



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN TOSSICOLOGIA

Farmacologia e Farmacoterapia delle Tossicodipendenze

Ciclo XXVI

Effetti dell'astinenza da morfina in un modello computazionale di un neurone dopaminergico

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/14 FARMACOLOGIA

Presentata da:	Dott. Fabio Caboni
Coordinatore Dottorato:	Prof. Gaetano Di Chiara
Relatore	Prof. Marco Diana

Esame finale anno accademico 2012 – 2013

INDICE

Abstract	Pag.	3
Introduzione		5
Neuroscienze computazionali		5
Il sistema limbico		9
La trasmissione dopaminergica		11
Oppioidi		18
Cenni storici		18
Effetti su sistema mesolimbico		21
La tossicodipendenza		23
Obiettivi		26
Metodi		27
Ricostruzione morfometrica		27
Generazione del modello computazionale		28
Risultati		32
Discussione		37
Ringraziamenti		40
Appendice		40
Bibliografia		43

Abstract

Dopamine (DA) neurons of the ventral tegmental area (VTA) are involved in the neurobiological mechanisms underlying addictive processes. It has been shown that withdrawal from drugs of abuse, causes profound modifications in the morphology and physiology of these neurons, but the mechanisms underlying these modifications are poorly understood. Because of their high predictive value, computational models are a powerful tool in neurobiological research, and have been used to gain further insights and deeper understanding on the molecular and physiological mechanisms underlying the development of various psychiatric disorders.

Here we present a biophysical model of a DA VTA neuron based on 3d morphological reconstruction and electrophysiological data from literature, showing how opiate withdrawal-driven morphological and electrophysiological changes could affect the firing rate and pattern of these neurons.

The model is composed by 89 membrane segments, with sodium and calcium dynamics responsible for the basal in vivo activity of these neurons; the set of inputs is modeled adding GabaA and AMPA/NMDA

synapses, activated in such a way to model the behavior of gabaergic and glutamatergic inputs, respectively. We modeled the opiate withdrawal state by applying to the model morphometric modifications observed experimentally and by modulating the balance of Gaba/Glu inputs as described by electrophysiological data. Our results suggest that changes in the balance of Gaba/Glu inputs could explain the hypofunction of VTA DA neurons with different effects on synaptic efficacy, while morphological changes could be responsible for their higher responsivity to opiate administration observed during opiate withdrawal.

Keywords : withdrawal, GABA, glutamate, biophysical model, VTA, dopamine.

Introduzione

Neuroscienze computazionali.

L'obiettivo centrale delle neuroscienze computazionali è quello di chiarire i meccanismi alla base della funzione del cervello, delle dinamiche e del calcolo nei circuiti neuronali, attraverso la realizzazione di modelli matematici in grado di descrivere i fenomeni biologici e simulazioni al computer in grado di riprodurre tali processi.

Essendo cellule eccitabili, i neuroni possono essere rappresentati attraverso l'utilizzo delle equazioni matematiche che descrivono le loro caratteristiche attive e passive; è possibile descrivere la cellula nervosa come un circuito elettrico nel quale la membrana si comporta come un condensatore, la permeabilità selettiva della membrana alle specie ioniche si comporta come una resistenza e i gradienti elettrochimici presenti a cavallo della membrana stessa forniscono le 'driving forces' che generano le correnti ioniche. I canali ionici vengono modellati utilizzando le equazioni che ne descrivono le cinetiche e le costanti di apertura e chiusura sulla base di dati ottenuti sperimentalmente attraverso tecniche elettrofisiologiche.

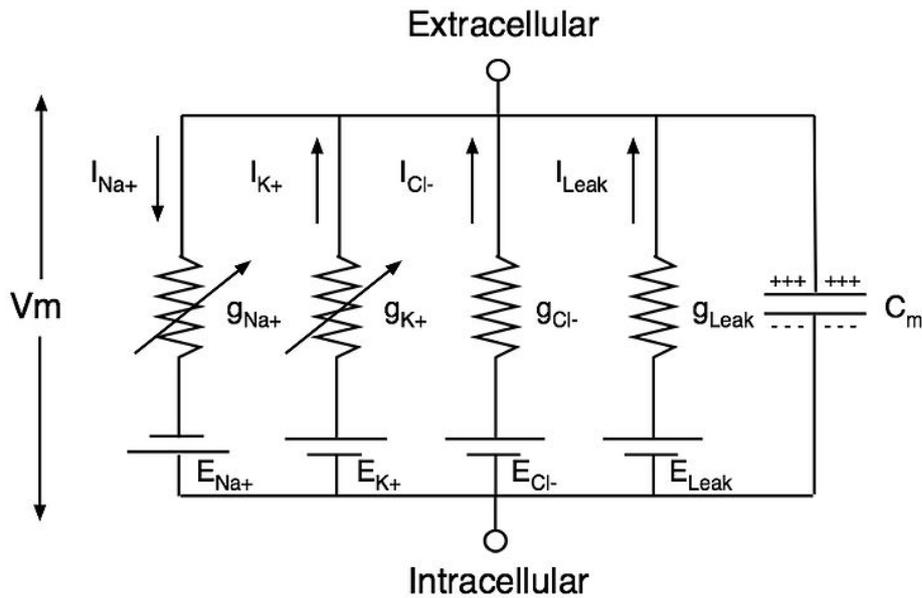


Figura 1 Diagramma del circuito equivalente che descrive la membrana cellulare di una cellula eccitabile permeabile a 3 ioni

La prima descrizione matematica dettagliata dell'attività neuronale fu realizzata da Alan Hodgkin e Andrew Huxley sulla generazione e propagazione del segnale nervoso nell'assone gigante del calamaro (Hodgkin and Huxley, 1952): grazie alle loro scoperte i due ricercatori svilupparono la prima teoria cinetica sulla permeabilità della membrana; la descrizione matematica del fenomeno dell'eccitabilità da loro realizzata è una delle basi delle neuroscienze. Essi identificarono due specie ioniche che contribuivano maggiormente ai cambiamenti nel potenziale di membrana, assieme ad una corrente di "leakage" di fondo: una corrente al Na^+ ed una al K^+ . Attraverso una serie di esperimenti furono in grado di

dimostrare che queste due correnti non solo rispettavano la legge di Ohm, ma che potevano essere descritte attraverso la combinazione di cinetiche bifasiche.

Il modello sviluppato da Hodgkin e Huxley descrive con precisione le dinamiche che sottendono alla genesi del potenziale d'azione (AP). Questo fenomeno, che è caratteristico delle cellule eccitabili, è essenziale per la ricezione, l'elaborazione e la comunicazione delle informazioni nel sistema nervoso. Un AP viene generato quando il voltaggio della membrana supera un valore denominato soglia. Quando la soglia viene superata, si attivano le correnti ioniche che portano la cellula a generare uno "spike" e in seguito a ripolarizzarsi (figura 2).

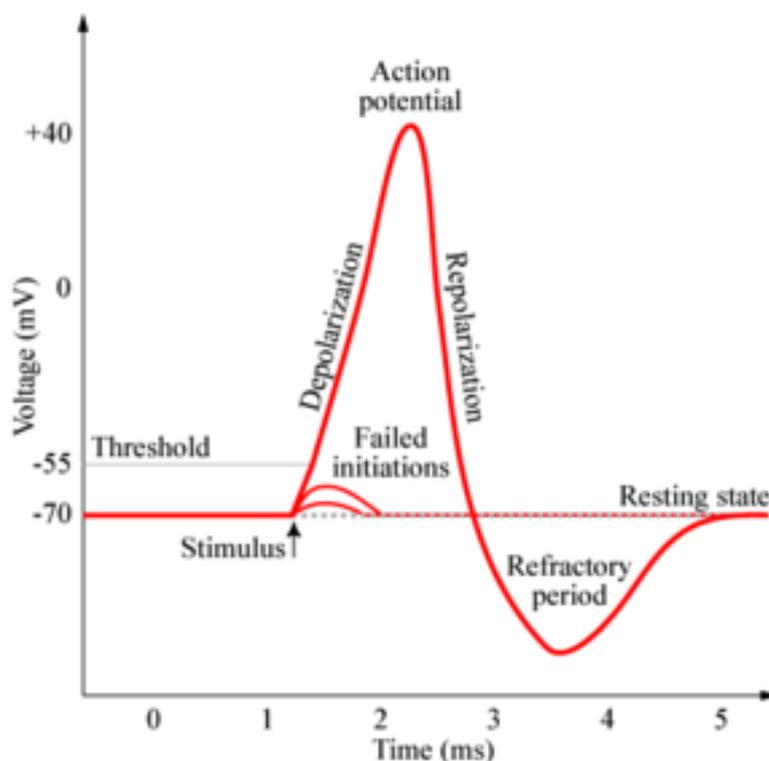


Figura 2 Rappresentazione schematica di un potenziale d'azione.

Con l'incremento delle conoscenze nelle neuroscienze e il progresso tecnologico, i modelli computazionali vengono utilizzati per studiare non soltanto il comportamento di singoli neuroni o le dinamiche che determinano la genesi del potenziale d'azione, ma anche fenomeni complessi quali l'effetto dell'accumulo della proteina β -amiloide sulla membrana dei neuroni piramidali nel morbo di Alzheimer (Culmone and Migliore, 2012), o le dinamiche molecolari che potrebbero portare alla degenerazione neuronale nella genesi del morbo di Parkinson (Pissadaki and Bolam, 2013); sono stati generati anche diversi modelli computazionali che simulano i diversi approcci al fenomeno della tossicodipendenza (Ahmed et al., 2009).

I modelli computazionali sono ad oggi un valido strumento predittivo per la progettazione di nuovi esperimenti, per dimostrare la plausibilità di una teoria, per analizzare le dinamiche complesse dei sistemi neurali; l'utilizzo dei modelli computazionali consente inoltre di ridurre il numero degli animali utilizzati per la sperimentazione.

Nell'ambito dello studio della trasmissione dopaminergica, diversi modelli computazionali sono stati realizzati con l'intento di delucidare i meccanismi che determinano le due modalità di firing esibite da questi

neuroni (Amini et al., 1999; Canavier and Landry, 2006; Komendantov et al., 2004) e i possibili effetti dell'assunzione di EtOH a livello cellulare (Migliore et al., 2008).

In questo lavoro, un modello dettagliato multicompartimentale è stato utilizzato per analizzare gli effetti delle modificazioni morfometriche ed elettrofisiologiche indotte dall'astinenza da morfina sulla trasmissione dopaminergica mesolimbica.

Il sistema limbico

Il sistema limbico è costituito da aree filogeneticamente antiche, sviluppatasi attorno alla funzione olfattoria e comprende formazioni telencefaliche e diencefaliche, l'ipotalamo, l'amigdala, il nucleo mediodorsale e il nucleo anteriore del talamo, l'ippocampo, il setto, il nucleus accumbens (NAcc), la corteccia prefrontale (PFCX), la corteccia entorinale (Castano e Donato, 2001). Il sistema limbico presiede a funzioni primordiali indispensabili per la sopravvivenza del singolo e della specie, regolando i comportamenti alimentari, di fuga e di attacco, di aggressività e di sottomissione, i comportamenti sessuali e l'istinto materno. Allo

scopo di assicurare il realizzarsi di questi comportamenti, la selezione naturale ha fornito il cervello degli organismi superiori di centri sensibili agli stimoli ambientali importanti per la sopravvivenza e anche della capacità di reagire a questi stimoli con una risposta emozionale, positiva o negativa, definita valenza motivazionale dello stimolo. Uno stimolo può essere percepito positivamente o negativamente in maniera specie-specifica, secondo parametri puramente istintivi, o in modo condizionato attraverso processi di apprendimento.

Il sistema limbico svolge, quindi, un ruolo importante nelle manifestazioni comportamentali relative alla gratificazione e all'avversione. Gli stimoli naturali indispensabili per la sopravvivenza (cibo, acqua, sesso) possiedono una valenza motivazionale positiva poiché producono effetti piacevoli, sono quindi considerati stimoli appetitivi. Qualunque stimolo riconosciuto come dannoso, spiacevole o doloroso, è interpretato come stimolo dotato di valenza motivazionale negativa e considerato avversivo. Nel caso di stimoli piacevoli, il comportamento sarà volto alla ricerca e all'avvicinamento degli stimoli stessi (comportamento motivato). Nel caso di stimoli spiacevoli o dolorosi, invece, saranno messe in atto strategie volte ad attenuarli o a estinguerli (comportamento avversivo).

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

Questo fenomeno è evidenziato da studi farmacologici, condotti per mezzo della microdialisi cerebrale (Di Chiara, 1995).

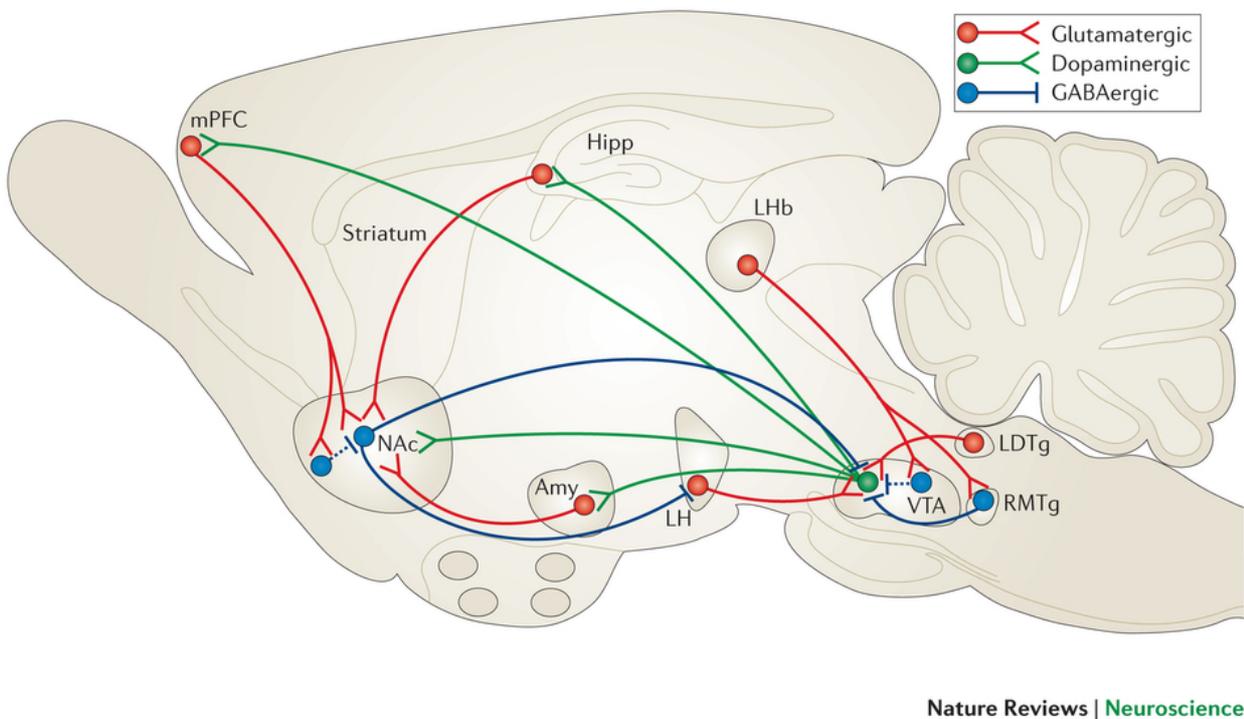


Figura 3 Rappresentazione schematica del circuito limbico (Russo and Nestler, 2013)

La trasmissione dopaminergica

La dopamina (3,4-diidrossifenilettilammina) è uno dei principali neurotrasmettitori della trasmissione catecolaminergica. Alla fine degli anni '50 si ipotizzò che potesse svolgere il ruolo di neurotrasmettitore indipendentemente dalla sua funzione di precursore dell'adrenalina e noradrenalina (Carlsson et al., 1957). Furono presto identificati neuroni specifici contenenti come neurotrasmettitore primario la DA a livello: extrapiramidale, limbico e ipotalamo-ipofisario.

Nella terminazione nervosa la DA viene immagazzinata all'interno di vescicole sinaptiche e, in misura minore, si trova libera nel citoplasma. La DA viene liberata nello spazio sinaptico attraverso un meccanismo di esocitosi, processo che viene scatenato dalla depolarizzazione della membrana presinaptica con conseguente entrata di calcio. La DA si lega ai suoi recettori metabotropici, associati a proteine G, che sono divisi nella famiglia dei D1-like e D2-like. Alla prima appartengono i recettori D1 e D5 mentre alla seconda i D2, D3 e D4. Le due famiglie differiscono per il meccanismo di trasduzione del segnale: i D1 stimolano l'adenilato ciclasi incrementando la sintesi di cAMP e aumentando l'attività della Fosfolipasi C, mentre i D2 inibiscono l'adenilato ciclasi, incrementando la fuoriuscita

di potassio dalla cellula e inibiscono l'influsso di calcio, iperpolarizzando così la cellula. Il segnale dopaminergico viene interrotto attraverso due meccanismi principali: ricaptazione e catabolismo. Inoltre la DA agendo sui recettori D2 presinaptici (noti anche come autorecettori) esercita un controllo di tipo inibitorio sulla liberazione della stessa DA. Circa l'80% della DA liberata nello spazio sinaptico viene ricaptata attraverso specifici trasportatori di membrana localizzati a livello presinaptico. Il catabolismo prevede due principali vie di degradazione: una deaminazione ossidativa realizzata dalle monoamine-ossidasi (MAO) e una O-metilazione che avviene per opera delle catecol-ossi-metiltransferasi. Il prodotto finale del catabolismo operato dalle MAO e dalle COMT è l'acido omovanillico.

Possiamo distinguere il sistema dopaminergico in funzione della lunghezza delle fibre di proiezione che lo costituiscono in:

- Sistema di proiezione breve
- Sistema di proiezione lungo

Sistema dopaminergico breve: i neuroni DA presentano il corpo cellulare nell'ipotalamo e i loro brevi assoni vengono proiettati all'eminenza mediana dove la DA viene liberata e tramite il circolo ipotalamo ipofisario giunge all'ipofisi anteriore regolando la secrezione ormonale.

Sistema dopaminergico lungo: si suddivide in mesostriatale, mesolimbico, mesocorticale. I neuroni DA presentano il corpo cellulare nel mesencefalo e in particolare alcuni sono localizzati nella pars compatta della SN (area A9) e altri nell'area ventrale del tegmento (VTA, area A10).

La maggior parte dei neuroni A9 confluisce nella parte somato- motoria dello striato (gangli della base) ossia striato dorsale, che è implicato nell'apprendimento e nell'esecuzione dei movimenti complessi che comportano una pianificazione motoria, con formazione del sistema mesostriatale. Una degenerazione dei neuroni a questo livello comporta l'insorgenza del morbo di Parkinson con la comparsa di tutta la sintomatologia caratteristica: rigidità, acinesia, tremori. La maggior parte dei neuroni A10 invece confluisce nella parte latero basale dello striato (striato ventrale) in prossimità di aree limbiche quali NAcc, nuclei olfattori, amigdala e ippocampo. Si tratta di aree fondamentalmente coinvolte nelle risposte emotive e nel comportamento motivazionale formando quello che va sotto il nome di sistema mesolimbico. Tale sistema integra le emozioni con il comportamento, tramite le motivazioni che spingono un individuo ad assumere un comportamento chiamato appunto comportamento motivato.

Infine lunghe proiezioni che dal mesencefalo terminano nel prosencefalo, in particolare nella corteccia prefrontale (PFCX) formano il cosiddetto sistema mesocorticale. Tale sistema svolge diverse e importanti funzioni quali: regolazione dell'attività di aree sottocorticali, influenza l'espressione del movimento ed è importante per focalizzare l'attenzione del soggetto verso stimoli motivazionali che hanno valenza sia negativa che positiva. Ancora è coinvolto nella regolazione del comportamento emozionale e affettivo. Tale sistema ha una notevole influenza sul tono dell'umore e sull'attenzione, rendendo l'individuo attivo verso l'ambiente esterno, ed è inoltre coinvolto nella regolazione dei processi di gratificazione e di apprendimento incentivo.

La trasmissione DA mesolimbica, ed in particolare le proiezioni verso il NAcc, svolge un ruolo importante nella gratificazione naturale e nella gratificazione indotta artificialmente tramite la somministrazione di sostanze d'abuso.

A questo proposito è necessario ricordare che il NAcc non è una struttura omogenea ma è suddiviso in due sottoporzioni molto diverse tra loro sia da un punto di vista anatomico che funzionale: un compartimento ventromediale, la "shell", con funzioni prettamente limbiche (integrazione

delle emozioni e della motivazione), e un compartimento dorso-laterale, il “core”, che è considerato la continuazione del caudato putamen e che quindi ha funzioni extrapiramidali (Alheid and Heimer, 1988; Groenewegen and Russchen, 1984; Heimer et al., 1991; Voorn et al., 1989; Zahm and Brog, 1992). Infine è stato individuato un compartimento anteriore, il “polo rostrale”, con caratteristiche comuni alle altre due porzioni (Zahm and Brog, 1992).

La DA esplica differenti azioni nei due compartimenti del NAcc nell’ambito delle manifestazioni del comportamento motivato; infatti, il suo aumento nella shell sarebbe importante per gli effetti correlati all’apprendimento associativo dello stimolo gratificante, mentre la sua stimolazione nel core, sarebbe necessaria per promuovere il comportamento motorio di approccio allo stimolo stesso.

Oppioidi.

Cenni storici

Gli oppioidi sono ben noti per i loro potenti effetti analgesici e per le loro proprietà rinforzanti.

Sono forse le prime sostanze d'abuso conosciute dall'uomo. Ai giorni nostri, l'abuso di oppiacei è un grave problema della società. La ricerca sulla tolleranza e dipendenza da oppiacei costituisce uno dei rami più interessanti nel campo della tossicodipendenza.

L'epoca in cui l'oppio è originariamente apparso nella vita umana può essere stimata a circa 5000 anni fa (Brownstein, 1993). L'oppio si ottiene estraendo il succo acerbo dalla capsula del *Papaver somniferum*. In un primo momento, l'oppio è stato utilizzato come euforizzante, che veniva chiamato ' gil ', che significa gioia. Nel medioevo è stato impiegato in medicina come antidolorifico e per il trattamento della dissenteria. Nel 1803 la prima sostanza attiva isolata da Sertürner dall'oppio è stata chiamata morphinum.



Figura 4 Capsula di *Papaver somniferum* incisa per la raccolta dell'oppio

Oggi più di 40 alcaloidi dell'oppio sono stati estratti e caratterizzati. Nello sforzo di ricerca di oppiacei più potenti, sicuri e non-additivi, nel 1898 venne sintetizzato il primo oppiaceo artificiale, l'eroina; subito dopo vennero sintetizzati il metadone e il primo antagonista, la nalorfina. Nel

1971 fu ipotizzata l'esistenza di un recettore per gli oppiacei (Goldstein et al., 1971). Nel 1973 tre gruppi indipendentemente e quasi simultaneamente descrivono la presenza di siti di legame stereospecifici per gli oppioidi all'interno del cervello (Pert and Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973). Studi successivi hanno rivelato la presenza di tre distinte tipologie del recettore per gli oppioidi: *mu*, *delta* e *kappa*. L'esistenza confermata dei recettori per gli oppioidi ha portato alla ricerca dei loro ligandi endogeni. Solo due anni dopo, Hughes e collaboratori hanno isolato due peptidi oppioidi, Met-enkefalina e Leu-enkefalina, capaci di inibire il rilascio di acetilcolina dal plesso mioenterico-longitudinale muscolare dell'ileo nelle cavie, e questa inibizione veniva bloccata dal naloxone (Hughes, 1975). Negli anni successivi, sono state identificate tre grandi famiglie di peptidi oppioidi (dinorfine, enkefaline e β -endorfine) con diversa origine genetica e una differente affinità per le tipologie recettoriali. Le enkefaline presentano elevata affinità per il recettore delta, le dinorfine si legano prevalentemente al recettore kappa, mentre si crede che le β -endorfine siano un ligando endogeno per i recettori mu. Recentemente sono stati scoperti due nuovi oppioidi endogeni, endomorfina-1 e endomorfina-2, con elevata affinità e selettiva

preferenza per il recettore mu (Zadina et al., 1997).

Effetti sul sistema mesolimbico

Sebbene gli oppioidi siano attualmente gli analgesici più potenti che si conoscano, il loro impiego clinico è limitato a causa delle loro spiccate proprietà rinforzanti; questi farmaci hanno dimostrato infatti di essere capaci di indurre una forte dipendenza, sia negli animali da esperimento che negli umani. È stato dimostrato che la somministrazione acuta di morfina provoca un aumento dell'attività dei neuroni dopaminergici della VTA (Diana et al., 1999; Georges et al., 2006); questo incremento nell'attività dei neuroni dopaminergici determina un aumento del rilascio di dopamina nel NAcc (Acquas and Di Chiara, 1992; Di Chiara and Imperato, 1988; Pontieri et al., 1995; Wise et al., 1995) e nel BNST (Carboni et al., 2000). Si ritiene che gli oppioidi legandosi ai loro recettori presenti sui neuroni GABAergici della VTA ne inibiscano l'attività, portando così ad un incremento nell'attività dei neuroni dopaminergici (Johnson and North, 1992).

La somministrazione cronica di farmaci oppioidergici determina l'insorgenza dei fenomeni di tolleranza e dipendenza. La tolleranza è

definita come la necessità di incrementare la dose di farmaco assunta per continuare ad ottenere lo stesso effetto (Nestler, 1996) mentre la dipendenza è resa evidente dai sintomi dell'astinenza che insorgono quando si interrompe bruscamente l'assunzione del farmaco dopo trattamento cronico o a seguito della somministrazione di un antagonista come il naloxone (Nestler, 1996). L'attività dei neuroni dopaminergici della VTA risulta essere profondamente ridotta nella sindrome di astinenza da morfina (Diana et al., 1995) così come il rilascio di dopamina nel NAcc (Acquas and Di Chiara, 1992); durante la sindrome di astinenza i neuroni dopaminergici sono interessati da modificazioni di carattere morfometrico, come il restringimento del corpo cellulare (Spiga et al., 2003) e da un cambiamento nel bilanciamento degli input sinaptici eccitatori e inibitori, con un incremento del rilascio di GABA (Bonci and Williams, 1997) e una riduzione delle correnti eccitatorie glutammatergiche (Manzoni and Williams, 1999).

La tossicodipendenza.

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

L'esposizione alle sostanze d'abuso altera la funzionalità dei circuiti neuronali coinvolti nella regolazione dei meccanismi di ricompensa e motivazione, apprendimento e memoria (Koob and Volkow, 2010).

L'assunzione ripetuta e prolungata delle sostanze d'abuso provoca, sia nell'uomo che negli animali da esperimento, l'insorgenza della tossicodipendenza. Essa è definita come un disturbo psichiatrico caratterizzato da tolleranza, compulsività e insorgenza della sindrome di astinenza a seguito della sospensione dell'assunzione del farmaco stesso.

La tolleranza è definita come la necessità di incrementare progressivamente la dose di farmaco assunto per ottenere un effetto pari a quello della prima somministrazione, mentre la sindrome di astinenza comprende la comparsa di una serie di stati emozionali negativi (disforia,

ansia, irritabilità) in seguito alla sospensione dell'assunzione della sostanza.

La tossicodipendenza coinvolge elementi di impulsività e compulsività: l'impulsività viene definita come “la tendenza a reagire rapidamente e con gesti non pianificati a stimoli interni ed esterni, senza preoccuparsi delle conseguenze negative di queste stesse reazioni per sé o per gli altri” (Moeller et al., 2001) , mentre la compulsività può essere definita come la attuazione continua di un comportamento nonostante le conseguenze negative ad esso associate. L'alternanza delle fasi di impulsività e compulsività determina la creazione di un complesso ciclo della dipendenza, che come il comportamento motivato, può essere suddiviso in tre fasi :

- fase incentiva, detta anche anticipatoria, in cui l'individuo è attratto dalla sostanza e mette in atto qualsiasi comportamento sia necessario per ottenerla.
- fase consumatoria, nella quale l'individuo entra in diretto contatto con la sostanza e la consuma.
- fase post-consumatoria, caratterizzata dalla comparsa dei sintomi della sindrome di astinenza.

Nelle prime due fasi, la capacità delle sostanze d'abuso di creare un rinforzo positivo risulta essere la “driving force” del comportamento di ricerca della sostanza, nell'ultima fase è il rinforzo negativo ad essere dominante. Il rinforzo negativo può essere definito come il processo attraverso il quale la rimozione di uno stimolo considerato negativo (i sintomi dell'astinenza) incrementa le probabilità di una risposta (Koob, 2004). È stato ipotizzato che queste tre diverse fasi interagiscano tra loro rafforzandosi, portando alla fine l'individuo verso la condizione patologica della dipendenza (Koob and Le Moal, 1997).

Obiettivi

Gli obiettivi fondamentali di questo lavoro sono stati:

- ✓ generare un modello computazionale in grado di riprodurre l'attività dei neuroni DAergici della VTA sia in condizioni di controllo che di astinenza da morfina, partendo dai dati morfometrici ed elettrofisiologici presenti in letteratura;
- ✓ analizzare il contributo di ogni singola modificazione indotta dalla sindrome di astinenza alla drammatica riduzione dell'attività dei neuroni DAergici della VTA osservata sperimentalmente;
- ✓ fornire possibili nuovi target farmacologici per il trattamento della sindrome di astinenza.

Metodi

Ricostruzione morfometrica

La ricostruzione morfometrica è stata ottenuta attraverso l'utilizzo della microscopia confocale (CLSM). Fette di cervello contenenti la VTA trattate con la procedura dell'immunoistochimica per la visualizzazione dei neuroni dopaminergici (Spiga et al., 2003) sono state scansionate utilizzando un microscopio confocale Leica 4D con laser argon-krypton. Le immagini confocali sono state ottenute con gli obiettivi PL Fluotar 10X (na.0.3), 40X oil (na.1.00) e 100X oil (na.1.3). Ogni immagine è stata acquisita otto volte e poi mediata per ottenere immagini prive di rumori di fondo (figura 5).

I dataset ottenuti con la CLSM sono stati ricostruiti utilizzando gli algoritmi "maximum intensity" ed "extended focus" del programma Imaris (v 5.0.3) della Bitplane. Tramite queste funzioni è possibile trasformare le immagini ottenute dalle scansioni in un oggetto virtuale tridimensionale che possiede le caratteristiche morfometriche delle cellule oggetto dello studio (diametro del soma; numero, lunghezza e diametro dei dendriti).

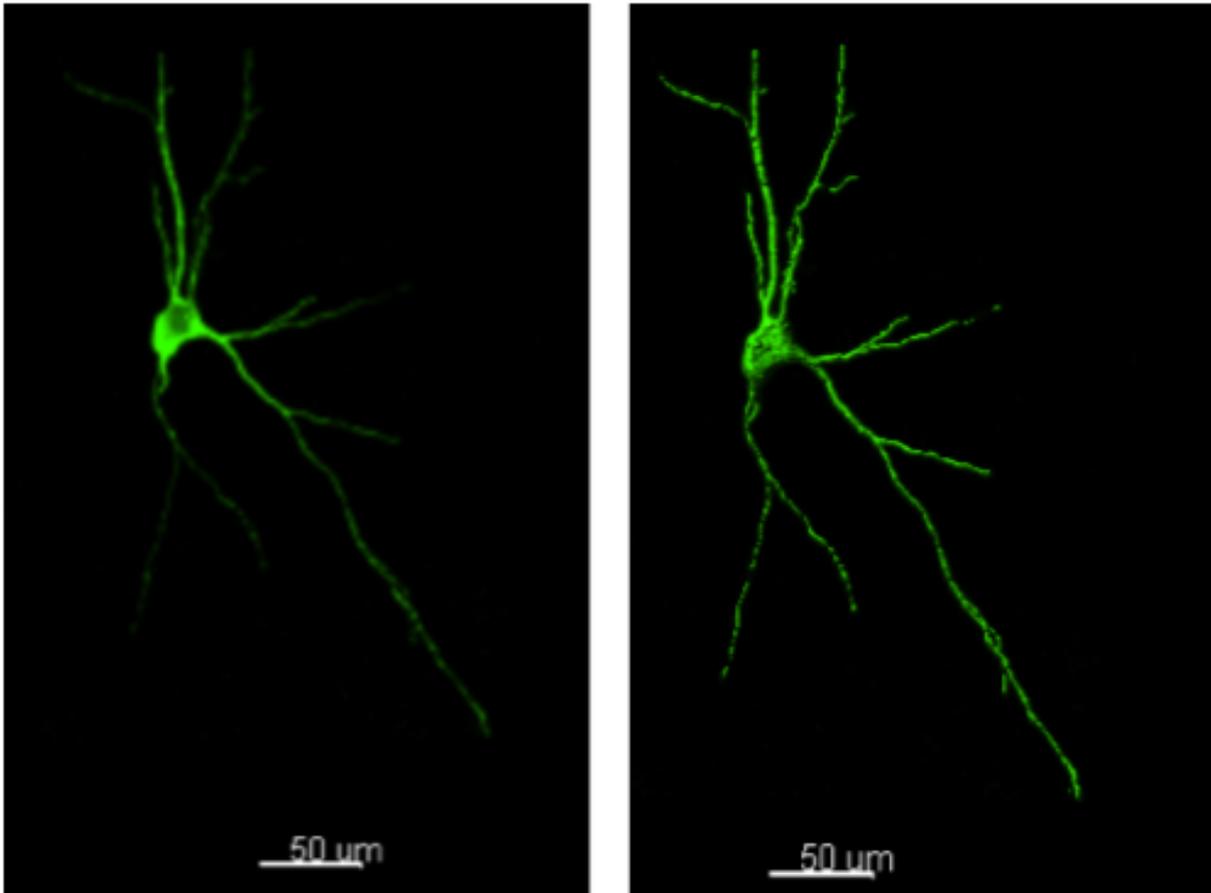


Figura 3 Ricostruzione morfometrica utilizzata per la creazione del modello. Sinistra: neurone dopaminergico marcato con anticorpo anti-TH. Destra: surface rendering realizzato tramite il software di ricostruzione Bitplane Imaris

Generazione del modello computazionale.

Tutte le simulazioni sono state effettuate attraverso l'utilizzo del software NEURON (v7, 61; Yale University, CT, USA).

Il modello è stato realizzato sulla base dei modelli precedentemente pubblicati (Amini et al., 1999; Canavier and Landry, 2006; Migliore et al., 2008).

il modello è composto da 89 segmenti di membrana ognuno dei quali contiene, oltre alle caratteristiche passive:

- Una corrente rapida al Na^+ (INa)
- Una corrente al K^+ “delayed rectifier” (IK,DR)
- Una corrente al K^+ “transiente” (IK,A)
- Una pompa al Na^+ (INaP)

Il corpo cellulare contiene inoltre le correnti voltaggio dipendenti del Ca^{2+} (ICa,T; ICa,N; ICa,L) e una corrente al K^+ dipendente dalla concentrazione intracellulare di Ca^{2+} (IK,SK).

La corrente sinaptica inibitoria GABA_A è presente su tutta la superficie del neurone, con un valore di conduttanza che nei dendriti è 1/10 rispetto a quella somatica, per enfatizzare il fatto che la componente inibitoria sia maggiormente localizzata sul corpo cellulare (Canavier and Landry, 2006).

Le sinapsi eccitatorie glutammatergiche AMPA ed NMDA sono state collocate sui dendriti secondari e vengono attivate attraverso un generatore di stimoli.

Il modello è stato calibrato in modo da riprodurre il comportamento dei neuroni dopaminergici osservato sperimentalmente (Grace and Bunney,

1984a, b), ed è in grado di riprodurre sia il “pacemaking” in assenza di stimoli sinaptici – sia eccitatori che inibitori – e il burst firing in presenza di stimolazione dei recettori glutammatergici. Le sinapsi eccitatorie sono state attivate tramite l'utilizzo di un generatore di stimoli bifasico che riproduce il comportamento dei neuroni piramidali della PFCX.

Per verificare quali siano gli effetti delle modificazioni delle correnti sinaptiche sull'attività dei neuroni DAergici, abbiamo modificato singolarmente ogni parametro; abbiamo applicato un incremento progressivo della conduttanza sinaptica inibitoria mantenendo costanti i livelli di stimolazione delle sinapsi eccitatorie, successivamente abbiamo applicato una riduzione progressiva della corrente eccitatoria mantenendo costante lo stimolo inibitorio. Sono stati testati anche gli effetti della riduzione del 30% del diametro del soma che è stata osservata sperimentalmente (Spiga et al., 2003).

Abbiamo valutato il numero di spikes/10 sec di simulazione, la percentuale di burst firing e i livelli di neurotrasmettitore rilasciato.

Uno spike viene considerato tale, e quindi contato, quando il voltaggio della membrana registrato sul soma supera i -30mV; i criteri per la definizione del “burst” sono basati sui dati sperimentali presenti in

letteratura : un “burst” è composto da due o più spike, inizia quando l’ISI -inter spike interval- è minore di 80ms e termina quando l’ISI è maggiore di 160ms (Grace and Bunney, 1984a). I livelli di neurotrasmettitore rilasciato durante una simulazione sono stati calcolati assumendo che venga rilasciato un quantitativo costante di neurotrasmettitore ad ogni spike emesso e che ci sia un meccanismo di reuptake con una $K_m=0.2\mu M$ e una velocità massima di reuptake di $5\mu M/s$ (Heien and Wightman, 2006; Wightman et al., 1988). La concentrazione di dopamina rilasciata ad ogni spike è stata calibrata in modo da riprodurre qualitativamente il rilascio osservato sperimentalmente nel NAcc e nel nucleo basolaterale dell’amigdala (Garris and Wightman, 1994). L’analisi ANOVA a una via è stata applicata per verificare la significatività statistica.

Risultati

Modificando contemporaneamente gli input sinaptici e la morfometria del neurone di interesse, abbiamo ottenuto una riduzione del 65% dell'attività neuronale, in accordo con le osservazioni sperimentali (Diana et al., 1995), come mostrato in figura 6. Al fine di individuare quale possa essere il contributo di ogni singola componente alla riduzione dell'attività neuronale osservata, abbiamo applicato ogni modificazione singolarmente. L'incremento della corrente inibitoria GABAergica ha provocato una riduzione dell'attività neuronale, riducendo la percentuale di burst senza modificare i single spike (burst/10 sec: $12,9 \pm 0.76$ CTRL VS 9.06 ± 0.8 GABA +50%, $p < 0.0001$), ma non è stato in grado di alterare significativamente il rilascio di DA. La riduzione dell'attività elettrofisiologica del neurone è accompagnata dalla riduzione della resistenza della cellula (figura 7).

La riduzione dell'intensità degli input eccitatori non solo ha provocato una riduzione più marcata dell'attività elettrofisiologica del modello (burst/10 sec 12.9 ± 0.76 CTRL VS 0.12 ± 0.09 Glu -50%, $p < 0.0001$), ma ha prodotto anche una profonda riduzione del rilascio della DA (95% rispetto alla simulazione di controllo, $p < 0.001$).

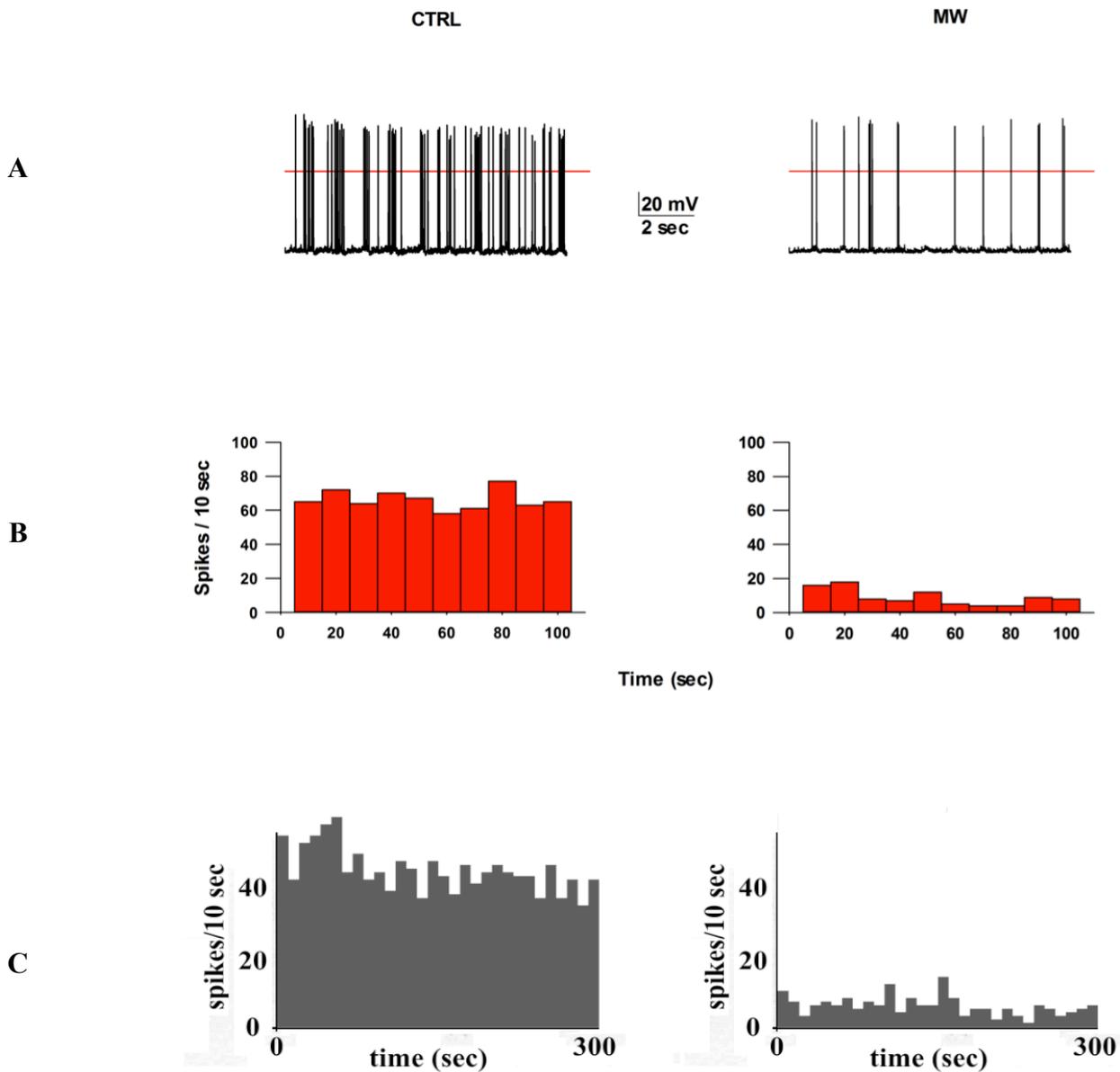


Figura 4 Confronto tra i risultati del modello e i dati sperimentali. A: traccia elettrofisiologica dei primi 10 sec di simulazione, in condizioni di controllo (sinistra) e astinenza da morfina (destra); B: firing frequency del modello; C: dati sperimentali (Diana et al., 1995)

Entrambe le modificazioni degli input hanno influenzato soltanto il burst firing pattern e non i single spikes (figura 8), confermando che questi ultimi dipendono dalle caratteristiche elettrofisiologiche intrinseche del neurone e non dagli input sinaptici.

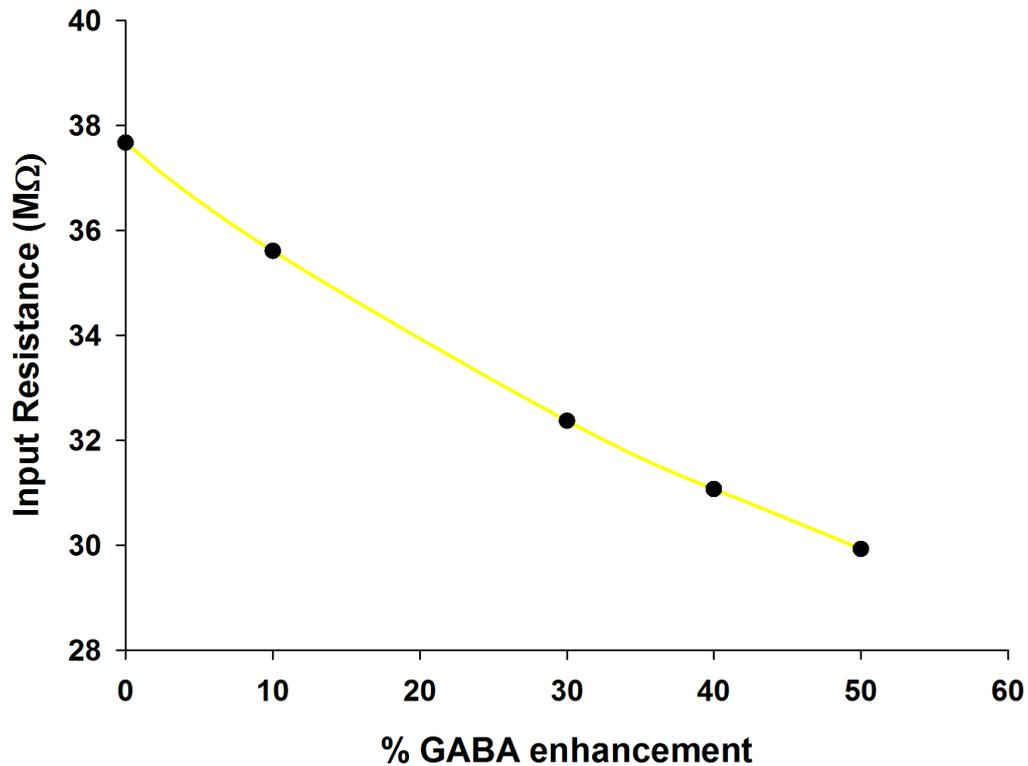


Figura 5 Effetto dell'incremento della corrente inibitoria sulla resistenza di membrana

La riduzione del diametro del corpo cellulare agisce in senso inverso alle modificazioni sinaptiche, provocando un incremento dell'attività elettrofisiologica neuronale, che in condizioni sperimentali è mascherato dall'incremento delle correnti sinaptiche inibitorie: abbiamo osservato in questo caso un incremento della resistenza di membrana, da 37 a 43MΩ (figura 9).

Effect of synaptic changes

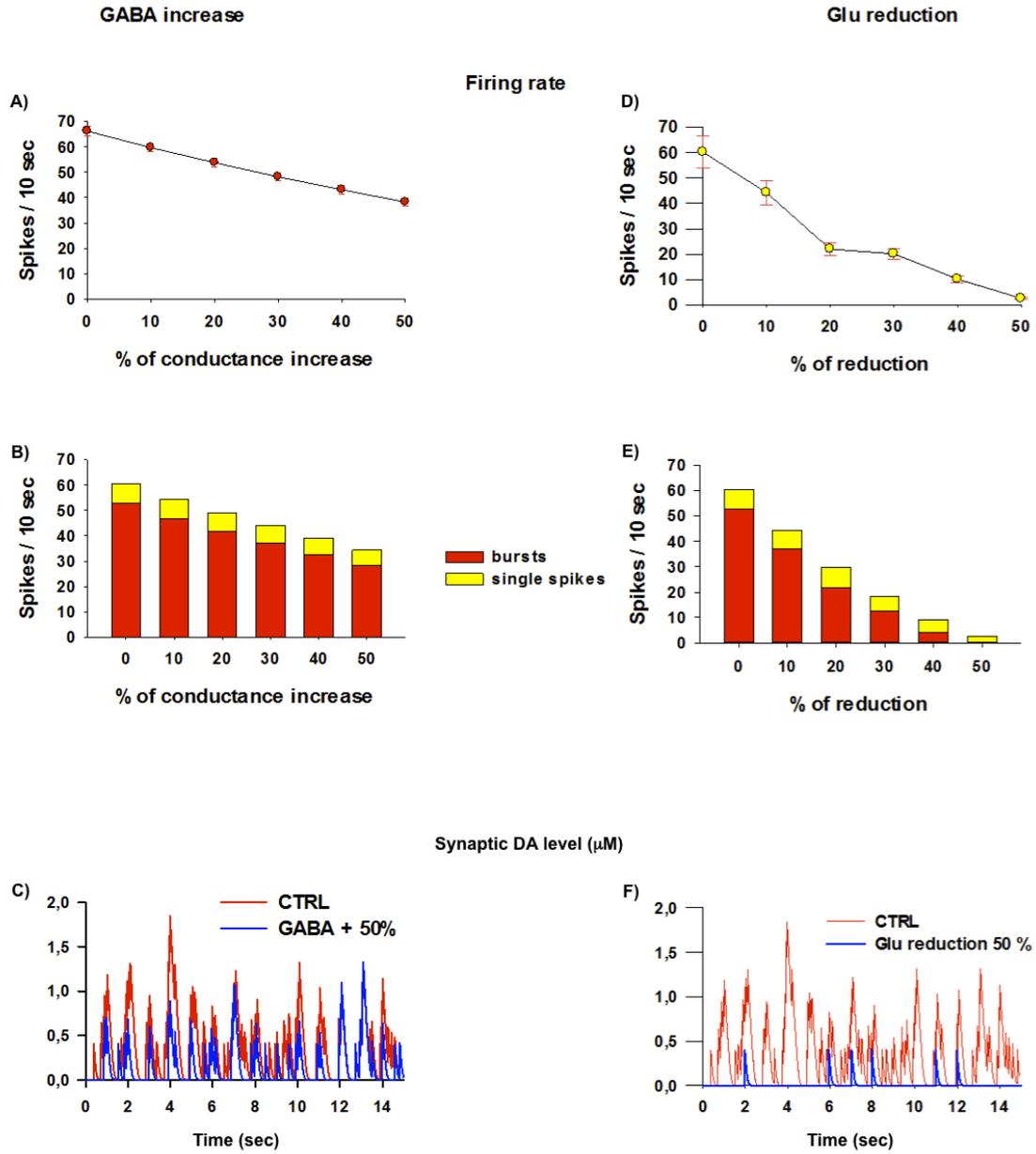


Figura 6 Confronto tra gli effetti dell'incremento delle correnti inibitorie e la riduzione degli input eccitatori sull'attività neuronale e sul release di DA.

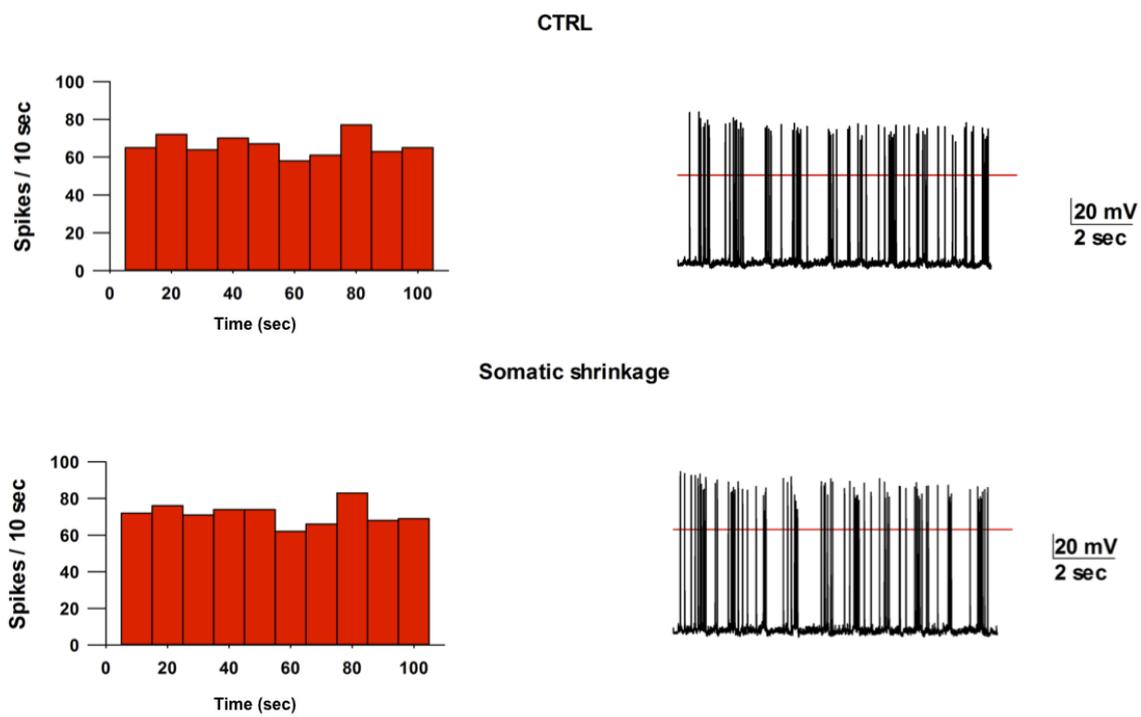


Figura 7 Effetti della riduzione del diametro del soma sulla firing frequency.

Discussione

La presente analisi mostra come gli input sinaptici giochino un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività tonica dei neuroni DAergici della VTA nella fase di astinenza da morfina. L'alterazione selettiva di queste afferenze potrebbe essere responsabile della riduzione dell'output elettrofisiologico dei neuroni DAergici osservato sperimentalmente in animali da esperimento in condizioni di astinenza da morfina (Diana et al., 1995). Abbiamo osservato che l'incremento dell'intensità della corrente GABAergica inibitoria ha provocato la riduzione dei burst firing modificando la resistenza di membrana, riducendo così la responsività del neurone agli stimoli eccitatori e alterando il meccanismo di pace-making che regola l'attività tonica di queste unità.

La riduzione dell'intensità degli input eccitatori (Manzoni and Williams, 1999) è risultata essere più efficace nel ridurre l'attività neuronale rispetto all'aumento delle correnti inibitorie poichè modifica il meccanismo principale attraverso il quale i burst vengono generati. La riduzione di questi input praticamente porta alla scomparsa dei burst e provoca una profonda riduzione del rilascio del neurotrasmettitore (Rossetti et al., 1992).

Considerando che i bursts portano ad un rilascio più consistente di neurotrasmettitore rispetto ai single spikes (Gonon et al., 1978), questo meccanismo potrebbe spiegare la riduzione dell'attività neuronale rilevata sperimentalmente durante la fase di astinenza da somministrazione cronica di morfina (Diana et al., 1995; Manzoni and Williams, 1999).

Le modificazioni morfometriche hanno provocato un incremento della resistenza di membrana che potrebbe essere responsabile della ipersensibilità alla somministrazione acuta di morfina durante la sindrome di astinenza osservata sperimentalmente (Diana et al., 1999).

Il fatto che l'incremento della corrente inibitoria da solo non sia riuscito nel modello a provocare una riduzione significativa dei livelli di neurotrasmettitore rilasciato ci induce a pensare che l'inibizione presinaptica del rilascio di glutammato sia necessaria per evocare gli effetti osservati sperimentalmente, supportando così la tesi avanzata da Manzoni e Williams nel 1999.

In questo modello abbiamo concentrato la nostra attenzione sul bilanciamento degli input sinaptici e sull'interazione di questi ultimi con le modificazioni morfometriche riscontrate negli animali durante l'astinenza, perciò mancano le analisi dei cambiamenti che potrebbero avvenire a

carico delle correnti intrinseche dei neuroni, che sono stati analizzati in modelli precedentemente pubblicati (Canavier and Landry, 2006; Komendantov et al., 2004; Migliore et al., 2008), ma per la prima volta con questo modello è stata analizzata le relazione tra le modificazioni morfometriche ed elettrofisiologiche a carico dei neuroni dopaminergici e i livelli di neurotrasmettitore rilasciato nelle aree bersaglio.

Uno sviluppo futuro del presente lavoro prevede l'estensione dello stesso e la realizzazione di un modello dell'intero circuito mesocorticolimbico, al fine di individuare nuove possibili strategie e bersagli per il trattamento della sindrome di astinenza.

Ringraziamenti

Ringrazio il Dr. Michele Migliore per il suo prezioso contributo nella generazione del modello utilizzato in questo lavoro, per la disponibilità e la pazienza mostrata in questi anni di collaborazione.

Appendice

Equazioni utilizzate per la generazione del modello (Canavier and Landry, 2006)

Linear leakage current:

$$I_{L,i} = I_{L,Na,i} + I_{L,K,i} + I_{L,Ca,i};$$

$$I_{L,K,i} = g_{L,K,i} (V_i - E_K);$$

$$I_{L,Na,i} = g_{L,Na,i} (V_i - E_{Na,i});$$

$$I_{L,Ca,i} = g_{L,Ca,i} (V_i - E_{Ca});$$

$$E_{Na,i} = (RT/F) \ln ([Na]_{out}/[Na]_{in,i})$$

Sodium pump current:

$$I_{NaP,i} = I_{NaP,max,i}/[1 + (K_{m,Na}/[Na]_{in,i})^{1.5}]$$

Sodium balance:

$$d[Na]_{in,d}/dt = 4 \times f_d (-I_{Na,d} - I_{L,Na,d} - I_{NMDA,Na,d} - I_{AMPA,Na,d} - 3I_{NaP,d})/(d_d F)$$

$$d[Na]_{in,p}/dt = 4 \times f_p (-I_{Na,p} - I_{L,Na,p} - I_{NMDA,Na,p} - I_{AMPA,Na,p} - 3I_{NaP,p})/(d_p F)$$

$$d[\text{Na}]_{\text{in},s}/dt = 4 \times f_s (-I_{\text{Na},s} - I_{\text{L,Na},s} - 3I_{\text{NaP},s})/(d_s F)$$

Calcium pump current:

$$I_{\text{CaP}} = I_{\text{CaP,max}}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}/([\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}} + K_{\text{m,CaP}})$$

Calcium balance:

$$d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}/dt = 2 \times f_{\text{Ca}} (I_{\text{Ca,T}} + I_{\text{Ca,L}} + I_{\text{Ca,N}} + I_{\text{CaP}} + I_{\text{L,Ca}})/(d_s F)$$

Fast sodium current:

$$I_{\text{Na},i} = g_{\text{Na},i} m_i^3 h_i (V_i - E_{\text{Na},i})$$

$$d m_i / dt = [1 / \{1 + \exp[(V_{\text{half},m,i} - V_i) / 6.0]\} - m_i] / \tau_m$$

$$d h_i / dt = (1 / \{1 + \exp[-(V_{\text{half},h,i} - V_i) / 7.8]\} - h_i) / \tau_h$$

$$\tau_m = 1.0 / \{1 + \exp[(V_i + 45.0) / 1.5]\} - 1.0 / \{1 + \exp[(V_i + 65) / 0.5]\} + 0.04$$

$$\tau_h = 56.0 / \{1 + \exp[(V_i - 27.8 - V_{\text{half},h,i}) / 4.5]\} - 56.0 / \{1 + \exp[(V_i - 7.8 - V_{\text{half},h,i}) / 2.0]\} + 1.0$$

Calcium currents:

$$I_{\text{Ca,T}} = g_{\text{Ca,T}} d_T f_T (V_s - E_{\text{Ca}})$$

$$d d_T / dt = (1 / \{1 + \exp[(V_s + 63.5) / 1.5]\} - d_T) / \tau_{dT}$$

$$d f_T / dt = (1 / \{1 + \exp[(V_s + 76.2) / 3.0]\} - f_T) / \tau_{fT}$$

$$\tau_{dT} = 65.0 \exp[-(V_s + 66.0)^2 / 40.0] + 3.5$$

$$\tau_{fT} = 50.0 \exp[-(V_s + 72.0)^2 / 100.0] + 10.0$$

$$I_{Ca,N} = g_{Ca,N} d_N f_{Ca,N} (V_s - E_{Ca})$$

$$dd_N/dt = \{1/(1 + \exp[-(V_s + 45.0)/7.0]) - d_N\}/\tau_{dN}$$

$$\tau_{dN} = 18.0 \exp[-(V_s + 70.0)^2/5.0] + 0.3$$

$$f_{Ca,N} = K_{M, fCaN}/(K_{M, fCaN} + [Ca^{2+}]_{in})$$

$$I_{Ca,L} = g_{Ca,L} d_L f_{Ca,L} (V_s - E_{Ca})$$

$$dd_L/dt = (1/\{1 + \exp[-(V_s + 50.0)/20.0]\} - d_L)/\tau_{dL}$$

$$\tau_{dL} = 18.0 \exp[-(V_s + 45.0)^2/400.0] + 1.5$$

$$f_{Ca,L} = K_{M, fCaL}/(K_{M, fCaL} + [Ca^{2+}]_{in})$$

Delayed rectifier current:

$$I_{KDR,i} = g_{KDR,i} n_i^3 (V_i - E_K)$$

$$dn_i/dt = (1/\{1 + \exp[(-35.0 - V_i)/12.0]\} - n_i)/10.0$$

Transient outward potassium current:

$$I_{A,i} = g_{A,i} q_i^3 s_i (V_i - E_K)$$

$$dq_i/dt = (1/\{1 + \exp[(-V_i - 42.0)/4.0]\} - q_i)/\tau_q$$

$$ds_i/dt = (1/\{1 + \exp[(V_i + 63.0)/4.0]\} - s_i)/50.0$$

$$\tau_q = 5.5 \exp[-(V_s + 42.0)^2/100.0] + 4.0$$

SK potassium current:

$$I_{K,SK} = g_{K,SK}/[1 + (K_{M,SK}/[Ca^{2+}]_{in})^4] (V_s - E_K)$$

Bibliografia

Acquas, E., Di Chiara, G., 1992. Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *Journal of neurochemistry* 58, 1620-1625.

Ahmed, S.H., Graupner, M., Gutkin, B., 2009. Computational approaches to the neurobiology of drug addiction. *Pharmacopsychiatry* 42 Suppl 1, S144-152.

Alheid, G.F., Heimer, L., 1988. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27, 1-39.

Amini, B., J. W. Clark, J., Canavier, C.C., 1999. Calcium Dynamics Underlying Pacemaker-Like and Burst Firing Oscillations in Midbrain Dopaminergic Neurons: A Computational Study. *J Neurophysiol* 82, 2249-2261.

Bonci, A., Williams, J.T., 1997. Increased Probability of GABA Release during Withdrawal from Morphine. *J Neurosci* 17(2)796-803.

Brownstein, M.J., 1993. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5391-5393.

Canavier, C.C., Landry, R.S., 2006. An increase in AMPA and a decrease in SK conductance increase burst firing by different mechanisms in a model of a dopamine neuron in vivo. *J Neurophysiol* 96, 2549-2563.

Carboni, E., Silvagni, A., Rolando, M.T., Di Chiara, G., 2000. Stimulation of in vivo dopamine transmission in the bed nucleus of stria terminalis by reinforcing drugs. *J Neurosci* 20, RC102.

Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., 1957. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180, 1200.

Culmone, V., Migliore, M., 2012. Progressive effect of beta amyloid peptides accumulation on CA1 pyramidal neurons: a model study suggesting possible treatments. *Frontiers in computational neuroscience* 6, 52.

Di Chiara, G., 1995. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug and alcohol dependence* 38, 95-137.

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.

Diana, M., Muntoni, A.L., Pistis, M., Melis, M., Gessa, G.L., 1999. Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal. *Eur J Neurosci* 11, 1037-1041.

Diana, M., Pistis, M., Muntoni, A.L., Gessa, G.L., 1995. Profound decrease of Mesolimbic Dopaminergic Neuronal Activity in Morphine Withdrawn Rats. *JPET* 272, 781-785.

Garris, P.A., Wightman, R.M., 1994. In vivo voltammetric measurement of evoked extracellular dopamine in the rat basolateral amygdaloid nucleus. *J Physiol* 478 (Pt 2), 239-249.

Georges, F., Le Moine, C., Aston-Jones, G., 2006. No effect of morphine on ventral tegmental dopamine neurons during withdrawal. *J Neurosci* 26, 5720-5726.

Goldstein, A., Lowney, L.I., Pal, B.K., 1971. Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 1742-1747.

Gonon, F., Cespuglio, R., Ponchon, J.L., Buda, M., Jouvet, M., Adams, R.N., Pujol, J.F., 1978. In vivo continuous electrochemical determination of dopamine release in rat neostriatum. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles* 286, 1203-1206.

Grace, A.A., Bunney, B.S., 1984a. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4, 2877-2890.

Grace, A.A., Bunney, B.S., 1984b. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4, 2866-2876.

Groenewegen, H.J., Russchen, F.T., 1984. Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic

structures: a tracing and immunohistochemical study in the cat. *J Comp Neurol* 223, 347-367.

Heien, M.L., Wightman, R.M., 2006. Phasic dopamine signaling during behavior, reward, and disease states. *CNS & neurological disorders drug targets* 5, 99-108.

Heimer, L., Zahm, D.S., Churchill, L., Kalivas, P.W., Wohltmann, C., 1991. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41, 89-125.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117, 500-544.

Hughes, J., 1975. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain research* 88, 295-308.

Johnson, S.W., North, R.A., 1992. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12, 483-488.

Komendantov, A.O., Komendantova, O.G., Johnson, S.W., Canavier, C.C., 2004. A modeling study suggests complementary roles for GABAA and NMDA receptors and the SK channel in regulating the firing pattern in midbrain dopamine neurons. *J Neurophysiol* 91, 346-357.

Koob, G.F., 2004. Allostatic view of motivation: implications for psychopathology. *Nebraska Symposium on Motivation*. Nebraska Symposium on Motivation 50, 1-18.

Koob, G.F., Le Moal, M., 1997. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278, 52-58.

Koob, G.F., Volkow, N.D., 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35, 217-238.

Manzoni, O.J., Williams, J.T., 1999. Presynaptic Regulation of Glutamate Release in the Ventral Tegmental Area During Morphine Withdrawal. *J Neurosci* 19(15), 6629-6636.

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.

Migliore, M., Cannia, C., Canavier, C.C., 2008. A modeling study suggesting a possible pharmacological target to mitigate the effects of ethanol on reward-related dopaminergic signaling. *J Neurophysiol* 99, 2703-2707.

Moeller, F.G., Barratt, E.S., Dougherty, D.M., Schmitz, J.M., Swann, A.C., 2001. Psychiatric aspects of impulsivity. *Am J Psychiatry* 158, 1783-1793.

Nestler, E.J., 1996. Under siege: The brain on opiates. *Neuron* 16, 897-900.

Pert, C.B., Snyder, S.H., 1973. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011-1014.

Pissadaki, E.K., Bolam, J.P., 2013. The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease. *Frontiers in computational neuroscience* 7, 13.

Pontieri, F.E., Tanda, G., Di Chiara, G., 1995. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12304-12308.

Rossetti, Z.L., Melis, F., Carboni, S., Gessa, G.L., 1992. Dramatic depletion of mesolimbic extracellular dopamine after withdrawal from morphine, alcohol or cocaine: a common neurochemical substrate for drug dependence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 654, 513-516.

Russo, S.J., Nestler, E.J., 2013. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 14, 16.

Simon, E.J., Hiller, J.M., Edelman, I., 1973. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 1947-1949.

Spiga, S., Serra, G.P., Puddu, M.C., Foddai, M., Diana, M., 2003. Morphine withdrawal-induced abnormalities in the VTA: confocal laser scanning microscopy. *Eur J Neurosci* 17, 605-612.

Terenius, L., 1973. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta pharmacologica et toxicologica* 33, 377-384.

Voorn, P., Gerfen, C.R., Groenewegen, H.J., 1989. Compartmental organization of the ventral striatum of the rat: immunohistochemical distribution of enkephalin, substance P, dopamine, and calcium-binding protein. *J Comp Neurol* 289, 189-201.

Wightman, R.M., Amatore, C., Engstrom, R.C., Hale, P.D., Kristensen, E.W., Kuhr, W.G., May, L.J., 1988. Real-time characterization of dopamine overflow and uptake in the rat striatum. *Neuroscience* 25, 513-523.

Wise, R.A., Leone, P., Rivest, R., Leeb, K., 1995. Elevations of nucleus accumbens dopamine and DOPAC levels during intravenous heroin self-administration. *Synapse* 21, 140-148.

Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J., Kastin, A.J., 1997. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386, 499-502.

Zahm, D.S., Brog, J.S., 1992. On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* 50, 751-767.