Le registrazioni elettrofisiologiche dell'attività di scarica spontanea dei neuroni GABAergici si sono concentrate su quella che Jhou (2009a) ha definito *core*. La *core* del RMTg risulta essere situata medialmente rispetto all'intera area che prevede

anche una periferia (vedi figura 1.6). Nella *core* si concentra il maggior numero di neuroni positivi al GAD67, che esprimono la proteina Fos a seguito di trattamento con psicostimolanti. Inoltre, la scelta è caduta sulla *core* anche in quanto è stato dimostrato che neuroni del RMTg e le loro proiezioni al mesencefalo sono organizzate topograficamente (Goncalves *et al.*, 2011): i neuroni del RMTg che risiedono nella periferia proiettano maggiormente alla SNc mentre quelli della *core* alla VTA. La conferma istologica ha permesso di scartare le cellule non propriamente in area.

I neuroni del RMTg, nell'animale anestetizzato, scaricano relativamente ad alta frequenza con un *pattern* alquanto regolare. Preventivamente sono state scartate cellule a basse frequenze, onde evitare la registrazione di neuroni contenenti serotonina dei nuclei del rafe (Schweimer *et al.*, 2011) che risultano in posizione mediale ed adiacente al RMTg. I nostri dati sulla frequenza spontanea delle cellule del RMTg, siti nella *core*, differiscono da quelli prodotti da Jhou su animali liberi di muoversi. In particolar modo la frequenza di scarica spontanea e la durata dei potenziali d'azione risultano rispettivamente inferiore e maggiore a quelle riportate dall'autore (Jhou *et al.*, 2009a). Queste dicotomie sono facilmente interpretabili alla luce delle differenti condizioni sperimentali: animale sveglio vs animale anestetizzato e differenti filtri usati per le registrazioni. A conferma di questa idea, recentemente Jalabert e colleghi (2011) hanno registrato i neuroni del RMTg, identificati in base alla loro risposta alla stimolazione della LHb, su animale anestetizzato. In questo caso non vi son differenze tra i dati da noi riportati ed i parametri delle cellule considerate dagli autori.

4.2.1 Il RMTg riceve proiezioni eccitatorie dalla LHb e invia proiezioni inibitorie alla VTA

La stimolazione elettrica della LHb ha permesso di isolare una popolazione distinta di cellule del RMTg innervate dalle sue proiezioni. Il 46% dei neuroni testati nel RMTg venivano eccitati a breve latenza dallo stimolo elettrico della LHb. La risposta presentava una latenza media di 5 ms dallo stimolo in linea con un meccanismo monosinaptico. A conferma di ciò, è utile seguire un semplice ragionamento matematico. Come riportato da Ji e Shepard (2007), essendo la velocità di

conduzione degli assoni glutamatergici della LHb all'incirca 2 m/s (Park, 1987), un'innervazione diretta sui neuroni GABAergici della VTA richiederebbe una risposta pari a 3.2 ms. Questo, in quanto, alla distanza media stimata tra le due aree in questione (2.7 mm), si deve sommare il ritardo di risposta dovuto ai meccanismi sinaptici. I risultati dei due ricercatori confermano questo dato. Di riflesso, essendo la distanza media tra la LHb e il RMTg pari a 4.7 mm, noi ci aspetteremo una latenza di risposta all'incirca di 5.6 ms. I nostri dati, confermano in pieno il calcolo precedente. Successivamente, le risposte ortodromiche dei neuroni del RMTg alla stimolazione della LHb sono state osservate da un altro gruppo di ricerca sui primati (Hong *et al.*, 2011).

Un altro dato interessante deriva dal fatto che le proiezioni provenienti dalla LHb innervano in maggior parte neuroni GABAergici che proiettano a loro volta in VTA (Goncalves *et al.*, 2011). La comprova di questo deriva dalla risposta dei neuroni DAergici alla stimolazione del RMTg. Infatti, l'inibizione, presente in circa metà delle cellule testate, perdura per 82.6 ms e avviene immediatamente dopo lo stimolo. L'assenza di una latenza visibile è in linea con un meccanismo monosinaptico e con una velocità di conduzione rapida, tipica dei neuroni GABAergici. Di fatto, eventuali potenziali d'azione potrebbero cadere a cavallo dell'artefatto prodotto dallo stimolo, e per questo non visualizzabili. La potente influenza inibitoria del RMTg sarebbe così confermata dai nostri dati. Confrontando i risultati derivanti dalla stimolazione del RMTg con precedenti lavori nei quali la stimolazione è avvenuta in LHb, (Christoph *et al.*, 1986; Ji & Shepard, 2007) sorprende quanto le risposte siano simili sia per la durata media che per il range. Tuttavia un dato resta discordante, ovvero la stimolazione elettrica della LHb produce una risposta inibitoria disinaptica in una percentuale altissima di neuroni DAergici (~97%). Quindi alla luce dei nostri risultati, non tutto il potere inibitorio della LHb nella VTA richiederebbe l'intermediazione del RMTg. Va comunque precisato, che la nostra, potrebbe essere una sottostima in quanto le stimolazioni, si sono concentrate in un solo punto del RMTg, che si estende in modo notevole in senso rostro-caudale, ed è ragionevole considerare che non tutte le proiezioni siano state coinvolte. Futuri studi con l'ausilio di nuove tecniche optogenetiche potrebbero chiarire questo punto.

4.2.2 Il RMTg controlla l'attività di scarica dei neuroni DA della VTA

L'analisi correlazionale ha dimostrato una forte correlazione negativa tra la frequenza di scarica spontanea dei neuroni DAergici registrati nella VTA e l'entità della loro risposta inibitoria. Una correlazione inversa seppur meno marcata è stata registrata anche nella percentuale di potenziali in *bursts* e la durata dell'inibizione. Questi dati vanno sommati alla correlazione tra il pattern di scarica dei neuroni DAergici e la forza dell'inibizione indotta da stimolazione del RMTg. La risposta inibitoria all'attivazione del RMTg è stata registrata sia in cellule classificate come regolari, irregolari e in *burst*. Le cellule classificate come irregolari, comunque, sembrano avere una maggiore componente inibitoria rispetto ai neuroni in diverse modalità di scarica. Considerando la vasta mole di evidenze che mettono in luce come l'attività dei neuroni DAergici sia in parte mediata dal bilancio tra input eccitatori ed inibitori (Meltzer *et al.*, 1997; Kitai *et al.*, 1999; Floresco *et al.*, 2003; Marinelli *et al.*, 2006), il nostro dato potrebbe far pensare ad una forte influenza del RMTg nel controllo dell'attività e del pattern di scarica dei neuroni DAergici della VTA. Di fatto è stato recentemente dimostrato che una temporanea inibizione farmacologica del RMTg produce un incremento dell'attività di scarica dei neuroni DAergici della VTA (Jalabert *et al.*, 2011).

4.2.3 RMTg-VTA: via preferenziale per la codifica degli stimoli avversivi?

Un'ulteriore interpretazione dei nostri dati, deriva dall'analisi delle risposte al pinzettamento della zampa sia sulle cellule del RMTg che sui neuroni DAergici della VTA. Il 72.3% dei neuroni del RMTg esaminati rispondevano allo stimolo nocicettivo con una risposta eccitatoria fasica rapida. Questo dato è molto simile a quello riportato nei ratti liberi di muoversi in risposta ad uno shock elettrico della zampa (Jhou *et al.*, 2009a). È interessante sottolineare come stimoli avversivi siano in grado di incrementare l'espressione della proteina Fos nel RMTg specificatamente in cellule positive al GAD67 (Jhou *et al.*, 2009a).

Nel caso dell'analisi delle risposte dei neuroni DAergici al pinzettamento, abbiamo scelto di procedere non per singoli neuroni, ma per popolazioni. In quanto, tenendo conto dell'eterogeneità delle risposte di questi neuroni ad uno stimolo nocicettivo (Brischoux *et al.*, 2009), il nostro interesse si è concentrato sui neuroni innervati dal

RMTg. I dati ottenuti, mostrano chiaramente come i neuroni inibiti dal RMTg siano a loro volta propensi a codificare il pinzettamento breve della zampa con un decremento fasico della loro frequenza. È interessante notare, come la risposta inibitoria di questi neuroni sia molto più pronunciata e significativa rispetto a quella dei neuroni non inibiti dal RMTg.

In una visione d'insieme, questi dati confermano il prominente ruolo del RMTg nella codifica degli stimoli avversivi. Inoltre aggiungono un dato interessante sulla possibile spiegazione dell'eterogeneità della risposta dei neuroni DAergici agli stessi stimoli. In linea con quanto asserisce Hong *et al.* (2011), le sinapsi inibitorie RMTg-VTA potrebbero inviare il segnale negativo correlato a gratificazione alla VTA, così da permettere le risposte inibitorie esclusivamente nei neuroni DAergici innervati dal RMTg. Tuttavia a causa dei limiti del protocollo da noi utilizzato, questo dato andrebbe confermato con studi di marcatura del fenotipo neuronale (esempio *juxtacellular*) e uso di traccianti (esempio tracciante anterogrado in RMTg).

4.3 L'espressione della proteina c-Fos nel RMTg

È stato dimostrato che i composti che condividono proprietà psicostimolanti, come la cocaina e la metamfetamina, inducono l'espressione dei derivati della proteina Fos sui neuroni GABAergici del RMTg (Kaufling *et al.*, 2010b). Questo dato fa pensare ad una possibile azione di queste sostanze sui neuroni DAergici attraverso le proiezioni del RMTg. Nel nostro studio confermiamo il fatto che la metamfetamina è in grado di indurre un'alta espressione di c-Fos nel RMTg. Tuttavia, i livelli di c-Fos da noi registrati in RMTg non differiscono in maniera netta da quelli evidenziati nelle aree adiacenti. Questo, potrebbe dipendere dalle differenti condizioni rispetto a lavori precedenti (Jhou *et al.*, 2009c). Nel nostro studio, infatti, i ratti hanno subito tutte le procedure chirurgiche per le registrazioni elettrofisiologiche, compresa l'inserzione degli elettrodi e la marcatura del sito di registrazione. Non è da escludere che queste procedure possano aver influito con l'espressione aspecifica di c-Fos.

4.4 RMTg-VTA: un nuovo target per le sostanze d'abuso

Le principali caratteristiche delle connessioni RMTg-VTA fanno presumere ad una possibile azione delle sostanze d'abuso in questo circuito. In particolare, la selettiva espressione dei derivati della proteina Fos, a seguito di esposizione dell'animale esclusivamente a sostanze psicostimolanti, ha portato i ricercatori a ipotizzare un ruolo chiave del RMTg nell'azione di questi composti (Kaufling *et al.*, 2010a; Kaufling *et al.*, 2010b). Tuttavia, l'espressione della proteina Fos non necessariamente implica che un neurone o una struttura sono stati eccitati da una data sostanza; all'inverso, l'assenza dell'espressione della stessa proteina non significa che una data sostanza non ha avuto alcun effetto sull'attività neuronale dell'area in questione (Zahm *et al.*, 2010). In uno studio recente, con l'utilizzo di doppi traccianti, è stato possibile identificare un elevato numero di neuroni DAergici ricevanti innervazioni dal RMTg e a loro volta proiettanti nel *nucleus accumbens* (Kaufling *et al.*, 2010a). Questo dato, sommato ad una serie crescente di evidenze, incrementa sensibilmente le quotazioni per un ruolo di mediazione del RMTg e delle sue proiezioni alla VTA nella risposta alla somministrazione di sostanze droganti.

4.4.1 Osservazioni tecniche e scelta delle cellule

La necessità di isolare unità del RMTg GABAergiche, che selettivamente proiettano alla VTA ci ha portato a seguire alcuni accorgimenti nel protocollo. Per questo, quando abbiamo somministrato le sostanze d'abuso, i neuroni venivano selezionati in base alla loro risposta eccitatoria alla LHb e al pinzettamento. È stato infatti dimostrato che l'espressione di c-Fos evocata da stimoli avversivi si concentra particolarmente nelle cellule del RMTg che proiettano alla VTA e che vengono innervate dalla LHb (Jhou *et al.*, 2009a). Il dato appena riportato, sommato all'alta percentuale di neuroni GAD 67 nella *core* del RMTg e all'organizzazione topografica descritta al punto 4.2, riducono notevolmente l'errore nella scelta finale dei neuroni. Seguendo il nostro protocollo, possiamo appunto solo limitare, ma non eliminare la possibilità di registrare neuroni che non proiettano alla VTA. Un metodo elettrofisiologico sicuro deriverebbe da un protocollo di stimolazione antidromica (con elettrodo stimolante in VTA e registrazione nel RMTg). Tuttavia, la sua applicazione risulta impossibile, considerata la vicinanza delle aree e la rapida velocità di conduzione degli assoni GABAergici del RMTg, seppur alcune evidenze mostrano

uno scarso livello di mielinizzazione degli stessi (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011). L'apporto delle recentissime tecniche optogenetiche e di identificazione del fenotipo neuronale, abbinata a registrazioni dell'attività elettrica, potrebbe aiutare a superare questi limiti.

Per quanto concerne i protocolli inerenti l'effetto delle sostanze d'abuso sulla durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione elettrica del RMTg, sarebbe opportuno utilizzare la minima corrente in grado di elicitare la risposta inibitoria. Noi abbiamo preferito attenerci a precedenti protocolli (Ji & Shepard, 2007) utilizzando una corrente standard media che comunque dovrebbe contenere il suo raggio d'azione in un'area circoscritta.

4.4.2 Morfina

L'effetto depressivo della morfina sui neuroni del RMTg è coerente con la recente scoperta dei recettori μ -oppioidi nei corpi cellulari delle cellule GABAergiche (Jalabert *et al.*, 2011). Dati *in vitro*, ottenuti nel nostro laboratorio, mostrano come la morfina riduce le correnti post-sinaptiche eccitatorie (EPSCs) promosse dalla stimolazione delle fibre glutamatergiche provenienti dalla LHB, agendo attraverso un meccanismo di natura post-sinaptica (Lecca *et al.*, 2011). Questo dato confermerebbe la presenza dei recettori μ -oppioidi sui corpi cellulari o sulle afferenze di questi neuroni. In diverse aree cerebrali, compresa la VTA, gli oppioidi inibiscono la trasmissione sinaptica GABAergica riducendo la probabilità di rilascio del neurotrasmettitore (Capogna *et al.*, 1993; Vaughan & Christie, 1997; Vaughan *et al.*, 1997; Bergevin *et al.*, 2002). Infatti, la morfina riduce anche la durata dell'inibizione indotta dalla stimolazione del RMTg agendo a livello pre-sinaptico. A conferma di ciò, i dati *in vitro* dimostrano una riduzione delle correnti post-sinaptiche inibitorie (IPSCs) evocate dalla stimolazione delle afferenze del RMTg alla VTA (Lecca *et al.*, in press). Un recentissimo lavoro suggerisce come le sinapsi inibitorie RMTg-VTA siano sensibili esclusivamente agli agonisti del recettore μ e non a quelli dei recettori δ e σ (Matsui & Williams, 2011). La somma di tutte queste evidenze ci porta a ipotizzare un ruolo fondamentale dei neuroni del RMTg, e delle loro afferenze inibitorie nella VTA, nella risposta eccitatoria dei neuroni DAergici alla morfina. Di fatto, gli oppioidi agiscono a due differenti livelli in questa particolare porzione del circuito della gratificazione: da una parte inibiscono

la frequenza di scarica dei neuroni GABAergici del RMTg e dall'altra diminuiscono il rilascio di neurotrasmettitore nella sinapsi inibitoria nella VTA. Considerato il potere tonico inibitorio esercitato dal RMTg nella VTA (Ikemoto, 2010), l'azione disinibitoria della morfina risulterebbe in un aumentato rilascio di dopamina nelle aree di proiezione.

4.4.3 WIN55212-2

A differenza dei recettori μ -oppioidi, i recettori CB1, nel sistema nervoso centrale, sono localizzati prevalentemente a livello presinaptico, sia su afferenze eccitatorie sia inibitorie, al fine di diminuire il rilascio di neurotrasmettitore (Freund *et al.*, 2003). I nostri dati mostrano un'azione inibitoria dell'agonista CB1 sulla frequenza di scarica dei neuroni GABAergici del RMTg. Evidenze *in vitro* rivelano che l'agonista WIN riduce le EPSCs agendo pre-sinapticamente (Lecca *et al.*, 2011).

Attualmente non vi sono ancora evidenze sulla presenza dei recettori CB1 nel RMTg. Tuttavia, la LHb mostra un alto livello di espressione del mRNA per i CB1 (Matsuda *et al.*, 1993) suggerendo una possibile localizzazione del recettore nelle afferenze eccitatorie della LHb nel RMTg. Questo, comporterebbe un ruolo dei CB1 nella riduzione del rilascio di glutamato nella sinapsi LHb-RMTg che spiegherebbe l'effetto inibitorio sui neuroni GABAergici del RMTg.

In aggiunta all'azione inibitoria a livello centrale, WIN è anche capace di ridurre l'inibizione indotta dall'attivazione del RMTg sui neuroni DAergici della VTA. Anche in questo caso, il meccanismo d'azione è presinaptico. Infatti, dati *in vitro* evidenziano come l'agonista CB1 riduca le IPSCs evocate dalla stimolazione del RMTg agendo pre-sinapticamente (Lecca *et al.*, in press). Quest'effetto è in linea con una vasta mole di evidenze che mostrerebbero la presenza del recettore CB1 nelle afferenze inibitorie nella VTA (Wenger, 2003; Matyas *et al.*, 2006; Marinelli *et al.*, 2007). L'attivazione del recettore in questione decrescerebbe il rilascio di GABA (Szabo *et al.*, 2002; Marinelli *et al.*, 2007).

Nell'insieme, questi dati potrebbero fornire la prima evidenza del meccanismo d'azione attraverso il quale i cannabinoidi eccitano i neuroni DAergici della VTA

(French *et al.*, 1997; Gessa *et al.*, 1998). Tuttavia è auspicabile dimostrare la presenza dei recettori CB1 nelle sinapsi RMTg-VTA.

4.4.4 Cocaina

La cocaina aumenta il rilascio di DA (Di Chiara & Imperato, 1988) e inibisce la frequenza di scarica dei neuroni DAergici (Einhorn *et al.*, 1988; Luchicchi *et al.*, 2010) attraverso il blocco del trasportatore della DA. Un interessante studio condotto da Steffensen e collaboratori (Steffensen *et al.*, 2008) mostra come la cocaina sia in grado di ridurre le IPSCs nei neuroni DAergici della VTA. L'autore suggerisce che questo composto agisce sui neuroni GABAergici riducendo il rilascio di trasmettitore attraverso il blocco dei canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti. Questo meccanismo, sommato all'inibizione del trasportatore della DA, potrebbe potenziare il rilascio di trasmettitore nelle aree di proiezione della VTA (Steffensen *et al.*, 2008). I nostri risultati mostrano una riduzione della frequenza di scarica dei neuroni del RMTg, ma nessun effetto a livello della sinapsi RMTg-VTA. Inoltre, esperimenti *in vitro* condotti dal nostro gruppo di ricerca (Lecca *et al.*, 2011) non mostrano nessun effetto significativo della cocaina nelle EPSCs nei neuroni GABAergici del RMTg. Alla luce di questi dati la cocaina sembra non esercitare un'azione diretta sul circuito RMTg-VTA. Gli effetti *in vivo* sulla frequenza di scarica dei neuroni del RMTg potrebbero essere, quindi, il risultato di un'azione indiretta della cocaina su queste cellule.

4.4.5 Nicotina

A differenza dei precedenti composti, la nicotina produce un forte incremento della frequenza di scarica dei neuroni del RMTg. Inoltre, agendo sulla sub-unità alpha 7 dei recettori nicotinici, tale composto aumenta le EPSCs nel RMTg (Lecca *et al.*, 2011). Quest'ultimo dato fa pensare alla presenza dei recettori alpha 7 nelle terminazioni nervose della LHb. A conferma di ciò, uno studio mostra un'elevata espressione per i fattori di trascrizione di questi recettori nei nuclei dell'abenula (Seguela *et al.*, 1993). Non possiamo comunque escludere un'azione della nicotina a livello somato-dendritico. Futuri studi di caratterizzazione recettoriale del RMTg potranno far luce su questo punto.

Tale dato resta comunque di difficile conciliazione sia con l'assenza d'effetto della nicotina a livello delle sinapsi inibitorie in VTA, sia con l'aumento di frequenza dei neuroni DAergici evocato dalla nicotina (Mereu *et al.*, 1987; Pidoplichko *et al.*, 1997). Proviamo a superare questo apparente paradosso ragionando su alcune evidenze sperimentali. I recettori nicotinici sono espressi sia sui terminali presinaptici, dove modulano direttamente il rilascio di GABA indipendentemente dall'attività di scarica della cellula (Fisher *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1999; Radcliffe *et al.*, 1999), sia sui corpi cellulari dove invece il rilascio dipende dalla frequenza dei potenziali d'azione (Alkondon *et al.*, 1997; Frazier *et al.*, 1998; Alkondon *et al.*, 1999). La risposta delle cellule del RMTg alla nicotina potrebbe far pensare ad un'inibizione dei neuroni della VTA. Di fatto, un'inibizione transitoria nella risposta dei neuroni DAergici alla nicotina è stata dimostrata (Erhardt *et al.*, 2002) e l'effetto eccitatorio finale dipenderebbe dalla combinazione di un contemporaneo aumentato rilascio di GABA che va incontro a rapida sensitizzazione e di un incremento di glutammato che perdura maggiormente nel tempo (Mansvelder *et al.*, 2002). È quindi ragionevole ipotizzare che l'azione della nicotina a livello del RMTg evocherebbe un aumento transitorio di GABA in VTA che viene subito contrastato dal contemporaneo aumento di glutammato, capace di indurre la stimolazione finale del neurone DAergico (Mansvelder *et al.*, 2002). Va altresì precisato che in VTA la nicotina esercita un'azione diretta anche sul corpo cellulare dei neuroni DAergici. Quindi, il risultato finale della stimolazione dei neuroni DAergici evocato dalla nicotina dipenderebbe da un complesso meccanismo che vede interagire diversi sistemi neurotrasmettitoriali. Per questo motivo isolare la componente RMTg-VTA può risultare in una maggior comprensione degli effetti della sostanza. A tal proposito, è interessante notare come iniezioni locali di nicotina nel RMTg evocano una risposta inibitoria dei neuroni DAergici della VTA (Barrot, comunicazione personale). La circostanza per la quale la nicotina non apporta modifiche alla durata dell'inibizione dei neuroni DAergici indotta dall'attivazione del RMTg, può trovare risposta nel protocollo di stimolazione stesso. Di fatto, attraverso la stimolazione, noi isoliamo completamente quello che avviene nella sinapsi inibitoria. Effetti a monte, a livello somato-dendritico, possono essere impediti dall'imposizione stessa dello stimolo elettrico. Tale evenienza, sommata alla forte risposta inibitoria dei neuroni DAergici in un sistema RMTg-VTA isolato (iniezioni locali di nicotina in RMTg), può far pensare ad un'azione della nicotina sui

recettori nAChR localizzati nei corpi cellulari dei neuroni del RMTg e non sui terminali in VTA.

4.5 Conclusioni

Convergenti evidenze antomo-funzionali (Jhou *et al.*, 2009a; Kaufling *et al.*, 2010a; Goncalves *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2011; Lavezzi & Zahm, 2011) fanno del RMTg un qualcosa di più di una semplice area di intermediazione tra LHb e neuroni DAergici del mesencefalo. In tal senso, le recenti evidenze sull'anticipata attivazione di alcune unità del RMTg rispetto a quelle della LHb a seguito dell'omissione di una ricompensa (Hong *et al.*, 2011), fanno pensare a questa eventualità. Quindi, oltre alla LHb vi sono altre aree afferenti che veicolano le informazioni legate a gratificazioni al RMTg. Una di queste potrebbe essere l'area preottica laterale (Lavezzi *et al.*, 2011), che innerva densamente sia la LHb che il RMTg.

Inoltrando i segnali negativi correlati a gratificazione, il RMTg sarebbe responsabile delle pause dei neuroni DAergici evocate da stimoli nocicettivi o omissioni di ricompense. Viceversa, l'inibizione dei neuroni del RMTg a seguito di stimoli che evocano ricompense, potrebbe influenzare la risposta dei neuroni DAergici agli stessi, attraverso meccanismi di dis-inibizione. Il potente controllo inibitorio che questo nucleo esercita sui neuroni DAergici della VTA, ne fa un punto cardine di interesse per la ricerca. Nella fattispecie, quella ricerca che si occupa della patofisiologia dei disturbi che vedono in una compromissione del funzionamento del sistema DAergico uno dei principali epifenomeni. È questo il caso di psicosi come la schizofrenia, disturbi dell'umore come la depressione ed anche disturbi legati all'abuso di sostanze. Sono appunto questi ultimi, oggetto principe della nostra indagine, che mostra come alcune tra le principali sostanze d'abuso possono esercitare i loro effetti agendo sulla connessione RMTg-VTA. In particolar modo, abbiamo visto come, in linea con la letteratura, la morfina e l'agonista sintetico per i cannabinoidi WIN55212-2 agiscono entrambe nel complesso RMTg-VTA in maniera simile. Inibiscono la frequenza di scarica del neurone del RMTg e inoltre son capaci di agire a livello sinaptico riducendo il rilascio di GABA sul neurone DAergico (vedi figura 4.1). Dati comportamentali a sostegno delle nostre evidenze, sono stati forniti. Lesioni specifiche del RMTg riducono le risposte inibitorie comportamentali nei ratti,

È ragionevole concludere che il RMTg, essendo la principale fonte inibitoria della VTA, si configura come bersaglio d'azione per quelle sostanze che, come la morfina e i derivati della *Cannabis*, condividono la proprietà di stimolare i neuroni DAergici della VTA (e il conseguente rilascio di DA nelle aree terminali) attraverso un meccanismo di dis-inibizione. Studi futuri sono necessari per confermare questa ipotesi. In tal senso, per quanto riguarda la morfina, molto è stato già fatto: la presenza dei recettori μ per gli oppioidi sui corpi cellulari e sulle terminazioni dei neuroni GABAergici del RMTg, sommata all'assenza di stimolazione dei neuroni DAergici della VTA a seguito di inattivazione farmacologica di questo nucleo (Jalabert *et al.*, 2011), forniscono una prova forte alla nostra ipotesi. Per quanto invece concerne l'effetto mediato dai composti cannabinoidi, si profila l'esigenza di ulteriori studi al fine di chiarire ruolo e funzione delle sinapsi inibitorie del RMTg in VTA negli effetti mediati dall'uso e abuso degli agonisti CB1.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale va a tutte le persone che hanno partecipato a questo lavoro: la Dott.ssa Miriam Melis per gli esperimenti in vitro; il Dott. Antonio Luchicchi per le registrazioni in vivo; la Dott.ssa Anna Lisa Muntoni per i continui consigli e confronti. Ringrazio inoltre il Dott. Giuliano Pillolla per l'aiuto fornitomi nell'acquisizione della tecnica.

In particolare vorrei ringraziare il mio supervisore, il Prof. Marco Pistis, per la sua presenza attiva, i preziosi suggerimenti e per avermi dato la possibilità di lavorare a questo progetto.

Un ultimo ringraziamento, ma non meno importante, va' alla Regione Autonoma della Sardegna per le borse regionali "giovani ricercatori" (legge 7/2007).

BIBLIOGRAFIA

- Alkondon, M., Pereira, E.F., Barbosa, C.T. & Albuquerque, E.X. (1997) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther*, **283**, 1396-1411.
- Alkondon, M., Pereira, E.F., Eisenberg, H.M. & Albuquerque, E.X. (1999) Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci*, **19**, 2693-2705.
- Andres, K.H., von Düring, M. & Veh, R.W. (1999) Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *The Journal of comparative neurology*, **407**, 130-150.
- Annett, L.E., McGregor, A. & Robbins, T.W. (1989) The effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on spatial learning and extinction in the rat. *Behavioural brain research*, **31**, 231-242.
- Anstrom, K.K., Miczek, K.A. & Budygin, E.A. (2009) Increased phasic dopamine signaling in the mesolimbic pathway during social defeat in rats. *Neuroscience*, **161**, 3-12.
- Araki, M., McGeer, P.L. & Kimura, H. (1988) The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain research*, **441**, 319-330.
- Balcita-Pedicino, J.J., Omelchenko, N., Bell, R. & Sesack, S.R. (2011) The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J Comp Neurol*, **519**, 1143-1164.
- Barrot, M. & Thome, J. (2011) Discovering a new anatomical structure in the brain: implications for neuropsychiatry and therapy. *World J Biol Psychiatry*, **12 Suppl 1**, 19-22.
- Bayer, H.M. & Glimcher, P.W. (2005) Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal. *Neuron*, **47**, 129-141.
- Bergevin, A., Girardot, D., Bourque, M.J. & Trudeau, L.E. (2002) Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacology*, **42**, 1065-1078.
- Bonci, A., Bernardi, G., Grillner, P. & Mercuri, N.B. (2003) The dopamine-containing neuron: maestro or simple musician in the orchestra of addiction? *Trends Pharmacol Sci*, **24**, 172-177.

- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I. & Ungless, M.A. (2009) Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 4894-4899.
- Budygin, E.A., Park, J., Bass, C.E., Grinevich, V.P., Bonin, K.D. & Wightman, R.M. (2011) Aversive stimulus differentially triggers subsecond dopamine release in reward regions. *Neuroscience*.
- Capogna, M., Gähwiler, B.H. & Thompson, S.M. (1993) Mechanism of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, **470**, 539-558.
- Carlezon, W.A., Jr. & Thomas, M.J. (2009) Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology*, **56 Suppl 1**, 122-132.
- Chen, B.T., Hopf, F.W. & Bonci, A. (2010) Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implications for substance abuse. *Ann N Y Acad Sci*, **1187**, 129-139.
- Chou, T.C., Baxter, M.G. & Saper, C.B. (2004) A novel afferent to dopaminergic neurons regulates fear-induced freezing. *Soc Neurosci Abstr.* **30**, 783.713.
- Christoph, G.R., Leonzio, R.J. & Wilcox, K.S. (1986) Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci*, **6**, 613-619.
- Cole, B.J. & Robbins, T.W. (1989) Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens septi on performance of a 5-choice serial reaction time task in rats: implications for theories of selective attention and arousal. *Behavioural brain research*, **33**, 165-179.
- Colussi-Mas, J., Geisler, S., Zimmer, L., Zahm, D.S. & Berod, A. (2007) Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. *Eur J Neurosci*, **26**, 1011-1025.
- Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988) 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.
- Einhorn, L.C., Johansen, P.A. & White, F.J. (1988) Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: studies in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, **8**, 100-112.
- Erhardt, S., Schwieler, L. & Engberg, G. (2002) Excitatory and inhibitory responses of dopamine neurons in the ventral tegmental area to nicotine. *Synapse*, **43**, 227-237.

- Fabricius, K., Helboe, L., Fink-Jensen, A., Wortwein, G., Steiniger-Brach, B. & Sotty, F. (2010) Increased dopaminergic activity in socially isolated rats: an electrophysiological study. *Neurosci Lett*, **482**, 117-122.
- Feenstra, M.G. & Botterblom, M.H. (1996) Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain research*, **742**, 17-24.
- Fibiger, H.C., LePiane, F.G., Jakubovic, A. & Phillips, A.G. (1987) The role of dopamine in intracranial self-stimulation of the ventral tegmental area. *J Neurosci*, **7**, 3888-3896.
- Fisher, J.L., Pidoplichko, V.I. & Dani, J.A. (1998) Nicotine modifies the activity of ventral tegmental area dopaminergic neurons and hippocampal GABAergic neurons. *J Physiol Paris*, **92**, 209-213.
- Floresco, S.B., West, A.R., Ash, B., Moore, H. & Grace, A.A. (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience*, **6**, 968-973.
- Frazier, C.J., Rollins, Y.D., Breese, C.R., Leonard, S., Freedman, R. & Dunwiddie, T.V. (1998) Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J Neurosci*, **18**, 1187-1195.
- French, E.D. (1997) delta9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. *Neurosci Lett*, **226**, 159-162.
- French, E.D., Dillon, K. & Wu, X. (1997) Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport*, **8**, 649-652.
- Freund, T.F., Katona, I. & Piomelli, D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, **83**, 1017-1066.
- Geisler, S., Derst, C., Veh, R.W. & Zahm, D.S. (2007) Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci*, **27**, 5730-5743.
- Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B., Becker, M.L., Freiman, A.J., Beales, M., Meredith, G.E. & Zahm, D.S. (2008) Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology*, **33**, 2688-2700.
- Geisler, S. & Trimble, M. (2008) The lateral habenula: no longer neglected. *CNS Spectr*, **13**, 484-489.
- Geisler, S. & Zahm, D.S. (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *The Journal of comparative neurology*, **490**, 270-294.

- Gessa, G.L., Melis, M., Muntoni, A.L. & Diana, M. (1998) Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol*, **341**, 39-44.
- Goncalves, L., Sego, C. & Metzger, M. (2011) Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. *The Journal of comparative neurology*.
- Gould, T.J. & Wehner, J.M. (1999) Nicotine enhancement of contextual fear conditioning. *Behav Brain Res*, **102**, 31-39.
- Grace, A.A. & Bunney, B.S. (1983) Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience*, **10**, 301-315.
- Grace, A.A. & Bunney, B.S. (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **4**, 2877-2890.
- Grace, A.A. & Bunney, B.S. (1984b) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **4**, 2866-2876.
- Gruber, C., Kahl, A., Lebenheim, L., Kowski, A., Dittgen, A. & Veh, R.W. (2007) Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat. *Neuroscience letters*, **427**, 165-170.
- Haney, M. & Miczek, K.A. (1994) Ultrasounds emitted by female rats during agonistic interactions: effects of morphine and naltrexone. *Psychopharmacology (Berl)*, **114**, 441-448.
- Herkenham, M. & Nauta, W.J. (1977) Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *The Journal of comparative neurology*, **173**, 123-146.
- Herkenham, M. & Nauta, W.J. (1979) Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **187**, 19-47.
- Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P. & El Mestikawy, S. (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience*, **123**, 983-1002.
- Hikosaka, O. (2007a) Basal ganglia mechanisms of reward-oriented eye movement. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1104**, 229-249.
- Hikosaka, O. (2007b) GABAergic output of the basal ganglia. *Progress in brain research*, **160**, 209-226.

- Hikosaka, O., Sesack, S.R., Lecourtier, L. & Shepard, P.D. (2008) Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci*, **28**, 11825-11829.
- Hong, S., Jhou, T.C., Smith, M., Saleem, K.S. & Hikosaka, O. (2011) Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *J Neurosci*, **31**, 11457-11471.
- Horvitz, J.C., Stewart, T. & Jacobs, B.L. (1997) Burst activity of ventral tegmental dopamine neurons is elicited by sensory stimuli in the awake cat. *Brain research*, **759**, 251-258.
- Hughes, R.N. (1968) Effects of age on novelty reactions and exploration in rats. *Q J Exp Psychol*, **20**, 189-192.
- Hyland, B.I., Reynolds, J.N., Hay, J., Perk, C.G. & Miller, R. (2002) Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience*, **114**, 475-492.
- Ikemoto, S. (2010) Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev*.
- Ikemoto, S., Qin, M. & Liu, Z.H. (2006) Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *J Neurosci*, **26**, 723-730.
- Jalabert, M., Bourdy, R., Courtin, J., Veinante, P., Manzoni, O.J., Barrot, M. & Georges, F. (2011) Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 16446-16450.
- Jhou, T.C., Fields, H.L., Baxter, M.G., Saper, C.B. & Holland, P.C. (2009a) The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron*, **61**, 786-800.
- Jhou, T.C. & Gallagher, M. (2007) Paramedian raphe neurons that project to midbrain dopamine neurons are activated by aversive stimuli. *Soc Neurosci Abstr.* , **33**.
- Jhou, T.C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B.A. & Zahm, D.S. (2009b) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol*, **513**, 566-596.
- Jhou, T.C., Xu, S. & Ikemoto, S. (2009c) Self-administration of a mu-opioid agonist into the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons and other arousal systems Society for Neuroscience, Chicago, IL.

- Ji, H. & Shepard, P.D. (2007) Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci*, **27**, 6923-6930.
- Johnson, S.W. & North, R.A. (1992a) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci*, **12**, 483-488.
- Johnson, S.W. & North, R.A. (1992b) Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol*, **450**, 455-468.
- Jones, G.A., Norris, S.K. & Henderson, Z. (1999) Conduction velocities and membrane properties of different classes of rat septohippocampal neurons recorded in vitro. *J Physiol*, **517 (Pt 3)**, 867-877.
- Kakade, S. & Dayan, P. (2002) Dopamine: generalization and bonuses. *Neural Netw*, **15**, 549-559.
- Kalen, P., Karlson, M. & Wiklund, L. (1985) Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[3H]aspartate tracing. *Brain research*, **360**, 285-297.
- Kauffling, J., Veinante, P., Pawlowski, S.A., Freund-Mercier, M.-J. & Barrot, M. (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **513**, 597-621.
- Kauffling, J., Veinante, P., Pawlowski, S.A., Freund-Mercier, M.J. & Barrot, M. (2010a) gamma-Aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry*, **67**, 88-92.
- Kauffling, J., Waltisperger, E., Bourdy, R., Valera, A., Veinante, P., Freund-Mercier, M.J. & Barrot, M. (2010b) Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol*.
- Kelland, M.D., Chiodo, L.A. & Freeman, A.S. (1990) Anesthetic influences on the basal activity and pharmacological responsiveness of nigrostriatal dopamine neurons. *Synapse*, **6**, 207-209.
- Kim, U. (2009) Topographic commissural and descending projections of the habenula in the rat. *The Journal of comparative neurology*, **513**, 173-187.
- Kitai, S.T., Shepard, P.D., Callaway, J.C. & Scroggs, R. (1999) Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol*, **9**, 690-697.
- Kowski, A.B., Geisler, S., Krauss, M. & Veh, R.W. (2008) Differential projections from subfields in the lateral preoptic area to the lateral habenular complex of the rat. *The Journal of comparative neurology*, **507**, 1465-1478.
- Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C. (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, **60**, 543-554.

- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B. & Roeper, J. (2008) Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron*, **57**, 760-773.
- Lavezzi, H.N., Parsley, K.P. & Zahm, D.S. (2011) Mesopontine rostromedial tegmental nucleus neurons projecting to the dorsal raphe and pedunculo-pontine tegmental nucleus: psychostimulant-elicited Fos expression and collateralization. *Brain Struct Funct*.
- Lavezzi, H.N. & Zahm, D.S. (2011) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: an integrative modulator of the reward system. *Basal Ganglia*, **1**, 191-200.
- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Ennas, M.G., Castelli, M.P., Muntoni, A.L. & Pistis, M. (2011) Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **36**, 589-602.
- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Muntoni, A.L. & Pistis, M. (in press) Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*.
- Lecourtier, L., DeFrancesco, A. & Moghaddam, B. (2008) Differential tonic influence of lateral habenula on prefrontal cortex and nucleus accumbens dopamine release. *The European journal of neuroscience*, **27**, 1755-1762.
- Lecourtier, L., Deschaux, O., Arnaud, C., Chessel, A., Kelly, P.H. & Garcia, R. (2006) Habenula lesions alter synaptic plasticity within the fimbria-accumbens pathway in the rat. *Neuroscience*, **141**, 1025-1032.
- Lisoprawski, A., Herve, D., Blanc, G., Glowinski, J. & Tassin, J.P. (1980) Selective activation of the mesocortico-frontal dopaminergic neurons induced by lesion of the habenula in the rat. *Brain research*, **183**, 229-234.
- Ljungberg, T., Apicella, P. & Schultz, W. (1992) Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *Journal of neurophysiology*, **67**, 145-163.
- Lu, Y., Marks, M.J. & Collins, A.C. (1999) Desensitization of nicotinic agonist-induced [3H]gamma-aminobutyric acid release from mouse brain synaptosomes is produced by subactivating concentrations of agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, **291**, 1127-1134.
- Luchicchi, A., Lecca, S., Carta, S., Pillolla, G., Muntoni, A.L., Yasar, S., Goldberg, S.R. & Pistis, M. (2010) Effects of fatty acid amide hydrolase inhibition on neuronal responses to nicotine, cocaine and morphine in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area: involvement of PPAR-alpha nuclear receptors. *Addict Biol*, **15**, 277-288.

- Mansvelder, H.D., Keath, J.R. & McGehee, D.S. (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*, **33**, 905-919.
- Margolis, E.B., Mitchell, J.M., Ishikawa, J., Hjelmstad, G.O. & Fields, H.L. (2008) Midbrain Dopamine Neurons: Projection Target Determines Action Potential Duration and Dopamine D2 Receptor Inhibition. *Journal of Neuroscience*, **28**, 8908-8913.
- Marinelli, M., Rudick, C.N., Hu, X.T. & White, F.J. (2006) Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **5**, 79-97.
- Marinelli, S., Di Marzo, V., Florenzano, F., Fezza, F., Viscomi, M.T., van der Stelt, M., Bernardi, G., Molinari, M., Maccarrone, M. & Mercuri, N.B. (2007) N-arachidonoyl-dopamine tunes synaptic transmission onto dopaminergic neurons by activating both cannabinoid and vanilloid receptors. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 298-308.
- Matsuda, L.A., Bonner, T.I. & Lolait, S.J. (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*, **327**, 535-550.
- Matsuda, Y. & Fujimura, K. (1992) Action of habenular efferents on ventral tegmental area neurons studied in vitro. *Brain research bulletin*, **28**, 743-749.
- Matsui, A. & Williams, J.T. (2011) Opioid-sensitive GABA inputs from rostromedial tegmental nucleus synapse onto midbrain dopamine neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **31**, 17729-17735.
- Matsumoto, M. & Hikosaka, O. (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*, **447**, 1111-1115.
- Matsumoto, M. & Hikosaka, O. (2008) Negative motivational control of saccadic eye movement by the lateral habenula. *Progress in brain research*, **171**, 399-402.
- Matsumoto, M. & Hikosaka, O. (2009) Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci*, **12**, 77-84.
- Matyas, F., Yanovsky, Y., Mackie, K., Kelsch, W., Misgeld, U. & Freund, T.F. (2006) Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience*, **137**, 337-361.
- Meltzer, L.T., Christoffersen, C.L. & Serpa, K.A. (1997) Modulation of dopamine neuronal activity by glutamate receptor subtypes. *Neurosci Biobehav Rev*, **21**, 511-518.

- Mereu, G., Yoon, K.W., Boi, V., Gessa, G.L., Naes, L. & Westfall, T.C. (1987) Preferential stimulation of ventral tegmental area dopaminergic neurons by nicotine. *Eur J Pharmacol*, **141**, 395-399.
- Mirenowicz, J. & Schultz, W. (1996) Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature*, **379**, 449-451.
- Montague, P.R., Dayan, P. & Sejnowski, T.J. (1996) A framework for mesencephalic dopamine systems based on predictive Hebbian learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**, 1936-1947.
- Montague, P.R., Hyman, S.E. & Cohen, J.D. (2004) Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature*, **431**, 760-767.
- Moreira, F.A., Aguiar, D.C., Campos, A.C., Lisboa, S.F., Terzian, A.L., Resstel, L.B. & Guimarães, F.S. (2009) Antiaversive Effects of Cannabinoids: Is the Periaqueductal Gray Involved? *Neural Plasticity*, **2009**, 1-11.
- Moreira, F.A. & Lutz, B. (2008) The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol*, **13**, 196-212.
- Nakamura, K. & Hikosaka, O. (2006) Role of dopamine in the primate caudate nucleus in reward modulation of saccades. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 5360-5369.
- Nishikawa, T., Fage, D. & Scatton, B. (1986) Evidence for, and nature of, the tonic inhibitory influence of habenulointerpeduncular pathways upon cerebral dopaminergic transmission in the rat. *Brain research*, **373**, 324-336.
- Omelchenko, N., Bell, R. & Sesack, S.R. (2009) Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci*, **30**, 1239-1250.
- Omelchenko, N. & Sesack, S.R. (2009) Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse*, **63**, 895-906.
- Pang, Y., Kiba, H. & Jayaraman, A. (1993) Acute nicotine injections induce c-fos mostly in non-dopaminergic neurons of the midbrain of the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, **20**, 162-170.
- Park, M.R. (1987) Monosynaptic inhibitory postsynaptic potentials from lateral habenula recorded in dorsal raphe neurons. *Brain research bulletin*, **19**, 581-586.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press, , London.

- Perrotti, L.I., Bolanos, C.A., Choi, K.H., Russo, S.J., Edwards, S., Ulery, P.G., Wallace, D.L., Self, D.W., Nestler, E.J. & Barrot, M. (2005) DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci*, **21**, 2817-2824.
- Phillips, A.G., Ahn, S. & Howland, J.G. (2003) Amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, **27**, 543-554.
- Pidoplichko, V.I., DeBiasi, M., Williams, J.T. & Dani, J.A. (1997) Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*, **390**, 401-404.
- Pistis, M., Perra, S., Pillolla, G., Melis, M., Muntoni, A.L. & Gessa, G.L. (2004) Adolescent exposure to cannabinoids induces long-lasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry*, **56**, 86-94.
- Radcliffe, K.A., Fisher, J.L., Gray, R. & Dani, J.A. (1999) Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 591-610.
- Redgrave, P. & Gurney, K. (2006) The short-latency dopamine signal: a role in discovering novel actions? *Nat Rev Neurosci*, **7**, 967-975.
- Redgrave, P., Gurney, K. & Reynolds, J. (2008) What is reinforced by phasic dopamine signals? *Brain research reviews*, **58**, 322-339.
- Redgrave, P., Prescott, T.J. & Gurney, K. (1999) Is the short-latency dopamine response too short to signal reward error? *Trends in neurosciences*, **22**, 146-151.
- Reynolds, J.N. & Wickens, J.R. (2002) Dopamine-dependent plasticity of corticostriatal synapses. *Neural Netw*, **15**, 507-521.
- Robbins, T.W., Cador, M., Taylor, J.R. & Everitt, B.J. (1989) Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **13**, 155-162.
- Robison, A.J. & Nestler, E.J. (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature reviews. Neuroscience*, **12**, 623-637.
- Roitman, M.F., Stuber, G.D., Phillips, P.E., Wightman, R.M. & Carelli, R.M. (2004) Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 1265-1271.
- Roitman, M.F., Wheeler, R.A., Wightman, R.M. & Carelli, R.M. (2008) Real-time chemical responses in the nucleus accumbens differentiate rewarding and aversive stimuli. *Nature neuroscience*, **11**, 1376-1377.

- Schultz, W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*, **80**, 1-27.
- Schultz, W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, **36**, 241-263.
- Schweimer, J.V., Mallet, N., Sharp, T. & Ungless, M.A. (2011) Spike-timing relationship of neurochemically-identified dorsal raphe neurons during cortical slow oscillations. *Neuroscience*, **196**, 115-123.
- Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J.A. & Patrick, J.W. (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci*, **13**, 596-604.
- Spanagel, R. & Weiss, F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci*, **22**, 521-527.
- Steffensen, S.C., Stobbs, S.H., Colago, E.E., Lee, R.S., Koob, G.F., Gallegos, R.A. & Henriksen, S.J. (2006) Contingent and non-contingent effects of heroin on mu-opioid receptor-containing ventral tegmental area GABA neurons. *Exp Neurol*, **202**, 139-151.
- Steffensen, S.C., Taylor, S.R., Horton, M.L., Barber, E.N., Lyle, L.T., Stobbs, S.H. & Allison, D.W. (2008) Cocaine disinhibits dopamine neurons in the ventral tegmental area via use-dependent blockade of GABA neuron voltage-sensitive sodium channels. *Eur J Neurosci*, **28**, 2028-2040.
- Stephenson-Jones, M., Floros, O., Robertson, B. & Grillner, S. (2012) Evolutionary conservation of the habenular nuclei and their circuitry controlling the dopamine and 5-hydroxytryptophan (5-HT) systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E164-173.
- Szabo, B., Siemes, S. & Wallmichrath, I. (2002) Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur J Neurosci*, **15**, 2057-2061.
- Tobler, P.N., Dickinson, A. & Schultz, W. (2003) Coding of predicted reward omission by dopamine neurons in a conditioned inhibition paradigm. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 10402-10410.
- Ullsperger, M. & von Cramon, D.Y. (2003) Error monitoring using external feedback: specific roles of the habenular complex, the reward system, and the cingulate motor area revealed by functional magnetic resonance imaging. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 4308-4314.
- Ungless, M.A. (2004) Uniform Inhibition of Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area by Aversive Stimuli. *Science*, **303**, 2040-2042.

- Ungless, M.A., Argilli, E. & Bonci, A. (2010) Effects of stress and aversion on dopamine neurons: implications for addiction. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **35**, 151-156.
- Vaughan, C.W. & Christie, M.J. (1997) Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. *J Physiol*, **498 (Pt 2)**, 463-472.
- Vaughan, C.W., Ingram, S.L., Connor, M.A. & Christie, M.J. (1997) How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*, **390**, 611-614.
- Vivian, J.A. & Miczek, K.A. (1998) Effects of mu and delta opioid agonists and antagonists on affective vocal and reflexive pain responses during social stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **139**, 364-375.
- Wang, D.V. & Tsien, J.Z. (2011) Convergent processing of both positive and negative motivational signals by the VTA dopamine neuronal populations. *PloS one*, **6**, e17047.
- Wang, M., Vijayraghavan, S. & Goldman-Rakic, P.S. (2004) Selective D2 receptor actions on the functional circuitry of working memory. *Science*, **303**, 853-856.
- Wang, R.Y. & Aghajanian, G.K. (1977) Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science*, **197**, 89-91.
- Wenger, T. (2003) Neuromorphological background of cannabis addiction. *Brain Research Bulletin*, **61**, 125-128.
- Wise, R.A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 483-494.
- Wise, R.A. & Hoffman, D.C. (1992) Localization of drug reward mechanisms by intracranial injections. *Synapse*, **10**, 247-263.
- Yamaguchi, T., Sheen, W. & Morales, M. (2007) Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *European Journal of Neuroscience*, **25**, 106-118.
- Yamaguchi, T., Wang, H.L., Li, X., Ng, T.H. & Morales, M. (2011) Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J Neurosci*, **31**, 8476-8490.
- Zahm, D.S., Becker, M.L., Freiman, A.J., Strauch, S., Degarmo, B., Geisler, S., Meredith, G.E. & Marinelli, M. (2010) Fos after single and repeated self-administration of cocaine and saline in the rat: emphasis on the Basal forebrain and recalibration of expression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **35**, 445-463.
- Zweifel, L.S., Fadok, J.P., Argilli, E., Garelick, M.G., Jones, G.L., Dickerson, T.M., Allen, J.M., Mizumori, S.J., Bonci, A. & Palmiter, R.D. (2011) Activation of

dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety. *Nature neuroscience*, **14**, 620-626.

APPENDICE

Effects of Drugs of Abuse on Putative Rostromedial Tegmental Neurons, Inhibitory Afferents to Midbrain Dopamine Cells

Salvatore Lecca¹, Miriam Melis¹, Antonio Luchicchi¹, Maria Grazia Ennas², Maria Paola Castelli^{1,3},
Anna Lisa Muntoni^{3,4} and Marco Pistis^{*,1,3}

¹B.B. Brodie Department of Neuroscience, University of Cagliari, Monserrato, Italy; ²Department of Cytomorphology, University of Cagliari, Monserrato, Italy; ³Center of Excellence for the Neurobiology of Addiction, University of Cagliari, Monserrato, Italy; ⁴C.N.R. Neuroscience Institute-Cagliari, University of Cagliari, Monserrato, Italy

Recent findings have underlined the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a structure located caudally to the ventral tegmental area, as an important site involved in the mechanisms of aversion. RMTg contains γ -aminobutyric acid neurons responding to noxious stimuli, densely innervated by the lateral habenula and providing a major inhibitory projection to reward-encoding midbrain dopamine (DA) neurons. One of the key features of drug addiction is the perseverance of drug seeking in spite of negative and unpleasant consequences, likely mediated by response suppression within neural pathways mediating aversion. To investigate whether the RMTg has a function in the mechanisms of addicting drugs, we studied acute effects of morphine, cocaine, the cannabinoid agonist WIN55212-2 (WIN), and nicotine on putative RMTg neurons. We utilized single unit extracellular recordings in anesthetized rats and whole-cell patch-clamp recordings in brain slices to identify and characterize putative RMTg neurons and their responses to drugs of abuse. Morphine and WIN inhibited both firing rate *in vivo* and excitatory postsynaptic currents (EPSCs) evoked by stimulation of rostral afferents *in vitro*, whereas cocaine inhibited discharge activity without affecting EPSC amplitude. Conversely, nicotine robustly excited putative RMTg neurons and enhanced EPSCs, an effect mediated by $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. Our results suggest that activity of RMTg neurons is profoundly influenced by drugs of abuse and, as important inhibitory afferents to midbrain DA neurons, they might take place in the complex interplay between the neural circuits mediating aversion and reward.

Neuropsychopharmacology advance online publication, 3 November 2010; doi:10.1038/npp.2010.190

Keywords: lateral habenula; aversion; addiction; patch clamp; electrophysiology; Fos

INTRODUCTION

Recent studies have provided information on how brain regions encoding aversion and reward are integrated. Mesolimbic dopamine (DA) neurons encode rewarding and appetitive stimuli with phasic excitation, whereas reward omission induces phasic inhibition (Schultz, 2007a,b). Aversive stimuli have been reported to induce both excitation (Brischoux *et al*, 2009) and inhibition (Ungless *et al*, 2004) of DA neurons, a heterogeneous response correlated to specific subgroups of DA neurons (ventral and dorsal, respectively) within the ventral tegmental area (VTA). On the other hand, glutamatergic neurons in the lateral habenula (LHb), an epithalamic region involved in the mechanisms of fear, anxiety, and stress, respond in a reverse manner, being inhibited by

rewards and excited by aversive stimuli (Hikosaka *et al*, 2008; Matsumoto and Hikosaka, 2007). Noteworthy, activity of DA and LHb neurons appears to be causally correlated, as electrical stimulation of the LHb inhibits DA neurons (Christoph *et al*, 1986; Ji and Shepard, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007). However, the sparse innervation of DA neurons by excitatory LHb afferents (Brinschwitz *et al*, 2010; Omelchenko *et al*, 2009) unlikely explains this inhibition, and the presence of an area intermediate between the LHb and the VTA was originally postulated. Elegant studies by Jhou *et al* (2009a,b) revealed that γ -aminobutyric acid (GABA) neurons in the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a region also denominated as 'tail' of the VTA (Perrotti *et al*, 2005), integrate input from the LHb and send output projection to midbrain DA neurons. As described, the missing link between LHb and midbrain DA neurons is provided. Notably, both RMTg and LHb neurons are phasically activated by aversive stimuli and inhibited by appetitive stimuli (Jhou *et al*, 2009a). In turn, RMTg neurons form inhibitory synapses with DA neurons in the VTA and the substantia nigra (Balcita-Pedicino *et al*, 2009), and are now accounted among the major inhibitory afferents to mesencephalic DA

*Correspondence: DR M Pistis, B.B. Brodie Department of Neuroscience, Center of Excellence for the Neurobiology of Addiction, University of Cagliari, Cittadella Universitaria, Monserrato (CA) 09042, Italy, Tel: +39 070 675 4324, Fax: +39 070 675 4320, E-mail: mpistis@unica.it

Received 27 May 2010; revised 10 September 2010; accepted 22 September 2010

neurons (Jhou *et al*, 2009a). The electrical activity of DA neurons, and the resulting DA output in terminal areas, crucially depends on the balance between excitatory and inhibitory inputs (Marinelli *et al*, 2006). Thus, the characterization of this novel inhibitory pathway to DA neurons is of interest to understand how DA neurons respond to behavioral and pharmacological stimuli.

Understanding the relationships between brain areas encoding reward and aversion, such as the VTA and the RMTg, is also relevant when it concerns the effects of addicting drugs. As drug abuse potential can be envisaged as a balance between rewarding and aversive effects (Hutchison and Riley, 2008; Simpson and Riley, 2005; Wise *et al*, 1976), it can be hypothesized that the components of the appetitive properties of addicting drugs might result from both direct activation of neural reward pathways and suppression of responses in neural circuits mediating aversion. Indeed, one of the hallmarks of drug addiction is the perseverance of drug taking despite of negative and unpleasant consequences of drug use. Recent studies indicate that drugs of abuse affect GABA neurons in the RMTg: these neurons, and notably those projecting to the VTA, express Δ FosB (Kaufling *et al*, 2009; Perrotti *et al*, 2005) and c-Fos following repeated cocaine exposure (Geisler *et al*, 2008). In addition, RMTg neurons are immunoreactive against μ -opioid receptors (Jhou *et al*, 2009b) and supposedly respond to opioid administration (Jhou *et al*, 2009c).

To determine further whether RMTg neurons are a primary target of drugs of abuse, we took advantage of extracellular single unit recordings in anesthetized rats together with whole-cell patch-clamp recordings in brain slices. We characterized the electrophysiological features of putative neurons in the RMTg, identified by their excitatory responses to both a noxious stimulus (ie, paw pinch) and LHB stimulation. We also studied the effects of the prototypical psychostimulant and opioid (cocaine and morphine, respectively), the type 1-cannabinoid (CB1) receptor agonist WIN55212-2 (WIN), and nicotine on firing rate *in vivo* and on excitatory postsynaptic currents (EPSCs) *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

In Vivo Electrophysiology

Male Sprague–Dawley albino rats (Harlan Nossan, San Pietro al Natisone, Italy) weighing 250–350 g were used in all *in vivo* experiments. Experiments were performed in strict accordance with EEC Council Directive of 24 November 1986 (86/609).

All efforts were made to minimize pain and suffering and to reduce the number of animals used.

Animals were housed in groups of three to six in standard conditions of temperature and humidity under a 12-h light/dark cycle (with lights on at 0700 hours) with food and water available *ad libitum*. We anesthetized rats with urethane (1300 mg/kg, intraperitoneally (i.p.)), cannulated their femoral vein for intravenous (i.v.) administration of pharmacological agents, and placed them in the stereotaxic apparatus (Kopf, Tujunga, CA) with their body temperature maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ by a heating pad.

Experiments in the RMTg. The skull surface was exposed and a burr hole was drilled over the RMTg (7.0–7.4 mm posterior to bregma, 0.8–1.0 mm lateral to the midline, 6.5–7.5 mm ventral to the cerebellar cortex) for the insertion of a recording electrode. For orthodromic stimulation experiments, a Formvar-coated stainless steel bipolar electrode (250 μm tip diameter) was inserted in the ipsilateral LHB (1.9 mm posterior to bregma, 0.7 mm lateral to the midline, 4.7 mm ventral to the cerebral cortex) with an inclination of 20° anteroposterior on the coronal plane.

Structures were localized according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (2007). Single unit activity of RMTg cells was recorded extracellularly by glass micropipettes filled with 2% Pontamine sky blue dye dissolved in 0.5 M sodium acetate (impedance 5–10 M Ω). Putative GABA-containing neurons in the RMTg were first isolated and identified according to previously described electrophysiological characteristics (Jhou *et al*, 2009a), including a relatively high spontaneous firing rate (> 10 Hz) and a biphasic and short (< 1.5 ms, see Results for more details) action potential. Once a cell was selected, stimuli (~ 0.5 mA) were delivered to the LHB at 1 Hz. Responses to electrical stimulation of the LHB were evaluated and a peri-stimulus time histogram (PSTH) was generated on-line (Spike 2 software, CED, Cambridge, UK) for each neuron. Only RMTg neurons with a robust excitatory response (latency range 2–8 ms) to LHB stimulation were selected in this study. We did not include cells whose onset latencies were longer than 8 ms following LHB stimulation because they could exhibit a polysynaptic response component.

The extracellular neuronal signal was filtered (bandpass 1–3 kHz) and amplified (Neurolog System, Digitimer, Hertfordshire, UK), displayed on a digital storage oscilloscope (TDS 3012, Tektronix, Marlow, UK) and digitally recorded. Experiments were sampled on- and off-line by a computer connected to CED Power 1401 laboratory interface (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). The spontaneous firing rate was recorded for 2–3 min to establish a baseline measure of firing rate. Interspike intervals and coefficient of variation ($\text{CV} = \text{SD of interspike intervals divided by the mean interspike interval}$; a measure of firing regularity) were also determined.

Drugs were administered *in bolus* i.v. (1 ml/kg of body weight). Changes in firing rate and regularity were calculated by averaging the effects of the drugs for the 2-min period following drug administration and comparing them to the mean of the pre-drug baseline. When drugs were administered, only one cell was recorded per rat.

At the end of recording sessions, DC current (15 mA for 5 min) was passed through the recording micropipette in order to eject Pontamine sky blue for marking the recording site. Brains were then rapidly removed and fixed in 4% paraformaldehyde solution. The position of the electrodes was microscopically identified on serial sections (60 μm) stained with Neutral Red.

Experiments in the VTA. The scalp was retracted and one burr hole was drilled above the VTA (6.0 mm posterior from bregma, 0.3–0.6 mm lateral from midline) for the placement of a recording electrode. To evaluate the inhibitory input arising from the RMTg to the VTA, a Formvar-coated-stimulating stainless steel bipolar electrode (250 μm tip

diameter) was inserted in the ipsilateral RMTg (9.6 mm posterior from bregma, 0.8 mm lateral from the midline, 7.0 mm ventral from the cortical surface) with an inclination of 20° anteroposterior on the coronal plane. Single unit activity of neurons located in the VTA (V 7.0–8.0 mm from the cortical surface) was recorded extracellularly with the same instruments previously described for the RMTg experiments. Single units were isolated and identified according to already published criteria (Grace and Bunney, 1983, 1984; Ungless *et al*, 2004). We recorded VTA DA neurons when all criteria for identification were fulfilled: firing rate ≤ 10 Hz, duration of action potential ≥ 2.5 ms, inhibitory responses to hindpaw pinching. Once a cell was selected, stimuli (~ 0.5 mA) were delivered to the RMTg at 1 s intervals and stimulation currents were progressively adjusted to induce an inhibitory response after each stimulus. The experimental protocol was essentially that published by Ji and Shepard (2007). Responses to electrical stimulation of RMTg were evaluated and a PSTH was generated on-line (Spike 2) for each neuron. Histological verification was carried out as described above.

In Vitro Electrophysiology

Experiments in the RMTg. Whole-cell patch-clamp recordings from Sprague–Dawley rat cells were as described previously (Melis *et al*, 2008). Briefly, male rats (14–31 days) were anesthetized with halothane and killed. A block of tissue containing the midbrain was rapidly dissected and sliced in the horizontal plane (300 μ m) with a vibratome (VT1000S, Leica) in ice-cold low-Ca²⁺ solution containing (in mM) 126 NaCl, 1.6 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.2 MgCl₂, 0.625 CaCl₂, 18 NaHCO₃, and 11 glucose. Slices were transferred to a holding chamber with artificial cerebrospinal fluid (ACSF, 37° C) saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ containing (in mM) 126 NaCl, 1.6 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.2 MgCl₂, 2.4 CaCl₂, 18 NaHCO₃, and 11 glucose. Slices (two per animal) were allowed to recover for at least 1 h before being placed (as hemislices) in the recording chamber and superfused with the ACSF (37° C) saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. Putative RMTg cells were visualized with an upright microscope with infrared illumination (Axioskop FS 2 plus, Zeiss), and whole-cell current- and voltage-clamp recordings (one per hemislice) were made by using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, CA). Current-clamp experiments were made with electrodes filled with a solution containing the following (in mM): 144 KCl, 10 HEPES, 3.45 BAPTA, 1 CaCl₂, 2.5 Mg₂ATP, and 0.25 Mg₂GTP (pH 7.2–7.4, 275–285 mOsm). All voltage-clamp recordings were made with electrodes filled with a solution containing the following (in mM): 117 Cs methansulfonic acid, 20 HEPES, 0.4 EGTA, 2.8 NaCl, 5 TEA-Cl, 2.5 Mg₂ATP, and 0.25 Mg₂GTP (pH 7.2–7.4, 275–285 mOsm). Experiments were begun only after series resistance had stabilized (typically 15–40 M Ω). Series and input resistance were monitored continuously on-line with a 5 mV depolarizing step (25 ms). Estimated resting potential was calculated by averaging V_m values measured 1 ms before the initiation of each spontaneous action potential. Data were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz, and collected on-line with acquisition software (pClamp 8.2, Molecular Devices). A bipolar stainless steel-stimulating electrode (FHC) was

placed 150 μ m rostral to the recording electrode to stimulate (duration 50 μ s) the afferent fibers at a frequency of 0.1 Hz. Paired stimuli were given with an interstimulus interval of 50 ms, and the ratio between the second and the first EPSC was calculated and averaged for a 5 min baseline. Each slice received only a single drug exposure.

Stimulation of RMTg FOS Expression and Immunofluorescent Staining

In a separate set of experiments, animals were first prepared for *in vivo* recordings as described above. The i.p. injection of (+) methamphetamine hydrochloride (10 mg/kg in 0.9% saline; 1 ml/kg) given 2 h prior killing was used to produce Fos expression in the RMTg, as previously described by Jhou *et al* (2009b). See Supplementary Materials and Methods for detailed information.

Drugs

Morphine and cocaine hydrochloride were purchased from S.a.l.a.r.s (Como, Italy) and Akzo Pharmadivision Diosynth (Oss, Netherlands), respectively. Nicotine ((-)-nicotine hydrogen tartrate), mecamylamine, and (+) methamphetamine hydrochloride were purchased from Sigma (Milano, Italy). WIN, methyllycaconitine, and AM281 were purchased from Tocris (Bristol, UK). Naloxone was purchased from RBI (Natick, MA). SR141716A was a generous gift of Sanofi-Aventis Recherche (Montpellier, France). For experiments *in vivo*, WIN and SR141716A were emulsified in 1% Tween 80, then diluted in saline, and sonicated. All other drugs were diluted in saline. Nicotine solution was adjusted to pH = 7.0 with NaOH. For experiments *in vitro*, all drugs were applied in known concentrations to the superfusion medium and, with the exception of WIN and AM281, were dissolved in saline. WIN and AM281 were dissolved in DMSO as stock concentrations and the final concentration of DMSO was <0.01%.

Statistical Analysis

Drug-induced changes in rate and regularity of action potential activity were calculated by averaging the effects after drug administration (2 min) and normalizing to the pre-drug baseline. All the numerical data are given as mean \pm SEM. Data were compared and analyzed by using two-way ANOVA for repeated measures (treatment \times time), or one-way ANOVA or Student's *t*-test for repeated measures, when appropriate. *Post hoc* multiple comparisons were made using the Dunnett's or Bonferroni's tests. Statistical analysis was performed by means of the Graphpad Prism software (La Jolla, CA). The significance level was established at $p < 0.05$.

RESULTS

Electrophysiological Characterization of RMTg Neurons

We recorded the spontaneous activity of single putative RMTg neurons ($n = 41$, from nine rats) in urethane-anesthetized rats. Relatively high spontaneous firing rate (> 10 Hz) and short (< 1.5 ms), biphasic action potential of RMTg cells recorded extracellularly were consistent with those recently

described in behaving rats (Jhou *et al*, 2009a). The action potential waveform of RMTg neurons ($n=41$), filtered using standard bandpass settings of 1–3 kHz, was characterized by an initial negative phase followed by a positive one (see Figure 1a). The mean duration from the start to the positive trough was 1.26 ± 0.04 ms (range 0.90–1.49 ms, $n=41$). The width of the neuronal action potentials was longer in our study when compared with that of Jhou *et al* (2009a) because of the difference in the experimental conditions (anesthetized *vs* behaving rats, filtering parameters). In general, RMTg neurons fired regularly at an average basal rate of 15.5 ± 1.0 Hz ($n=41$) (Figure 1a). The regularity of firing was quantified by the CV of interspike intervals (mean CV = $36.8 \pm 3.3\%$, $n=41$) (see Material and Methods for CV detail). A typical interspike interval histogram showing the relatively constant interspike intervals, and their unimodal distribution peaking at around 50 ms, is shown in Figure 1a.

All *in vitro* data presented were obtained from cells ($n=57$) located within the RMTg, identified in the horizontal slice as the region posterior (~ 1 mm) to the VTA (Figure 1b), which is in turn placed medially to the medial terminal nucleus of the accessory optic tract (MT)

and laterally to the interpeduncular fossa (Paxinos and Watson, 2007). Under current-clamp mode in a whole-cell configuration, all of the neurons recorded ($n=22$) were spontaneously active with a mean firing rate of 4.7 ± 0.3 Hz within a range of 3–9 Hz (Figure 1c). The estimated resting membrane potential was -44.5 ± 9.9 mV, and putative RMTg cells fired short-duration spikes (mean width at threshold: 1.77 ± 0.01 ms), whose amplitude and input resistance were 65.0 ± 0.8 mV and 304 ± 37 M Ω , respectively. These electrophysiological features are similar to those described for GABA neurons of the neighbor pars reticulata of the substantia nigra recorded under the same conditions (Atherton and Bevan, 2005). EPSCs were evoked by repetitively stimulating the afferents (duration 50 μ s, frequency 0.1 Hz, intensity 0.01–0.30 mA) with a stimulating electrode that was placed rostro-laterally (~ 150 μ m) from the recording electrode (Figure 1b), and pharmacologically isolated by continuous perfusion of the GABA_A antagonist picrotoxin (100 μ M). Bath application of 10 μ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione completely suppressed these currents (Figure 1c), indicating that they are AMPA-mediated EPSCs. EPSCs had a half-rise time of 1.36 ± 0.20 ms ($n=35$) and a decay time constant of

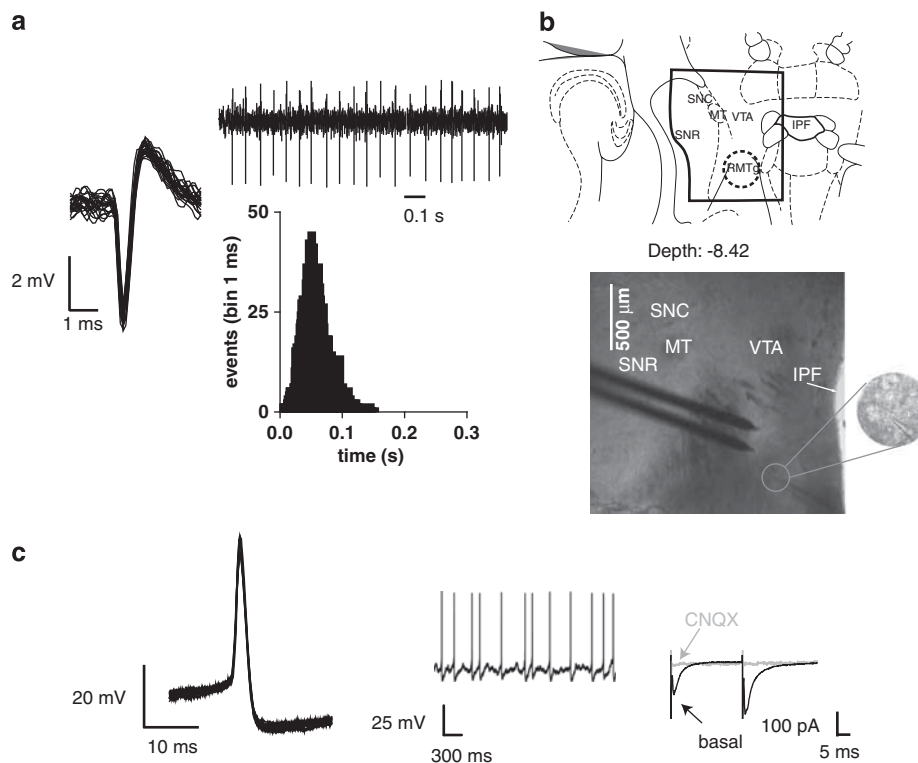


Figure 1 Characterization of neurons in the rostromedial tegmental nucleus (RMTg). (a) Traces illustrating representative extracellular recordings of a putative GABA neuron in the RMTg of an anesthetized rat. The left trace shows typical superimposed spike waveforms characterized by an initial negative deflection followed by a positive phase. The right trace shows the typical fast firing rate and regular pattern of an RMTg neuron. The representative interspike interval histogram shows the regularity of discharge pattern. (b) Identification of RMTg in the horizontal section in the brain slice preparation. The RMTg was identified as the region posterior to the ventral tegmental area (VTA), which is located medially to the medial terminal nucleus of the accessory optic tract (MT) and laterally to the interpeduncular fossa (IPF). The stimulating electrode is placed rostro-laterally to the recording electrode (at a distance of ~ 150 μ m), whose position is posterior to the VTA (at a distance of ~ 1 mm). A recorded putative RMTg neuron is visualized in the inset. SNC, substantia nigra pars compacta, SNR, substantia nigra pars reticulata. The number indicates the ventral coordinate with reference to the horizontal plane passing through the skull surface at bregma, as in Paxinos and Watson (2007). (c) The electrophysiological properties exhibited by the neuron in (b) were similar to all of the neurons recorded in the study. RMTg cell physiology includes short-duration spikes (left panel, superimposed traces), regular spontaneous activity at rest (middle panel). The right panel displays typical whole-cell patch-clamp recordings and shows that bath application of 10 μ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) completely suppressed evoked postsynaptic currents (EPSCs) when cells are held at -70 mV, indicating that they are AMPA mediated. Traces show paired EPSCs from a typical experiment, before (basal, black line) and during superfusion of CNQX (gray line).

4.71 ± 0.06 ms ($n = 35$). Although we cannot identify definitively the sources of excitatory afferents in this slice preparation, we can assume that most of the rostral inputs electrically stimulated in our preparation are presumably originating from the LHB, given that it is one of the major excitatory sources to the RMTg passing through the VTA (Jhou et al, 2009a).

Jhou et al (2009a) recently showed that aversive stimuli induce Fos expression in VTA-projecting RMTg neurons, and phasically stimulate their electrical activity in behaving rats. Notably, a substantial number of VTA-projecting RMTg cells receive a major afferent from the LHB (Jhou et al, 2009b), thus corroborating the idea that RMTg might signal aversive events and inhibit midbrain DA neurons. Hence, *in vivo* we first tested the responses of putative RMTg neurons to a standard aversive somatosensory stimulus (hindpaw mechanical stimulation), which is known to exceed the threshold of pain in freely moving animals (Cahusac et al, 1990).

Following 2–3 min of stable baseline firing rate, a brief (~ 2 –4 s) pinch was applied to the hindpaw ipsilateral to the recording site and the response analyzed during the 5 s after stimulus onset (Figure 2a). In agreement with recent data (Jhou et al, 2009a), we found that a majority (73.2%, 30 out of 41) of putative RMTg neurons were significantly stimulated by paw pinch. The overall response of RMTg neuronal population to the pinch stimulus is illustrated in Figure 2a: phasic excitation peaked at around 2 s after the onset of the paw pinch ($237.3 \pm 40.9\%$ of baseline firing rate;

$n = 12$; $F_{13,43} = 6.7$; $p < 0.0001$; one-way ANOVA and Dunnett's test).

We next examined the response of putative RMTg neurons to electrical stimulation of the LHB. Single-pulse stimulation (0.5 mA, 0.5 ms, 1 Hz) of the LHB enhanced spiking activity in 46.3% (19/41) of RMTg neurons sampled with a mean onset latency of 5.5 ± 0.3 ms after current ejection (Figure 2b). The majority (15 out of 19) of RMTg neurons responding to LHB stimulation were also 'pinch excited.' The remaining (22 out of 41) cells tested failed to respond to LHB stimulation.

Notably, Ji and Shepard (2007) reported that LHB stimulation transiently suppressed the activity of 97% of midbrain DA neurons through a GABA_A receptor-mediated mechanism. This inhibition unlikely is monosynaptic, being relayed by GABA neurons in the RMTg, which receive a major LHB input, and heavily project to midbrain DA neurons (see Jhou et al, 2009b). To investigate this possibility, in a separate series of experiments, the effect of RMTg stimulation on the spontaneous firing rate of DA neurons in the VTA was examined. As expected, single-pulse electrical stimulation (0.5 mA, 0.5 ms, 1 Hz) of the RMTg resulted in a short term, though complete, suppression of VTA DA neuron activity (Figure 2c). Peri-stimulus histograms and CUMSUM plots showing the typical responses of these cells to a 0.5 mA current pulse are illustrated in Figure 2c. The duration of inhibition averaged 124.8 ± 13.2 ms ($n = 10$) (see Figure 2c). The stimulating and recording sites were verified to be within the RMTg and the VTA, respectively (Paxinos and Watson, 2007).

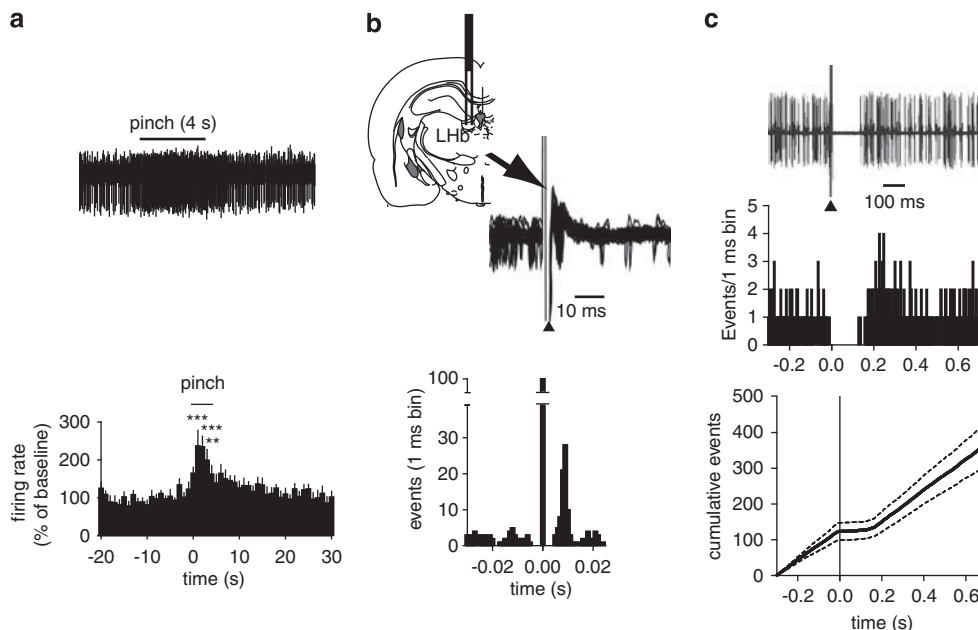


Figure 2 Neurons in the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) exhibit a fast and phasic increase in firing rate after paw pinch, are excited by lateral habenula, and inhibit dopamine (DA) neurons. (a) Typical recording from a putative RMTg neuron showing the rapid and phasic increase in firing activity during paw pinch. The average rate histogram (1 s bin) is shown ($n = 12$) ($***p < 0.001$, $**p < 0.01$; one-way ANOVA and Dunnett's test). (b) Superimposed traces acquired from a digital storage oscilloscope showing a relatively constant latency of the orthodromic responses of RMTg neuron after LHB stimulation (top). The arrowhead indicates the artifacts produced by LHB stimulation. The coronal plate indicates the position of the stimulating electrode. Representative peri-stimulus time-histogram displaying the typical response of a recorded putative RMTg neuron during LHB stimulation (bottom). (c) Traces acquired from a digital oscilloscope (top) and peri-stimulus time histogram of the same cell (middle), comprising 100 consecutive sweeps, showing that RMTg stimulation induces a complete inhibition of discharge activity of a VTA DA neuron (top) for ~ 100 ms. Stimuli consisted of rectangular current pulses (0.5 mA, 0.5 ms) delivered 1 s after the start of each sweep (middle). Graph showing the average CUMSUM plots of 10 VTA DA neurons under RMTg stimulation (bottom). The graph was generated by adding the contents of consecutive bins in the corresponding peri-stimulus time histograms to create a cumulative total average and SEM of the number of spikes recorded across trials.

Methamphetamine-Induced Fos Expression Within RMTg Recording Sites

The RMTg is a newly characterized brain region and poorly defined anatomically. Although we selected for our experiments only cells fulfilling precise electrophysiological criteria, the correct localization of recording sites is crucial. Figure 3 shows that these sites were localized within the RMTg region as recently defined (Jhou *et al*, 2009a,b; Kaufling *et al*, 2009) (Figure 3a and b). In addition, the RMTg is reliably identified by accumulation of Fos-immunoreactive (Fos-IR) neurons following pharmacological stimuli, such as an acute methamphetamine administration (Jhou *et al*, 2009b). To verify that the recording sites (marked with Pontamine sky blue) were located in the RMTg, we carried out electrophysiological experiments as described above and thereafter induced Fos expression by injecting methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*, 2 h before killing). We used a specific antibody for c-Fos raised against a synthetic peptide corresponding to amino acids 4–17 of human c-Fos, which reacts with rat Fos proteins but not with Jun protein. As previously described (Jhou *et al*, 2009b; Kaufling *et al*, 2009), 2 h after methamphetamine administration, Fos-IR cells were found in the RMTg, which resides within and ventral to the superior cerebellar decussation (xscp) (Figure 3). As shown in Figure 3c and d, clusters of Fos-IR neurons are observed in the RMTg, symmetrically to the electrophysiological recording site

marked with Pontamine sky blue (which appears red at wavelength 594–617 nm).

Effects of Drugs of Abuse on RMTg Neurons

The firing rate of GABA neurons within the RMTg is inhibited by natural rewards like food or reward predictive stimuli, and, conversely, stimulated by aversive stimuli (Jhou *et al*, 2009a). However, it is not known whether exposure to drugs of abuse influence RMTg neuronal activity. Ergo, we investigated the electrophysiological effects of four major addicting drugs (ie morphine, cocaine, the cannabinoid receptor agonist WIN, and nicotine) on putative RMTg neurons both *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, all neurons were identified by their excitatory responses to both electrical stimulation of the Lhb and paw pinch. Only cells whose correct localization was confirmed histologically were included in the study.

Morphine. The RMTg is immunoreactive against μ -opioid receptors (Jhou *et al*, 2009b). Accordingly, rats self-administer the μ -opioid receptor agonist endomorphin-1 into the RMTg, but not into the regions dorsal, ventral, or lateral to it (Jhou *et al*, 2009c). Therefore, we first assessed if the μ -opioid receptor agonist morphine modulates the neuronal activity of RMTg neurons. We selected seven neurons that responded to both Lhb stimulation and paw pinch. Systemic administration of morphine (4 mg/kg, *i.v.*)

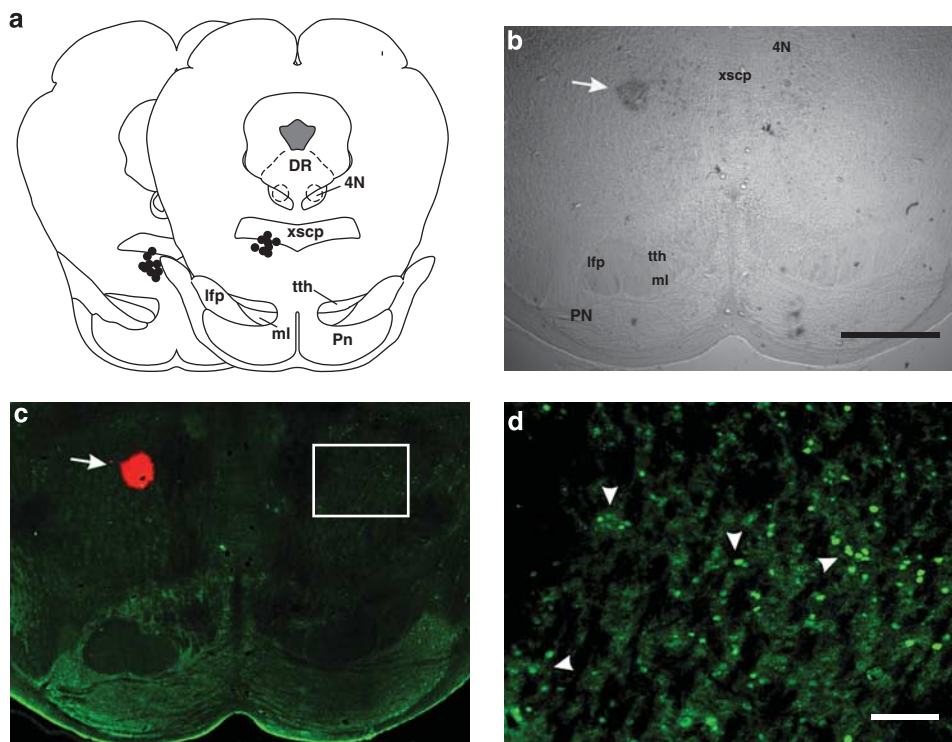


Figure 3 Methamphetamine-induced Fos immunoreactivity within the rostromedial tegmental nucleus (RMTg). The rat from which the brain sections were taken received an injection of methamphetamine (10 mg/kg, *i.p.*) 2 h prior to killing. (a) Schematic redrawing of coronal plates (based on Paxinos and Watson, 2007) including the RMTg (bregma AP–7.2 and –7.44) showing Pontamine sky blue labeling sites (black dots). (b) Microphotograph of a transmitted light image showing the Pontamine sky blue dye (arrow). (c) This section shows Fos immunostaining (green). The arrow indicates the dye, which appears red at wavelength 594–617 nm. (d) Higher magnification of the white-boxed area in (c) revealing Fos-positive nuclei inside the RMTg (arrowheads). 4N, trochlear nucleus; DR, dorsal raphe nuclei; lfp, longitudinal fasciculus of the pons; ml, medial lemniscus; Pn, pontine nuclei; tth, trigeminothalamic tract; xscp, superior cerebellar peduncle decussation; scale bars, 1000 μ m in (b–c); 100 μ m in (d).

strongly inhibited the spontaneous firing rate of putative RMTg neurons ($49.7 \pm 8.6\%$ of baseline; $n = 7$; $F_{5,30} = 13.02$, $p < 0.0001$; one-way ANOVA and Dunnett's test) (Figure 4a and c). This effect required the activation of μ -opioid receptors, as pretreatment with the μ -opioid receptor antagonist naloxone (0.1 mg/kg , i.v., 4 min before morphine) fully prevented morphine-induced suppression of RMTg neuron activity ($103.5 \pm 7.2\%$ of baseline level; $n = 4$; $F_{1,45} = 14.55$; $p < 0.01$ vs morphine; two-way ANOVA and Bonferroni's test) (Figure 4b and c). Morphine did not significantly affect firing regularity (basal CV: $45.1 \pm 9.8\%$; morphine CV: $46.3 \pm 7.2\%$; $p > 0.05$, Student's t -test).

To investigate whether or not μ -opioid receptor activation might affect excitatory synaptic transmission onto putative RMTg cells *in vitro*, we measured EPSCs recorded from these neurons while holding them in a voltage-clamp mode at -70 mV . Bath application of morphine at a concentration of $1 \mu\text{M}$ (3 min) significantly reduced EPSCs (by $40.0 \pm 15.0\%$; $n = 5$; $F_{18,72} = 3.417$; $p = 0.0001$; one-way ANOVA for repeated measures) (Figure 4d). Morphine did not significantly affect either the mean value of the decay time constant (5.06 ± 0.10 and $5.14 \pm 0.05 \text{ ms}$ in the absence and presence of morphine, respectively) or the holding current ($5.56 \pm 3.01 \text{ pA}$). However, a decreased input resistance (from 0.42 ± 0.05 to $0.32 \pm 0.06 \text{ G}\Omega$; paired t -test, $p < 0.05$) was detected, which might contribute to the reduction in EPSC amplitude. The effect of morphine was reversible on wash out, and it was fully abolished in the presence of naloxone ($0.1 \mu\text{M}$; $n = 5$; $F_{1,152} = 23.77$; $p = 0.0012$; two-way ANOVA) (Figure 4e). The reduction of EPSC amplitude observed could be explained by either a presynaptic effect on glutamate release, a postsynaptic change of the AMPA receptors, or a combination of these. We, therefore, measured the paired-pulse ratio, whose modifications are considered to reflect changes in transmitter release (Melis *et al*, 2002; Nie *et al*, 2004). Morphine did not modify the paired-pulse ratio (EPSC2/EPSC1 from 0.88 ± 0.10 to 0.91 ± 0.10 ; $n = 5$, paired t -test $t = 0.20$; $p = 0.849$) (Figure 4f), suggesting that it might reduce EPSC amplitude at a postsynaptic site.

Cocaine. GABA neurons in the RMTg have been shown to display strong Fos, FosB, and ΔFosB activation after both acute and chronic exposure to psychostimulants (Colussi-Mas *et al*, 2007; Geisler *et al*, 2008; Jhou *et al*, 2009b; Kaufling *et al*, 2009; Perrotti *et al*, 2005), thus suggesting a potential role for this area in psychostimulant reward-related effects. Therefore, we investigated the possibility that cocaine might influence RMTg neuron discharge activity. We recorded seven cells identified by both their excitatory response to LHB stimulation and paw pinch. Acute injection of cocaine (1 mg/kg , i.v.) caused a transient depression of firing rate of putative RMTg neurons ($82.1 \pm 6.0\%$ of baseline level; $n = 7$; $F_{5,30} = 2.58$; $p < 0.05$; one-way ANOVA and Dunnett's test) (Figure 5a and b). The inhibitory effect of cocaine was less pronounced and shorter than the one induced by morphine. There was also no significant change in CV after the psychostimulant administration (basal CV: $30.9 \pm 4.6\%$; cocaine CV: $34.3 \pm 6.2\%$; $p > 0.05$, Student's t -test).

As cocaine-induced plasticity at excitatory synapses in the VTA has a crucial function in those adaptations contributing

and promoting addictive behaviors (Chen *et al*, 2010), we decided to examine whether it could trigger similar changes in the RMTg. Bath application of cocaine ($1 \mu\text{M}$, 5 min) caused no change in all measured parameters: in fact, neither EPSC amplitude ($108.0 \pm 16.7\%$ of baseline; $n = 5$; $F_{18,72} = 0.80$; $p = 0.68$; one-way ANOVA) (Figure 5c and d) nor paired-pulse ratio (EPSC2/EPSC1 from 0.97 ± 0.10 to 1.03 ± 0.10 ; $n = 5$, $t = 0.5583$; $p = 0.6$; paired t -test) were affected. In addition, no changes were detected in either mean value of the decay time constant (being 5.03 ± 0.08 and $4.87 \pm 0.05 \text{ ms}$ in the absence and presence of cocaine, respectively) or the holding current (being the change of $-0.76 \pm 4.15 \text{ pA}$) or input resistance (from 0.39 ± 0.05 to $0.48 \pm 0.1 \text{ G}\Omega$). This lack of effect could be ascribed to the specificity of acute effect of cocaine on DA neurons, which appears to be merely on NMDA-mediated EPSCs (Schilstrom *et al*, 2006).

WIN55212-2. CB1 receptors are widely distributed in the central nervous system, being mostly located in presynaptic terminals (Freund *et al*, 2003) in which they modulate both inhibitory and excitatory neurotransmission in neuronal subpopulations relevant to responses to rewarding and aversive stimuli (reviewed in Moreira and Lutz, 2008). Moreover, as DA neurons are excited by cannabinoids (French *et al*, 1997; Gessa *et al*, 1998), we hypothesized that inhibition of RMTg neurons could contribute to this effect. Hence, we thought to examine the effect of acute exposure to the CB1 receptor agonist WIN on seven putative RMTg neurons, which were identified by their excitatory responses to both LHB stimulation and paw pinch. Similarly to morphine, WIN (0.5 mg/kg , i.v.) produced a profound and long-lasting decrease in discharge frequency ($46.9 \pm 6.7\%$ of baseline level; $n = 7$; $F_{5,30} = 19.44$; $p < 0.0001$; one-way ANOVA and Dunnett's test) (Figure 6a and c), whereas no considerable changes were observed in the regularity of firing (basal CV: $31.0 \pm 5.0\%$; WIN CV: $38.5 \pm 3.6\%$; $p > 0.05$, Student's t -test).

To clarify the involvement of CB1 receptors in this effect, we administered the CB1 receptor antagonist SR141716A (SR, 0.5 mg/kg , i.v.) 4 min before WIN (Figure 6b and c). SR, while *per se* ineffective, fully prevented WIN-induced depression of putative RMTg neurons ($102.6 \pm 3.1\%$ of baseline level; $n = 4$; $F_{1,45} = 16.08$; $p < 0.01$; two-way ANOVA and Bonferroni's test) (Figure 6b and c).

As CB1 receptor activation by endogenous ligands has been shown to modulate synaptic transmission in many brain regions (Kano *et al*, 2009), we examined whether WIN would affect excitatory transmission onto putative RMTg cells. WIN ($1 \mu\text{M}$, 5 min) significantly and irreversibly reduced EPSC amplitude (by $30.0 \pm 4.0\%$; $n = 5$; $F_{18,90} = 3.62$; $p < 0.0001$; one-way ANOVA) (Figure 6d). Probably because of its high lipophilicity, WIN effect did not wash out. However, when it was co-applied with the potent and selective CB1 receptor antagonist AM281 ($0.5 \mu\text{M}$), WIN-induced inhibition of EPSC amplitude was fully prevented ($n = 5$; $F_{1,171} = 5.30$; $p < 0.05$; two-way ANOVA) (Figure 6e). WIN did not affect either the mean value of the decay time constant (being 4.66 ± 0.2 and $4.86 \pm 0.3 \text{ ms}$ in the absence and presence of WIN, respectively) or the holding current (being the change of

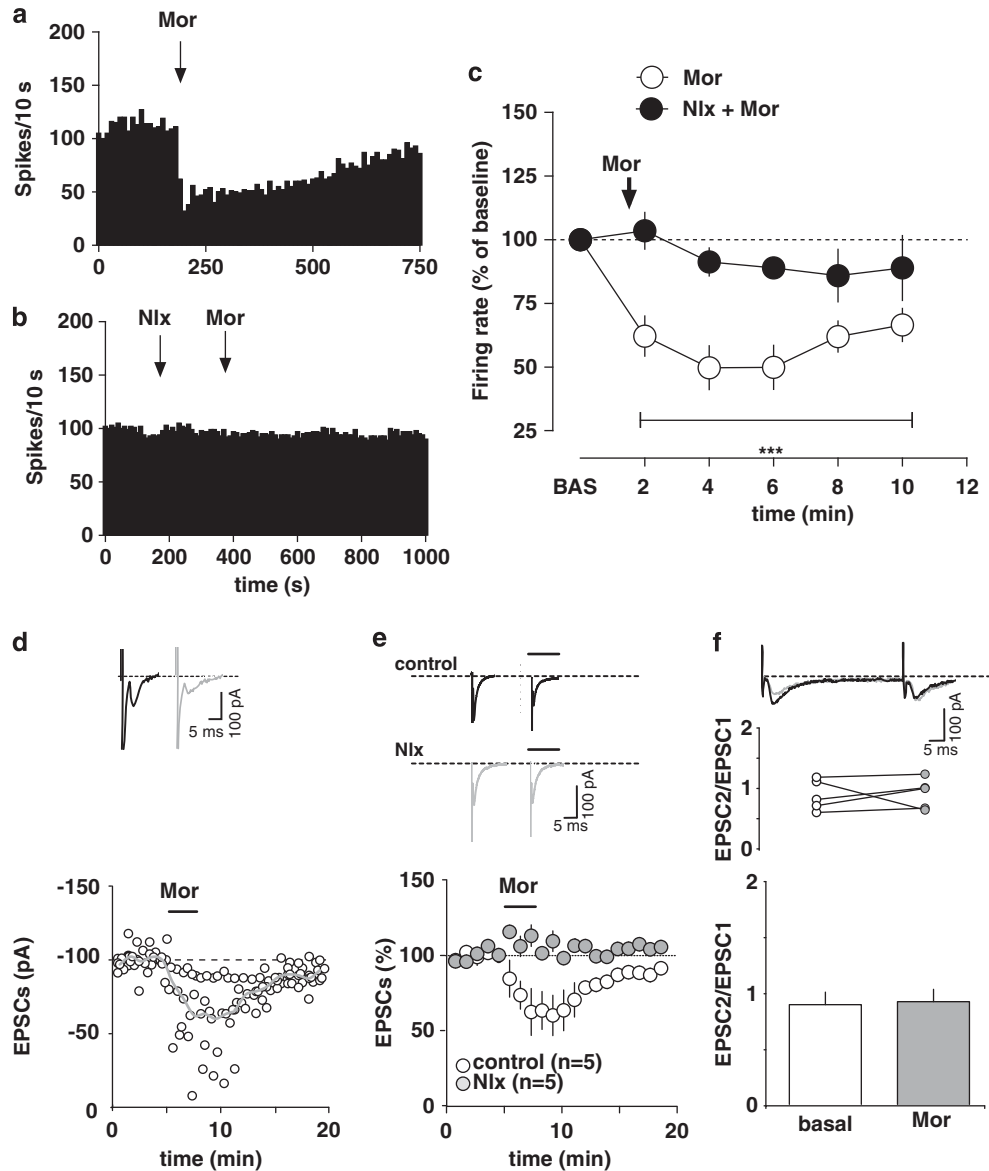


Figure 4 Effects of morphine on rostromedial tegmental nucleus (RMTg) neurons. (a) Representative firing rate histogram showing the inhibitory effects of i.v. morphine (Mor, 4 mg/kg injected at arrow) on discharge activity of an individual putative RMTg neuron. (b) Representative firing rate histogram showing that naloxone (Nlx, 0.1 mg/kg, i.v. injected 4 min before morphine) fully prevents morphine-induced inhibition of firing rate of an RMTg neuron. (c) Graph illustrating the time course of morphine's effects (4 mg/kg, i.v.) on firing rate of putative RMTg neurons with and without naloxone (0.1 mg/kg, i.v.) pretreatment. Naloxone blocked the inhibition of RMTg neurons induced by morphine (arrow). The results are means with vertical bars representing the SEM of firing rate expressed as a percentage of the baseline (BAS). *** $p < 0.001$ vs baseline, one-way ANOVA and Dunnett's test. (d) Morphine induces inhibition of glutamatergic synaptic transmission in rat RMTg cells. A typical whole-cell patch-clamp recording showing that bath application of morphine (1 μ M) inhibits EPSC amplitude, when cells are held at -70 mV. The gray line represents mean EPSC amplitude. The inset shows single EPSC from a typical experiment, before (black line) and during (gray line) superfusion of morphine. (e) Morphine reduces EPSC amplitude through activation of μ -opioid receptors. All data are normalized to the respective baseline (5 min of baseline). Black bar shows time of superfusion of morphine in the presence (gray circles) and absence (open circles) of the μ -opioid antagonist naloxone (100 nM). SEM bars are smaller than symbols in some cases. The inset shows 12-trace averages of EPSCs in the absence (black line) and presence (gray line) of naloxone. Black bars represent time of morphine application. (f) Morphine does not change the paired-pulse ratio of EPSCs. The top graph plots the paired-pulse ratio for each of the experiments in (e) before (open circles) and during (gray circles) the application of morphine, while the bottom graph plots the averaged paired-pulse ratio in a bar graph form. Representative traces are shown in the inset.

4.67 ± 2.60 pA) or the input resistance (from 0.49 ± 0.05 to 0.4 ± 0.05 G Ω). As probability of release is inversely related to paired-pulse ratio, if WIN decreases EPSC amplitude through activation of presynaptic CB1 receptors, one would expect an increased paired-pulse ratio in the presence of this drug. WIN-induced decrease of EPSC amplitude was accompanied by an increased paired-pulse ratio (EPSC2/

EPSC1 from 0.95 ± 0.05 to 1.45 ± 0.20 ; $n = 5$; $t = 3.039$; $p = 0.019$; paired t -test) (Figure 6f), thus suggesting that WIN reduced probability of glutamate release via activation of presynaptic CB1 receptors.

Nicotine. Acute injections of nicotine induce c-Fos expression specifically in non-DA neurons of the most caudal tier

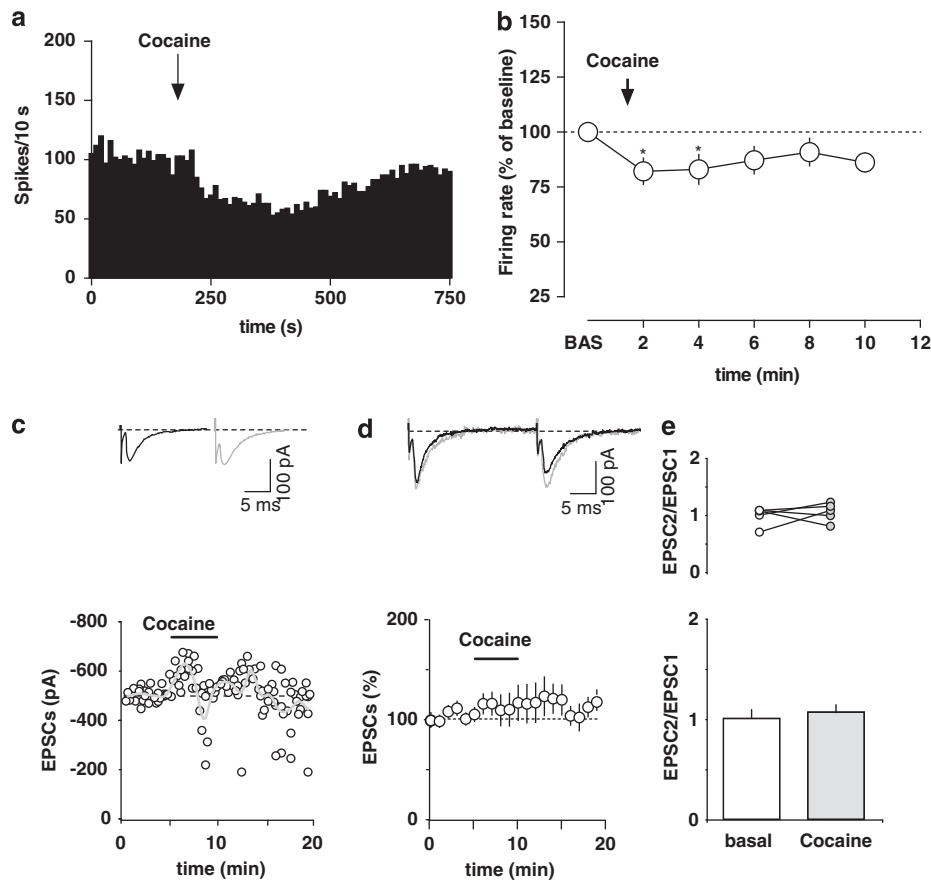


Figure 5 Cocaine's effects on rostromedial tegmental nucleus (RMTg) neurons. (a) Representative rate histogram illustrating the inhibition of firing rate of a putative RMTg neuron after cocaine administration (1 mg/kg injected i.v. at arrow). (b) Graph showing the time course of cocaine's effects (1 mg/kg, i.v.) on firing rate of putative RMTg neurons. The results are means with vertical bars representing the SEM of firing rate expressed as a percentage of baseline (BAS). * $p < 0.05$ vs baseline, one-way ANOVA and Dunnett's test. (c) Cocaine does not affect glutamatergic synaptic transmission in rat putative RMTg cells. A typical whole-cell patch-clamp recording showing the effect of bath application of cocaine (1 μ M) on EPSC amplitude, when cells are held at -70 mV. The gray line represents mean EPSC amplitude. The inset shows single EPSC from a typical experiment, before (black line) and during (gray line) application of cocaine. (d) Cocaine effect on EPSC amplitude. All data are normalized to the respective baseline (5 min of baseline). Black bar shows time of superfusion of cocaine. SEM bars are smaller than symbols in some cases. The inset shows 12-trace averages of EPSCs in the absence (black line) and presence (gray line) of cocaine. Black bars represent time of cocaine application. (e) Cocaine does not change the paired-pulse ratio of EPSCs. The top graph plots the paired-pulse ratio for each of the experiments in (d) before (open circles) and during (gray circles) the application of cocaine, while the bottom graph plots the averaged paired-pulse ratio in a bar graph form. Representative traces are shown in the inset. Lines (black) represent EPSC amplitude before and during (gray line) application of cocaine.

of the rat VTA (Pang *et al*, 1993). Moreover, agonists at nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) have been reported to be more readily self-administered into the posterior than anterior VTA (Ikemoto *et al*, 2006). Thus, we next tested whether nicotine would affect the spontaneous activity of RMTg cells. We recorded seven putative RMTg neurons previously identified by both LHB stimulation and paw pinch. After 2–3 min of stable baseline activity, we administered nicotine (0.2 mg/kg, i.v.) (Figure 7a and c). Nicotine caused a robust stimulation of firing rate ($198.8 \pm 29.2\%$ of baseline level; $n = 7$; $F_{5,30} = 6.63$; $p < 0.001$; one-way ANOVA and Dunnett's test) (Figure 7c), without significantly affecting spiking regularity (basal CV: $34.1 \pm 3.8\%$; nicotine CV: $33.0 \pm 3.8\%$; $p > 0.05$, Student's *t*-test). We then asked if the nAChR antagonist mecamylamine (2 mg/kg, i.v.) would antagonize nicotine's actions on putative RMTg cells. Administration of mecamylamine 4 min before nicotine did not alter spontaneous activity, but completely prevented nicotine-induced excitation ($100.7 \pm 10.7\%$ of

baseline level; $n = 4$; $F_{1,45} = 18.98$; $p < 0.01$; two-way ANOVA and Bonferroni's test) (Figure 7b and c), thus supporting the role of nAChRs in the observed effects.

In vitro, nicotine (1 μ M, 2 min) also produced a long-lasting enhancement of EPSC amplitude (by $40.0 \pm 7.0\%$ in the presence of nicotine; $n = 5$; $F_{18,72} = 10.13$; $p < 0.0001$; one-way ANOVA) (Figure 7d). This effect was accompanied by an increased mean value of decay time constant (from 4.5 ± 0.1 to 5.8 ± 0.2 ms; $p = 0.005$; paired *t*-test), which corresponds well with the increased EPSC amplitude. We also observed that the decay time constant of EPSCs showed a positive correlation with peak amplitude (Figure 7d). This correlation was presumably not filtered by properties of the cell membrane, as neither the holding current (being 44.2 ± 13.2 and 47.9 ± 14.6 pA for baseline and nicotine, respectively) nor the input resistance (from 0.34 ± 0.1 to 0.38 ± 0.1 M Ω) changed during nicotine application. The positive relationship between the decay time constant and the peak amplitude might suggest a dependency of

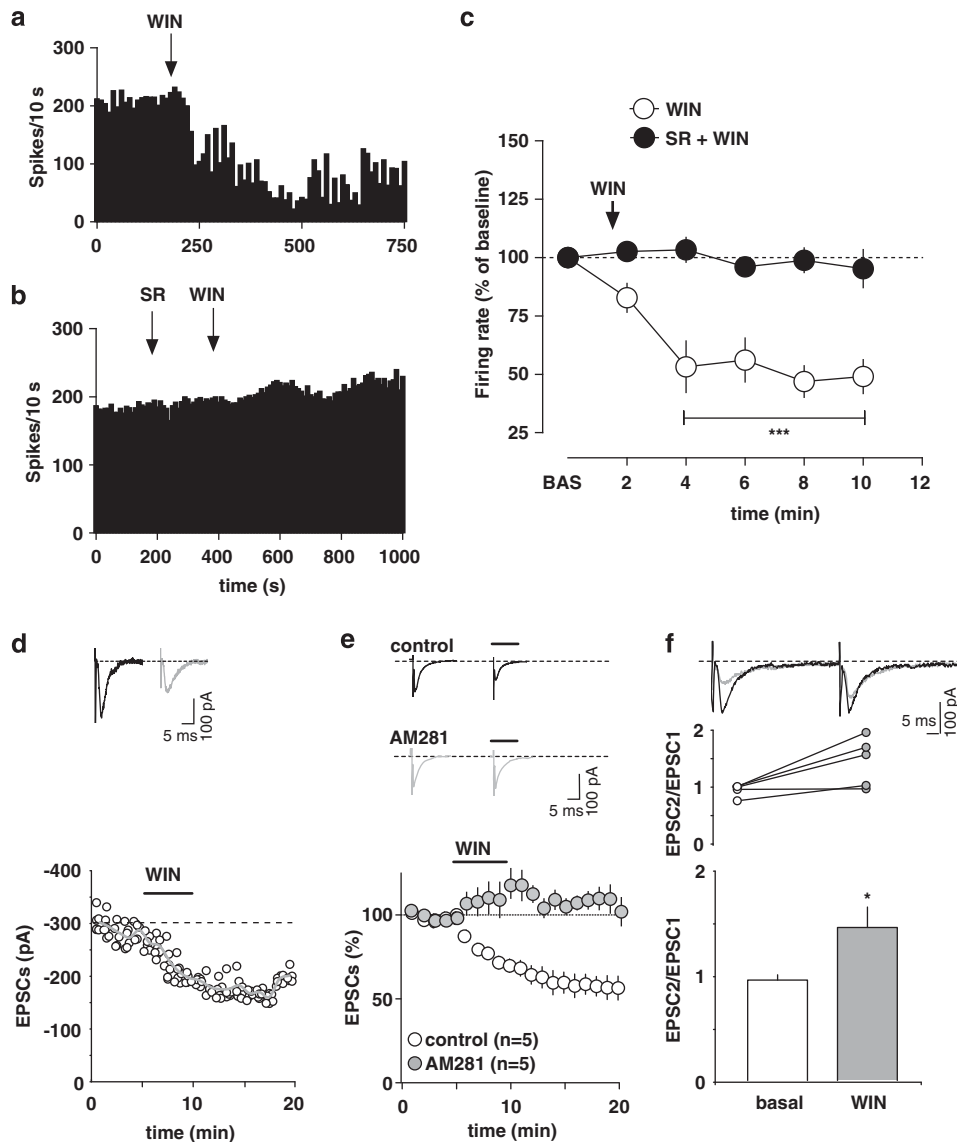


Figure 6 Responses of rostromedial tegmental nucleus (RMTg) neurons to the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 (WIN). (a) Typical firing rate histogram showing the inhibitory response of a putative RMTg neuron after WIN (0.5 mg/kg, *i.v.*) administration (arrow). (b) Representative rate histogram showing that the CBI antagonist SR141716A (SR, 0.5 mg/kg, injected *i.v.* 4 min before WIN, at arrows) blocks WIN-induced inhibition of firing rate. (c) Graph showing the time course of WIN-induced inhibition of putative RMTg neurons, and that this inhibition by WIN was prevented by the administration (arrow) of SR (0.5 mg/kg, *i.v.*). The results are means with vertical bars representing the SEM of firing rate expressed as a percentage of baseline (BAS). *** $p < 0.0001$ vs baseline, one-way ANOVA and Dunnett's test. (d) WIN inhibits glutamatergic synaptic transmission in rat putative RMTg cells. A typical whole-cell patch-clamp recording showing that bath application of WIN (1 μ M) inhibits EPSC amplitude, when cells are held at -70 mV. The gray line represents mean EPSC amplitude. The inset shows single EPSC from a typical experiment, before (black line) and during (gray line) perfusion of WIN. (e) WIN reduces EPSC amplitude through activation of CBI receptors. All data are normalized to the respective baseline (5 min of baseline). Black bar shows time of superfusion of WIN in the presence (gray circles) and absence (open circles) of the CBI receptor antagonist AM281 (500 nM). SEM bars are smaller than symbols in some cases. The inset shows 12-trace averages of EPSCs in the absence (black line) and presence (gray line) of AM281. Black bars represent time of WIN application. (f) WIN enhances the paired-pulse ratio of EPSCs, producing paired-pulse facilitation. The top graph plots the paired-pulse ratio for each of the experiments in (e) before (open circles) and during (gray circles) the application of WIN, while the bottom graph plots the averaged paired-pulse ratio in a bar graph form. Representative traces are shown in the inset, in which the EPSCs are represented before (black lines) and during WIN (gray lines) application. * $p < 0.05$, Student's *t*-test.

amplitude on the rate of glutamate diffusion from the terminal to the synaptic cleft (Glavinovic and Rabie, 1998; Hirasawa *et al*, 2001). Notably, nicotine-induced potentiation of EPSC amplitude was sensitive to methyllycaconitine (5 nM), an antagonist of $\alpha 7$ -subtype nAChR subunit ($n = 5$; $F_{1,152} = 17.87$; $p = 0.0029$; two-way ANOVA) (Figure 7e). As nicotine-induced enhancement of EPSC amplitude is

associated with a decrease in the paired-pulse ratio (EPSC2/EPSC1 from 1.01 ± 0.07 to 0.82 ± 0.05 ; $n = 5$; $t = 2.45$; $p = 0.03$; paired *t*-test) (Figure 7f), altogether these data suggest that $\alpha 7$ subunits are the major components of nAChRs located on glutamatergic presynaptic terminals onto RMTg neurons, and might mediate the long-lasting excitation of putative RMTg neurons observed *in vivo*.

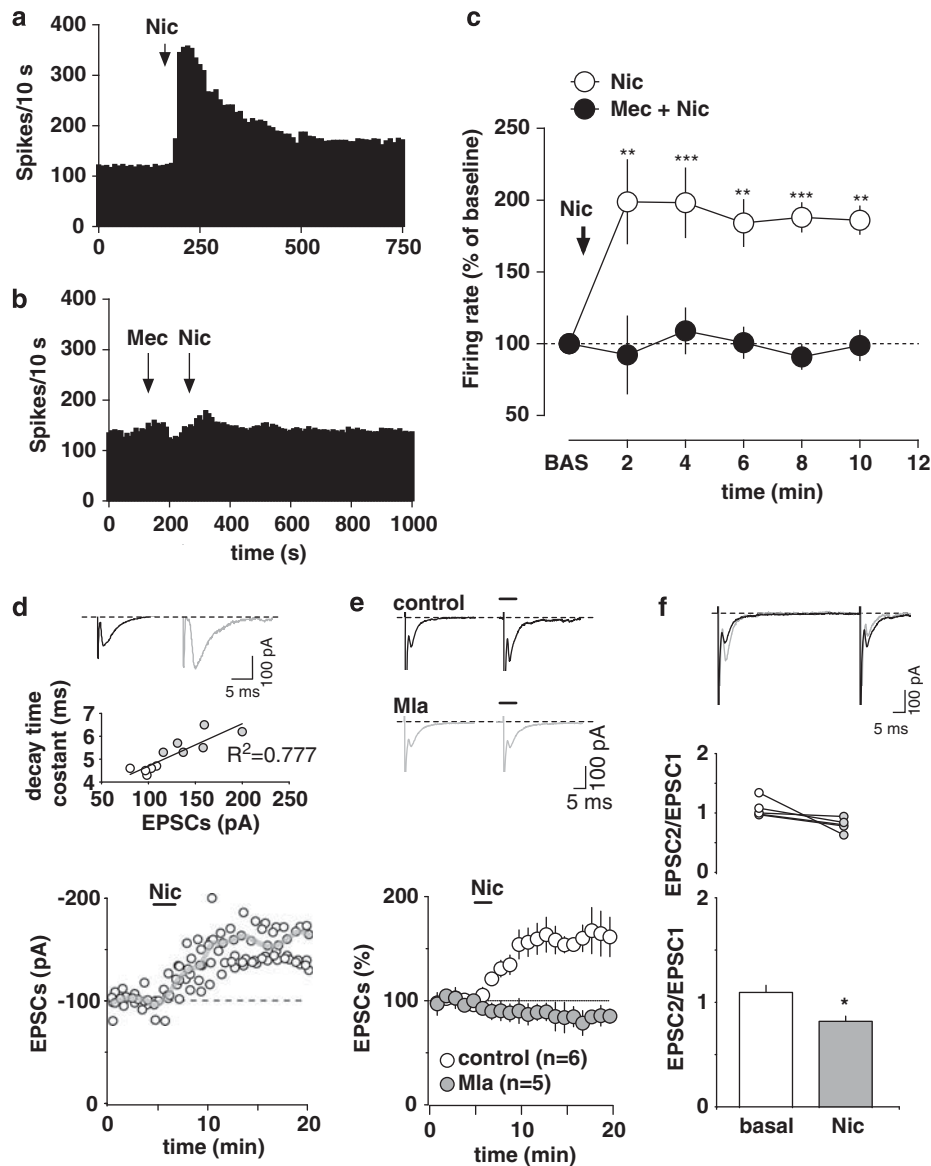


Figure 7 Rostromedial tegmental nucleus (RMTg) neurons are excited by nicotine. (a) Representative rate histogram showing that nicotine (Nic, 0.2 mg/kg, i.v., arrow) strongly excites firing activity of a putative RMTg neuron. (b) This example shows that the non-selective nicotinic receptor antagonist mecamylamine (Mec, 2 mg/kg, i.v. 4 min before nicotine, arrow) fully prevents the effects of nicotine. (c) Graph showing the time course of the stimulation of firing rate induced by nicotine. Mecamylamine pretreatment fully prevents nicotine-induced stimulation of firing rate. The results are means with vertical bars representing the SEM of firing rate expressed as a percentage of the baseline (BAS). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs baseline, one-way ANOVA and Dunnett's test. (d) Nicotine enhances glutamatergic synaptic transmission in rat putative RMTg cells. A typical whole-cell patch-clamp recording showing that bath application of nicotine (1 μ M; Nic) increases EPSC amplitude, when cells are held at -70 mV. The gray line represents mean EPSC amplitude. The inset shows single EPSC from a typical experiment, before (black line) and during (gray line) perfusion of nicotine. The graph shows that the decay time constant of EPSCs is positively correlates with peak amplitude. (e) Nicotine enhances EPSC amplitude through activation of $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors. All data are normalized to the respective baseline (5 min of baseline). Black bar shows time of superfusion of nicotine in the presence (gray circles) and absence (open circles) of the $\alpha 7$ -subunit receptor antagonist methyllycaconitine (5 nM; Mla). SEM bars are smaller than symbols in some cases. The inset shows 12-trace averages of EPSCs in the absence (black line) and presence (gray line) of Mla. Black bars represent time of nicotine application. (f) Nicotine reduces the paired-pulse ratio of EPSCs, producing paired-pulse depression. The top graph plots the paired-pulse ratio for each of the experiments in (e) before (open circles) and during (gray circles) the application of nicotine, while the bottom graph plots the averaged paired-pulse ratio in a bar graph form. Representative traces are shown in the inset, in which the EPSCs are represented before (black lines) and during nicotine (gray lines) application. * $p < 0.05$, Student's t -test.

DISCUSSION

Here, we studied putative RMTg neurons that were excited by LHB stimulation and aversive stimuli (eg paw pinch). Conversely, we show that VTA DA neurons are inhibited by RMTg stimulation. On these bases, we hypothesized that

these anatomical and functional aspects of RMTg neurons would be consistent with sensitivity to addicting drugs, which are known to interfere with reward and aversion mechanisms. Indeed, here we found that these cells, selected for their excitatory response to both LHB stimulation and a noxious stimulus, are inhibited by morphine, cocaine, and

the cannabinoid agonist WIN. In addition, patch-clamp experiments show that EPSCs recorded from putative RMTg neurons and evoked by stimulation of rostral fibers were unchanged by cocaine, whereas inhibited by both WIN and morphine, with presynaptic and postsynaptic mechanisms, respectively. Notably, we also found that nicotine exerts opposite effects to those of morphine and WIN, as it strongly enhances firing rate of putative RMTg neurons and persistently increases the magnitude of EPSCs. Accordingly, converging anatomical, physiological, and behavioral studies show that the RMTg encodes aversive stimuli similarly to the LHB and opposite to the VTA. RMTg neurons are considered as an intermediate site between the LHB, which sends an extensive excitatory innervation, and VTA DA neurons, which in response are uniformly inhibited.

The depressant effect of morphine on putative RMTg neurons is consistent with the finding that this nucleus displays immunoreactivity against μ -opioid receptors (Jhou et al, 2009b), and supports the hypothesis that opioids excite VTA DA neurons also by inhibiting RMTg neurons. Notably, RMTg cells exert a tonic inhibition on DA cells (Ikemoto, 2010). Consistently, rats will self-administer opioids into the RMTg, but not in the adjoining regions (Jhou et al, 2009c). Morphine also depressed EPSCs without changing the paired-pulse ratio, although decreasing the input resistance, thus suggesting that it does not affect the probability of glutamate release and that the site of action is at postsynaptic μ -opioid receptors. However, the presence of cesium in the recording pipette argues against activation of G-protein-coupled inward rectifier K^+ channels as contributing factors to the decreased input resistance (Davila et al, 2003; Lesage et al, 1995).

Differently from μ -opioid receptors, CB1 receptors in the CNS are mostly localized presynaptically on a large variety of axon terminals to suppress neurotransmitter release (Freund et al, 2003). It is not currently known whether CB1 receptors are localized within the RMTg. However, the LHB displays a relative abundance of CB1 mRNA, when compared with other thalamic nuclei (Matsuda et al, 1993), suggesting that CB1 receptors may be localized presynaptically at excitatory afferents in the RMTg to control glutamate release. Alternatively, CB1 receptors might also be located on axon terminals of output neurons of the peri-aqueductal gray, one of the major afferents to the RMTg (Jhou et al, 2009a). The observations that the CB1 agonist WIN depresses EPSC amplitude on putative RMTg neurons, induces a paired-pulse facilitation, and inhibits firing rate *in vivo* are consistent with a presynaptic locus of CB1 receptors, whose activation leads to a decreased probability of glutamate release. In addition, one can speculate that inhibition of RMTg neurons by WIN might be one of the mechanisms contributing to cannabinoid-induced excitation of DA neurons *in vivo* (French et al, 1997; Gessa et al, 1998).

Cocaine was shown to evoke Δ FosB expression on GABA neurons in the VTA tail (Perrotti et al, 2005), and this indicates that psychostimulants might affect DA neurons through the RMTg-VTA projection. Here, we confirmed the finding that methamphetamine induces Fos expression within RMTg. Prior studies show that psychostimulants activate RMTg Fos much more than in adjacent regions, but in our study, Fos levels detected in RMTg neurons do not

appear to be strikingly higher than surrounding areas. It must be pointed out that, differently from procedures for methamphetamine-induced Fos activation described in previous papers, here rats were further prepared for electrophysiological recordings with anesthesia, surgery, electrode insertion, and dye ejection. Those additional procedures might have interfered with Fos expression by increasing aspecific expression within surrounding areas.

Cocaine was found to depress firing rate of putative RMTg neurons *in vivo*. The mechanism underlying this effect remains to be established. As cocaine does not affect the magnitude of EPSC, and neither changes the paired-pulse ratio nor the membrane properties of these cells, we can only hypothesize that effects *in vivo* result from indirect actions of cocaine on RMTg neurons, possibly through a long synaptic loop, which does not directly involve effects on excitatory afferents from the LHB.

Differently from the other drugs studied here, nicotine induces a robust and persistent excitation on putative RMTg neuron firing rate and increases both EPSC amplitude and the mean value of the decay time constant, while decreases the paired-pulse ratio. Taken together, our findings are indicative of the enhancement of glutamate release from excitatory afferents likely induced by α 7-containing nAChRs located on presynaptic terminals. Habenular afferents are likely to express α 7-containing nAChRs, given that intense *in situ* hybridization for transcripts encoding these receptors was detected in the habenula (Seguela et al, 1993). We cannot exclude, however, that nicotine excites RMTg neurons also by acting at somatodendritic nAChRs. Hence, subcellular localization of nAChRs is relevant for the functional impact of their activation: nAChRs are expressed both on presynaptic terminals, in which they directly modulate GABA release independent of action potential firing (Fisher et al, 1998; Lu et al, 1999; Radcliffe et al, 1999), and on cell bodies, in which modulation of GABA release depends on discharge activity (Alkondon et al, 1997; Alkondon et al, 1999; Frazier et al, 1998). Extensive evidence indicates that nicotine stimulates discharge rate of VTA DA neurons (Mereu et al, 1987; Pidoplichko et al, 1997). In apparent contradiction with those findings, our results suggest that DA neurons might be inhibited by nicotine-induced excitation of RMTg neurons. However, a transient inhibition of DA neurons precedes long-lasting excitation in some instances (Erhardt et al, 2002) and the net overall excitatory effect of nicotine on VTA DA neurons is considered to result from the combination of fast sensitizing stimulation of GABA release and slowly sensitizing potentiation of glutamate release within the VTA, as elegantly shown by Mansvelter et al (2002). Thus, it is conceivable that stimulation of RMTg neurons by nicotine may contribute to the elevation of GABA levels in the VTA, which is ultimately overcome by a larger and long-lasting potentiation of glutamate release inducing DA neuron excitation (Mansvelter et al, 2002). Consistently, in the VTA, nAChR-induced modulation of GABA transmission was completely tetrodotoxin sensitive, implying that these receptors are expressed far away from terminals (Mansvelter et al, 2002).

The inhibition evoked by addicting drugs, with the exception of nicotine, on discharge activity and/or EPSCs on putative RMTg neurons is consistent with the notion that

aversive stimuli encoded by the LHb, relayed to the RMTg and finally conveyed to the VTA, might be attenuated in their magnitude by concomitant administration of addicting drugs. Hence, RMTg lesions blunt inhibitory behavioral responses, such as freezing elicited by aversive stimuli and open arm avoidance in the elevated plus maze (Jhou *et al*, 2009a). Consistently, both opioids and cannabinoids reduce the magnitude of aversion-elicited inhibitory behavioral responses (Haney and Miczek, 1994; Moreira *et al*, 2009; Vivian and Miczek, 1998). On the other hand, opposite to morphine and cannabinoid agonists, nicotine enhances behavioral responses to aversive stimuli, as it enhances contextual fear as evaluated by measuring freezing, a natural fear response in rodent (Gould and Wehner, 1999). Data on the effects of cocaine are conflicting, possibly because it is difficult to separate the locomotor-activating effects of the drug: in one study, impaired freezing was associated with locomotor sensitization (Morrow *et al*, 1995), whereas in other studies, enhanced conditioned startle, possibly related to decreased freezing (Gordon and Rosen, 1999), or no effect on fear conditioning, were observed (Burke *et al*, 2006).

Our results show that putative RMTg neurons are a site of action of major addicting drugs. Being an important relay inhibitory region to the VTA, the RMTg is involved in the regulation of firing discharge of VTA DA neurons, and, therefore, might have an important function in the mechanisms and functional aspects of drugs of abuse.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Stefano Carta and Angelo Casu for their skillful technical assistance and the Regione Autonoma della Sardegna, Assessorato alla Programmazione, for the support given to SL and AL through the program 'Bursaries for Young Researchers.'

DISCLOSURE

The authors declare that, except for income received from their primary employer, no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity over the past 3 years for research or professional service and there are no personal financial holdings that could be perceived as constituting a potential conflict of interest.

REFERENCES

- Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* **283**: 1396–1411.
- Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM, Albuquerque EX (1999). Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci* **19**: 2693–2705.
- Atherton JF, Bevan MD (2005). Ionic mechanisms underlying autonomous action potential generation in the somata and dendrites of GABAergic substantia nigra pars reticulata neurons *in vitro*. *J Neurosci* **25**: 8272–8281.
- Balcita-Pedicino J, Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2009). The rostromedial mesopontine tegmentum as a relay between the lateral habenula and dopamine neurons in the ventral tegmental area: ultrastructural evidence in the rat program no 815.7/B91. *2009 Neuroscience Meeting Planner*. Society for Neuroscience: Chicago, IL.
- Brinschwitz K, Dittgen A, Madai VI, Lommel R, Geisler S, Veh RW (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* **168**: 463–476.
- Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4894–4899.
- Burke KA, Franz TM, Gugsu N, Schoenbaum G (2006). Prior cocaine exposure disrupts extinction of fear conditioning. *Learn Mem* **13**: 416–421.
- Cahusac PM, Morris R, Salt TE, Hill RG (1990). Sensory responses of caudal trigeminal neurons to thermal and mechanical stimuli and their behavioural correlates in the rat. *Neuroscience* **36**: 543–551.
- Chen BT, Hopf FW, Bonci A (2010). Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implications for substance abuse. *Ann N Y Acad Sci* **1187**: 129–139.
- Christoph GR, Leonzio RJ, Wilcox KS (1986). Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci* **6**: 613–619.
- Colussi-Mas J, Geisler S, Zimmer L, Zahm DS, Berod A (2007). Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. *Eur J Neurosci* **26**: 1011–1025.
- Davila V, Yan Z, Craciun LC, Logothetis D, Sulzer D (2003). D3 dopamine autoreceptors do not activate G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel currents in substantia nigra dopamine neurons. *J Neurosci* **23**: 5693–5697.
- Erhardt S, Schwieler L, Engberg G (2002). Excitatory and inhibitory responses of dopamine neurons in the ventral tegmental area to nicotine. *Synapse* **43**: 227–237.
- Fisher JL, Pidoplichko VI, Dani JA (1998). Nicotine modifies the activity of ventral tegmental area dopaminergic neurons and hippocampal GABAergic neurons. *J Physiol Paris* **92**: 209–213.
- Frazier CJ, Rollins YD, Breese CR, Leonard S, Freedman R, Dunwiddie TV (1998). Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J Neurosci* **18**: 1187–1195.
- French ED, Dillon K, Wu X (1997). Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* **8**: 649–652.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* **83**: 1017–1066.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M *et al* (2008). Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* **33**: 2688–2700.
- Gessa GL, Melis M, Muntoni AL, Diana M (1998). Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* **341**: 39–44.
- Glavinovic MI, Rabie HR (1998). Monte Carlo simulation of spontaneous miniature excitatory postsynaptic currents in rat hippocampal synapse in the presence and absence of desensitization. *Pflugers Arch* **435**: 193–202.
- Gordon MK, Rosen JB (1999). Lasting effect of repeated cocaine administration on acoustic and fear-potentiated startle in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **144**: 1–7.
- Gould TJ, Wehner JM (1999). Nicotine enhancement of contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* **102**: 31–39.
- Grace AA, Bunney BS (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons—1. Identification and characterization. *Neuroscience* **10**: 301–315.
- Grace AA, Bunney BS (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* **4**: 2877–2890.

- Haney M, Miczek KA (1994). Ultrasounds emitted by female rats during agonistic interactions: effects of morphine and naltrexone. *Psychopharmacology (Berl)* **114**: 441–448.
- Hikosaka O, Sesack SR, Lecourtier L, Shepard PD (2008). Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci* **28**: 11825–11829.
- Hirasawa H, Shiells R, Yamada M (2001). Blocking AMPA receptor desensitization prolongs spontaneous EPSC decay times and depolarizes H1 horizontal cells in carp retinal slices. *Neurosci Res* **40**: 217–225.
- Hutchison MA, Riley AL (2008). Adolescent exposure to nicotine alters the aversive effects of cocaine in adult rats. *Neurotoxicol Teratol* **30**: 404–411.
- Ikemoto S (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev* (in press, originally published online 10 February 2010, doi:10.1016/j.neubiorev.2010.02.001).
- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2006). Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *J Neurosci* **26**: 723–730.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009a). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* **61**: 786–800.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009b). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* **513**: 566–596.
- Jhou TC, Xu S, Ikemoto S (2009c). Self-administration of a mu-opioid agonist into the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons and other arousal systems Program No 683.1/GG66. *2009 Neuroscience Meeting Planner*. Society for Neuroscience: Chicago, IL.
- Ji H, Shepard PD (2007). Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* **27**: 6923–6930.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* **89**: 309–380.
- Kauffman J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* **513**: 597–621.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Heurteaux C, Fosset M et al (1995). Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* **270**: 28660–28667.
- Lu Y, Marks MJ, Collins AC (1999). Desensitization of nicotinic agonist-induced [3H]gamma-aminobutyric acid release from mouse brain synaptosomes is produced by subactivating concentrations of agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 1127–1134.
- Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* **33**: 905–919.
- Marinelli M, Rudick CN, Hu XT, White FJ (2006). Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **5**: 79–97.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* **327**: 535–550.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* **447**: 1111–1115.
- Melis M, Camarini R, Ungless MA, Bonci A (2002). Long-lasting potentiation of GABAergic synapses in dopamine neurons after a single *in vivo* ethanol exposure. *J Neurosci* **22**: 2074–2082.
- Melis M, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR et al (2008). Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *J Neurosci* **28**: 13985–13994.
- Mereu G, Yoon KW, 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.
- Moreira FA, Aguiar DC, Campos AC, Lisboa SF, Terzian AL, Resstel LB et al (2009). Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? *Neural Plast* **2009**: 625469.
- Moreira FA, Lutz B (2008). The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* **13**: 196–212.
- Morrow BA, Taylor JR, Roth RH (1995). Prior exposure to cocaine diminishes behavioral and biochemical responses to aversive conditioning: reversal by glycine/N-methyl-D-aspartate antagonist co-treatment. *Neuroscience* **69**: 233–240.
- Nie Z, Schweitzer P, Roberts AJ, Madamba SG, Moore SD, Siggins GR (2004). Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science* **303**: 1512–1514.
- Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2009). Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* **30**: 1239–1250.
- Pang Y, Kiba H, Jayaraman A (1993). Acute nicotine injections induce c-fos mostly in non-dopaminergic neurons of the midbrain of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* **20**: 162–170.
- Paxinos G, Watson C (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th edn. Elsevier Academic Press: London.
- Perrotti LI, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG et al (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* **21**: 2817–2824.
- Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* **390**: 401–404.
- Radcliffe KA, Fisher JL, Gray R, Dani JA (1999). Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci* **868**: 591–610.
- Schilstrom B, Yaka R, Argilli E, Suvarna N, Schumann J, Chen BT et al (2006). Cocaine enhances NMDA receptor-mediated currents in ventral tegmental area cells via dopamine D5 receptor-dependent redistribution of NMDA receptors. *J Neurosci* **26**: 8549–8558.
- Schultz W (2007a). Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* **30**: 203–210.
- Schultz W (2007b). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* **30**: 259–288.
- Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* **13**: 596–604.
- Simpson GR, Riley AL (2005). Morphine preexposure facilitates morphine place preference and attenuates morphine taste aversion. *Pharmacol Biochem Behav* **80**: 471–479.
- Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP (2004). Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* **303**: 2040–2042.
- Vivian JA, Miczek KA (1998). Effects of mu and delta opioid agonists and antagonists on affective vocal and reflexive pain responses during social stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **139**: 364–375.
- Wise RA, Yokel RA, DeWit H (1976). Both positive reinforcement and conditioned aversion from amphetamine and from apomorphine in rats. *Science* **191**: 1273–1275.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

Inhibitory Inputs from Rostromedial Tegmental Neurons Regulate Spontaneous Activity of Midbrain Dopamine Cells and Their Responses to Drugs of Abuse

Salvatore Lecca¹, Miriam Melis¹, Antonio Luchicchi¹, Anna Lisa Muntoni^{2,3} and Marco Pistis^{*,1,2,3}

¹BB Brodie Department of Neuroscience, University of Cagliari, Monserrato, Italy; ²Center of Excellence for the Neurobiology of Addiction, University of Cagliari, Monserrato, Italy; ³CNR Neuroscience Institute-Cagliari, University of Cagliari, Monserrato, Italy

The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a structure located just posterior to the ventral tegmental area (VTA), is an important site involved in aversion processes. The RMTg contains γ -aminobutyric acid neurons responding to noxious stimuli, densely innervated by the lateral habenula and providing a major inhibitory projection to reward-encoding dopamine (DA) neurons in the VTA. Here, we studied how RMTg neurons regulate both spontaneous firing of DA cells and their response to the cannabinoid agonist WIN55212-2 (WIN), morphine, cocaine, and nicotine. We utilized single-unit extracellular recordings in anesthetized rats and whole-cell patch clamp recordings in brain slices to study RMTg-induced inhibition of DA cells and inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) evoked by stimulation of caudal afferents, respectively. The electrical stimulation of the RMTg elicited a complete suppression of spontaneous activity in approximately half of the DA neurons examined. RMTg-induced inhibition correlated with firing rate and pattern of DA neurons and with their response to a noxious stimulus, highlighting that inhibitory inputs from the RMTg strongly control spontaneous activity of DA cells. Both morphine and WIN depressed RMTg-induced inhibition of DA neurons *in vivo* and IPSCs evoked by RMTg stimulation in brain slices with presynaptic mechanisms. Conversely, neither cocaine nor nicotine modulated DA neuron responses to RMTg stimulation. Our results further support the role of the RMTg as one of the main inhibitory afferents to DA cells and suggest that cannabinoids and opioids might disinhibit DA neurons by profoundly influencing synaptic responses evoked by RMTg activation.

Neuropsychopharmacology advance online publication, 14 December 2011; doi:10.1038/npp.2011.302

Keywords: electrophysiology; patch clamp; cannabinoids; morphine; rat

INTRODUCTION

The mesopontine rostromedial tegmental nucleus (RMTg), also named tail of the ventral tegmental area (VTA; Kaufling *et al*, 2009; Perrotti *et al*, 2005), is a recently identified nucleus, primarily containing γ -aminobutyric acid (GABA) neurons projecting to midbrain dopamine (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta and in the VTA (Jhou *et al*, 2009a; Kaufling *et al*, 2010a).

The RMTg has a pivotal role in processing both aversive and appetitive stimuli (Jhou *et al*, 2009a). In fact, RMTg neurons are excited by noxious stimuli and inhibited by rewarding stimuli (Hong *et al*, 2011; Jhou *et al*, 2009a) in a similar way to glutamatergic neurons of the lateral habenula

(LHb; Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009). This epithalamic area is involved in the mechanisms of fear, anxiety, and stress, and is also the main excitatory input to the RMTg (Jhou *et al*, 2009a). The LHb is one of the neural substrates for negative reinforcement and a source of inhibitory inputs to DA neurons (Christoph *et al*, 1986; Ji and Shepard, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007). However, it was shown that the inhibitory influence of the LHb on midbrain DA cells requires an indirect mediation via RMTg neurons. These cells form inhibitory synapses with VTA DA neurons (Balcita-Pedicino *et al*, 2011) preferentially targeting the nucleus accumbens (Kaufling *et al*, 2010a). Consistently, electrical stimulation of the RMTg inhibits DA neurons both in rat (Lecca *et al*, 2011) and monkey (Hong *et al*, 2011).

Taken together, these studies suggest a functional integration between these areas mediating aversion and gratification. Considering that the electrical activity of DA neurons, and the resulting DA output in terminal areas, depends on the balance between excitatory and inhibitory inputs (Marinelli *et al*, 2006; Morikawa and Paladini, 2011), it is of great interest to characterize the impact of this

*Correspondence: Professor M Pistis, BB Brodie Department of Neuroscience, Center of Excellence for the Neurobiology of Addiction, University of Cagliari, Cittadella Universitaria, Monserrato, CA 09042, Italy, Tel: +39 070 675 4324, Fax: +39 070 675 4320, E-mail: mpistis@unica.it

Received 7 October 2011; accepted 31 October 2011

pathway on the activity of DA neurons and on their responses to addicting drugs. In fact, recent studies indicate that abused substances affect RMTg neurons in different ways. Hence, these cells show high immunoreactivity against μ -opioid receptors (Jhou *et al*, 2009a); they express FosB/deltaFosB (Kaufling *et al*, 2010a; Kaufling *et al*, 2010b; Perrotti *et al*, 2005) or c-Fos (Geisler *et al*, 2008; Jhou *et al*, 2009a) following both acute and chronic injection of psychostimulants, and their electrical activity is inhibited by acute administration of most of the drugs of abuse (Lecca *et al*, 2011).

Here, we investigate how addictive substances affect the evoked inhibitory responses of VTA DA neurons to RMTg activation. We took advantage of extracellular single-unit recordings in anesthetized rats together with whole-cell patch clamp recordings in brain slices. We first characterized the electrophysiological responses of DA cells to RMTg electrical stimulation. Furthermore, we studied the effects of several prototypical drugs of abuse, the type 1 cannabinoid (CB1) receptor agonist WIN55212-2 (WIN), the opioid-receptor agonist morphine, nicotine, and cocaine, on inhibition elicited by RMTg stimulation.

MATERIALS AND METHODS

In vivo Experiments

Subjects and surgery. Experiments were performed in strict accordance with the EEC Council Directive of 24 November 1986 (86/609). Male Sprague-Dawley albino rats (Harlan-Nossan, San Pietro al Natisone, Italy) weighing 250–350 g were used in all *in vivo* experiments. All efforts were made to minimize pain and suffering and to reduce the number of animals used. Animals were housed in groups of three to six in standard conditions of temperature and humidity under a 12 h light/dark cycle (with lights on at 0700 hours) with food and water available *ad libitum*. We anesthetized rats with urethane (1300 mg/kg, ip), cannulated their femoral vein for intravenous administration of pharmacological agents, and placed them in the stereotaxic apparatus (Kopf, Tujunga, CA), with their body temperature maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ by a heating pad. The scalp was retracted and one burr hole was drilled above the VTA (5.6–5.8 mm posterior to bregma, 0.4–0.6 mm lateral to midline) for the placement of a recording electrode. To evaluate the inhibitory input arising from the RMTg to the VTA, a formvar-coated stimulating stainless steel bipolar electrode (250 μm tip diameter) was aimed at the ipsilateral RMTg (7.2 mm posterior to bregma and 0.8 mm lateral to midline, and 6.5 mm ventral to cortical surface) according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (2007). The electrode was inserted with an inclination of 20° anteroposterior on the coronal plane.

Single-unit recordings. Single unit activity of neurons located in the VTA (V 7.0–8.0 mm to cortical surface) was recorded extracellularly by glass micropipettes filled with 2% pontamine sky blue dissolved in 0.5 M sodium acetate (impedance 2–5 M Ω). Signal was filtered (band-pass 500–5000 Hz) and amplified (Neurolog System, Digitimer, Hertfordshire, UK), displayed on a digital storage oscilloscope (TDS 3012, Tektronix, Marlow, UK), and digitally recorded. Experiments were sampled on- and off-line by a

computer connected to CED Power 1401 laboratory interface (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) running the Spike2 software (Cambridge Electronic Design). Single units were isolated and identified according to previously described electrophysiological characteristics (Grace and Bunney, 1983, 1984; Ungless *et al*, 2004). We recorded VTA DA neurons only when criteria for identification were fulfilled (firing rate ≤ 10 Hz, duration of action potential ≥ 2.5 ms).

Drugs were administered in bolus iv (1 ml/kg of body weight). When drugs were administered, only one cell was recorded per rat. At the end of recording sessions, DC current (15 mA for 5 min) was passed through the recording micropipette to eject pontamine sky blue for marking the recording site. Brains were then rapidly removed and fixed in 4% paraformaldehyde solution. The position of the electrodes was microscopically identified on serial sections (60 μm) stained with neutral red.

Stimulation protocol. The experimental protocol was essentially as described previously (Lecca *et al*, 2011). Briefly, once a cell was selected, electrical stimuli consisting of single, monophasic, rectangular pulses (0.5 mA, 0.5 ms) were delivered to the RMTg at 1 Hz. Responses to electrical stimulation of the RMTg were evaluated, and a peristimulus time histogram (PSTH) was generated online for each neuron.

Data analysis. Isolated DA neurons were recorded for 2 min to establish basal firing properties. Spontaneous firing rate, percentage of spikes in bursts, and coefficient of variation (CV = standard deviation of interspike intervals divided by the mean interspike interval; a measure of firing regularity) were determined. Additionally, autocorrelograms were generated using a 10 ms bin width for intervals up to 2 s, to qualitatively classify neurons as firing in the regular, irregular or burst firing mode (Fabricius *et al*, 2010; Hyland *et al*, 2002). Autocorrelograms showing three or more regularly occurring peaks were characteristic of the regular firing pattern. An initial trough that rose smoothly to a steady state was classified as irregular firing pattern, whereas an initial peak, followed by decay to a steady state, was characteristic of the bursting mode (Fabricius *et al*, 2010; Hyland *et al*, 2002). After recording baseline activity, each cell was tested for its response to repetitive (1 Hz) stimulation of the RMTg. PSTHs were built from 100 stimuli and displayed using 1 ms bin width. A cell was considered inhibited or excited when the number of action potentials/bin (bin length = 1 ms) in the 50 ms after the stimulus was significantly lower or higher (one-way ANOVA for repeated measures), respectively, than baseline levels (the number of action potentials/bin in the 50 ms period before the stimulus). The duration of stimulus-evoked inhibition was defined as the time of complete cessation of firing after the stimulus.

In vitro Experiments

The preparation of VTA slices was as described previously (Melis *et al*, 2002). Briefly, Sprague-Dawley rats (10–25 days, Harlan-Nossan) were anesthetized with halothane and killed. A block of tissue containing the midbrain was sliced

in the horizontal plane (300 μm) with a vibratome (Leica, Nussloch, Germany) in ice-cold low Ca^{2+} solution containing (in mM): 126 NaCl, 1.6 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 1.2 MgCl_2 , 0.625 CaCl_2 , 18 NaHCO_3 , and 11 glucose. Slices (two per animal) were transferred in a holding chamber and allowed to recover for at least 1 h before being placed in the recording chamber and superfused with a bicarbonate-buffered solution (32–34 $^\circ\text{C}$) saturated with 95% O_2 /5% CO_2 and containing (in mM): 126 NaCl, 1.6 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 1.2 MgCl_2 , 2.4 CaCl_2 , 18 NaHCO_3 , and 11 glucose.

Whole-cell recording. Cells were visualized with an upright microscope with infrared illumination, and whole-cell voltage clamp recordings were made by using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, CA). All GABA_A inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) recordings were made with electrodes filled with an internal solution containing the following (mM): KCl 144, 1 CaCl_2 , 3.45 K_4BAPTA , 10 HEPES, 2 Mg_2ATP , 0.25 Mg_2GTP , pH 7.2–7.4. Experiments were begun only after series resistance had stabilized (typically 15–40 M Ω). Series resistance and input resistance were monitored continuously online with a 4-mV depolarizing step (25 ms). Data were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz, and collected online with acquisition software (Clampex 8.2, Molecular Devices). Because of the composition of the internal solution, the GABA_A IPSCs were inward at a membrane potential of -70 mV and were completely blocked by picrotoxin (100 μM , data not shown). DA cells were identified by the presence of a large I_h current (Johnson and North, 1992) that was assayed immediately after break-in, using a series of incremental 10 mV hyperpolarizing steps from a holding potential of -70 mV. A bipolar stainless steel stimulating electrode was placed 450–650 μm caudal to the recording electrode and was used to stimulate at a frequency of 0.1 Hz (50 μs duration). Neurons were voltage clamped at a membrane potential of -70 mV. All GABA_A IPSCs were recorded in presence of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid (100 μM), 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitroquinoxaline (10 μM), strychnine (1 μM), and eticlopride (100 nM) to block *N*-methyl-D-aspartate, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionic acid, glycine, and DA D2-mediated synaptic currents, respectively. As already described (Bonci and Williams, 1997), there was no effect of this solution on the holding current of the DA cells.

Drugs

Morphine and cocaine hydrochloride were purchased from Salars (Como, Italy) and Akzo Pharma Division Diosynth (Oss, Netherlands), respectively. Nicotine ((-)-nicotine hydrogen tartrate) was purchased from Sigma (Milano, Italy). WIN and AM281 were purchased from Tocris (Bristol, UK). Naloxone was purchased from RBI (Natick, MA). Rimonabant (SR141716) was a generous gift of Sanofi-Aventis Recherche (Montpellier, France). For experiments *in vivo*, WIN and rimonabant were emulsified in 1% Tween 80, then diluted in saline and sonicated. All other drugs were diluted in saline. Nicotine solution was adjusted to pH = 7.0 with NaOH. For experiments *in vitro*, all drugs were applied in known concentrations to the superfusion medium and, with the exception of WIN, AM281, and

rimonabant were dissolved in saline. WIN, rimonabant and AM281 were dissolved in DMSO as stock concentrations and the final concentration of DMSO was <0.01%.

Statistical Analysis

Changes in the duration of inhibition evoked by RMTg stimulation were calculated analyzing PSTH every 100 s. We averaged the effects of the drugs for the 100 s period following drug administration and compared them with the mean of the predrug baseline. All the numerical data are given as mean \pm SEM. Data were compared and analyzed by using two-way ANOVA for repeated measures (treatment \times time), or one-way ANOVA or Student's *t* test for repeated measures. Correlation analysis was used when appropriate. *Post hoc* multiple comparisons were made using the Tukey's, Dunnett's, and Bonferroni's tests. Statistical analysis was performed by means of the Graphpad Prism software (La Jolla, CA).

The amplitudes of IPSCs were calculated by taking the 1 ms window around the peak of the IPSC and comparing this with the 2 ms window immediately before the stimulation artifact. Drugs were applied in known concentrations to the superfusion medium. Results in the text and Figures are presented as the mean \pm SEM. Results between groups were compared using two-way ANOVA. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Effects of RMTg Stimulation on the Spontaneous Activity of VTA DA Neurons

Given that RMTg GABA neurons diffusely project to midbrain DA cells (Jhou *et al*, 2009b), and that their electrical stimulation produces a temporary but complete inhibition of the spontaneous activity of VTA DA neurons (Lecca *et al*, 2011), we further characterized the inhibitory contribution from RMTg afferents to VTA DA neurons. To this aim, a sampling of DA neurons was carried out in six rats. We recorded the spontaneous activity of 60 cells in the posterior VTA identified as putative DA on the basis of their action potential characteristics (see Figure 1a for a representative example) and firing properties (see Figure 2a). Recording sites were located within the mediolateral aspects of the parabrachial pigmented nuclei of the VTA (Figure 1a). Although the VTA shows some cellular heterogeneity (Ford, 2006; Lammel *et al*, 2008; Margolis *et al*, 2008; Yamaguchi *et al*, 2011), the subregion where all recording sites were found contains a larger density of TH-positive neurons when compared with the more medial levels of the VTA (Yamaguchi *et al*, 2011). After 2 min of stable baseline firing rate, we tested the response of DA neurons to RMTg stimulation (1 Hz, 0.5 ms; Figure 1b). A cell was considered inhibited or excited when the number of action potentials/bin (bin length = 1 ms) in the 50 ms after the stimulus was significantly lower or higher (one-way ANOVA for repeated measures), respectively, than that calculated in the 50 ms before the stimulus. The electrical stimulation of the RMTg induced an inhibition of the spontaneous activity in 53.3% of the neurons examined (32 out of 60; Figure 1b). A representative PSTH

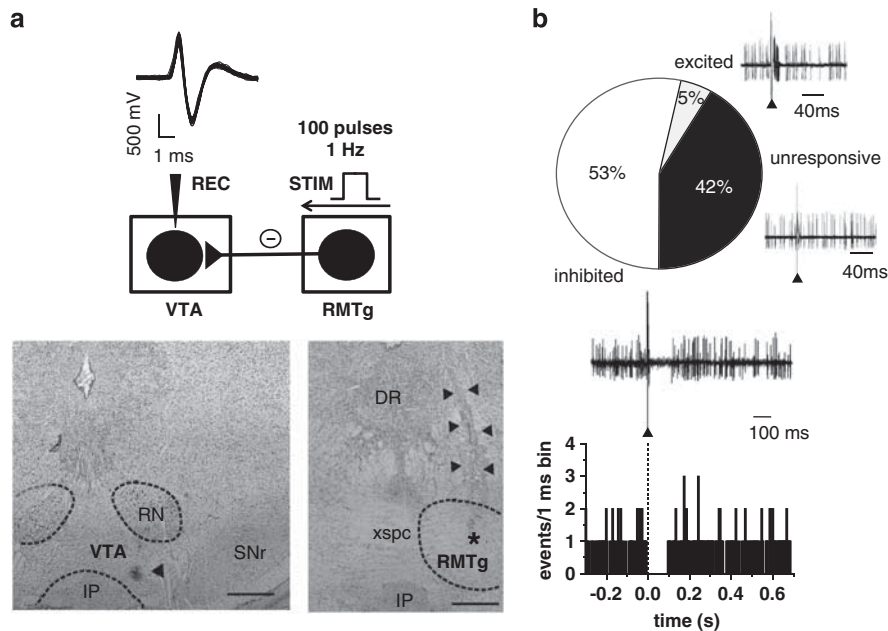


Figure 1 RMTg stimulation induces inhibition of VTA DA neuron spontaneous activity. (a; top panel) The trace shows typical superimposed spike waveforms of a DA neuron recorded in the VTA. Below, the diagram illustrates the stimulation protocol used in all *in vivo* experiments. The RMTg was stimulated with rectangular current pulses (0.5 mA, 0.5 ms) delivered at 1 Hz, and responses of DA cells to RMTg stimulation were recorded extracellularly. Recording location for a DA neuron in the posterior VTA (the triangle indicates the pontamine sky blue dye; bottom panel; left). Right: electrical stimulation site in the RMTg. The black asterisk indicates the area lesioned by the tip of the electrode, the black triangles indicate the track of the recording electrode. DR, dorsal raphe; IP, interpeduncular nucleus; RN, red nucleus; SNr, substantia nigra pars reticulata; xspc, decussation of the superior cerebellar peduncle. Scale bars, 0.5 mm. (b) Percentages of different types of DA cell responses to RMTg stimulation. Traces acquired from a digital oscilloscope represent typical examples of excited, inhibited, and unresponsive DA cells. A PSTH of the inhibited cell is displayed (100 consecutive sweeps) and shows that RMTg stimulation produced a full suppression in firing activity of a VTA DA neuron for ~90 ms. Note that the inhibitory response occurred immediately after the stimulus (arrowhead).

illustrating the typical RMTg-induced suppression of VTA DA neuronal discharge is shown in Figure 1b. Owing to the close proximity between the stimulating and the recording sites, we were unable to calculate the onset latency of the inhibition. Hence, by assuming a conduction velocity of ~2 m/s, typical for fast-firing GABA neurons (Jones *et al*, 1999), the latency would be <3 ms, and would fall within the duration of the stimulus artifact. This short latency was consistent with a direct innervation, and persisted for 82.5 ± 6.12 ms (range, 28–250 ms; $n = 32$; Figure 1b). Among VTA DA cells that were not inhibited ($n = 28$), 25 were unresponsive to RMTg stimulation (42%), and 3 others were excited (5%) (Figure 1b). To confirm that the placement of the stimulating electrode allowed a specific stimulation of RMTg neurons, in a separate set of experiments (in four rats) the electrode was placed 1 mm more laterally to avoid the RMTg (coordinates in mm: -7.2 posterior to bregma; 1.8 lateral to midline; and 6.5 ventral from cortical surface). Under these circumstances, the responses of VTA neurons were drastically different ($\chi^2 = 27.88$; $df = 2$; $P < 0.0001$, χ^2 -test), the effect of electrical stimulation being: 5.2% (1/19) of cells inhibited, 52.6% (10/19) excited, and 42.1% (8/19) unresponsive.

Correlation between DA neuron spontaneous activity and duration of RMTg-evoked inhibition. In order to assess whether spontaneous firing activity of VTA DA neurons and the duration of inhibition evoked by RMTg stimulation were correlated, we analyzed a total of 69 DA cells inhibited

from RMTg. In line with previous results in urethane-anesthetized rats (Kelland *et al*, 1990; Pistis *et al*, 2004), DA neurons fired at 3.7 ± 0.2 Hz ($n = 69$), and presented $18.5 \pm 2.8\%$ of spikes in bursts (data not shown). The mean CV of interspike intervals was $62.4 \pm 3.4\%$, indicating that the average firing pattern of recorded VTA DA cells was irregular.

Interestingly, as illustrated in Figure 2a, we found a negative correlation between duration of inhibition and both spontaneous firing rate ($F_{1,67} = 66.71$; $r = -0.71$, $P < 0.0001$, Pearson's test) and percentage of burst firing ($F_{1,67} = 4.05$; $r = -0.24$, $P < 0.05$, Pearson's test, data not shown), but not with CV ($F_{1,67} = 1.83$; $r = 0.16$, $P > 0.05$, Pearson's test, data not shown).

Moreover, generation of autocorrelograms for all recorded cells permitted their classification as regular, irregular, or bursting (Figure 2b). The distribution of these firing patterns confirmed that the majority of DA neurons (34 out of 69; 49.3%) fired irregularly, whereas the remaining were classified as regular (14 out of 69; 20.3%) or bursting neurons (21 out of 69; 30.4%; see Figure 2b). Noteworthy, neurons showing an irregular discharge pattern exhibited a longer duration of inhibition (103.2 ± 9.4 ms; $n = 34$) in response to RMTg stimulation than regular (61.21 ± 5.9 ms; $n = 14$) or bursting (63.0 ± 9.7 ms; $n = 21$) DA cells ($F_{2,66} = 6.48$, $P < 0.01$, one-way ANOVA, and Tukey's test; Figure 2b).

Considering the role of RMTg in aversion, which is strongly supported by the predominant, phasic excitation of

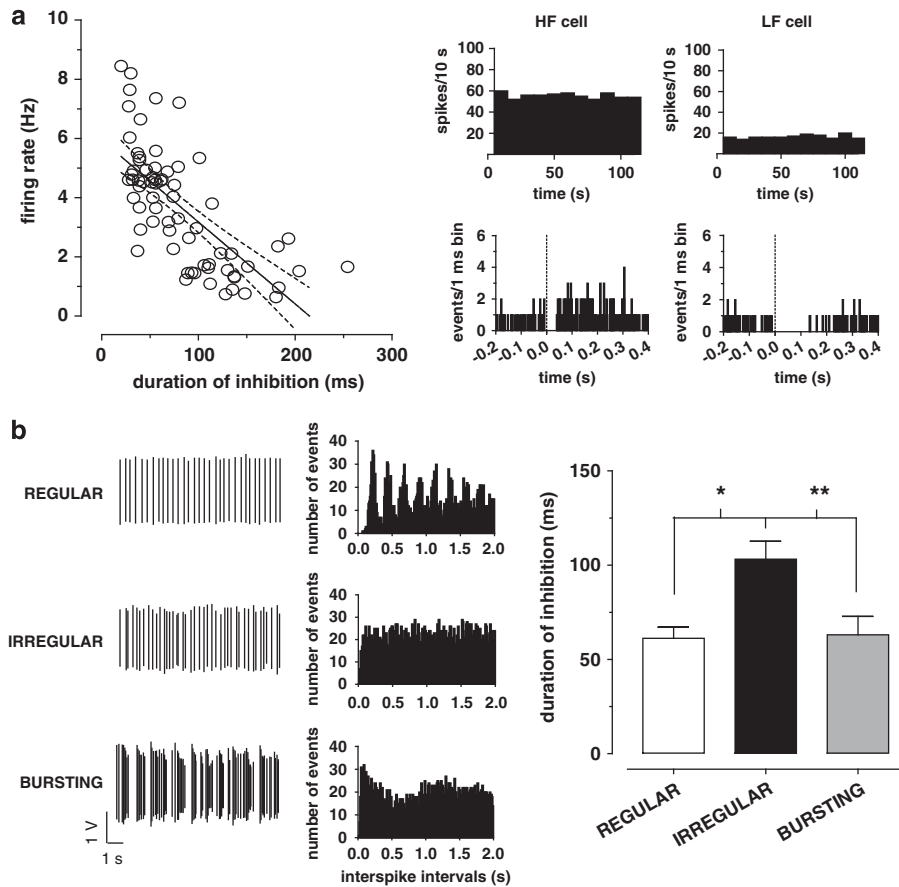


Figure 2 The duration of RMTg-evoked inhibition is negatively correlated with the spontaneous discharge activity of VTA DA neurons. (a) On the left, the graph illustrates the negative correlation between spontaneous firing rate and duration of inhibition induced by RMTg stimulation (dashed lines represent $\pm 95\%$ confidence intervals). Representative rate histograms (top right) and PSTHs (bottom right) of two individual DA cells displaying that a high firing neuron (HF cell) was suppressed for a shorter period of time than a low firing neuron (LF cell). (b) Autocorrelograms of DA neurons were generated from action potential recordings and allowed the classification of their firing pattern into regular (top), irregular (middle), and bursting (bottom) mode. The right bar graph shows that irregular neurons exhibited a longer inhibitory response to RMTg stimulation when compared with regular or bursting cells. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, one-way ANOVA, and Tukey's test.

RMTg neurons in response to noxious stimuli (Jhou *et al*, 2009a; Lecca *et al*, 2011), and the heterogeneous responses of VTA DA neurons to aversive stimuli (Brischoux *et al*, 2009), we then examined whether this heterogeneity could depend on DA cell responses to RMTg stimulation. To this aim, the response to a brief (2 s) paw pinch (Lecca *et al*, 2011) was studied in 20 DA neurons (12 inhibited and 8 unresponsive). To detect rapid changes in firing rate, rate histograms were built with 0.5 s bins (Figure 3). The firing rate during the 5 s following the pinch (10 bins) was analyzed and compared with the average baseline values. Remarkably, neurons inhibited by RMTg stimulation responded to paw pinch with a pronounced short-lasting phasic inhibition (average firing rate after pinch: $78.4 \pm 5.6\%$ of baseline, $n = 12$, $F_{10,110} = 2.06$, $P = 0.03$, one-way ANOVA, and Dunnett's test). No significant change in firing rate was produced by paw pinch in unresponsive DA neurons (average firing rate after pinch: $85.2 \pm 5.2\%$ of baseline firing rate, $n = 8$, $F_{10,70} = 0.85$, $P = 0.58$, one-way ANOVA, and Dunnett's test). Figure 3 illustrates the average rate histograms of RMTg-inhibited and not-inhibited cells. The phasic decrease in firing rate occurred immediately after mechanical pinch in those DA cells suppressed by

RMTg stimulation (Figure 3a). On the other hand, neurons that did not respond to RMTg stimulation showed no significant decrease in firing rate after the aversive somatosensory stimulus (Figure 3b).

Effects of Drugs of Abuse on RMTg-Induced Inhibition of VTA DA Cells

Next, we tested the effects of different drugs of abuse (ie, the CB1 agonist WIN, morphine, cocaine, and nicotine) on VTA inhibition evoked by stimulation of the RMTg.

The CB1 agonist WIN reduces the inhibition of VTA DA neurons. Inhibition of RMTg GABA neurons by the CB1 agonist WIN (Lecca *et al*, 2011) might be one of the mechanisms contributing to cannabinoid-induced excitation of midbrain DA cells *in vivo* (French *et al*, 1997; Gessa *et al*, 1998). We therefore investigated the influence of WIN on RMTg-evoked suppression of DA neuron firing. To this aim, DA neurons in the VTA inhibited by RMTg stimulation were selected (see Figure 4a). Cells were recorded for 2 min and then the stimulator was switched on to measure their baseline inhibitory response. The administration of WIN

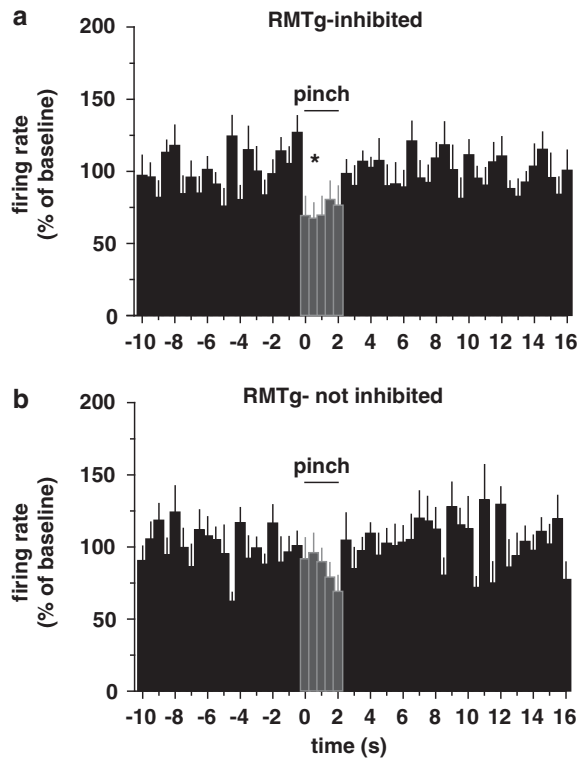


Figure 3 DA neurons inhibited by RMTg stimulation show a significant decrease in firing rate after paw pinch. (a) Average rate histogram (0.5 s bin) for 12 putative DA neurons suppressed from RMTg (RMTg-inhibited) illustrating the rapid and short-term decrease in firing frequency after paw pinch (2 s). (b) Conversely, DA cells whose activity was not suppressed by RMTg stimulation (RMTg-not inhibited) did not show any significant change in firing rate after the aversive stimulus ($n = 8$). * $P < 0.05$, one-way ANOVA, and Dunnett's test.

(0.5 mg/kg, iv) was preceded (200 s) by the injection of either rimobant (0.5 mg/kg, iv; $n = 6$) or its vehicle (1 ml/kg, iv; $n = 7$; Figure 4a and b). Only one cell was recorded per rat, hence the number of animals used in this subset of experiments is 13. Two-way ANOVA for repeated measures of the time courses yielded a very significant treatment \times time interaction ($F_{1,55} = 10.67$, $P < 0.0001$), therefore separate analyses of drugs' effects were carried out. The administration of either vehicle or rimobant did not affect the duration of RMTg-evoked inhibition of DA neurons (vehicle: $n = 7$, $F_{2,12} = 1.45$, $P = 0.27$; rimobant: $n = 6$, $F_{2,10} = 0.48$, $P = 0.63$, one-way ANOVA for repeated measures; Figure 4b). On the other hand, WIN, when injected after vehicle, robustly reduced RMTg-induced suppression of VTA DA firing activity to $\sim 22\%$ of baseline (baseline duration of inhibition: 94.0 ± 10.4 ms, maximum effect of WIN: 20.6 ± 7.4 ms; $n = 7$, $F_{3,18} = 13.93$, $P < 0.0001$, one-way ANOVA for repeated measures and Dunnett's test; Figure 4a and b). This effect occurred quite rapidly (within the first 100 s from injection), persisted relatively unchanged over 20 min, and required CB1 receptor activation. Indeed, rimobant completely prevented WIN's effects when administered 200 s before the agonist (baseline duration of inhibition: 84.3 ± 26.2 ms, maximum effect of WIN: 81.1 ± 26.2 ms; $n = 6$, $F_{3,15} = 0.06$, $P = 0.98$, one-way ANOVA for repeated measures; Figure 4b). Additionally, in all experiments ($n = 5$) when the cell was recorded for a

time sufficient to allow the administration of rimobant 5 min after the agonist, rimobant fully restored RMTg-induced inhibition of VTA neuron activity to baseline levels (Figure 4a and c). For these experiments, the comparison between baseline inhibition, the effect of WIN, and the effect of rimobant (for both drugs' effects the time point analyzed was 300 s after injection) yielded a highly significant difference ($n = 5$, $F_{2,8} = 18.08$, $P = 0.0011$, one-way ANOVA for repeated measures, and Tukey's test; Figure 4a and c). *Post hoc* analysis revealed that post-rimobant inhibition was not different from baseline values ($P > 0.05$, Tukey's test), but significantly different from post-WIN inhibition ($P < 0.01$, Tukey's test; Figure 4c). These experiments confirm the involvement of CB1 receptors in WIN-induced suppression of inhibition and that the endocannabinoid system is not tonically activated.

GABA_A-mediated IPSCs recorded from VTA DA cells and evoked by repetitively stimulating caudal afferents (duration 50 μ s, frequency 0.1 Hz, intensity 0.01–0.3 mA) in an *in vitro* midbrain slice preparation were supportive. Although we cannot identify definitively the sources of inhibitory afferents, we can assume that most of the caudal inputs electrically stimulated in our preparation are presumably originating from the RMTg, given that it is one of the main caudally located inhibitory sources to the VTA. The change in synaptic strength elicited by paired stimuli given at an interval of 50 ms was not different from those described before (Melis *et al*, 2002). In fact, DA cells exhibited a paired-pulse facilitation (IPSC2/IPSC1: 1.11 ± 0.07 , $n = 33$), which did not depend on the amplitude of the first IPSCs recorded (Figure 4d).

As CB1 receptor activation decreased RMTg neuron activity (Lecca *et al*, 2011) and RMTg-induced inhibition of DA cells, we examined whether WIN would affect caudal inhibitory transmission onto these neurons. WIN (1 μ M, 5 min) significantly and irreversibly reduced IPSCs amplitude by $57 \pm 5.2\%$ ($n = 5$, $F_{19,80} = 13.42$, $P < 0.0001$, one-way ANOVA for repeated measures; Figure 4d and e). Probably owing to its high lipophilicity, WIN effect did not wash out; however, when it was co-applied with two structurally different CB1 receptor antagonists, AM281 (0.5 μ M) and rimobant (1.0 μ M), WIN-induced inhibition of IPSC amplitude was fully prevented (AM281: $n = 5$, $F_{1,152} = 602.44$, $P < 0.0001$; rimobant: $n = 5$, $F_{1,152} = 23.47$, $P < 0.001$, two-way ANOVA for repeated measures; Figure 4e). As probability of release is inversely related to paired-pulse ratio, if WIN decreases IPSC amplitude through activation of presynaptic CB1 receptors, one would expect an increased paired-pulse ratio in the presence of this drug. WIN-induced decreased IPSC amplitude was accompanied by an increased paired-pulse ratio (from IPSC2/IPSC1 = 1.24 ± 0.07 to IPSC2/IPSC1 = 1.53 ± 0.03 ; $n = 5$, $P = 0.01$, paired *t*-test; Figure 4f). Furthermore, as analysis of the changes in quantitative measure of the variability (ie, CV²) of postsynaptic responses is a powerful, though indirect, tool to identify the locus for the modifications (Faber and Korn, 1991; Malinow and Tsien, 1990), we measured the changes in CV² and evoked IPSCs caused by WIN (Figure 4f). Taken altogether, these data suggested that WIN reduced probability of GABA release presumably from RMTg terminals via activation of presynaptic CB1 receptors.

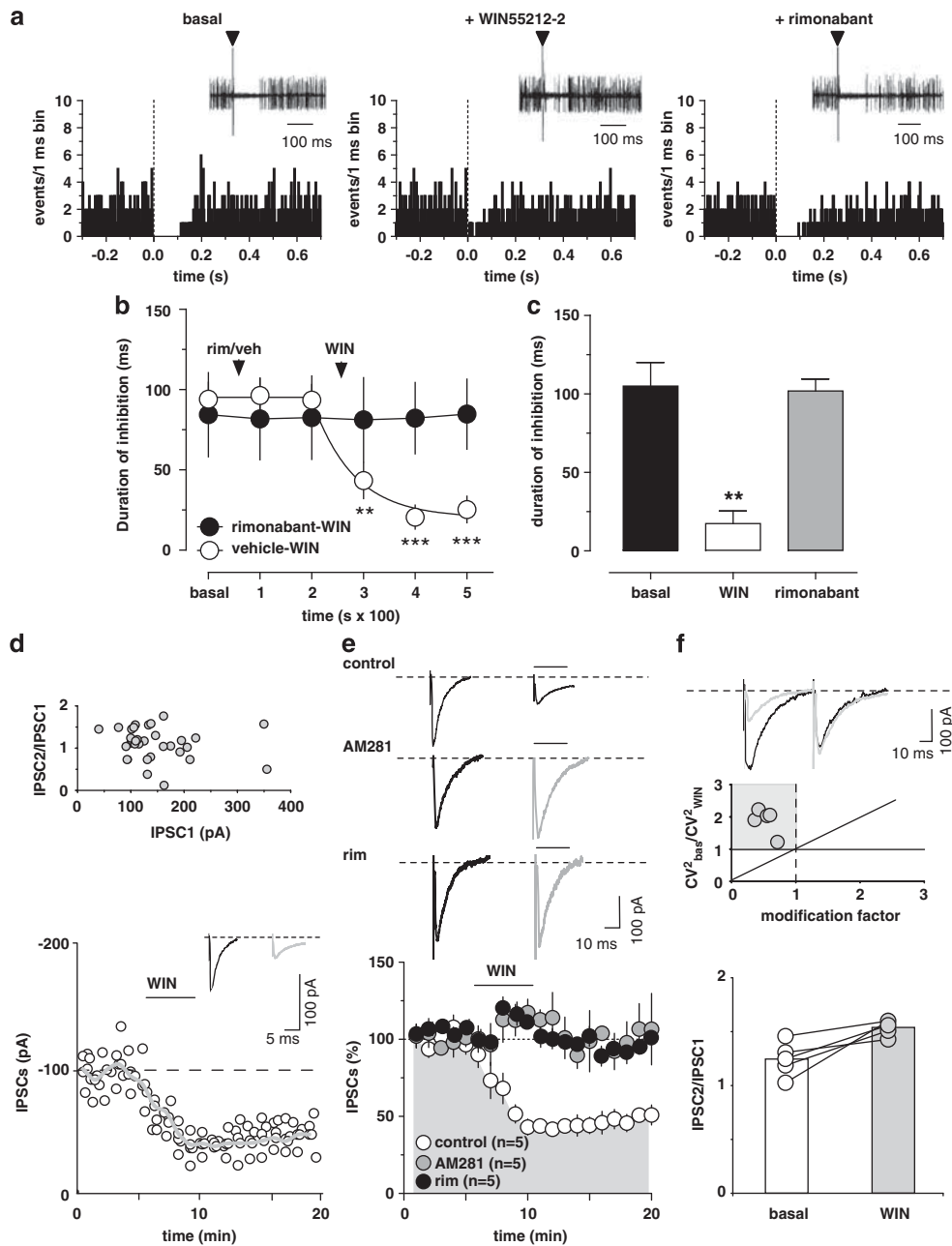


Figure 4 The cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 (WIN) blocks RMTg-evoked suppression of VTA DA neuron firing. (a) Representative PSTHs and superimposed traces acquired from a digital oscilloscope (insets) illustrating the typical inhibitory responses of VTA DA neurons after electrical stimulation of the RMTg (1 Hz) at time 0 (arrowheads), the suppression of inhibition induced by WIN (0.5 mg/kg, iv), and the reversal by the CB1 receptor antagonist rimonabant (0.5 mg/kg, iv). (b) This graph shows the time course of WIN's effect on RMTg-induced inhibition of VTA DA neurons, with ($n = 7$) and without ($n = 6$) rimonabant pretreatment. Rimonabant, injected before WIN, prevented the suppression of inhibition induced by the cannabinoid. (c) The bar graph summarizes the effects of WIN on the duration of inhibition evoked by RMTg stimulation and shows that rimonabant, administered 5 min after WIN, reverts the suppression of inhibition ($n = 5$). (d) WIN inhibits GABA synaptic transmission elicited by stimulation of caudal afferents in rat VTA DA cells. Top panel, no correlation was found between the amplitude of IPSC1 and the IPSC2/IPSC1 ratio. Each circle represents the mean paired-pulse ratio of 2 min recording. Bottom panel, a typical whole-cell voltage clamp recording showing that bath application of WIN (1 μ M) inhibits IPSC amplitude, when cells are held at -70 mV. The gray line represents mean IPSC amplitude. The inset shows single IPSC from a typical experiment, before (black line), and during (gray line) perfusion of WIN. (e) WIN reduces IPSC amplitude through activation of CB1 receptors. All data are normalized to the respective baseline (5 min of baseline). Black bar shows time of superfusion of WIN, alone (open circles) and in the presence of CB1 receptor antagonists AM281 (500 nM, gray circles), or rimonabant (1 μ M, black circles). SEM bars are smaller than symbols in some cases. The top panel shows 12-trace averages of IPSCs in the absence (black line) and presence (gray line) of AM281 or rimonabant. Black bars represent time of WIN application. (f) Top panel, from the data presented in e, the ratio of CV^2 in WIN to baseline is plotted against the modification factor (ie, the ratio of mean synaptic responses in WIN to baseline values). Data points in the gray area and along the diagonal line of $y = x$ imply a presynaptic reduction of synaptic transmission induced by WIN. Bottom panel, WIN enhances the paired-pulse ratio of IPSCs, producing paired-pulse facilitation. The circles show the paired-pulse ratio for each of the experiments in e before (open circles) and during (gray circles) the application of WIN, whereas the graph plots the averaged paired-pulse ratio in a bar graph form. Representative traces are shown in the inset, where the IPSCs are represented before (black lines) and during WIN (gray lines) application. The results are means, with vertical bars representing the SEM of duration of inhibition expressed as a percentage of the baseline. Arrows represent the time of injections. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, and one-way ANOVA.

Morphine decreases RMTg-induced inhibition of VTA DA neurons. The most widely accepted hypothesis postulates that opiate excitation of VTA DA neurons results from disinhibition consequent to a primary inhibitory effect on local GABA interneurons (Johnson and North, 1992). Accordingly, *in vivo* morphine reduces GABA neuron discharge activity in both the VTA (Steffensen et al, 2006) and RMTg (Jalabert et al, 2011; Lecca et al, 2011). As RMTg afferents exert a tonic inhibitory influence on midbrain DA cells (Ikemoto, 2010; Lecca et al, 2011), we decided to assess whether morphine would also affect RMTg-evoked suppression of VTA DA spontaneous neuronal firing. We recorded DA cells in the VTA that showed an inhibitory response following RMTg stimulation (0.5 mA, 0.5 ms, 1 Hz, Figure 5a).

The administration of morphine (4.0 mg/kg, iv) was preceded (200 s) by the injection of either naloxone (0.1 mg/kg, iv; $n=6$) or its vehicle (1 ml/kg, iv; $n=7$) (Figure 5a and b). As only one cell was recorded per rat, the number of animal used in this subset of experiments is 13. Two-way ANOVA analysis for repeated measures of the time courses yielded a very significant drug \times time interaction ($F_{1,55} = 3.46$, $P < 0.0087$), therefore separate analyses of drugs' effects were carried out. The administration of either vehicle or naloxone did not affect the duration of RMTg-evoked inhibition of DA neurons (vehicle: $n=7$, $F_{2,12} = 1.15$, $P = 0.35$; naloxone: $n=6$, $F_{2,10} = 3.049$, $P = 0.09$, one-way ANOVA for repeated measures; Figure 5b). Conversely, morphine, when injected after vehicle, significantly shortened RMTg-induced suppression of VTA DA firing activity to $\sim 48\%$ of baseline (baseline duration of inhibition: 81.7 ± 18.2 ms; maximum effect of morphine: 39.4 ± 12.4 ms; $n=7$, $F_{3,18} = 8.98$, $P < 0.001$, one-way ANOVA for repeated measures and Dunnett's test; Figure 5a and b). This effect required μ -opioid receptor activation, as naloxone prevented morphine's effects when administered 200 s before the agonist (baseline duration of inhibition: 92.3 ± 20.5 ms; effect of morphine at 300 s: 121.2 ± 25.2 ms; $n=6$, $F_{3,15} = 1.88$, $P = 0.17$, one-way ANOVA for repeated measures; Figure 5b) and fully restored RMTg-induced inhibition of VTA neuron activity to baseline levels in all experiments ($n=5$) when it was injected after (5 min) the agonist (Figure 5a and c). For these experiments, the comparison between baseline inhibition, the effect of morphine, and the effect of naloxone (for both drugs' effects the time point analyzed was 300 s after injection) yielded a significant difference ($n=5$, $F_{2,8} = 4.47$, $P < 0.05$, one-way ANOVA for repeated measures and Tukey's test; Figure 5a and c). These results indicate that the effects of morphine require the activation of opioid receptors and that endogenous opioids do not exert a significant tonic control over the RMTg-DA synapse.

Additionally, in order to investigate whether or not μ -opioid receptor activation might affect inhibitory synapses arising from RMTg onto VTA DA cells, we measured GABA_A IPSCs recorded from DA neurons. Acute bath application of morphine at a concentration of $1 \mu\text{M}$ (3 min) significantly reduced IPSCs by $42 \pm 4.2\%$ ($n=5$, $F_{1,99} = 13.59$; $P < 0.0001$; Figure 5d and e), and the effect did not depend on the amplitude of the first IPSCs ($r = 0.48$, $P > 0.05$, data not shown). The effect of morphine was reversible on wash out, and it was fully abolished in the

presence of naloxone ($0.1 \mu\text{M}$; $n=5$, $F_{1,152} = 3.76$, $P = 0.008$, two-way ANOVA for repeated measures; Figure 5e). Because modifications in the paired-pulse ratio are considered to reflect changes in transmitter release (Melis et al, 2002; Nie et al, 2004), we analyzed whether morphine affected it. Acute bath application of morphine increased the paired-pulse ratio (from $\text{IPSC2}/\text{IPSC1} = 1.10 \pm 0.02$ to $\text{IPSC2}/\text{IPSC1} = 1.63 \pm 0.11$; $n=5$, $P = 0.005$, paired t -test; Figure 5f). Further analysis of the CV^2 and evoked IPSCs caused by morphine (Figure 5f) are indicative of a presynaptic locus for these modifications, consistently with previous reports (Lecca et al, 2011) and the present *in vivo* data.

Cocaine and nicotine do not affect the response of VTA DA neurons to RMTg stimulation. We have previously shown that cocaine, similarly to WIN and morphine but to a lesser magnitude, inhibits RMTg discharge activity (Lecca et al, 2011). On the other hand, nicotine produces a strong and enduring stimulation on RMTg neuron firing rate (Lecca et al, 2011). Here, we sought to verify whether nicotine and cocaine interact with RMTg GABA inputs to the VTA. To test this hypothesis, we first assessed the effect of nicotine on seven DA neurons in the VTA (from seven rats) exhibiting an inhibitory response to RMTg stimulation (Figure 6a). As illustrated in Figure 6a, nicotine (0.2 mg/kg , iv) administered 200 s after vehicle injection caused no change in the duration of RMTg-induced inhibition of VTA DA neuronal firing (baseline duration of inhibition: 72.1 ± 15.1 ms; effect of nicotine at 300 s: 75.3 ± 13.7 ; $n=7$, $F_{5,30} = 0.63$, $P = 0.68$, one-way ANOVA for repeated measure; Figure 6a). Next, we examined cocaine's action on VTA inhibition from the RMTg. We selected a subset of seven DA neurons (from seven rats) whose spontaneous activity was suppressed by RMTg stimulation (Figure 6b). Acute cocaine injection also (1 mg/kg , iv) did not affect the inhibition of VTA DA discharge rate evoked by RMTg stimulation (baseline duration of inhibition: 72.1 ± 15.1 ms; effect of cocaine at 300 s: 75.8 ± 16.5 ; $n=7$, $F_{5,30} = 0.22$, $P = 0.94$, one-way ANOVA for repeated measure; Figure 6b). An example of the lack of effect of cocaine on RMTg-induced VTA responses is shown in Figure 6b. As these drugs did not affect RMTg-induced inhibition *in vivo*, we did not further analyze their effects on evoked IPSCs with patch clamp experiments.

DISCUSSION

Our results provide the electrophysiological evidence of the monosynaptic inhibitory RMTg projections on VTA DA neurons, and the relationship between spontaneous discharge activity of these cells and the strength of RMTg inhibition. Moreover, we discovered that this inhibition could contribute to the effects of some drugs of abuse. Specifically, we showed that both cannabinoids and opioids share the property of strongly reducing the suppression of VTA neuronal activity elicited by the electrical stimulation of the RMTg *in vivo*, as well as to depress IPSCs evoked by caudal afferents *in vitro*. We therefore provide a plausible and alternative mechanism of action by which cannabinoids and opioids excite DA neurons, ie, inhibition of extrinsic GABA afferents arising from the RMTg.

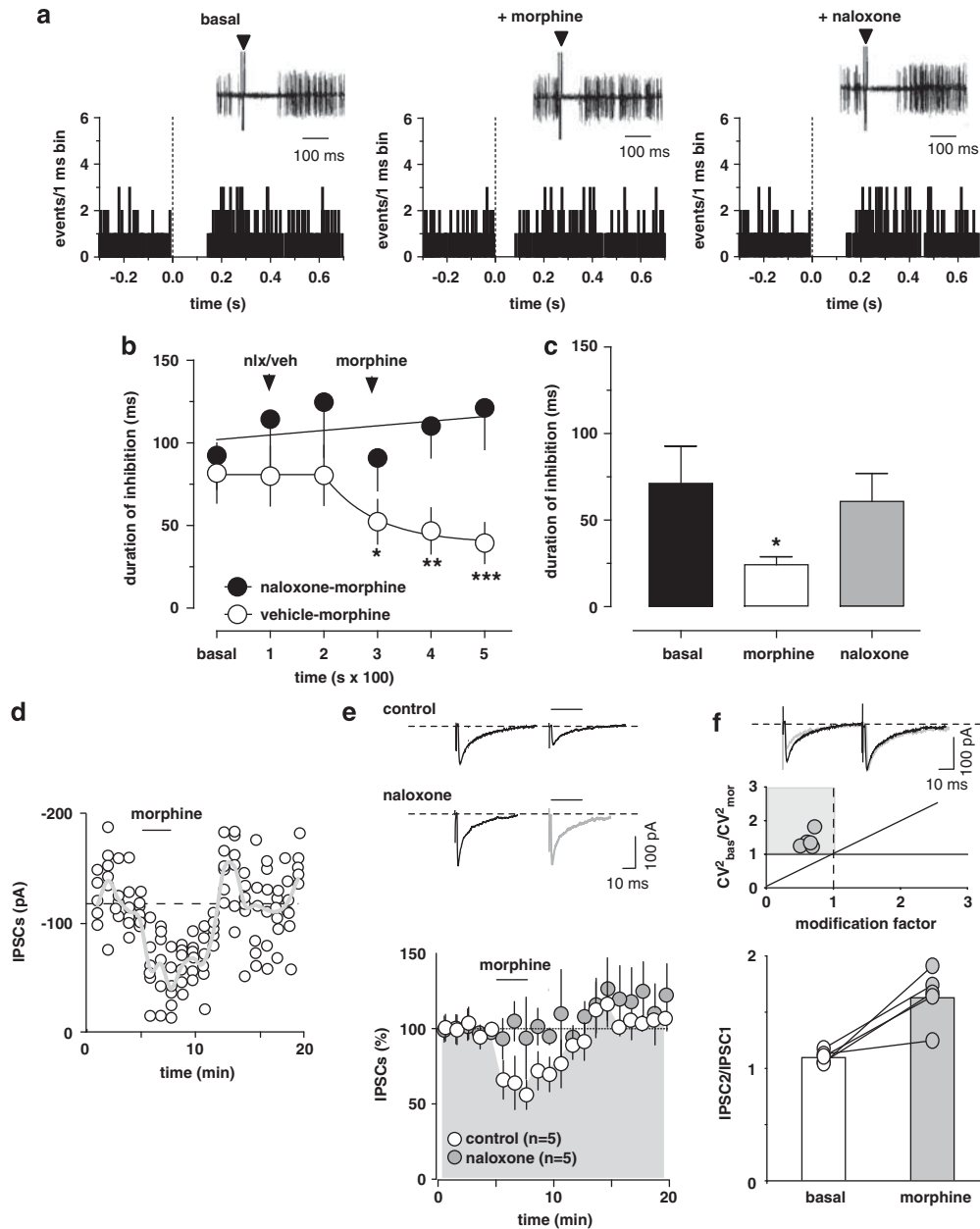


Figure 5 Morphine shortens the duration of RMTg-evoked inhibition of VTA DA neurons through activation of μ -opioid receptors. (a) Representative PSTHs and superimposed traces acquired from a digital oscilloscope (insets) showing inhibitory responses elicited in DA neurons by RMTg stimulation (1 Hz, delivered at time 0, arrowheads). Morphine (4 mg/kg, iv) reduced RMTg-evoked inhibition. The effect was fully reverted by the μ -opioid antagonist naloxone (0.1 mg/kg, iv). (b) Time course of morphine's effects on RMTg-evoked suppression of VTA DA discharge activity, with and without ($n=7$) naloxone pretreatment. Naloxone (nlx) completely prevented morphine's reduction of inhibition ($n=6$). (c) The bar graph summarizes the actions of morphine on the duration of VTA inhibition induced by RMTg stimulation and shows that naloxone ($n=5$, 5 min after morphine) reverts morphine's effects. (d) Morphine induces inhibition of GABA synaptic transmission elicited by stimulation of RMTg afferents in rat VTA DA cells. A typical whole-cell patch clamp recording showing that bath application of morphine (1 μ M) inhibits IPSC amplitude, when cells are held at -70 mV. The gray line represents mean IPSC amplitude. (e) Morphine reduces IPSC amplitude through activation of μ -opioid receptors. All data are normalized to the respective baseline (5 min of baseline). The black bar shows time of superfusion of morphine in the presence (gray circles) and absence (open circles) of the μ -opioid antagonist naloxone (100 nM). SEM bars are smaller than symbols in some cases. The inset shows 12-trace averages of IPSCs in the absence (black line) and presence (gray line) of naloxone. Black bars represent time of morphine application. (f) Top panel, from the data presented in e, the ratio of CV^2 in morphine to baseline is plotted against the modification factor (ie, the ratio of mean synaptic responses in morphine to baseline values). Data points in the gray area and along the diagonal line of $y=x$ imply a presynaptic reduction of synaptic transmission induced by morphine. Bottom panel, morphine enhances the paired-pulse ratio of IPSCs, producing paired-pulse facilitation. The circles show the paired-pulse ratio for each of the experiments in f before (open circles) and during (gray circles) the application of morphine, whereas the graph plots the averaged paired-pulse ratio in a bar graph form. Representative traces are shown in the inset, where the IPSCs are represented before (black lines) and during morphine (gray lines) application. The results are means with vertical bars representing the SEM of the duration of inhibition expressed as a percentage of the baseline. Arrows represent the time of injections. * $P<0.05$, ** $P<0.001$, *** $P<0.0001$ vs baseline, and one-way ANOVA.

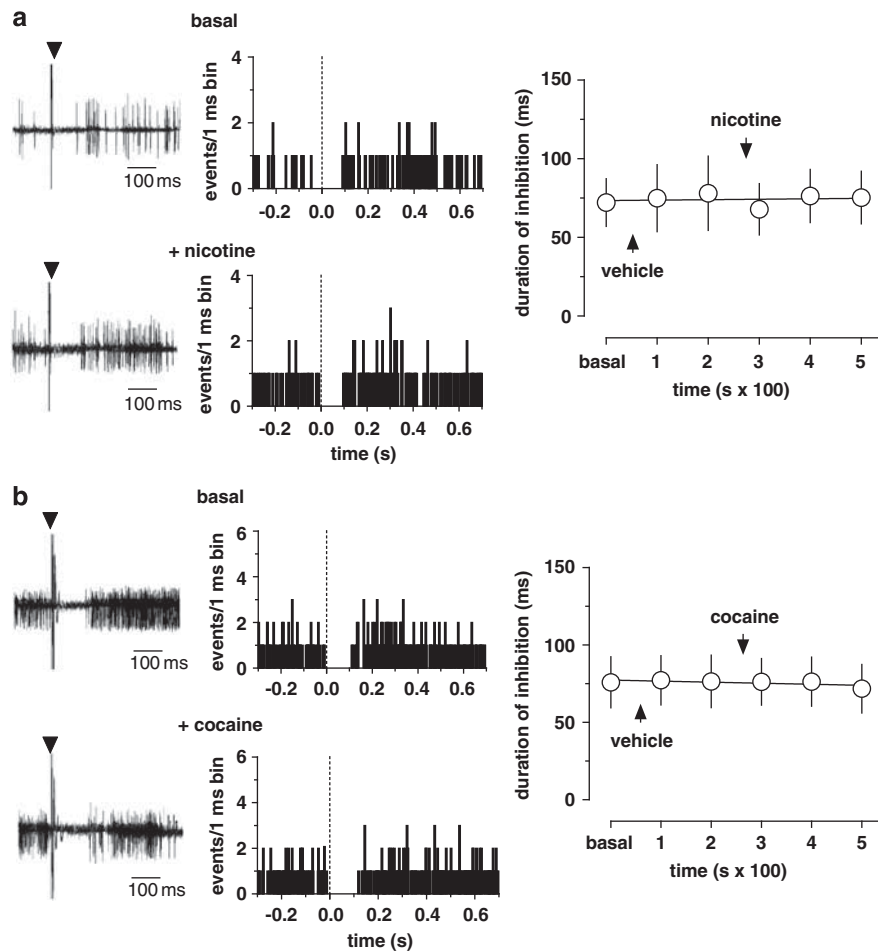


Figure 6 Nicotine and cocaine do not affect the suppression of VTA DA spontaneous activity elicited by RMTg stimulation. (a) Example of short-latency RMTg-evoked responses in a VTA DA neuron before and after nicotine (0.2 mg/kg, iv). Inhibitory responses were unchanged. On the right, the graph shows the time course of nicotine's effect on the duration of inhibition ($n = 6$). (b) Example of RMTg-evoked responses before and after cocaine in a VTA DA neuron. VTA inhibitory responses were also unaffected by cocaine (1 mg/kg, iv). The time course of cocaine's effect is shown (right panel). The results are means, with vertical bars representing the SEM of the duration of inhibition expressed as a percentage of the baseline ($n = 5$).

The physiological relevance of the RMTg as a primary source of inhibitory inputs to DA neurons is emphasized by the finding that RMTg stimulation induced a time-locked temporary cessation of discharge activity in half of DA cells of the VTA, thus suggesting a monosynaptic pathway. This result is in agreement with anatomical studies showing that about 60% of VTA DA neurons are directly innervated by RMTg GABA projections (Jhou *et al*, 2009a; Jhou *et al*, 2009b; Kaufling *et al*, 2010a). It must be pointed out, however, that this proportion could be underestimated, as the RMTg shifts dorsally as it extends caudalward, hence we unlikely stimulated the entire efferent projections. Hence, studies in monkeys have determined that 96% of DA neurons were inhibited by RMTg stimulation (Hong *et al*, 2011). Interestingly, the electrical stimulation of the LHB, one of the main excitatory inputs to RMTg, induces a similar inhibition, though relatively delayed, on a large number of VTA DA neurons (Christoph *et al*, 1986; Ji and Shepard, 2007). This is consistent with recent anatomical studies illustrating that glutamatergic projections from LHB primarily end on GABA neurons in the RMTg (Balcita-Pedicino *et al*, 2011) and that inhibition of DA neurons is disynaptic. Furthermore, our characterization of the

RMTg-induced inhibition on DA neurons underscored a negative correlation between the spontaneous activity of DA neurons and the duration of activity suppression: the higher the firing rate, the shorter the time of complete firing cessation induced by RMTg stimulation. This result further suggests that RMTg afferents to VTA DA neurons are major regulators of their spontaneous discharge rate. Moreover, bursting and regularly firing cells were silenced by RMTg stimulation for a shorter duration than irregular cells, suggesting that the latter subpopulation of DA neurons is under a stronger control by the RMTg. Additionally, the reaction of DA neurons to a noxious stimulus (paw pinch) was crucially dependent on their response to the RMTg. Hence, only DA cells inhibited by RMTg stimulation were also significantly inhibited by paw pinch. This finding can be explained by the prominent role of RMTg in the encoding of aversive stimuli (Jhou *et al*, 2009a), by responding to paw pinch with a fast and phasic excitation (Lecca *et al*, 2011), whereas DA neurons display heterogeneous responses (Brischoux *et al*, 2009). Our results suggest the possibility that this heterogeneity might depend on the presence of RMTg synapses impinging on DA neurons and/or their relative strength, and that DA neurons might also

encode aversive and noxious signals depending on whether they are innervated by the RMTg. It must be pointed out, however, that conventional criteria for DA neurons identification are quite conservative (see Materials and Methods) and might have led us to exclude subpopulations of DA neurons that differ from the main population in several parameters, such as high firing rate or short duration of action potentials (Lammel *et al*, 2008; Margolis *et al*, 2008).

Our findings that synapses between RMTg neurons and DA cells could also be an important locus of action for some drugs of abuse support the notion that firing rate and pattern of VTA DA cells depend crucially on the balance between excitatory and inhibitory afferents (Marinelli *et al*, 2006; Morikawa and Paladini, 2011), rather than on their intrinsic properties, and that affects DA release in terminal regions.

Hence, our observation that WIN suppressed the inhibition of DA neurons evoked by RMTg stimulation, an effect reversed by the cannabinoid antagonist rimonabant, is consistent with the depression of IPSCs evoked by stimulation of caudal afferents through a reduced probability of GABA release. This effect is mediated by CB1 receptors expressed by GABA terminals in the VTA (Marinelli *et al*, 2007; Matyas *et al*, 2007; Wenger *et al*, 2003), where they decrease GABA release (Marinelli *et al*, 2007; Szabo *et al*, 2002). Taken together, the combined effects of RMTg inhibition (Lecca *et al*, 2011) and depression of its GABA synaptic inputs to DA neurons (present results) might provide the first evidence, to our knowledge, for the mechanism by which cannabinoids excite DA cells *in vivo* (French, 1997; Gessa *et al*, 1998).

Similarly, morphine not only decreased the duration of RMTg-induced inhibition on DA neurons, but also reduced the amplitude of IPSCs evoked by the stimulation of caudal afferents to the VTA. Our findings point to a presynaptic mechanism, which would imply the presence of presynaptic μ -opioid receptors on GABA terminals arising from the RMTg. This is consistent with the presence of μ -opioid receptors on RMTg neurons (Jalabert *et al*, 2011), and with the effect of morphine on RMTg neuronal activity (Lecca *et al*, 2011), that was accompanied by a reduction of excitatory postsynaptic current amplitude recorded from those neurons. Opioids inhibit GABA synaptic transmission by reducing the probability of presynaptic neurotransmitter release in several brain regions (Capogna *et al*, 1993; Vaughan and Christie, 1997a; Vaughan *et al*, 1997b), and the VTA does not make an exception to this rule (Bergevin *et al*, 2002). Thus, similar to cannabinoids, opioids might alternatively disinhibit VTA DA neurons by means of a depression of discharge activity of RMTg cells coupled with a reduced probability of GABA release through presynaptic μ -opioid receptors.

Conversely, neither nicotine nor cocaine affects the duration of RMTg-evoked suppression of DA neurons *in vivo*. This was not unexpected, given that the mechanism of action of these drugs on DA neurons is not a disinhibition (Luscher and Ungless, 2006).

Previous studies have already shown that nicotine-induced increase of GABA drive to DA neurons, as indexed by an enhanced spontaneous IPSC frequency, is eliminated by tetrodotoxin (TTX; Keath *et al*, 2007). The TTX

sensitivity of nicotine's effects indicates that an increase in action potential activity of GABA neurons innervating the VTA might be responsible. Consistently, we previously demonstrated that nicotine strongly enhances firing rate of RMTg neurons (Lecca *et al*, 2011). However, nicotine did not enhance the duration of DA cell inhibition, as one would have expected if GABA release was facilitated. The reason is probably due to the contextual nicotine-induced increase in glutamate release (Mansvelder *et al*, 2002), which functionally counteracts the effects on GABA.

On the other hand, cocaine increases DA release (Di Chiara and Imperato, 1988) and inhibits firing rate of DA neurons (Einhorn *et al*, 1988; Luchicchi *et al*, 2010) through blockade of the DA transporter. Other studies showed that in VTA DA neurons cocaine also reduced IPSC frequency (Steffensen *et al*, 2008) and suggested that this drug acts on GABA neurons to reduce activity-dependent GABA release on DA cells by blocking voltage-gated Ca^{2+} channels. This effect may synergize with the inhibition of the DA transporter to further enhance DA release (Steffensen *et al*, 2008). Our results show that cocaine, although it reduces the discharge activity of both RMTg and DA neurons, does not affect the inhibition induced by RMTg stimulation. This finding leads us to hypothesize that cocaine does not target the RMTg–DA synapses.

The fact that cocaine and nicotine do not affect the duration of RMTg-induced firing suppression of DA neurons, but they do decrease or increase, respectively, firing rate of these cells, strongly suggests that the effect of drugs on frequency and on the evoked inhibition are not passively correlated, and therefore that one is not a consequence of the other.

In conclusion, our results suggest that cannabinoids and opioids profoundly influence both RMTg neuron activity and synaptic responses of DA neurons evoked by RMTg activation. It can be speculated that RMTg neurons, which lie in functional opposition to reward-encoding DA cells, might take place in the complex neural circuits mediating aversion and reward.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Stefano Aramo and Barbara Tuveri for their skillful technical assistance, and the Regione Autonoma della Sardegna, Assessorato alla Programmazione for the support given to MP (grants for basic research, Legge Regionale 7/2007) and to SL, and AL through the program 'Bursaries for Young Researchers' (Legge Regionale 7/2007).

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Balcita-Pedicino JJ, Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2011). The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J Comp Neurol* 519: 1143–1164.
- Bergevin A, Girardot D, Bourque MJ, Trudeau LE (2002). Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the

- secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacology* 42: 1065–1078.
- Bonci A, Williams JT (1997). Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci* 17: 796–803.
- Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4894–4899.
- Capogna M, Gahwiler BH, Thompson SM (1993). Mechanism of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus *in vitro*. *J Physiol* 470: 539–558.
- Christoph GR, Leonzio RJ, Wilcox KS (1986). Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci* 6: 613–619.
- Di Chiara G, Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5274–5278.
- Einhorn LC, Johansen PA, White FJ (1988). Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: studies in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 8: 100–112.
- Faber DS, Korn H (1991). Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys J* 60: 1288–1294.
- Fabricius K, Helboe L, Fink-Jensen A, Wortwein G, Steiniger-Brach B, Sotty F (2010). Increased dopaminergic activity in socially isolated rats: an electrophysiological study. *Neurosci Lett* 482: 117–122.
- Ford CP (2006). Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J Neurosci* 26: 2788–2797.
- French ED (1997). delta9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. *Neurosci Lett* 226: 159–162.
- French ED, Dillon K, Wu X (1997). Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* 8: 649–652.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M et al (2008). Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33: 2688–2700.
- Gessa GL, Melis M, Muntoni AL, Diana M (1998). Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 341: 39–44.
- Grace AA, Bunney BS (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons-1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10: 301–315.
- Grace AA, Bunney BS (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4: 2877–2890.
- Hong S, Jhou TC, Smith M, Saleem KS, Hikosaka O (2011). Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *J Neurosci* 31: 11457–11471.
- Hyland BI, Reynolds JN, Hay J, Perk CG, Miller R (2002). Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114: 475–492.
- Ikemoto S (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 129–150.
- Jalabert M, Bourdy R, Courtin J, Veinante P, Manzoni OJ, Barrot M et al (2011). Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 16446–16450.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009a). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61: 786–800.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009b). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513: 566–596.
- Ji H, Shepard PD (2007). Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* 27: 6923–6930.
- Johnson SW, North RA (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12: 483–488.
- Jones GA, Norris SK, Henderson Z (1999). Conduction velocities and membrane properties of different classes of rat septo-hippocampal neurons recorded *in vitro*. *J Physiol* 517(Pt 3): 867–877.
- Kauffman J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513: 597–621.
- Kauffman J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010a). gamma-Aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* 67: 88–92.
- Kauffman J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ et al (2010b). Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol* 161: 1677–1691.
- Keath JR, Iacoviello MP, Barrett LE, Mansvelder HD, McGehee DS (2007). Differential modulation by nicotine of substantia nigra vs ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol* 98: 3388–3396.
- Kelland MD, Chiodo LA, Freeman AS (1990). Anesthetic influences on the basal activity and pharmacological responsiveness of nigrostriatal dopamine neurons. *Synapse* 6: 207–209.
- Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B, Roeper J (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57: 760–773.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Ennas MG, Castelli MP, Muntoni AL et al (2011). Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36: 589–602.
- Luchicchi A, Lecca S, Carta S, Pillolla G, Muntoni AL, Yasar S et al (2010). Effects of fatty acid amide hydrolase inhibition on neuronal responses to nicotine, cocaine and morphine in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area: involvement of PPAR-alpha nuclear receptors. *Addict Biol* 15: 277–288.
- Luscher C, Ungless MA (2006). The mechanistic classification of addictive drugs. *PLoS Med* 3: e437.
- Malinow R, Tsien RW (1990). Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346: 177–180.
- Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 33: 905–919.
- Margolis EB, Mitchell JM, Ishikawa J, Hjelmstad GO, Fields HL (2008). Midbrain dopamine neurons: projection target determines action potential duration and dopamine d2 receptor inhibition. *J Neurosci* 28: 8908–8913.
- Marinelli M, Rudick CN, Hu XT, White FJ (2006). Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5: 79–97.
- Marinelli S, Di Marzo V, Florenzano F, Fezza F, Viscomi MT, van der Stelt M et al (2007). N-arachidonoyl-dopamine tunes synaptic transmission onto dopaminergic neurons by activating both cannabinoid and vanilloid receptors. *Neuropsychopharmacology* 32: 298–308.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447: 1111–1115.

- Matsumoto M, Hikosaka O (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci* **12**: 77–84.
- Matyas F, Urban GM, Watanabe M, Mackie K, Zimmer A, Freund TF et al (2007). Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology* **54**: 95–107.
- Melis M, Camarini R, Ungless MA, Bonci A (2002). Long-lasting potentiation of GABAergic synapses in dopamine neurons after a single *in vivo* ethanol exposure. *J Neurosci* **22**: 2074–2082.
- Morikawa H, Paladini CA (2011). Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. *Neuroscience* **198**: 95–111.
- Nie Z, Schweitzer P, Roberts AJ, Madamba SG, Moore SD, Siggins GR (2004). Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science* **303**: 1512–1514.
- Paxinos G, Watson C (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th edn. Elsevier Academic Press: London.
- Perrotti LI, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulerly PG et al (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* **21**: 2817–2824.
- Pistis M, Perra S, Pillolla G, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL (2004). Adolescent exposure to cannabinoids induces long-lasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry* **56**: 86–94.
- Steffensen SC, Stobbs SH, Colago EE, Lee RS, Koob GF, Gallegos RA et al (2006). Contingent and non-contingent effects of heroin on mu-opioid receptor-containing ventral tegmental area GABA neurons. *Exp Neurol* **202**: 139–151.
- Steffensen SC, Taylor SR, Horton ML, Barber EN, Lyle LT, Stobbs SH et al (2008). Cocaine disinhibits dopamine neurons in the ventral tegmental area via use-dependent blockade of GABA neuron voltage-sensitive sodium channels. *Eur J Neurosci* **28**: 2028–2040.
- Szabo B, Siemes S, Wallmichrath I (2002). Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur J Neurosci* **15**: 2057–2061.
- Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP (2004). Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* **303**: 2040–2042.
- Vaughan CW, Christie MJ (1997a). Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey *in vitro*. *J Physiol* **498**(Pt 2): 463–472.
- Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ (1997b). How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* **390**: 611–614.
- Wenger T, Moldrich G, Furst S (2003). Neuromorphological background of cannabis addiction. *Brain Res Bull* **61**: 125–128.
- Yamaguchi T, Wang HL, Li X, Ng TH, Morales M (2011). Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J Neurosci* **31**: 8476–8490.