

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 05/D1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/09

***STUDIO ELETTROFISIOLOGICO DI MODIFICAZIONI A LUNGO
TERMINE DELLA FORZA DELLA TRASMISSIONE SINAPTICA
NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE***

Presentata da: Dott.ssa Giulia Battistini

Coordinatore Dottorato

Prof. Lucio Cocco

Relatore

prof. Giorgio Aicardi

Esame finale anno 2015

Indice

1. Sistema dopaminergico mesocorticolimbico	p. 3
- Nucleus Accumbens	p. 4
2. Sistema endocannabinoide	p. 8
3. Sistema serotoninergico	p. 12
- Biosintesi	p. 13
- Metabolismo	p. 14
- Funzioni fisiologiche	p. 15
- Recettori serotoninergici	p. 16
- Trasportatore della serotonina	p. 20
4. Plasticità sinaptica	p. 21
- Plasticità a breve termine	p. 22
- Plasticità a lungo termine	p. 22
- Potenziamento a lungo termine	p. 23
- Depressione a lungo termine	p. 27
- <i>LTD nel NAc</i>	p. 30
5. Materiali e metodi	p. 37
- Chirurgia	p. 37
- Elettrofisiologia	p. 38
- Parametri di registrazione	p. 40
- Trattamento farmacologico	p. 41
- Sistema di analisi	p. 42
6. Risultati	p. 44
7. Discussione	p. 57
8. Bibliografia	p. 63

L'attivazione del SDM da parte di stimoli gratificanti determina l'attivazione dei neuroni dopaminergici della VTA con conseguente aumento della dopamina (DA) rilasciata dai terminali assonici che proiettano al NAc e alle altre regioni limbiche coinvolte in questo sistema (Thomas and Malenka, 2003; Nestler, 2001). Tutte le azioni che portano ad un aumento di DA rilasciata a livello sinaptico in questo circuito tendono ad essere ripetute, in quanto vengono riconosciute dal cervello come intrinsecamente positive (Krasnova and Cadet, 2009).

Il SDM è stato oggetto di molti studi sulla tossicodipendenza poiché risulta coinvolto nelle proprietà di rinforzo positivo generato da diverse sostanze d'abuso (Fibiger and Phillips, 1988). Analogamente agli stimoli naturali, infatti, queste sostanze sono in grado di interagire con il sistema di gratificazione cerebrale. Il rilascio di DA indotto dagli stimoli naturali è molto minore rispetto a quello indotto dalle sostanze psicotrope: uno stimolo naturale, anche se applicato per un tempo relativamente lungo, induce un lieve rilascio di DA per pochi minuti.

- **Nucleo Accumbens**

Il componente principale del SDM è il NAc, che gioca un ruolo chiave nel circuito della gratificazione perchè costituisce l'interfaccia tra le informazioni emozionali e motivazionali che originano a livello del sistema limbico, e la regolazione motoria esercitata dai gangli della base, un insieme di nuclei che fa parte del sistema motorio extrapiramidale.

Il NAc è l'estensione ventrale del corpo striato; è situato dove la testa del caudato e la porzione anteriore del putamen si incontrano, lateralmente al setto pellucido, che insieme al tubercolo olfattivo costituiscono appunto lo striato ventrale (Heimer and Wilson, 1995). Dal punto di vista

anatomico il NAc può essere suddiviso in una zona centrale denominata “core”, circondata nei versanti mediale, laterale e ventrale da una regione denominata “shell”. Core e shell possono essere differenziati anche in base al tipo di afferenze che ricevono dalle diverse aree della corteccia cerebrale: allo shell arrivano proiezioni che originano nella VTA, mentre al core arrivano proiezioni derivanti dalla substantia nigra e dalla VTA parabranchiale (McKritick and Abercrombie, 2007). Il core rappresenta la porzione più ventrale del corpo striato, con connessioni dirette al pallido ventrale; ha un ruolo nell’iniziazione del movimento. Lo shell è la porzione più rostrale di un complesso sistema nucleare (amigdala estesa) con funzioni prettamente limbiche e d’integrazione neurovegetativa con aree ipotalamiche.

Il NAc è costituito in gran parte dalle terminazioni dendritiche dei neuroni spinosi medi (NSM); sono neuroni di tipo GABA-ergico e allo stato di riposo trovano in una condizione di iperpolarizzazione: il loro potenziale di membrana in condizioni basali, infatti, è di circa -85 mV. In questo stato di membrana si trovano al “down state” e non sono in grado di generare alcun potenziale d’azione, ma in risposta ad input eccitatorio sinaptico glutammatergico proveniente dalla corteccia i NSM si depolarizzano e raggiungono l’“up state”, caratterizzato da un potenziale di membrana vicino alla soglia di attivazione, -60 mV (Fig. 2). Input deboli e di breve durata non riescono a far raggiungere l’“up state” ed i neuroni tornano allo stato di riposo. Altre condizioni possono impedire la transizione allo stato attivo, per esempio l’interruzione o il danneggiamento delle fibre afferenti provenienti dal talamo e dall’ippocampo. Quando però le condizioni lo permettono, i neuroni possono rimanere allo stato attivato per un periodo molto variabile di

tempo, a volte anche per più di un secondo (Wilson, 1993). In queste condizioni un'ulteriore lieve depolarizzazione è in grado di generare un potenziale d'azione. Anche se la transizione da uno stato all'altro è innescata da un input sinaptico, la probabilità della sua riuscita è influenzata dalla conduttanza intrinseca della membrana. I NSM esprimono diversi tipi di recettori, in particolare quelli glutammatergici e dopaminergici.

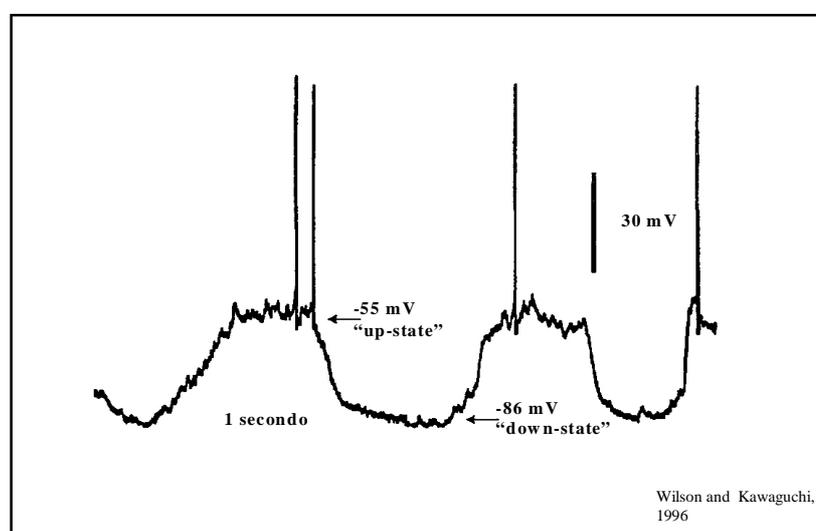


Figura 2. *Stati di transizione di membrana di un NSM.*

Il NAc ha un ruolo chiave nella genesi delle emozioni e nell'induzione di comportamenti ad esse correlati; è infatti implicato nell'autogrificazione, in particolare nell'associare le emozioni positive all'esecuzione di comportamenti finalizzati: l'attività neuronale aumenta quando si realizza lo scopo preposto.

Di grande interesse è il ruolo svolto nella gratificazione in seguito a ripetute assunzioni di sostanze d'abuso; questa si manifesta con modificazioni a livello molecolare, cellulare e anatomo-fisiologico, che si proiettano anche in cambiamenti comportamentali (Brebner et al., 2005).

L'auto-somministrazione cronica di cocaina e ripetute somministrazioni *in vivo* riducono il numero di recettori glutammatergici sui NSM dello shell del NAc (Thomas et al., 2001). Si sviluppano inoltre reazioni psicofisiologiche: le emozioni intense danno luogo a modulazioni nella sfera neurovegetativa con variazioni della frequenza cardiaca e respiratoria. L'esperienza emotiva influenza anche l'aspetto cognitivo: esperienze con forte valenza emotiva possono radicarsi nella memoria per molto tempo, al contrario in condizioni di forte stress si possono avere carenze mnemoniche anche di esperienze ben consolidate.

2. Sistema endocannabinoide

Il sistema endocannabinoide è un complesso sistema di comunicazione tra cellule; è composto dai recettori endocannabinoidi (eCBR), i loro ligandi endogeni (endocannabinoidi, eCB) e le proteine coinvolte nel metabolismo e nel trasporto degli eCB. Prende il suo nome dalla pianta di Cannabis Sativa poiché alcuni fitocannabinoidi in essa presenti, tra cui il tetraidrocannabinolo (THC), mimano gli effetti degli eCB legandosi ai medesimi recettori. Tra gli effetti del THC si possono elencare: sedazione, effetto ansiolitico, euforia, aumento dell'appetito, diminuzione del senso di nausea e riduzione dell'attività motoria.

In base alla localizzazione degli eCBR nell'organismo, è stato ipotizzato che il sistema eCB sia coinvolto in un gran numero di processi fisiologici, tra i quali il controllo motorio, la memoria e l'apprendimento, la percezione del dolore, la regolazione dell'equilibrio energetico e l'assunzione di cibo (Ameri, 1999; Di Marzo, 1998).

Gli eCBR sono recettori transmembrana (Fig. 3) accoppiati a proteine $G_{i/o}$, la cui attivazione provoca l'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi (AC) e la conseguente diminuzione dei livelli di adenosina monofosfato ciclico (cAMP), la chiusura dei canali del Ca^{2+} , l'apertura dei canali del K^+ e la stimolazione di proteine chinasi.

Gli eCBR hanno differenti distribuzione (Fig. 4) e meccanismi di segnalazione nei tessuti. I CB_1 sono i più abbondanti e ampiamente distribuiti nell'encefalo. Si trovano principalmente sui neuroni del SNC (oltre che nell'encefalo quindi, anche nel midollo spinale). A livello dell'encefalo, la distribuzione dei CB_1 è particolarmente marcata nelle regioni responsabili della coordinazione motoria e del movimento,

dell'attenzione, dell'apprendimento, della memoria e delle emozioni e delle funzioni cognitive complesse come il giudizio (Beigon and Kerman, 2001; Glass et al., 1990; Maileux et al., 1992; Pettit et al., 1998).

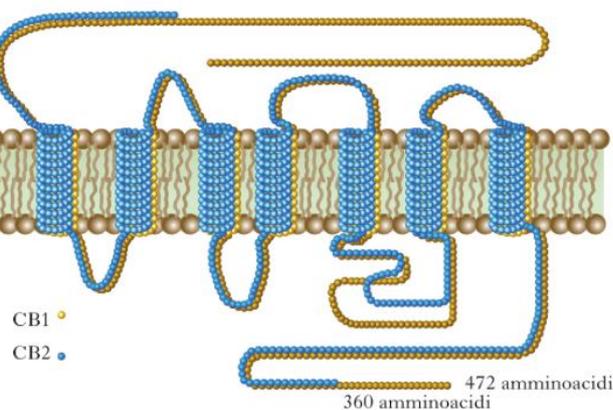
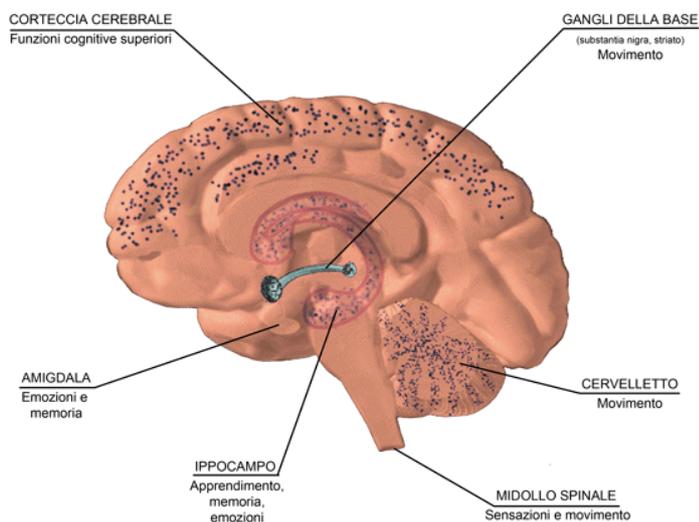


Figura 3. Rappresentazione grafica dei recettori eCB.

Di Marzo, 2010



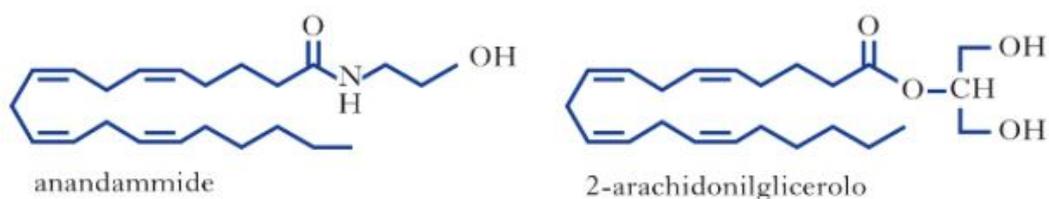
Fonte: NIDA

Figura 4. Distribuzione dei recettori CB_1 nel cervello. Nello specifico, le aree indicate con i puntini neri sono quelle in cui si lega maggiormente il cannabinoide esogeno THC modificandone il normale funzionamento e sviluppo.

A differenza dei CB₁ invece, i CB₂ sono espressi principalmente a livello periferico. Sono presenti prevalentemente in cellule immunocompetenti, tra cui i leucociti, la milza e le tonsille, il midollo osseo ematopoietico, ma anche nel pancreas. Recentemente sono stati identificati anche nel SNC, seppur a basse concentrazioni (Van Sickle et al., 2005), in particolare nelle cellule gliali e microgliali.

Il ruolo degli eCBR è essenzialmente quello di regolare il rilascio di altri messaggeri chimici. I recettori CB₁ interferiscono con il rilascio di alcuni neurotrasmettitori, e la loro attivazione protegge il SNC dalla sovrastimolazione o dalla sovraeccitazione prodotta da altri neurotrasmettitori. I recettori CB₂, invece, svolgono prevalentemente un'azione periferica con attività immunomodulatoria. Nel sistema immunitario, infatti, una delle funzioni degli eCBR è la modulazione del rilascio di citochine, molecole proteiche responsabili della regolazione della funzione immunitaria e delle risposte infiammatorie.

Due dei ligandi endogeni eCB meglio caratterizzati sono l'*N*-arachidonoiletanolamide (AEA), che è anche il primo ad essere stato identificato (Devane et al., 2002), e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), che è il più abbondante nel cervello (Mechoulam et al., 1995; Stella et al., 1997; Sugiura et al., 1995). Questi eCB vengono sintetizzati da precursori lipidici membranari, ed essendo molecole lipidiche possono attraversare le membrane biologiche; non possono essere immagazzinati in vescicole, ma sono sintetizzati *on demand* (Piomelli, 2003).



Il trasporto di 2-AG e AEA è indipendente dal Na^+ e dall'energia cellulare, indicando un processo di diffusione facilitata. Essi competono per l'uptake suggerendo un trasportatore comune. Una volta captato dalla cellula l'AEA viene degradato dalla fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Cravatt et al., 1996; Hillard et al., 1995; M^cKinney and Cravatt, 2005), e il 2-AG dalla monoacilglicerolo lipasi (MAGL) (Dinh et al., 2002).

Un tipico esempio di funzioni del sistema eCB riguarda l'attivazione di una cellula postsinaptica che induce la produzione di eCB il quale diffonde, in modo facilitato, in direzione retrograda attraverso la membrana postsinaptica e lega il recettore CB_1 sul terminale presinaptico inibendo il rilascio di neurotrasmettitore (De Petrocellis et al., 2004; Freund et al. 2003; Howlett et al., 2002/2004).

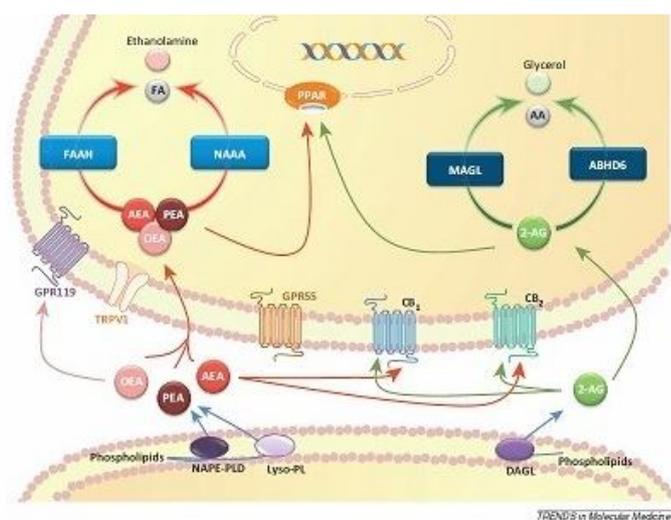
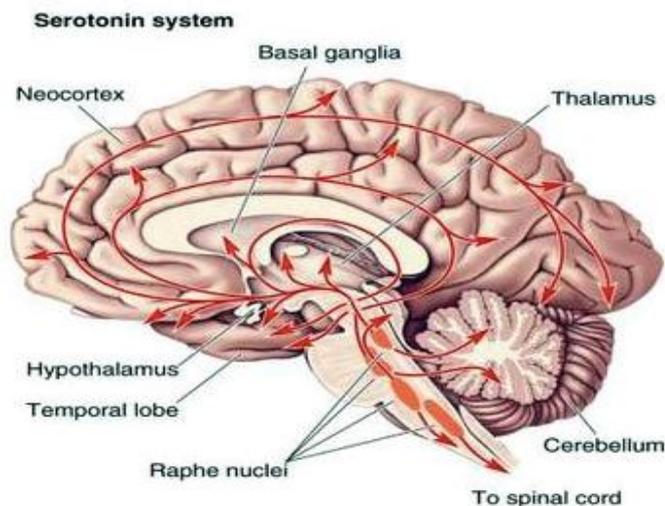


Figura 5. Rappresentazione del sistema endocannabinoide

3. Sistema serotonergico

La 5-idrossitriptamina o serotonina (5-HT) è un mediatore chimico largamente distribuito in natura. Nell'uomo la 5-HT è presente a livello delle piastrine, nell'intestino e nel SNC e periferico; in particolare nei mammiferi il tessuto con la più alta concentrazione di 5-HT è la mucosa intestinale e a questo livello più del 90% è presente nelle cellule enterocromaffini (EC) (per questo motivo il nome iniziale della 5-HT era "enteramina"; De Ponti, 2004).

Precedenti studi sperimentali indicano che la 5-HT è particolarmente concentrata a livello dell'ipotalamo, del mesencefalo e del sistema limbico. I corpi cellulari delle fibre contenenti 5-HT sono localizzati nel segmento inferiore del tronco encefalico (ponte, bulbo), in particolare a livello dei nuclei del rafe. Da qui si dipartono sia vie ascendenti, che innervano aree corticali e subcorticali, sia discendenti nel midollo spinale con una distribuzione topografica analoga a quella delle vie noradrenergiche (Fig. 6).



Lippinott Williams &
Wilkins 2007

Figura 6. Rappresentazione dei circuiti serotonergici nel SNC.

La 5-HT svolge un ruolo molto importante nella regolazione di varie funzioni fisiologiche quali la nutrizione, la gratificazione, la termoregolazione, così come anche nel dolore, nelle emozioni e nell'umore; inoltre regola anche alcune funzioni dell'apparato cardiovascolare.

- **Biosintesi**

Nell'organismo umano la 5-HT viene sintetizzata per circa il 90% dalle cellule ematocromaffini del tratto gastrointestinale e per il rimanente 10% dai neuroni serotoninergici localizzati nel nucleo del rafe e nel tronco encefalico (Jonakuty e Gragnoli, 2008). La sintesi di 5-HT avviene a partire dall'L-triptofano, aminoacido aromatico che viene assunto con la dieta. L'aminoacido viene inizialmente idrossilato sulla posizione 5 dell'anello indolico ad opera dell'enzima triptofano 5-idrossilasi, e viene infine decarbossilato mediante una reazione catalizzata dalla decarbossilasi specifica per gli aminoacidi aromatici (Mohammad-Zadeh et al., 2008). Una volta sintetizzata, la 5-HT viene immagazzinata in granuli o vescicole dove è complessata con adenosina trifosfato (ATP); stimoli nervosi o chimico-fisici possono indurre la sua liberazione. Le cellule EC presentano granuli secretori elettrondensi che occupano la base delle cellule e liberano il proprio contenuto principalmente nei siti interstiziali, attraverso la membrana basolaterale. I neuroni serotoninergici presentano le vescicole all'estremità del terminale assonico e liberano 5-HT nel vallo sinaptico (Mohammad-Zadeh, 2008, Spiller, 2008) (Fig. 7).

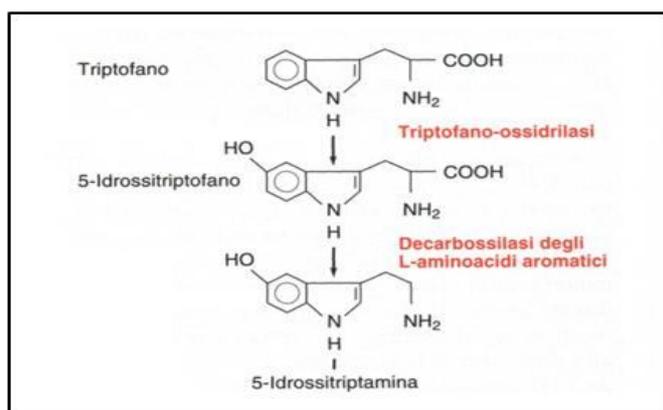


Figura 7. Biosintesi della 5-HT.

- **Metabolismo**

Una volta secreta dalle vescicole, la 5-HT viene ricaptata all'interno del terminale sinaptico, o delle piastrine, o degli enterociti grazie a un trasportatore specifico, denominato serotonin transporter (SERT). In seguito alla ricaptazione, la 5-HT può essere re-immagazzinata in vescicole secretorie o entrare in contatto con enzimi che la degradano. La principale via catabolica è quella delle monoammino ossidasi (MAO), enzimi che catalizzano una reazione che produce 5-idrossindolo-acetaldeide, un prodotto intermedio che per azione dell'enzima aldeide deidrogenasi viene ossidato ad acido 5-idrossindolacetico. L'enzima MAO presenta 2 isoforme: MAO-A e MAO-B, ma solo il primo è specifico per 5-HT, noradrenalina e tiramina e risulta maggiormente espresso nei neuroni; il secondo invece è prevalentemente periferico (Shih, 1991). In alternativa, la 5-idrossindolo acetaldeide può subire una riduzione mediante una reazione catalizzata dall'enzima aldeide riduttasi che la trasforma in 5-idrossitriptofolo. I prodotti finali, giunti nel flusso ematico, vengono eliminati dall'organismo mediante secrezione renale.

La 5-HT che si trova nelle cellule pituitarie può seguire un'altra via metabolica: l'enzima N-acetilasi forma N-acetil 5-HT, ed infine l'enzima O-metiltransferasi catalizza la tappa finale della sintesi della melatonina, ormone coinvolto nei ritmi circadiani (Mohammad-Zadeh et al., 2008) (Fig. 8).

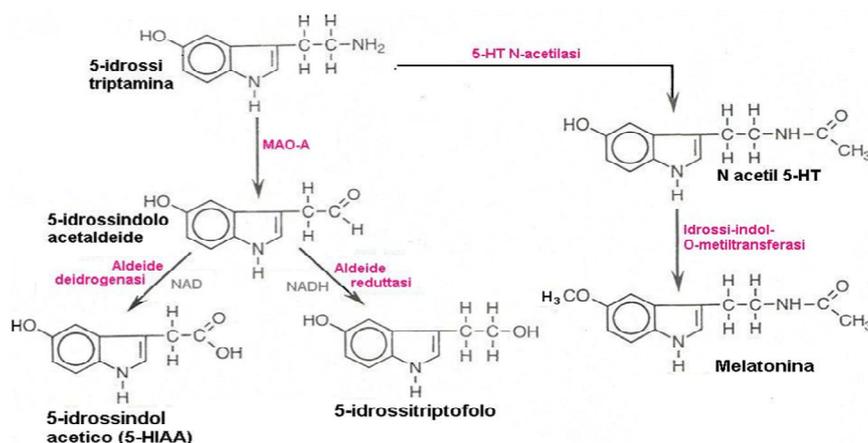


Figura 8. *Metabolismo della 5-HT.*

- Funzioni fisiologiche

La 5-HT è un importante regolatore di molte funzioni gastrointestinali (De Ponti, 2004), influenza soprattutto la motilità intestinale, ed in particolare stimola la contrazione della muscolatura liscia promuovendo la liberazione di acetilcolina.

A livello del sistema respiratorio la 5-HT provoca, sempre per azione diretta sulla muscolatura liscia, broncostrizione, particolarmente marcata nei pazienti con tumore carcinomatoide.

Nell'apparato cardiovascolare la 5-HT, per azione diretta sul cuore, induce effetti inotropi e cronotropi positivi di scarsa rilevanza fisiologica (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

A livello del SNC, attiva i chemiocettori, causando bradicardia e

ipotensione, influenza i ritmi circadiani in quanto strutturalmente correlata alla melatonina, stimola il centro del vomito, regola il senso di fame, regola la temperatura corporea per azione sull'ipotalamo, aumenta la sensibilità al dolore e svolge un ruolo importante nel controllo del tono dell'umore (Jonakuty e Gragnoli, 2008). Numerose evidenze sperimentali mostrano che la neurotrasmissione serotoninergica risulta alterata, rispetto ai soggetti sani, nei pazienti con disturbi psichiatrici quali depressione, tendenza al suicidio, schizofrenia, disturbi ossessivo-compulsivi, comportamento aggressivo (Wang et al., 2002).

- Recettori serotoninergici

La 5-HT interagisce con recettori specifici per svolgere le proprie funzioni biologiche. La classificazione attuale comprende 7 famiglie di recettori: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇. Alcune famiglie sono costituite da sottotipi recettoriali diversi che presentano differenze significative in termini di localizzazione e sequenze aminoacidiche, struttura proteica, sistemi di trasduzione e funzioni fisiologiche. Le famiglie recettoriali 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄₋₇ sono costituite da proteine di membrana monomeriche a 7 domini transmembrana accoppiate alla proteina G, mentre il recettore 5-HT₃ è un canale ionico. Le caratteristiche e le funzioni dei principali recettori serotoninergici sono riportate nella figura 9.

Caratteristiche e funzioni dei principali recettori serotoninergici			
Recettore	Agonista	Antagonista	Funzioni e Distribuzione
5HT _{1A}	8-OH-DPAT	WAY100365	Autorecettori, controllo e rilascio di NE e Ach. Nuclei del rafe, ippocampo, setto, amigdala
5HT _{1B}	sumatriptan	SB224289 (metergolina)	Autorecettore sia terminale che centrale. Striato, SN, ippocampo, muscolatura liscia vascolare
5HT _{1D}	sumatriptan	BRL15572 (metergolina)	Autorecettore sia terminale che centrale. Striato, nucleo accumbens, ippocampo, muscolatura liscia vascolare
5HT _{2A}	DOI	Ketanserina	Neuroinibizione, costrizione, attivazione. Corteccia, striato, piastrine, muscolatura liscia vascolare
5HT _{2B}	a-me-5HT	RS127445	Costrizione, vasodilatazione. Cervelletto, setto, muscolatura liscia vascolare, endotelio
5HT _{2C}	mCPP	Mesulergina	Volume CSF. Plesso coroideo, ipotalamo, ippocampo
5HT ₃	mCPB	Ondansetron	Neuroeccitazione, emesi. Striato, ippocampo, area postrema
5HT ₄	Cisapride	GR133808	Rilascio di DA, contrattilità miocitaria, rilasciamento. Striato, SN, muscolo cardiaco, muscolatura liscia esofagea

Figura 9. *Caratteristiche e funzioni dei principali recettori serotoninergici.*

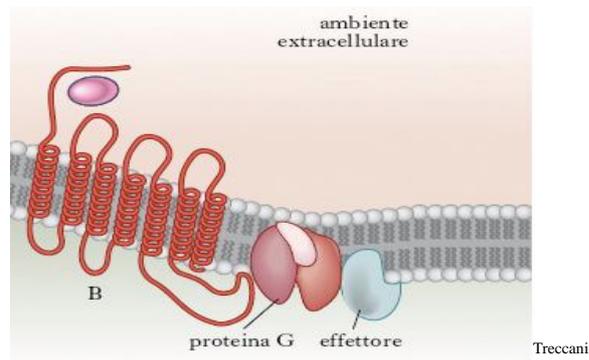


Figura 10. Recettore serotonergico a 7 domini transmembrana accoppiato a proteina G.

La famiglia dei recettori 5-HT₁ è molto eterogenea e comprende vari sottotipi (-1A, -1B, -1D, -1E, -1F, -1like); dopo una prima classificazione è stato osservato che il recettore 5-HT_{1C} presenta maggiori analogie di struttura e di meccanismo di trasduzione con la famiglia 5-HT₂ e per questo è stato rinominato come 5-HT_{2C} (Humphrey et al., 1993).

Tutti i recettori 5-HT₁ sono localizzati principalmente a livello centrale, in particolare in aree quali substantia nigra, globus pallido, ippocampo e nucleo dorsale del rafe.

La famiglia dei recettori 5-HT₂ mostra una collocazione più periferica rispetto a quella del tipo 1, e comprende 3 sottotipi: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}, accoppiati alla fosfolipasi C tramite le proteine G_q e G₁₁.

Il recettore 5-HT_{2A}, presente sui terminali assonici di neuroni serotonergici centrali, risulta espresso anche sulle piastrine e sulla muscolatura liscia di vasi, bronchi e utero; è anche ampiamente espresso nel prosencefalo, sia sugli interneuroni che sui neuroni piramidali.

Il recettore 5-HT_{2B} venne identificato per la prima volta nello stomaco di ratto e fu classificato come 5-HT_{1-like} (Vane et al., 1959). È poco espresso in diverse subregioni del SNC; al contrario è più espresso nel

fegato, nel rene, nel cuore e nel fundus dello stomaco. Questo recettore condivide diversi ligandi farmacologici con gli altri recettori 5-HT₂, ma esistono solo poche molecole altamente selettive per questo sottotipo.

I recettori 5-HT_{2C} sono fortemente espressi in tutto il SNC. L'attivazione di questi recettori inibisce il rilascio di DA nello striato e nella PFC (Alex et al., 2005). Regolano inoltre il rilascio di DA nel SDM sia in condizioni fisiologiche che in risposta ad alcune sostanze psicoattive.

I recettori 5-HT₃ sono distribuiti sia su neuroni centrali che periferici (Yakel and Jackson, 1988; Waeber et al., 1989). Nel SNC la più alta densità è stata riscontrata nel complesso dorsale del nervo vago e nei nuclei spinali del trigemino, nell'area postrema, nei nuclei del tratto solitario e nella sostanza gelatinosa della colonna spinale (Hamon et al., 1989; Pratt et al., 1990).

I recettori 5-HT₄ furono scoperti nel cervello di topo e di cavia (Bockaert et al., 1992); in seguito furono identificati anche nel cuore umano (Kaumann et al., 1989, 1990) e in altre aree periferiche. A livello centrale la maggiore concentrazione di 5-HT₄ è presente nei neuroni del collicolo, nell'ippocampo e nella corteccia (Monferini et al., 1993).

La famiglia dei recettori 5-HT₅ comprende due sottotipi: 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B}. La loro localizzazione non è ben determinata, anche se alcuni studi mostrano la presenza dell'mRNA per il sottotipo 5-HT_{5A} nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo, nel peduncolo pineale, nel bulbo olfattivo e nello strato granulare nel cervelletto, mentre l'mRNA del sottotipo 5-HT_{5B} è limitato al peduncolo pineale (Plassat et al., 1992).

Il profilo di espressione dei recettori 5-HT₆ non è noto. L'mRNA di questi recettori è stato ritrovato in concentrazioni rilevanti a livello centrale nel corpo striato, nel tubercolo olfattivo, nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo.

I recettori 5-HT₇ sono espressi a livello periferico sulla muscolatura liscia dei vasi e dell'intestino; in particolare è stato descritto il loro coinvolgimento nel rilasciamento muscolare nel colon nell'uomo (Prins et al., 1999) e nella cavia (Tonini et al., 2005). A livello centrale sono espressi nelle regioni del talamo, dell'ipotalamo, dell'ippocampo e della corteccia cerebrale.

- Trasportatore della serotonina

Il trasportatore della 5-HT, SERT, analogamente ai trasportatori del GABA e di alcune monoamine [DA, noradrenalina (NA)], appartiene alla famiglia dei neurotrasportatori Na⁺/Cl⁻-dipendenti, che agiscono come cotrasportatori. Il SERT è prevalentemente correlato ai trasportatori delle catecolamine dopamina e NA, e insieme a questi viene classificato come trasportatore di membrana neuronale Na⁺/K⁺-dipendente (Blakely et al., 1994). Il SERT ha il compito di ricaptare il neurotrasmettitore dal vallo sinaptico extracellulare nel citoplasma del terminale assonico. La ricaptazione di 5-HT all'interno delle cellule si ritiene associata al cotrasporto di Na⁺ e Cl⁻ e al controtrasporto di K⁺ attraverso un meccanismo elettricamente neutro (Inoue et al., 2002).

4. Plasticità sinaptica

Per plasticità sinaptica s'intende la capacità del cervello di adattarsi e modificarsi in seguito all'esperienza. La capacità di crescita e di modellamento delle sinapsi è un processo che persiste per tutta la vita, e consiste in modificazioni strutturali che sono alla base dei processi di apprendimento e memoria, sia motoria sia cognitiva, e dei processi di adattamento dell'organismo in risposta ai cambiamenti ambientali.

Durante l'apprendimento si verificano modificazioni funzionali delle sinapsi: la loro superficie può aumentare o diminuire, oppure possono variare nel numero; inoltre si possono avere variazioni sia del numero di recettori sinaptici che delle molecole liberate nello spazio sinaptico. Queste variazioni possono essere considerate come substrato biologico di una traccia mnesica (Genoux and Montgomery, 2007).

I fattori discriminanti della plasticità sinaptica sono "direzione", e tempo di persistenza della modificazione della forza di trasmissione; si può perciò distinguere la plasticità sinaptica in potenziamento e depressione, e in plasticità a breve termine e a lungo termine, rispettivamente.

Evidenze raccolte durante l'ultima decade dimostrano che le sostanze d'abuso innescano meccanismi di plasticità sinaptica nei circuiti cerebrali coinvolti nei processi di rinforzo e ricompensa: si ritiene che la tossicodipendenza rappresenti una patologica, ma potente, forma di apprendimento e memoria (Kelley, 2004).

Il circuito alla base della tossicodipendenza è molto complesso, ma è certo che il SDM, e in particolare la VTA e il NAc, sono il substrato per l'adattamento neurale che sta alla base di questo processo. Le interazioni tra sostanze d'abuso e plasticità sinaptica in diverse regioni cerebrali

contribuiscono a diversi aspetti della tossicodipendenza, come la sindrome d'astinenza, l'irresistibile bisogno ("craving") di assumere la sostanza d'abuso e, forse la parte più importante, la ricaduta nell'assunzione. La plasticità sinaptica è richiesta per adattamenti neurali risultanti da un ampio range di interazioni nel SNC, anche in risposta a stimoli ambientali.

- **Plasticità sinaptica a breve termine**

La modificazione della trasmissione sinaptica con durata inferiore ai 30 minuti è definita plasticità sinaptica a breve termine. Quando i tempi sono molto brevi (pochi secondi o minuti), si parla di facilitazione sinaptica; questa consiste in un aumento transitorio di efficacia della trasmissione sinaptica quando due o più potenziali d'azione raggiungono il terminale di un assone in stretta successione, determinando un aumento progressivo della quantità di neurotrasmettitore rilasciato da ogni potenziale d'azione.

- **Plasticità sinaptica a lungo termine**

Quando le modificazioni durano più di 30 minuti (possono mantenersi anche per ore, giorni, settimane o anni) si parla di plasticità sinaptica a lungo termine; in questo caso si attivano complessi meccanismi biochimici e cellulari che portano a cambiamenti consolidati a livello del circuito cerebrale.

- **Potenzamento a lungo termine (LTP)**

Quando il potenziamento della trasmissione sinaptica dura più di 30 minuti si parla di potenziamento a lungo termine (LTP); dalla sua scoperta nel 1973 da parte di Bliss e Lomo, è la forma di plasticità sinaptica più studiata. Nel loro studio venne dimostrato per la prima volta che una breve stimolazione ad alta frequenza (100 Hz) in un fascio di assoni che collega la corteccia entorinale con il giro dentato dell'ippocampo di coniglio provoca l'incremento dell'ampiezza del potenziale di campo sinaptico eccitatorio (fEPSP) evocato da un singolo stimolo elettrico. In base alla sua durata può essere definito early-LTP (e-LTP) se si mantiene da 30 minuti a 3 ore, o late-LTP (l-LTP) se è stabile per più di 3 ore; di questi solo la l-LTP richiede sintesi di mRNA e proteine. Le tre proprietà basilari della LTP sono la cooperatività, l'associatività e la specificità dell'afferenza. La cooperatività consiste nella necessità di attivare un numero sufficientemente elevato di fibre che cooperino nell'induzione della plasticità nel neurone postsinaptico. Ci sono infatti delle soglie di cooperatività che, in ordine crescente, determinano il protrarsi nel tempo del potenziamento, inducendo potenziamento post-tetanic, STP o LTP. L'associatività consiste nella possibilità di potenziare una sinapsi utilizzando uno stimolo debole se questo viene associato ad uno stimolo forte applicato ad un'altra afferenza che converga sulla stessa cellula. Infine la LTP è afferenza-specifica perché le fibre che non sono attive durante la stimolazione ad alta frequenza non condividono il potenziamento indotto nell'afferenza stimolata.

La sede dei principali cambiamenti plastici nel sistema nervoso centrale (SNC) sono le sinapsi eccitatorie, e tra queste, quelle più estesamente

studiate e conosciute sono quelle che utilizzano come neurotrasmettitore il glutammato. I recettori del glutammato si dividono in due categorie:

- *ionotropici*: formano canali ionici di membrana permeabili a cationi mono e bivalenti (Na^+ e Ca^{2+}); vengono suddivisi a loro volta in:
 - NMDA: costituiti da 5 subunità che legano N-metil-D-aspartato, un neurotrasmettitore analogo al glutammato;
 - non-NMDA: che comprendono i recettori AMPA costituiti da 7 domini transmembranari e attivati selettivamente dall'acido amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazol-propionico, e i recettori *kainato* attivati invece dall'acido kainico;
- *metabotropici*: una volta legato il ligando, attivano una serie di reazioni a cascata mediate da un secondo messaggero, la proteina G.

I recettori maggiormente coinvolti nei processi di apprendimento che si basano su sinapsi glutammatergiche sono i recettori AMPA ed NMDA. I recettori AMPA sono permeabili al Na^+ (e al K^+) ma impermeabili al Ca^{2+} (a causa di un residuo di arginina carico positivamente nella subunità GluR2 che va a costituire la parete del canale). I recettori NMDA sono invece permeabili al Ca^{2+} (e al Na^+ e al K^+) ma presentano un sito di legame interno per il Mg^{2+} che blocca il passaggio di ioni attraverso questo canale; tuttavia questo blocco è voltaggio-dipendente e può perciò essere annullato dalla depolarizzazione del neurone in modo da consentire il passaggio di ioni Ca^{2+} (Song and Huganir, 2002).

Durante la trasmissione di base il glutammato viene rilasciato dai terminali presinaptici e va ad attivare i recettori AMPA a livello

postsinaptico: in questo modo incrementa l'afflusso di ioni Na^+ causando così depolarizzazione del terminale postsinaptico. In queste condizioni di trasmissione basale i canali NMDA sono bloccati dagli ioni Mg^{2+} che impediscono il passaggio degli ioni Ca^{2+} . Ripetute depolarizzazioni della membrana postsinaptica consentono la rimozione dello ione Mg^{2+} , l'apertura del canale NMDA, con conseguente ingresso di Ca^{2+} nel neurone postsinaptico. Il Ca^{2+} si lega alla sua proteina specifica, la calmodulina (CaM), formando il complesso Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM) che a sua volta interagisce con la proteina Ca-calmodulina chinasi II (CaMKII). Questo complesso può determinare la fosforilazione di vari substrati, fra cui quella del residuo Ser831 della subunità GluR1 del recettore AMPA (Lisman et al., 2002). Questa sequenza di eventi è in grado di provocare modificazioni locali che portano alla liberazione di un messaggero retrogrado, l'ossido nitrico, il quale a sua volta determina un aumento del rilascio di glutammato. Questo effetto a feedback positivo induce la cosiddetta plasticità sinaptica. La fosforilazione della subunità GluR1 del recettore AMPA pertanto contribuisce ai meccanismi di espressione dell'LTP (Lee et al., 1998). Oltre alla CaMK II, altre due proteine chinasi possono fosforilare la subunità GluR1 del recettore AMPA: la proteina chinasi C (PKC), che fosforila il residuo di Ser831, e la proteina chinasi A AMPciclico-dipendente (PKA-cAMP), che fosforila il residuo di Ser845. L'ingresso di ioni Ca^{2+} nel neurone postsinaptico può influenzare non solo l'attività della CaMK II, ma anche quella della PKC-cAMP: il complesso Ca-CaM attiva l'AC con un conseguente aumento intracellulare di cAMP, necessario per l'attivazione della PKA (Nguyen and Woo, 2003). Studi condotti in fettine cerebrali di ratto contententi l'ippocampo dimostrano che sia la PKA che la PKC

svolgono un ruolo anche a livello presinaptico, favorendo il rilascio di neurotrasmettitore (Lu and Gean, 1999). L'azione delle proteine chinasi avviene circa 30 minuti dopo l'induzione del potenziamento e può mantenersi fino a 3 ore; pertanto le chinasi sono principalmente coinvolte nell'e-LTP; la l-LTP richiede cambiamenti dell'espressione genica e un aumento consistente nella secrezione del fattore di crescita neuronale (BDNF) (Aicardi et al., 2004); l'STP dipende soltanto dall'attivazione dei recettori NMDA e dai canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti (Sweatt, 1999).

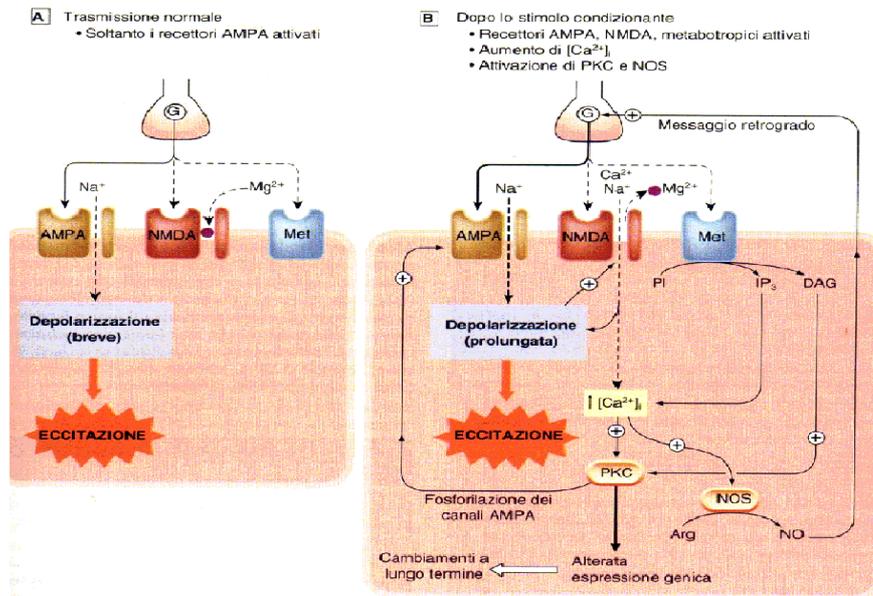


Figura 11. Meccanismi del potenziamento a lungo termine (LTP). a) Trasmissione sinaptica normale: il glutammato attiva principalmente i recettori AMPA; non c'è una quantità sufficiente di glutammato per attivare i recettori metabotropici, inoltre i canali NMDA sono bloccati dal Mg^{2+} . b) Una serie di stimoli condizionanti fa rilasciare una quantità di glutammato sufficiente ad attivare i recettori metabotropici ed i recettori NMDA, i cui canali vengono sbloccati dalla depolarizzazione prolungata. Si ha un aumento del Ca^{2+} intracellulare che attiva la PKC la quale a sua volta fosforila varie proteine tra cui i recettori AMPA. Il rilascio di ossido nitrico è un segnale retrogrado che fa aumentare ulteriormente il rilascio di glutammato.

- **Depressione a lungo termine (LTD)**

Una stimolazione a bassa frequenza (1-5 Hz) dei neuroni presinaptici induce, se applicata in condizioni basali, una depressione della trasmissione sinaptica.

Anche la depressione, così come il potenziamento, può essere classificata in: depressione a breve termine (se si mantiene per meno di 30 minuti – *short term depression*, STD), o a lungo termine (se si mantiene per più di 3 ore - *long term depression*, LTD).

In base al coinvolgimento dei terminali pre- e postsinaptici possiamo classificare la LTD secondo le regole dell'apprendimento:

- LTD omosinaptica: quando è conforme ai requisiti Hebbiani della simultanea attività pre- e postsinaptica (Hebb, D.O., 1949); anche la LTD associativa è omosinaptica, ma l'attività postsinaptica richiesta è provveduta dalle vicine afferenze convergenti attivate in congiunzione o separazione rispetto al secondo input afferente (Massey and Bashir, 2007);
- LTD eterosinaptica: si ha invece nelle sinapsi nelle quali l'input presinaptico rimane inattivo e l'attività postsinaptica è guidata dalle altre afferenze convergenti (Massey et al, 2007); questa è la prima forma di LTD scoperta in ippocampo ed è peculiare per la LTD; non obbedisce alla classica regola di Hebb ed è perciò spesso definita LTD “anti-Hebbiana”.

La LTD omosinaptica è stata descritta per la prima volta quando è stato osservato che una stimolazione a bassa frequenza è in grado di invertire una LTP stabile (Barrionuevo et al., 1980), fenomeno noto come *depotenziamento*. Il primo studio a riportare la LTD *de novo* invece dimostra che una stimolazione a bassa frequenza (LFS) nell'ippocampo

induce una LTD senza precedente induzione di LTP. Successivamente la LTD omosinaptica è stata osservata in diverse aree cerebrali, tra cui la corteccia visiva, lo striato, il NAc, la corteccia peririnale, l'amigdala, la corteccia prefrontale e la corteccia posteriore cingolata (Pennartz et al., 1993).

Il protocollo di stimolazione necessario nell'induzione della LTD varia da una regione all'altra del cervello: spesso è necessaria una prolungata LFS. Nella regione CA1 dell'ippocampo è stata inoltre riscontrata una riduzione della LTD indotta dal tipo di LFS utilizzato (600-900 stimoli ad 1Hz) in funzione dell'età.

Analogamente alla LTP, anche per la LTD svolge un ruolo fondamentale il Ca^{2+} intracellulare; la concentrazione di Ca^{2+} in entrata però è minore rispetto a quella che osserviamo per la LTP: le frequenze di stimolazione che generano depressione consentono infatti un afflusso di ioni Ca^{2+} più limitato attraverso i recettori NMDA che vengono aperti solo in modo parziale. Con il progredire degli studi è stato osservato che l'implicazione dei recettori NMDA non è sempre essenziale, poiché il Ca^{2+} necessario può derivare da altre fonti, come ad esempio dai canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti (VGCC), o dalle scorte intracellulari tramite l'attivazione di recettori metabotropici, come gli mGlu. Altri neurotrasmettitori implicati nella LTD includono NA, acetilcolina, DA e 5HT (Gu, 2002). I livelli di Ca^{2+} raggiunti promuovono l'attivazione di proteine fosfatasi, enzimi che rimuovono i gruppi fosfato da particolari siti di fosforilazione sulle proteine: un'azione contraria rispetto a quella delle proteine chinasi attivate nel caso della LTP. Si ritiene che la fosfatasi responsabile di questo meccanismo sia la fosfatasi 2b, conosciuta altrimenti come calcineurina (CN), una proteina fosfatasi Ca^{2+} -calmodulina dipendente.

La CN è uno degli enzimi più sensibili alla variazione delle concentrazioni di Ca^{2+} , caratteristica fondamentale nell'induzione della LTD, poiché i valori dello ione subiscono lievi cambiamenti. La CN regola altresì l'attività dell'enzima fosfatasi 1 (PP1), tramite una proteina intermedia, l'inibitore-1 (IN-1) che normalmente inibisce la PP1; la CN defosforila IN-1 attivando di conseguenza la PP1. La fosfatasi così attivata agisce su diversi substrati: la CaMK II, le subunità recettoriali non-NMDA, e altri processi ancora non ben caratterizzati che influenzano la produzione di messaggeri retrogradi, come l'ossido nitrico e i metaboliti della lipossigenasi.

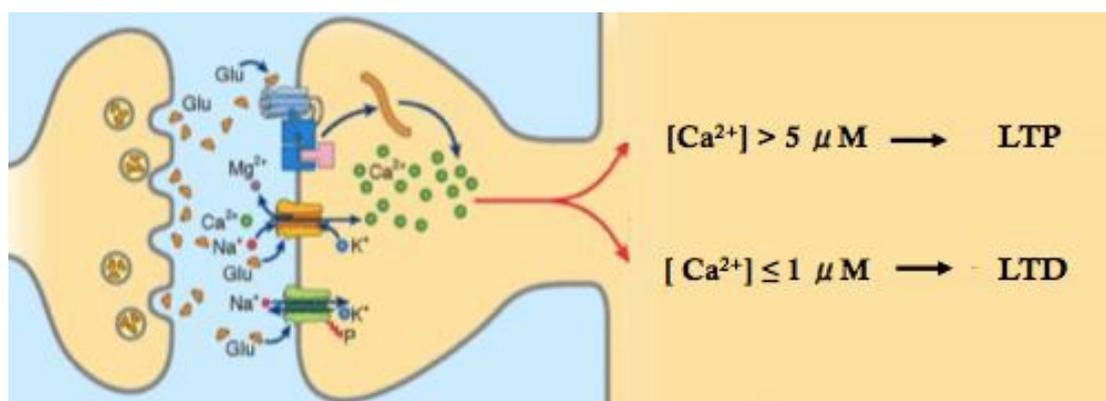


Figura 12. Concentrazioni di Ca^{2+} richieste per il potenziamento e la depressione a lungo termine.

➤ LTD nel NAc

Diversi studi indicano che i meccanismi neurali alla base di varie forme di apprendimento e memoria probabilmente giocano anche un ruolo critico nella fisiopatologia della dipendenza da sostanze d'abuso (Berke and Hyman, 2000; Hyman and Malenka, 2001; Nestler, 2001). LTP ed LTD sono stati osservati a livello della VTA e del NAc, ed è ragionevole ipotizzare che cerebrali queste due forme di plasticità sinaptica siano coinvolte nelle alterazioni delle funzioni dei circuiti neurali e quindi nelle alterazioni comportamentali indotte dalle sostanze d'abuso. Si è potuto inoltre osservare che l'esposizione a droghe d'abuso *in vivo* conduce modificazioni sinaptiche simili alla LTP a livello del SDM: ad esempio la somministrazione di una singola dose di differenti droghe d'abuso (cocaina, amfetamina, etanolo, nicotina, morfina) causa potenziamento della trasmissione nelle sinapsi eccitatorie sui neuroni dopaminergici in VTA (Faleiro et al., 2004; Saal et al., 2003; Ungless et al., 2001). Inoltre è stato dimostrato che l'assunzione di sostanze d'abuso induce plasticità sinaptica anche a livello del NAc; in particolare, la somministrazione cronica *in vivo* di cocaina causa depressione sinaptica nei MSN nello shell del NAc (Thomas et al., 2001). Uno studio successivo dimostra che questa depressione è una forma di LTD: in seguito al trattamento con cocaina è possibile indurre sperimentalmente (mediante stimolazione delle fibre afferenti) solo una LTD di entità minore (Thomas and Malenka, 2003).

Sono state descritte varie forme di plasticità sinaptica nel NAc, con caratteristiche diverse a seconda del tipo di protocollo di stimolazione

applicato: LTD mediata dai recettori NMDA (NMDA-LTD), mGlu_{2/3} (mGlu_{2/3}-LTD) o eCB (eCB-LTD).

- NMDA-LTD

La prima forma di LTD nel NAc è stata ottenuta tramite applicazione di una LFS ad 1Hz, in condizioni di patch clamp, in cui il voltaggio della cellula postsinaptica viene mantenuto tra -70 e -80 mV. Questa forma di LTD richiede l'attivazione dei recettori NMDA, la depolarizzazione postsinaptica e l'aumento delle concentrazioni intracellulari di Ca²⁺, ma non coinvolge i recettori dopaminergici o mGlu. Essa è dovuta principalmente alla defosforilazione dei recettori AMPA che riduce la loro funzionalità e conduce anche alla loro internalizzazione o endocitosi dinamica e clatrina-dipendente. (Thomas et al., 2000; Carroll et al., 2001). Un'interessante caratteristica di questa forma di LTD è che le risposte sinaptiche mediate dai recettori NMDA sono depresse anche mediante meccanismi distinti da questi responsabili della LTD (Morshita et al., 2005; Selig et al., 1995). Questa osservazione suggerisce che una volta indotta questa forma di LTD la plasticità sinaptica dipendente dai recettori NMDA venga limitata, perlomeno temporaneamente (Kauer and Malenka, 2007).

- mGlu_{2/3}-LTD

L'attivazione dei recettori mGlu_{2/3} mediante l'agonista esogeno LY354740 può portare a LTD indotta ed espressa a livello presinaptico (Kahn et al., 2001). I recettori mGlu_{2/3} presentano una localizzazione prevalentemente presinaptica e sono accoppiati a

proteine $G_{i/o}$; la loro attivazione comporta l'inibizione dell'AC e previene la formazione del cAMP. Un ruolo importante nell'induzione della mGlu_{2/3}-LTD è stato attribuito alla via della PKA cAMP-dipendente, in quanto sia l'attivazione dell'AC (enzima deputato alla sintesi di cAMP), che l'inibizione della via della PKA impediscono l'instaurarsi della LTD. L'induzione della mGlu_{2/3}-LTD non richiede l'aumento di Ca^{2+} intracellulare, ma comporta una riduzione del rilascio di neurotrasmettitore attraverso l'inibizione dei canali per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti di tipo P/Q (Robbe et al., 2002a). A certi livelli di sviluppo è richiesta una rapida sintesi proteica sia per l'endocitosi dei recettori AMPA mediata dall'attivazione dei recettori mGlu sia per LTD (Pfeiffer and Huber, 2002).

- eCB-LTD

Nei primi anni '90 è iniziato uno studio sui CBR che è culminato con la scoperta del fenomeno di soppressione dell'inibizione indotta dalla depolarizzazione (DSI), che descrive come una breve depolarizzazione dei neuroni principali provoca una soppressione della trasmissione sinaptica inibitoria GABA-ergica (Llano et al., 1991; Pitler and Alger, 1992).

L'induzione di DSI e il conseguente aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} postsinaptico sono in grado di produrre un composto eCB che diffonde nello spazio sinaptico per poi legarsi al terminale assonico presinaptico (Wilson and Nicoll, 2001). A conferma di ciò si possono citare Ohno-Shosaku et al. 2001, i quali, in neuroni ippocampali, hanno registrato una corrente sinaptica inibitoria (IPSC) dipendente dalla trasmissione GABA-ergica in seguito

all'applicazione dell'agonista del recettore GABA; successivamente hanno applicato l'agonista selettivo CB₁ WIN55,212,2 e hanno osservato una riduzione del rilascio di GABA dal terminale presinaptico nel 60% dei neuroni ippocampali. Infine hanno osservato come l'applicazione di antagonisti CB selettivi AM251 e SR141716A causi l'eliminazione totale della SDI, cosa che non accade applicando antagonisti selettivi del recettore GABA. Queste osservazioni supportano la tesi della funzione retrograda di eCB nell'eliminare il rilascio di GABA presinaptico. Questi studi sostengono l'importanza dell'eCB come mediatori della plasticità sinaptica a breve termine. Tutte queste forme di plasticità sinaptica a breve termine mediate dagli eCB sono state definite eCB-STD.

Il coinvolgimento degli eCB è stato dimostrato anche in fenomeni di plasticità sinaptica a lungo termine: eCB-LTD. Esempi di questo tipo di plasticità sono stati osservati in seguito a stimolazione ad alta frequenza (high frequency stimulation, HFS) di fibre corticali che innervano lo striato (Calabresi et al., 1992); anche in questo caso l'insorgenza della LTD è determinata dall'aumento dell'influsso di Ca²⁺ e si riflette nella diminuzione del rilascio di glutammato da parte dell'assone terminale delle fibre corticali (Choi and Lovinger, 1997). La partecipazione di messaggeri retrogradi eCB è confermata dal fatto che LTD striatale è bloccata da antagonisti selettivi del recettore CB₁ ed è assente in topi knockout per questo recettore (Gerdeman et al., 2002).

Nello striato dorsale la eCB-LTD si verifica in seguito ad una HFS (100Hz) delle sinapsi glutamatergiche dei NSM (Calabresi et al., 1992; Lovinger et al., 1993; Walsh, 1993), che causa attivazione degli

ioni Ca^{2+} (Di Marzo et al., 1994) e dei recettori mGlu del gruppo I (Gubellini et al., 2001; Sung et al., 2001) con conseguente rilascio di eCB dal terminale presinaptico che causa, a sua volta, una diminuzione del rilascio di glutammato.

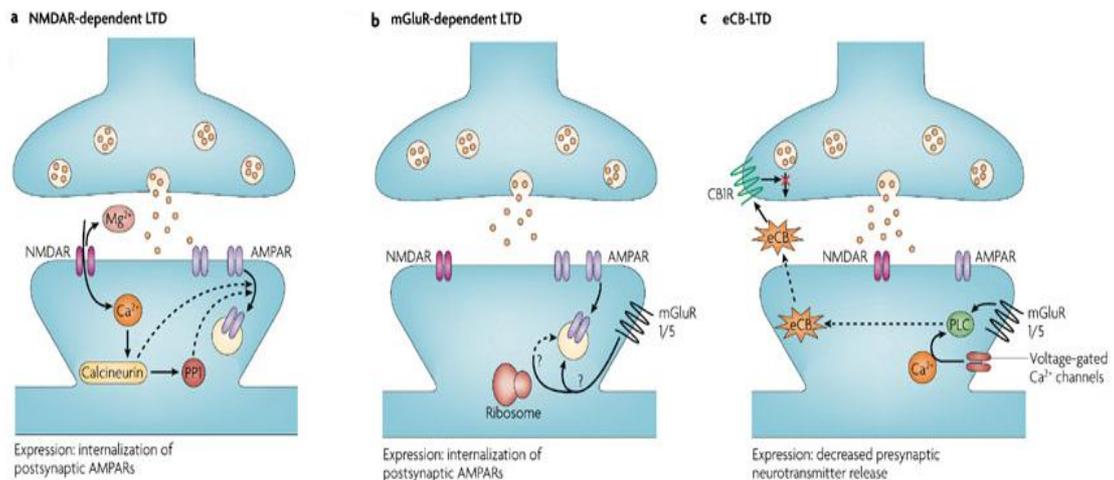
Nell'ippocampo la ripetuta stimolazione dei neuroni glutamatergici dello strato radiato induce una depressione eterosinaptica dei neuroni inibitori vicini mediata dall'eCB 2-AG.

Nell'amigdala la LFS 1 Hz per 100 secondi induce LTD dei neuroni inibitori vicini, coinvolgendo l'eCB AEA, poiché la LTD è facilitata in topi che non presentano la FAAH, enzima preposto alla degradazione della AEA. Esperimenti svolti in presenza di un chelante per il Ca^{2+} dimostrano che l'induzione di eCB-LTD nell'ippocampo e nell'amigdala non richiede un aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} , fattore che risulta invece fondamentale negli altri tipi di eCB studiati.

Una forma di eCB-LTD può essere indotta da una stimolazione a 13 Hz per 10 minuti delle fibre corticali che innervano il NAc; questa stimolazione richiede il coinvolgimento dei recettori mGlu₅ e aumenta i livelli di Ca^{2+} proveniente dai depositi intercellulari; gli eCB rilasciati dal terminale presinaptico costituiscono un segnale retrogrado e causano l'attivazione dei recettori CB₁ presinaptici con conseguente inibizione del rilascio di glutammato a livello della corteccia cerebrale (Robbe et al., 2002b).

I NSM del NAc possono essere suddivisi in due sottotipi, uno che esprime i recettori dopaminergici D₁ e segue una via diretta, proiettando direttamente nei centri dopaminergici mesencefalici (D2-NSM); la seconda tipologia esprime i recettori D₂ dopaminergici e segue una via indiretta, proiettando al pallido ventrale (D2-NSM).

Queste due tipologie di NSM possiedono caratteristiche sinaptiche ed elettrofisiologiche diverse, sono implicate in funzioni diverse (Kreitzer and Malenka, 2008) e presentano meccanismi induttivi della LTD diversi: nei D2+ NSMs la LTD è innescata dall'attivazione dei recettori mGlu postsinaptici, mentre nei D2- NSMs la LTD viene ridotta, ma non bloccata, da antagonisti del recettore CB₁. Questa osservazione suggerisce che alle sinapsi eccitatorie sui D2+ NSMs possa essere indotta una LTD mediata dall'attivazione di un recettore del canale vanilloide, il transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV₁) (Grueter et al., 2010); questa ipotesi prende origine dalla scoperta dell'attivazione del recettore TRPV1 da parte di AEA (De Petrocellis et al., 2001). La via indiretta dei NSMs è maggiormente eccitabile rispetto ai D2- NSMs, e può generare LTD in seguito a LFS (10Hz per 5 min); questa LTD non coinvolge i recettori del glutammato NMDA, ma i recettori mGlu₅, oltre ai recettori CB₁ e TRPV₁.



Nature Reviews | Neuroscience
 Kauer and Malenka, 2007

Figura 13. a) NMDA-LTD. E' caratterizzato dall'entrata di Ca^{2+} attraverso i recettori NMDA a livello postsinaptico, collegato all'aumento dell'attività della fosfatasi calcineurina e PPI. L'espressione primaria del meccanismo coinvolge l'internalizzazione dei recettori AMPA e una downregulation dei recettori NMDA tramite un meccanismo sconosciuto. b) mGlu-LTD. È stata caratterizzata a livello delle sinapsi delle fibre di Purkinje nel cervelletto e nelle sinapsi ippocampali. L'attivazione dei recettori $mGlu_{1/5}$ promuove l'internalizzazione dei recettori AMPA postsinaptici, un processo che, in determinate condizioni, richiede la sintesi di proteine. c) eCB-LTD. È la più recente forma di LTD scoperta, ed è stata osservata in diverse aree cerebrali. L'attivazione dei recettori $mGlu_{1/5}$, unita all'attivazione della fosfatasi C (PLC) o all'aumento di Ca^{2+} intracellulare (o entrambi), a livello dei neuroni postsinaptici causa la sintesi di un eCB. L'eCB viene successivamente rilasciato dal neurone postsinaptico, viaggia a ritroso fino a legarsi al recettore CB_1 a livello presinaptico e l'attivazione prolungata del recettore causa una riduzione del rilascio di glutammato tramite meccanismi sconosciuti.

5. Materiali e metodi

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti *in vitro* in fettine cerebrali parasaggittali includenti il NAc, ottenute da ratti maschi Sprague-Dawey di età compresa tra 28 e 42 giorni. Le fettine sono state preparate secondo il metodo descritto da Li e Kauer (2004).

- **Chirurgia**

Tutte le procedure svolte hanno seguito le linee guida della Commissione europea per il trattamento degli animali da esperimento. Il protocollo sperimentale utilizzato è stato approvato dal Comitato etico dell'Università di Bologna. Ogni ratto è stato dapprima anestetizzato con alotano e successivamente sacrificato; il cervello è stato rapidamente rimosso, è stato asportato il cervelletto e la parte laterale di entrambi gli emisferi, che alla fine sono stati separati. Tutta l'operazione chirurgica è stata eseguita in liquido cerebro-spinale artificiale (LCSA, contenente in mM: NaCl 119; KCl 2,5; NaH₂PO₄ 1; NaHCO₃ 26; MgSO₄ 1,3; glucosio 10; CaCl₂ 2,5; pH 7.4) mantenuto ad una temperatura di circa 4°C (allo scopo di rallentare il metabolismo cerebrale riducendo al minimo eventuali danni al tessuto) e saturato con una miscela di O₂ 95%, e CO₂ 5%.

Durante la fase di taglio è stato addizionato all'LCSA il bloccante dei recettori NMDA acido kynurenico (1mM), in modo da proteggere ulteriormente il tessuto cerebrale. Ciascun emisfero, uno alla volta, è stato fissato sulla vaschetta di taglio di un vibratomo con piatto vibrante immerso in LCSA contenente acido kynurenico mantenuto a 4°C grazie ad un sistema di raffreddamento ad acqua. Si è quindi proceduto al taglio

di fettine parasagittali dello spessore di 400 μ m partendo dalla parte mediale. Le fettine cerebrali contenenti il “core” del NAc sono state identificate tramite l’atlante “The rat brain atlas” (tavole 81, 82, 83 Paxinos and Watson 1986). Nella maggior parte dei casi sono state ottenute 3 fettine contenenti il NAc per ogni emisfero cerebrale. Le fettine selezionate sono state introdotte in camerette separate contenenti LCSA a temperatura ambiente, ossigenate e conservate per almeno un’ora prima dell’inizio dell’esperimento.

- **Elettrofisiologia**

La registrazione dell’attività bioelettrica neuronale è stata effettuata in un’apposita camera di registrazione del tipo “ad immersione”, in cui ogni singola fetta di tessuto cerebrale, posta su un retino di nylon e fermata da un secondo retino sovrapposto, viene continuamente perfusa con una soluzione costituita da LCSA a temperatura ambiente addizionato con picrotossina 50 μ M (bloccante dei recettori GABA_A) e saturata con O₂ al 95% e CO₂ al 5%. Il flusso della soluzione è mantenuto tra i 2 e i 3 ml/min in modo costante grazie ad una pompa inserita in serie nel circuito. Un microscopio da chirurgia posto sopra la cameretta permette l’individuazione esatta dell’area in cui collocare, mediante micromanipolatori ad elevata stabilità, gli elettrodi di stimolazione e registrazione.

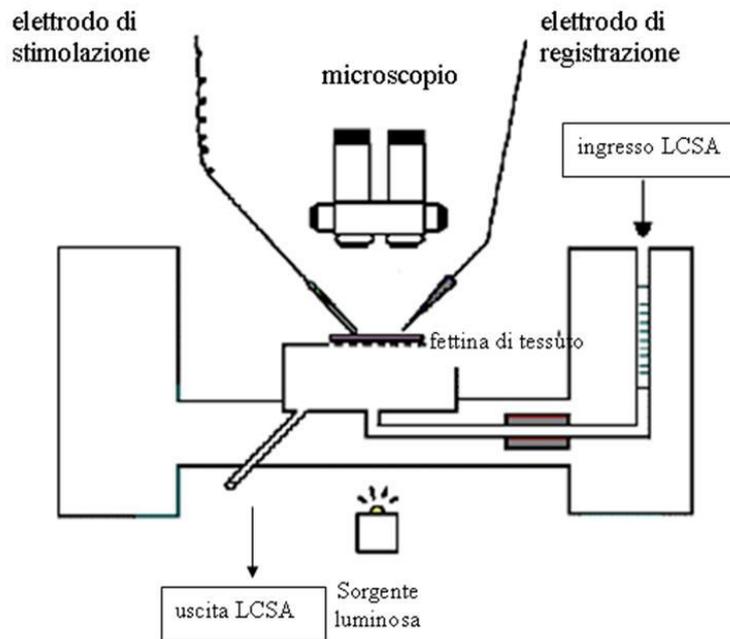
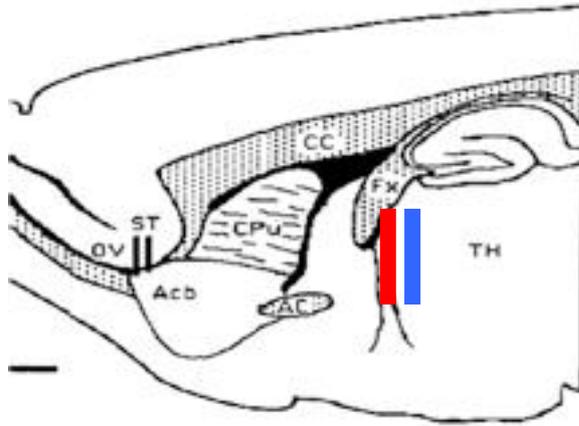


Figura 14. Rappresentazione schematic dell'apparato di registrazione elettrofisiologica.

Per evocare e registrare i potenziali di campo extracellulari sono stati utilizzati un elettrodo di stimolazione concentrico di acciaio inox rivestito di teflon avente una resistenza di 70-80k Ω e un elettrodo di registrazione costituito da un capillare in vetro di resistenza 2,5-5M Ω riempito con LCSA addizionato di picrotossina 50 μ M, collegato ad un amplificatore di corrente continua attraverso un elettrodo di Ag/AgCl. L'elettrodo di stimolazione è stato posto nella parte rostrale del NAc, subito sotto la commissura anteriore. L'elettrodo di registrazione è stato posto a circa 400-600 μ m dall'elettrodo di stimolazione, in direzione caudale o caudale-ventrale.



Paxinos and Watson 1986

Figura 15. Rappresentazione schematica della fettina di cervello utilizzata negli esperimenti. Le barre verticali indicano gli elettrodi: in rosso l'elettrodo di stimolazione, in blu quello di registrazione. Acb (nucleo accumbens), AC (commissura anteriore), CC (corpo calloso), Cpu (caudato-putamen), OV (ventricolo olfattorio), TH (complesso talamico).

- Parametri di registrazione

Inizialmente si è proceduto con una stimolazione di base che consiste in impulsi della durata di 200 μ s alla frequenza di 0,033 Hz (1 impulso ogni 30 secondi) d'intensità variabile individuata per ogni singola fettina in funzione della relazione di input-output: viene utilizzata l'intensità che evoca il 50% della risposta massima. Dopo aver verificato che il potenziale di campo si mantenesse stabile (fluttuazioni inferiori a $\pm 10\%$) per almeno 20 minuti, si è proceduto con l'induzione di LTD secondo il protocollo LFS-4Hz, ossia un singolo treno di 4800 pulsii a 4Hz per 20 minuti, all'intensità della baseline. E' stato anche utilizzato anche un protocollo di stimolazione sottosoglia, consistente in 2400 pulsii a 4Hz (LFS-weak) della durata di 10 minuti, all'intensità della baseline.

Trattamento farmacologico

Tutte le sostanze sono state applicate passando dalla perfusione con la soluzione di controllo ad una perfusione con una soluzione che differiva solo per la presenza della sostanza aggiunta. In questo studio sono state applicate le seguenti sostanze: il bloccante del recettore GABA_A picrotossina (50 µM), il bloccante dei VGCC di tipo-L nifedipina (10 µM), l'antagonista non selettivo dei recettori ionotropici del glutammato acido kinurenico (1mM), l'antagonista selettivo dei recettori ionotropici del glutammato D-amino-5-phosphonovaleric acid (D-AP5), l'antagonista dei recettori CB1 N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1 H-pyrazole-3-carboxamide (AM251; 2 µM) e 4-[[6-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-3-benzofuranyl]carbonyl]-benzotrile (LY320135; 10 µM), l'antagonista dei mGluR 1 (S)-(+)-α-amino-4-carboxy-2-methyl-benzeneacetic acid (LY367385), l'antagonista dei mGluR 5 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), l'antagonista dei mGluR 2/3 2-amino-2-(2carboxycyclopropan-1-yl)-3-(dibenzopyran-4-yl) propanoic acid (LY341495), 5-hydroxytryptamine hydrobromide (5-HT; 5 µM), l'antagonista dei recettori 5-HT₂ ketanserina tartrato (10 µM), l'antagonista dei recettori 5-HT₁ pindololo (10 µM), l'antagonista dei TRPV1 capsazepina (10 µM), l'antagonista dei recettori D₁ SCH23390 (25 µM), l'antagonista dei recettori D₂ sulpiride (25 µM), l'inibitore della diacilglicerolo lipasi α (DGL) tetraidrolipstatina (THL; 10 µM) e l'inibitore del fatty acid amide hydrolase (FAAH) JNJ-1661010 (1 µM), l'inibitore selettivo del reuptake di 5-HT (SSRI) citalopram hydrobromide (4 µM), l'agonista selettivo dei recettori 5-HT₂ alpha-methyl-5-hydroxytryptamine maleate (alpha-methyl 5-HT; 20 µM), l'inibitore selettivo della monoacilglicerolo lipasi

(MAGL) 4-[bis(1,3-benzodioxol-5-yl)hydroxyl-methyl]-1-piperidine-carboxylic acid 4-nitrophenyl ester (JZL 184; 50 μ M. Le sostanze sono state tutte sciolte a partire da una soluzione stock in dimetilsolfossido (DMSO) o acqua bidistillata e diluite 1000 volte in LCSA, ottenendo la loro concentrazione finale. Con l'eccezione dell'acido kynurenico, della 5-HT e dell'alpha-methyl 5-HT, nessuna delle sostanze ha alterato la trasmissione di base.

- **Sistema di analisi**

I potenziali di campo sono stati monitorati durante l'esperimento mediante un oscilloscopio e contemporaneamente digitalizzati attraverso un'interfaccia analogico-digitale (Digita 1200A, frequenza di campionamento di 10Hz) e infine acquisiti da un PC tramite il programma Axoscope 7.0 (Axon Instruments). I dati registrati sono stati analizzati (misurazione dell'ampiezza massima della componente sinaptica) utilizzando il programma Clampfit 6 (Axon Instruments) e l'analisi è stata effettuata utilizzando il programma Excel (Office 2000).

Nello studio della trasmissione sinaptica di base i valori relativi all'ampiezza dei fEPSP registrati durante e dopo l'applicazione delle sostanze sono stati espressi in percentuale rispetto alla media dei valori registrati nei 10 minuti precedenti il trattamento. Nello studio della LTD i valori relativi all'ampiezza del fEPSP post-LFS sono stati espressi in percentuale rispetto alla media dei valori registrati nei 10 minuti precedenti la LFS. L'analisi statistica è stata effettuata confrontando la media dei valori registrati negli ultimi 5 minuti di baseline con la media di quelli ottenuti nei minuti 55-60 dopo stimolazione a bassa frequenza. Il confronto è stato eseguito mediante test T di Student per le comparazioni

binarie, mentre per paragonare diversi time-points degli esperimenti vs. baseline (es. post dopo il 2° LFS vs. post dopo 1° LFS) è stata usata l'analisi di varianza (ANOVA) one way repeated measures (RM) con l'analisi post-hoc di Bonferroni. Per comparazioni statistiche tra l'ampiezza normalizzata (%) (media \pm S.E.M.) del fEPSP registrato nei minuti 55-60 dopo la fine dell'LFS in condizioni di controllo e in presenza di trattamento con diverse sostanze è stata usata la one-way ANOVA con l'analisi post-hoc di Bonferroni. Le differenze sono state considerate significative per $p < 0,005$.

6. Risultati

I potenziali di campo extracellulare evocati nel NAc dalla stimolazione delle fibre glutammatergiche provenienti dalla corteccia prefrontale sono caratterizzati da due picchi negativi. Il primo picco (N1) è di natura non sinaptica, ha un tempo di latenza di 2-4 ms e la sua ampiezza non varia significativamente in seguito alle stimolazioni in grado di alterare la risposta sinaptica. Il secondo picco (N2) costituisce la risposta sinaptica (componente sinaptica eccitatoria del potenziale di campo, fEPSP), ha un tempo di latenza maggiore (tra gli 8 e i 10 ms) e la sua ampiezza varia significativamente in seguito a varie stimolazioni, sia ad alta che a bassa frequenza (Fig. 16).

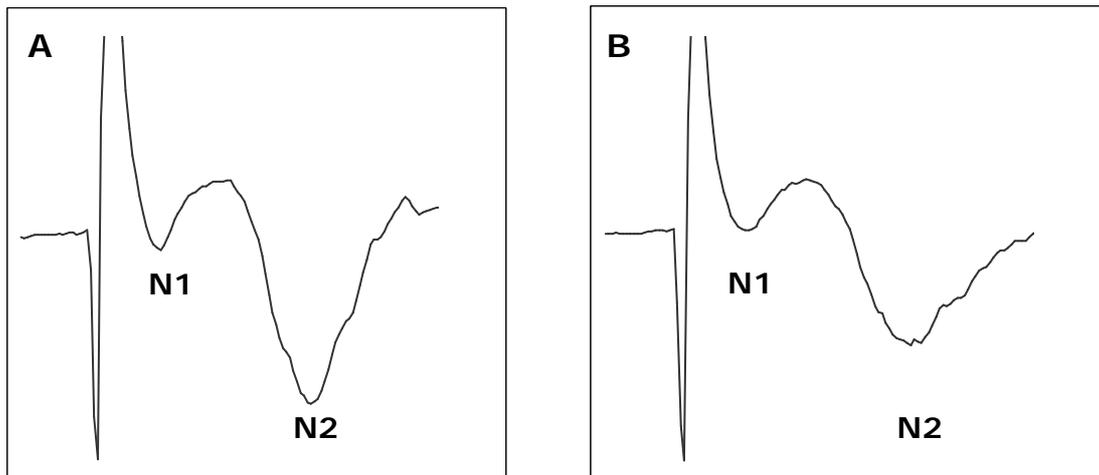


Figura 16. Esempio di tracciato di un potenziale di campo extracellulare registrato nel NAc in una fetta cerebrale di ratto prima (A) e dopo (B) stimolazione a bassa frequenza LFS-4Hz.

I primi risultati ottenuti dimostrano che LFS-4Hz induce una LTD (n=8; figura 17, A e D; tabella 1): quando la registrazione è stata mantenuta per 180 minuti dopo la fine della stimolazione LFS-4Hz, la media

dell'ampiezza del fEPSP registrata tra i minuti 175 e 180 era 74.87% rispetto alla baseline, valore significativamente ($p < 0.05$) diverso ($n=3$). Inizialmente è stata verificato il coinvolgimento dei recettori NMDA in seguito a questa nuova forma di stimolazione a bassa frequenza, come precedentemente dimostrato in altre forme di LTD nel NAc (Thomas et al., 200; Grueter et al., 2010); è stato quindi aggiunto alla soluzione di perfusione l'antagonista competitivo dei recettori NMDA D-AP5 (50 μM) 20 minuti prima e durante la stimolazione LFS-4Hz: questo trattamento non ha alterato la LTD ($n=6$; figura 17 D; tabella 1). Per valutare il coinvolgimento dei recettori postsinaptici ionotropici del glutammato, le fette sono state perfuse con l'antagonista non selettivo dei recettori ionotropici del glutammato acido kinurenico (1 mM) 20 minuti prima e durante la stimolazione LFS-4Hz. L'acido kinurenico ha completamente inibito la fEPSP, ma non ha alterato l'induzione di LTD ($n=8$; figura 17, B e D; tabella 1).

Le registrazioni di controllo indicano che l'effetto depressivo dell'acido kinurenico sull'ampiezza del fEPSP è completamente annullato dopo lavaggio in assenza della stimolazione LFS-4Hz ($n=6$; figura 17 B). Studi precedenti hanno dimostrato che, oltre ai recettori NMDA, l'attivazione transiente dei recettori mGlu 2/3 (sia tramite rilascio sinaptico di glutammato, sia tramite agonisti esogeni) genera una forma di LTD delle sinapsi eccitatorie sia nel NAc (Robbe et al., 2002a) che nell'ippocampo (Tzounopoulos et al., 1998). Successivamente, è stata verificata l'efficacia della LFS-4Hz in presenza dell'antagonista dei recettori mGlu_{2/3} LY 341495 (0,2 μM) 20 minuti prima e durante la stimolazione LFS-4Hz, ed è stato osservato che non ha alcun effetto sull'induzione di LTD ($n=6$; figura 17, C e D; tabella 1).

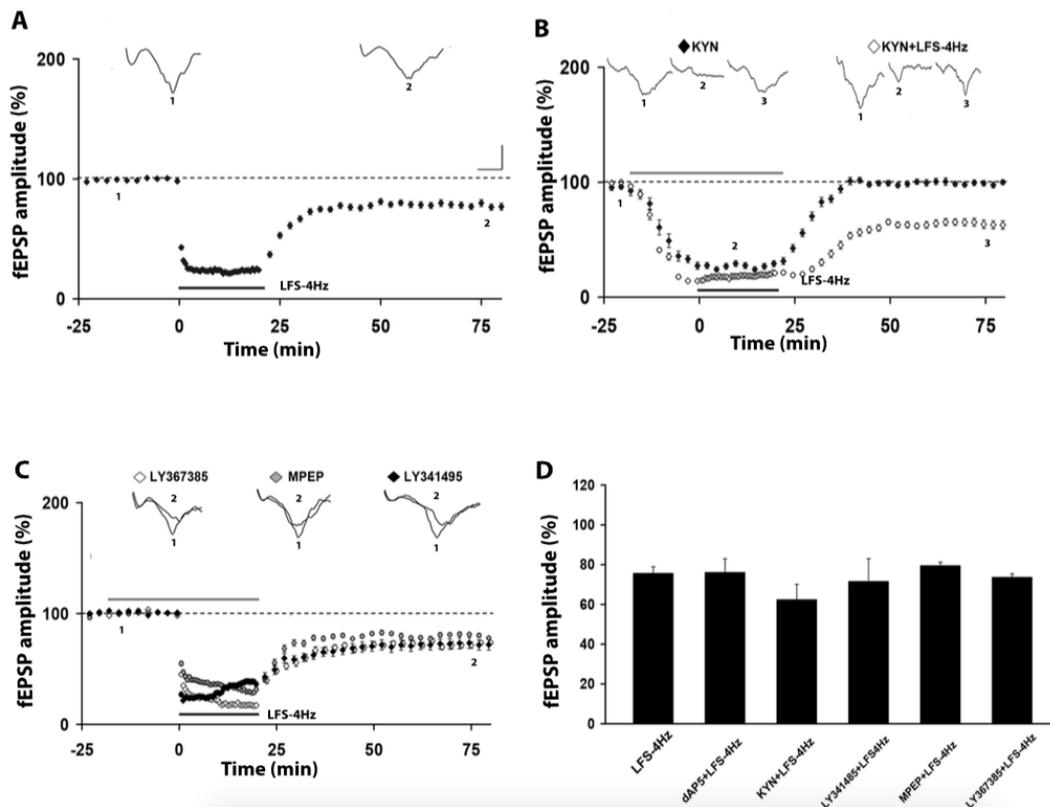


Figura 17. La LTD indotta dalla LFS-4Hz a livello delle sinapsi glutamatergiche nel core del NAc non richiede l'attivazione dei recettori ionotropici e metabotropici del glutammato. A. la stimolazione LFS-4Hz induce LTD della trasmissione glutamatergica eccitatoria ($n=8$, \blacklozenge); B. LFS-4Hz induce LTD in presenza dell'antagonista non selettivo dei recettori ionotropici del glutammato acido kynurenico (1 mM, $n=8$, \diamond); l'effetto depressivo dell'acido kynurenico è completamente annullato dopo lavaggio in assenza della stimolazione LFS-4Hz (1 mM, $n=6$, \blacklozenge). C. LFS-4Hz induce LTD in presenza di: un agonista selettivo mGluR 1 LY367385 (0.1 mM, $n=6$, \diamond), l'antagonista selettivo mGluR 5 MPEP (10 μ M, $n=6$, \blacklozenge), e l'antagonista mGluR II LY341495 (0,2 M, $n=6$, \blacklozenge). D. Istogramma riassuntivo dell'ampiezza (%) del fEPSP (media \pm SEM) durante i minuti 55-60 dopo l'induzione di LTD in condizioni di controllo (LFS-4Hz, $n=8$) o in presenza di: D-AP5 (50 μ M, $n=6$), acido kynurenico (1 mM, $n=6$), LY341495 (0,2 M, $n=6$), MPEP (10 μ M, $n=4$) o LY367385 (0,1 mM, $n=4$). * $p < 0.05$ rispetto alle condizioni di controllo.

Oltre alla LTD dipendente dai recettori NMDA e mGlu_{2/3}, le sinapsi del NAc esprimono anche una eCB-LTD, che dipende dalla produzione di eCB in seguito al legame con il recettore CB₁ (Grueter et al., 2010;

Hoffman et al., 2003; Robbe et al., 2003b). Quindi è stato valutato il coinvolgimento del sistema eCB anche nelle nostre condizioni sperimentali (LFS-4Hz) in presenza dell'antagonista del recettore CB₁ AM251 (2 µM) o LY320135 (10 µM) (Yu et al., 2013); come mostrato in figura 18 A e C, entrambi prevengono completamente l'induzione di LTD (n=6, n=6; tabella 1). I due principali eCB prodotti nel SNC sono AEA e 2-AG (Piomelli, 2003). Inizialmente è stato valutato il coinvolgimento del 2-AG: le fette sono state trattate con THL (10 µM), un inibitore dell'enzima DGL che produce il 2-AG. Come mostrato in figura 18 A e C, una preincubazione delle fette (>2 ore) con THL previene completamente l'induzione di LTD (n=9; tabella 1). Successivamente è stato esaminato se anche l'AEA fosse coinvolto nel meccanismo di induzione di LTD: è stato usato un protocollo di stimolazione sottosoglia (10 minuti invece di 20 a 4Hz, LFS-weak), che non è in grado di generare LTD in condizioni di controllo (n=5; figura 18, Be C; tabella 2). Quindi la produzione di AEA endogena è stata aumentata bloccando l'attività del FAAH, l'enzima responsabile della degradazione dell'AEA, aggiungendo JNJ1661010. Come mostrato in figura 18, B e C, la LFS-weak non è in grado di indurre LTD in presenza di JNJ1661010 (1 µM) (n=5; tabella 2), indicando che l'AEA non è coinvolta in questa forma di LTD.

Per valutare ulteriormente il coinvolgimento del 2-AG in questo processo, le fette sono state incubate (>2 ore) con JZL184 (50 µM) (Puente et al., 2011), un inibitore del MAGL, l'enzima responsabile della degradazione del 2-AG, ed è stata utilizzata LFS-weak. Come mostrato in figura 18 B e C, l'aumento dei livelli di 2-AG ripristina la LTD,

confermando il coinvolgimento del 2-AG nella LTD indotta nelle nostre condizioni sperimentali (n=6; tabella 2).

Un recente studio dimostra che la LTD indotta nel core del NAc da una stimolazione 10 Hz/5 min coinvolge l'attivazione dei TRPV₁ (Grueter et al., 2010); quindi è stata eseguita una serie di esperimenti in presenza dell'antagonista del TRPV₁ capsazepina (10 µM) che non ha alterato la LTD indotta dalla stimolazione LFS-4Hz (n=6; figura 18, A e C, tabella 1). Inoltre sono stati condotti degli esperimenti utilizzando il protocollo di stimolazione 10Hz/5 min che, nelle nostre condizioni sperimentali, non ha indotto LTD (la media dell'fEPSP era $106.52 \pm 4.67\%$, nei minuti 55-60 dopo la stimolazione 10 Hz/5 min LFS; n=6).

Poiché è stato dimostrato che l'eCB-LTD nel NAc richiede l'attivazione dei recettori mGlu 5 (Robbe et al., 2002b), è stato valutato il loro coinvolgimento nella LTD ottenuta nelle nostre condizioni sperimentali: l'utilizzo dell'antagonista dei recettori mGlu 5 MPEP (10 µM) 20 minuti prima e durante la stimolazione LFS-4Hz non ha alterato l'induzione di LTD (n=4; figura 17, C e D; tabella 1). Inoltre è stato valutato il coinvolgimento del gruppo I dei recettori mGlu (che comprende sia i recettori mGlu 1 che mGlu 5), applicando l'antagonista dei recettori mGlu 1 LY367385 (0,1 mM): la figura 17, C e D mostra che LFS-4Hz continua ad indurre LTD (n=4; tabella 1).

Per chiarire ulteriormente il meccanismo alla base di questo processo, è stato analizzato l'effetto del bloccante dei VGCC di tipo L nifedipina (10 µM) sul protocollo di stimolazione LFS-4Hz; come mostrato in figura 19 A ed E, la nifedipina previene completamente l'induzione di LTD.

Poiché è stato dimostrato che l'innervazione DA-ergica afferente al NAc regola l'attività dei NSM, così come la loro capacità di mettere in atto

cambiamenti plastici (Kreitzer and Malenka, 2005; Schotanus and Cergui, 2008, Thomas et al., 2001), è stato indagato se la DA fosse coinvolta anche nel processo di LFS-4Hz: sono stati aggiunti alla soluzione di perfusione gli antagonisti dei recettori D₁ e D₂ SCH23390 (25 μ M) e sulpiride (25 μ M) 20 minuti prima e durante la stimolazione LFS-4Hz; i risultati indicano che il blocco dei recettori D₁ e D₂ non previene l'induzione di LTD (n=6).

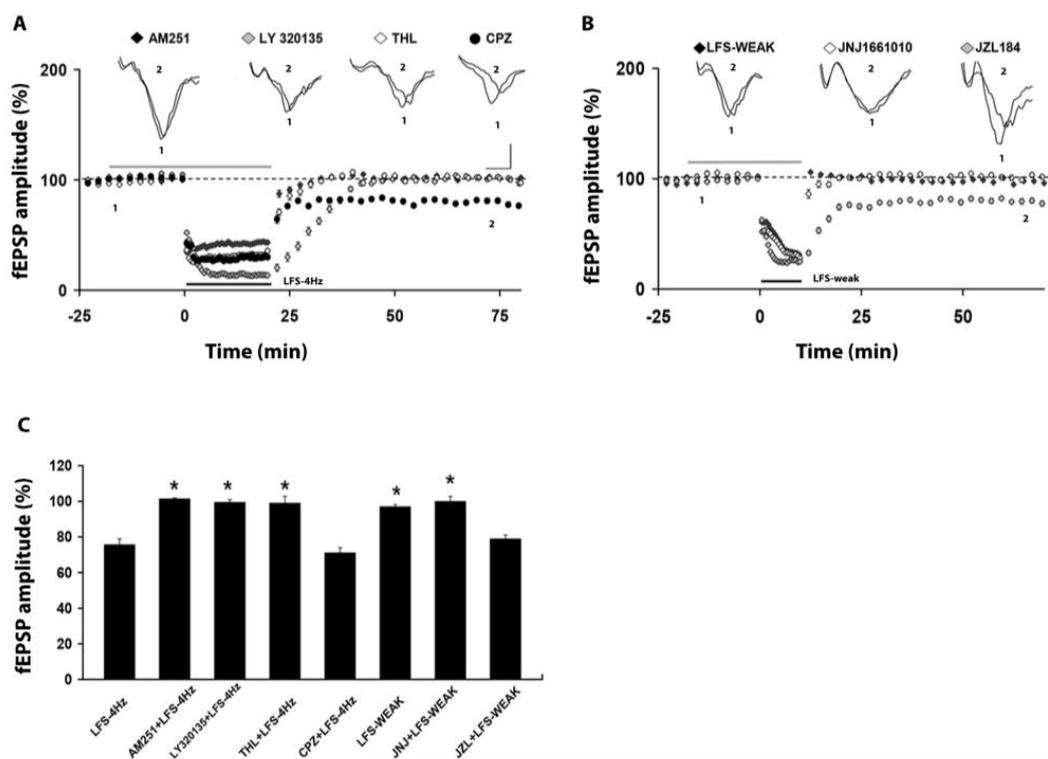


Figura 18. La LTD indotta dalla LFS-4Hz a livello delle sinapsi glutammatergiche nel core del NAc richiede la produzione di 2-AG e l'attivazione dei recettori CB₁, ma non dei recettori TRPV₁. A. la stimolazione LFS-4Hz non induce LTD in presenza dell'antagonista CB₁ AM251 (2 μ M; n=6, \blacklozenge) e LY320135 (10 μ M, n=6, \blacklozenge), così come in presenza dell'inibitore della DGL THL (10 μ M, n=9, \blacklozenge), ma induce comunque LTD in presenza dell'antagonista del TRPV₁ capsazepina (10 μ M, n= 6, \bullet); B. Una stimolazione sottosoglia 4Hz-10 min (LFS-weak) non induce LTD in condizioni di controllo (n=5, \blacklozenge) ed in presenza dell'inibitore del FAAH JNJ1661010 (1 μ M, n=5, \blacklozenge), ma induce LTD in presenza dell'inibitore MAGL JZL184 (50 μ M, n=6, \blacklozenge) C. Istogramma riassuntivo dell'ampiezza (%) del fEPSP

*(media ± SEM) durante i minuti 55-60 dopo l'induzione di LTD in condizioni di controllo (LFS-4Hz, n=8) o in presenza di AM251 (2 μM, n=6), LY320135 (10 μM, n=6), THL (10 μM, n=6), o capsazepina (10 μM, n=6); o durante i minuti 55-60 dopo LFS-weak in condizioni di controllo (n=5), o in presenza di JNJ1661010 (1 μM, n=5) o JZL184 (50μM, n=6). * p<0.05 rispetto alle condizioni di controllo.*

Sia i recettori CB₁ che 5-HT₂ sono espressi nel NAc (Barnes and Sharp, 1999; Pertwee 1997), e l'attivazione dei recettori 5-HT₂ causa la produzione e il rilascio di eCB responsabili della LTD nell'oliva inferiore (Best and Regehr, 2008); perciò è stato analizzato il coinvolgimento dei recettori 5-HT₂ nel protocollo di stimolazione LFS-4Hz. Come mostrato nella figura 19, A ed E, l'antagonista dei recettori 5-HT₂ ketanserina (10 μM) blocca completamente la LTD. I risultati ottenuti, invece, in presenza dell'antagonista dei recettori 5-HT₁ pindololo (10 μM) indica che questo sottotipo recettoriale non contribuisce all'induzione di LTD in seguito al nostro protocollo di stimolazione (n=4; figura 19, A ed E; tabella 1).

Per confermare il coinvolgimento dei recettori 5-HT in questa eCB-LTD, nella successiva serie di esperimenti il protocollo di stimolazione LFS-4Hz è stato sostituito da una perfusione di 5-HT (5 μM) per 20 minuti. Coerentemente con le osservazioni riscontrate a livello delle sinapsi corticostriatali (Mathur et al., 2011), la 5-HT aggiunta alla soluzione di perfusione (5 μM per 20 minuti) produce un'iniziale ampia depressione sinaptica, e una stabile e significativa LTD in seguito a lavaggio (n=4; figura 19, B ed E; tabella 3). Per verificare se l'effetto di questa LTD fosse mediata dai recettori 5-HT₂, le fette sono state perfuse con lo specifico agonista 5-HT₂ alfa-metil 5-HT (20 μM): come mostrato nella figura 19, B ed E, l'agonista mima l'effetto della 5-HT (n=6) nell'indurre

LTD. Un confronto tra le ampiezze delle LTD (in seguito a perfusione con 5-HT o alfa-metil 5-HT), rivela che la depressione risulta significativamente maggiore nel secondo caso. Per verificare ulteriormente il coinvolgimento dei recettori 5-HT₂ nella 5-HT-LTD è stato applicato l'antagonista selettivo 5-HT₂ ketanserina (10 µM) per 20 minuti prima e durante l'applicazione di 5-HT (5 µM). Come mostra la figura 19 C ed E, la ketanserina blocca completamente la LTD indotta dalla 5-HT (n=6; tabella 3). Successivamente è stato verificato se la 5-HT-LTD fosse mediata dai recettori CB₁: una co-applicazione di 5-HT e dell'antagonista CB₁ AM251 (2 µM) previene completamente 5-HT-LTD (n=4; figura 19, C ed E, tabella 3). Successivamente è stato valutato il coinvolgimento dei VGCC di tipo L nella 5-HT-LTD perfondendo con 5-HT (5 µM) insieme al bloccante selettivo dei VGCC di tipo L nifedipina (10 µM). La figura 19 C ed E mostra che la nifedipina blocca completamente la LTD indotta dalla 5-HT (n=4; tabella 3). Per valutare se la 5-HT endogena facilitasse l'induzione di LTD, è stato applicato il protocollo di stimolazione LFS-weak in presenza del SSRI citalopram (4 µM). La figura 19 D ed E mostra che il trattamento consente all'LFS-weak di indurre LTD (n=6; tabella 2), indicando il coinvolgimento della 5-HT endogena nel processo.

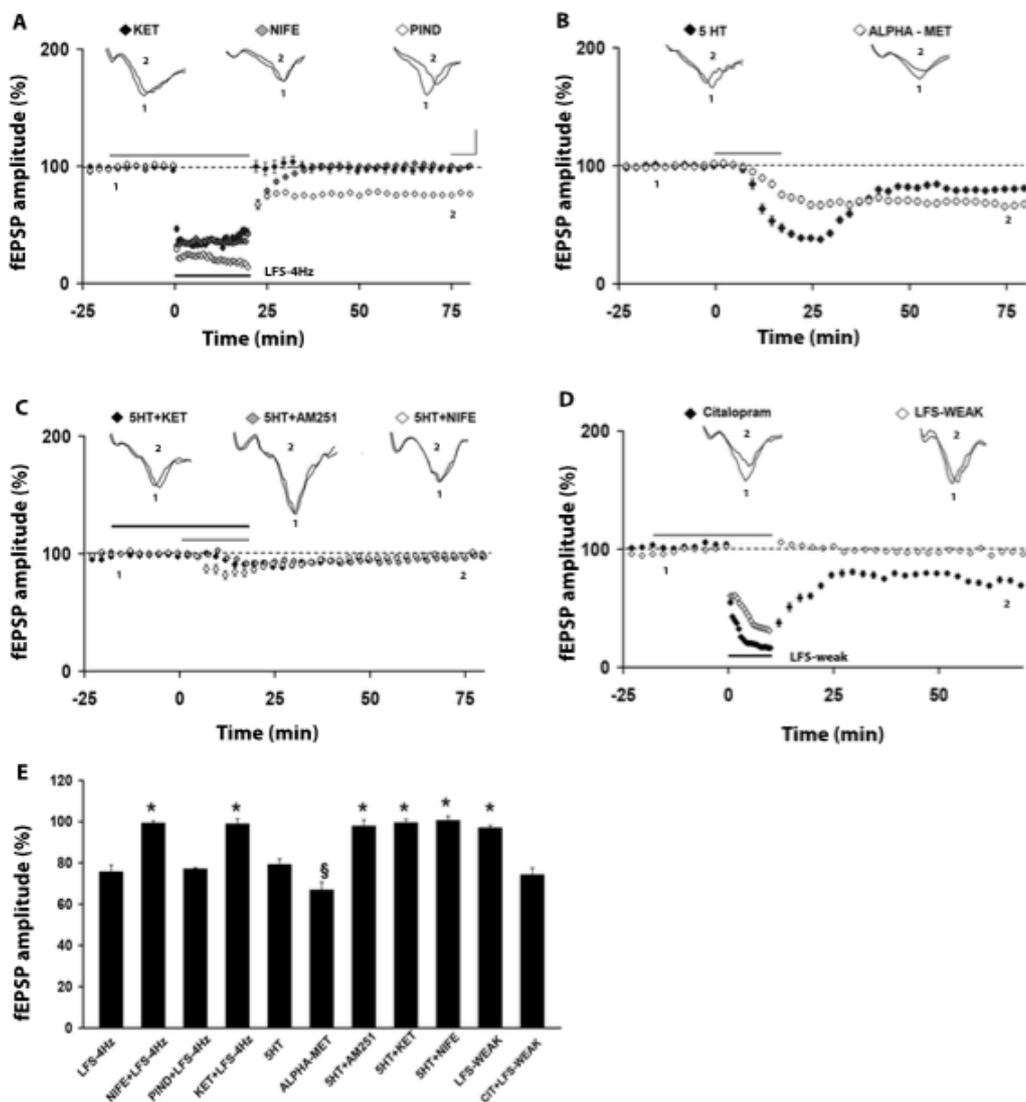


Figura 19. La LTD indotta dalla LFS-4Hz a livello delle sinapsi glutammatergiche nel core del NAC richiede l'attivazione dei recettori 5-HT₂ e l'apertura dei canali del Ca²⁺ di tipo L, la 5-HT-LTD richiede l'attivazione dei recettori 5-HT₂ e CB₁ e l'apertura dei canali del Ca²⁺ di tipo L. A. LFS-4Hz non induce LTD in presenza dell'antagonista selettivo 5-HT₂ ketanserina (10 μM; n=6, ◆) o in presenza del bloccante del VGCC di tipo L nifedipina (10 μM, n=6, ◇), ma la induce dopo pretrattamento con l'antagonista selettivo 5-HT₁ pindololo (10 μM, n=6, ◇); B. Applicazione di 5-HT (5 μM, n=8, ◆) induce LTD; LTD è altresì indotto dall'agonista selettivo 5-HT₂ alfa-metil 5-HT (20 μM, n=6, ◇); C. 5-HT-LTD è prevenuta dalla pre-applicazione con ketanserina (10 μM, n=6, ◆), con l'antagonista CB₁ AM251 (2 μM, n=6, ◇), e con il bloccante del VGCC di tipo L nifedipina (10 μM, n=6, ◇); D. una stimolazione sottosoglia (4Hz-10 minuti, LFS-weak) induce LTD in presenza del SSRI citalopram (4 μM n=6, ◆), ma non la induce in condizioni di controllo (n=5, ◇) E. Istogramma riassuntivo dell'ampiezza (%) del fEPSP (media ± SEM) durante i minuti 55-60 dopo l'induzione di LTD in condizioni di controllo (LFS-4Hz, n=8) o in presenza di: nifedipina (10 μM, n=7), ketanserina

*(10 μ M, n=4); o durante i minuti 55-60 dopo applicazione di 5-HT (5 μ M, n=4), alfa-metil 5-HT (20 μ M, n=6), 5-HT e AM251 (2 μ M, n=4), 5-HT e ketanserina (10 μ M, n=4) e 5-HT e nifedipina (10 μ M, n=4); o durante i minuti 55-60 dopo LFS-weak in condizioni di controllo (n=5), o in presenza di citalopram (4 μ M, n=5). * $p < 0.05$ rispetto alle condizioni di controllo, § $p < 0.05$ rispetto a 5-HT.*

I recettori CB₁ presinaptici sono in grado di inibire il rilascio di glutammato a livello delle sinapsi del NAc e della corteccia prefrontale (Robbe et al., 2001), quindi se l'attivazione dei recettori della 5-HT e LFS-4-Hz condividono gli stessi meccanismi di inibizione della trasmissione sinaptica eccitatoria, la LTD dipendente dalla LFS-4-Hz e quella dipendente dalla 5-HT potrebbero risultare saturanti. Inizialmente è stato verificato se ripetizioni di LFS-4Hz fossero saturanti. Come mostrato in figura 20 A, una seconda LFs-4Hz applicata durante il consolidamento della LTD non è in grado di indurre un'ulteriore depressione: l'ampiezza del fEPSP era 74.02 ± 5.44 % (n=5; $p < 0.05$ vs. baseline) tra i 25 e i 30 minuti dopo la fine della prima stimolazione LFS-4Hz, un valore simile a quello ottenuto alla fine della prima LFS-4Hz. Come mostrato in figura 20 B, per verificare se anche la 5-HT-LTD saturasse la LTD indotta dalla LFS-4Hz, abbiamo per prima cosa perfuso con 5-HT (5 μ M) e successivamente è stato applicato il protocollo LFS-4Hz: l'ampiezza del fEPSP era 78.99 ± 2.96 % (n=5; $p < 0.05$ vs. baseline) tra i minuti 25 e 30 dopo la fine della perfusione con 5-HT, e 76.20 ± 1.34 % tra i minuti 25 e 30 dopo la fine della stimolazione LFS-4Hz. Analogamente la 5-HT (5 μ M) non ha effetti significativi se applicata dopo la LTD indotta dalla stimolazione LFS-4Hz: il fEPSP era di 70.52 ± 4.46 % della baseline (n=7; $p < 0.05$ vs. baseline) tra i minuti 25 e 30 dopo l'applicazione di 5-HT (Fig. 20 C).

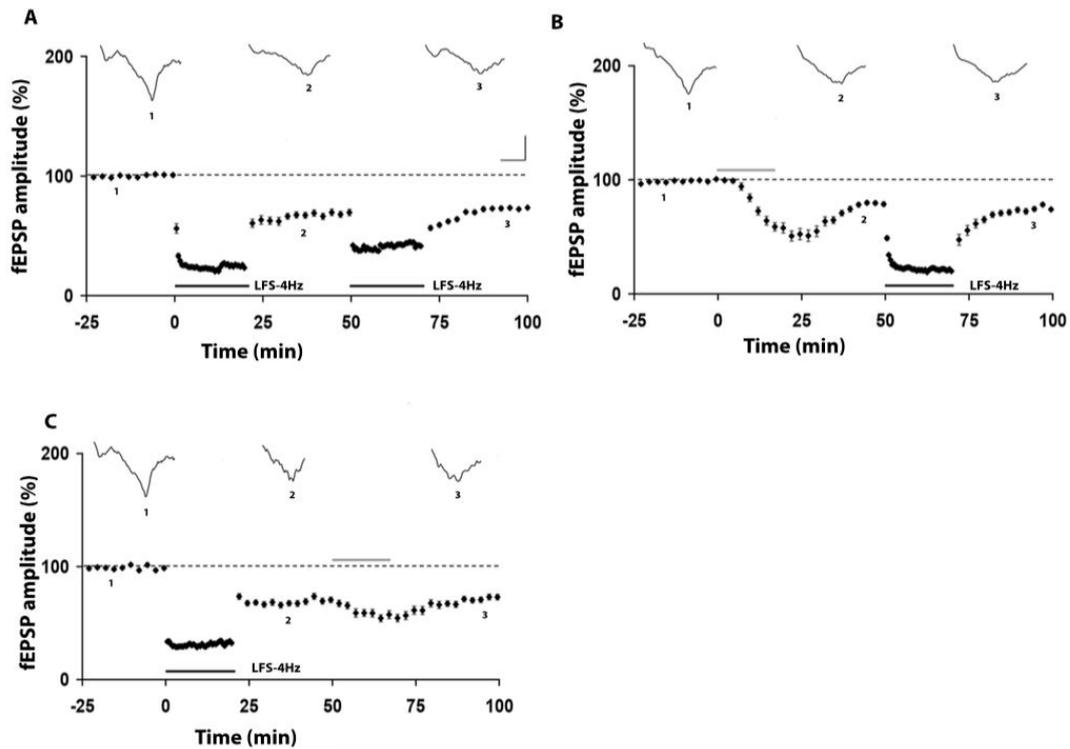


Figura 20. Le LTD indotte dalla LFS-4Hz e da 5-HT a livello delle sinapsi glutamatergiche nel core del NAc sono reciprocamente saturanti. A. LFS-4Hz induce LTD ($n=5$; $p<0,05$ vs. baseline, prima LTD); una seconda stimolazione LFS-4Hz applicata durante la stabilizzazione della mpiezza del fEPSP non induce una LTD ulteriore ($n=5$; NS. vs. first LTD); B. 5-HT (5 μ M) induce LTD ($n=5$; $p<0,05$ vs. baseline); la stimolazione LFS-4Hz è stata applicata durante la stabilizzazione della 5-HT-LTD, ma non induce una LTD ulteriore ($n=5$; NS vs. 5-HT-LTD); C. LFS-4Hz induce LTD ($n=5$; $p<0,05$ vs. baseline); 5-HT (5 μ M) applicata durante la stabilizzazione della LFS-4Hz-LTD non induce una LTD ulteriore ($n=5$; NS vs. LFS-4Hz-LTD).

Tabella 1. LTD indotto da LFS-4Hz

Trattamento	Ampiezza del fEPSP normalizzata (%) (media \pm SEM)	Significatività vs. baseline (Student's paired t test)	Significatività vs. control (One-way ANOVA)
Controllo	75.64 \pm 3.26	$P < 0.05$	-
dAP5	76.10 \pm 6.79	$P < 0.05$	NS
Kynureato	62.41 \pm 7.68	$P < 0.05$	NS
LY341495	71.55 \pm 11.41	$P < 0.05$	NS
MPEP	79.48 \pm 1.70	$P < 0.05$	NS
LY367385	73.63 \pm 1.03	$P < 0.05$	NS
AM251	101.36 \pm 0.51	NS	$P < 0.05$
LY320135	99.39 \pm 1.53	NS	$P < 0.05$
Capsazepina	80.87 \pm 2.90	$P < 0.05$	NS
THL	98.91 \pm 3.89	NS	$P < 0.05$
Ketanserina	98.88 \pm 2.51	NS	$P < 0.05$
Pindololo	77.09 \pm 0.53	$P < 0.05$	NS
Nifedipina	99.28 \pm 0.99	NS	$P < 0.05$
SCH2339+sulpiride	67.48 \pm 9.38	$P < 0.05$	NS

Questa tabella riassume gli effetti della LFS-4Hz sulla trasmissione sinaptica nel NAc in condizioni di controllo o in presenza delle molecole indicate. La media % dell'ampiezza del fEPSP \pm SEM è stata calcolata dai valori registrati tra i minuti 55 e 60 dopo la fine della stimolazione LFS-4Hz.

Tabella 2. Effetto della LFS-weak			
Trattamento	Ampiezza del fEPSP normalizzata (%) (media \pm SEM)	Significatività vs. baseline (Student's paired <i>t</i> test)	Significatività vs. control (One-way ANOVA)
Controllo	96.97 \pm 1.16	NS	-
JNJ-1661010	102.43 \pm 2.80	NS	NS
JZL-184	78.88 \pm 2.24	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05
Citalopram	74.25 \pm 3.33	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05

Questa tabella riassume gli effetti della LFS-weak sulla trasmissione sinaptica nel NAc in condizioni di controllo o dopo pre-trattamento delle seguenti sostanze. La media % dell'ampiezza del fEPSP \pm SEM è stata calcolata dai valori registrati tra i minuti 55 e 60 dopo la fine della stimolazione LFS-weak.

Tabella 3. LTD indotta da 5-HT			
Trattamento	Ampiezza del fEPSP normalizzata (%) (media \pm SEM)	Significatività vs. baseline (Student's paired <i>t</i> test)	Significatività vs. control (One-way ANOVA)
Controllo	80.79 \pm 1.96	NS	-
Nifedipina	100.57 \pm 2.04	NS	NS
Ketanserina	99.43 \pm 3.09	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05
AM251	97.84 \pm 3.09	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05

Questa tabella riassume gli effetti dell'applicazione di 5-HT sulla trasmissione sinaptica nel NAc in condizioni di controllo e dopo pre-applicazione delle seguenti sostanze. La media % dell'ampiezza del fEPSP \pm SEM è stata calcolata dai valori registrati tra i minuti 55 e 60 dopo la fine dell'applicazione di 5-HT.

7. Discussione

Negli ultimi anni la LTD nel NAc è stata analizzata in diversi studi (Grueter et al., 2010; Hoffman et al., 2003; Ji and Martin, 2012; Kahn et al. 2001; Kombian e Malenka, 1994; Pennartz et al., 1993; Thomas et al., 2000; Thomas et al., 2001; Robbe et al., 2002a; Robbe et al., 2002b), ma la ricerca svolta in questa tesi fornisce la prima evidenza di una eCB-LTD che richiede l'attivazione dei recettori CB₁ e 5-HT₂ e un aumento di Ca²⁺ in entrata attraverso i VGCC di tipo L. Quindi almeno due forme distinte di LTD dipendenti dall'eCB possono essere indotte nel NAc a seconda del protocollo usato, perché precedenti studi hanno dimostrato che la LTD-eCB indotta da una stimolazione a più alta frequenza richiede l'attivazione dei recettori mGluR5 e CB₁, un aumento di Ca²⁺ postsinaptico mediato dai depositi intracellulari (Grueter et al., 2010; Robbe et al., 2002b) e l'attivazione del canale TRPV₁ che promuove l'endocitosi dei recettori AMPA (Grueter et al., 2010).

Gli eCB sono molecole lipidiche derivanti dall'acido arachidonico che svolgono un'azione potente a livello dei recettori CB₁, largamente espressi a livello del SNC (Herkenham et al., 2001), e CB₂, principalmente presenti nei tessuti periferici e nelle cellule immunologiche (Galiègue et al., 1995). Precedenti studi nel NAc di topo dimostrano che l'attivazione dei recettori CB₁ inibisce la trasmissione sinaptica glutammatergica attraverso la modulazione presinaptica delle correnti di K⁺ (Robbe et al., 2001) ed è alla base della LTD indotta dai protocolli di stimolazione 13Hz-10 minuti (Robbe et al., 2002b), 5Hz-10 minuti (Hoffman et al. 2003) e 10Hz-5 minuti (Grueter et al., 2010).

Tutte queste osservazioni suggeriscono il coinvolgimento di un meccanismo presinaptico, che consiste nella riduzione del rilascio di glutammato indotto dagli eCB che agiscono sul recettore CB₁ come messaggeri retrogradi. Questa osservazione è in accordo con le precedenti evidenze nel NAc (Hoffman e Lupica, 2001) e a livello delle sinapsi eccitatorie nelle altre regioni cerebrali, come il corpo striato (Gerdeman e Lovinger, 2001), la neocorteccia (Sjöstrom et al., 2003) e l'oliva principale dorsale (Best e Regehr, 2008), così come a livello delle sinapsi inibitorie nell'ippocampo (Chevalleyre e Castillo, 2003) e nell'amigdala (Marsicano et al., 2002).

I recettori CB₁ sono attivati dal Δ^9 -tetraidrocannabinolo, il principio psicoattivo della pianta di canapa, così come dai ligandi endogeni, come l'AEA e il 2-AG; quest'ultimo ligando risulta prevalente nel cervello. L'AEA attiva il TRPV₁ (De Petrocellis et al., 2001), una proteina intracellulare di membrana appartenente alla famiglia dei recettori transienti.

A partire dall'osservazione che i TRPV₁ e i CB₁ sono estesamente co-localizzati nel core del NAc (Micale et al., 2009), e in accordo con le recenti evidenze del loro coinvolgimento nell'eCB-LTD indotto dalla stimolazione 10Hz/5 minuti (Grueter et al., 2010), era ragionevole ipotizzare che la LTD indotta dalla LFS-4Hz risultasse dall'attivazione del TRPV₁. Tuttavia i risultati ottenuti dopo stimolazione LFS-4Hz in presenza del bloccante del TRPV₁, o aumentando i livelli di AEA in presenza della stimolazione LFS-weak, o negli esperimenti eseguiti con la stimolazione 10Hz/5 minuti, escludono questa possibilità, e depongono a favore del coinvolgimento del ligando selettivo del recettore CB₁ 2-AG, che non ha attività sul TRPV₁ (De Petrocellis et al., 2000).

Il 2-AG è l'eCB più abbondante nel SNC (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995); in particolare la sua concentrazione nel mesencefalo è 100 volte maggiore rispetto all'AEA (Bisogno et al., 1999). Inoltre il 2-AG agisce come completo e potente agonista del recettore CB₁, mentre l'AEA è solo un agonista parziale (Sugiura et al., 1995; 1999; Savinainen et al., 2001; Stella et al., 1997). Studi biochimici indicano che l'enzima maggiormente coinvolto nella biosintesi di 2-AG sono la fosfolipasi C (PLC) e DGL (Piomelli 2003), sebbene anche altre vie anaboliche siano state suggerite (Sugiura et al., 2006). Il coinvolgimento del 2-AG nel nostro protocollo di stimolazione è stato confermato dagli esperimenti condotti in presenza dell'inibitore della DGL THL, che -come già dimostrato- non ha effetti diretti sui recettori CB₁ (Szabl et al., 2006; Uchigashima et al., 2007). Questa osservazione è ulteriormente supportata dalle evidenze che la LTD può essere indotta da un protocollo di stimolazione sottosoglia quando i livelli di 2-AG sono aumentati mediante applicazione di un inibitore del MAGL, l'enzima idrolizzante il 2-AG. Questo risultato è in accordo con evidenze precedenti in ippocampo (Ameri e Simmet, 2000; Edwards et al., 2006; Hashimoto et al., 2007; Stella et al., 1997), cervelletto (Maejima et al., 2005; Safo e Regehr 2005) e corteccia prefrontale (Melis et al., 2004) che sostengono il coinvolgimento del 2-AG.

Oltre all'eCB, i risultati ottenuti indicano il coinvolgimento della 5-HT, che agisce a livello dei recettori 5-HT₂ nel nostro protocollo di stimolazione, come dimostrano gli esperimenti di LFS-4Hz ottenuti in presenza del bloccante dei recettori 5-HT₂, e dalle prove che la LTD può essere indotta da un protocollo di stimolazione sotto-soglia quando i livelli endogeni di 5-HT sono aumentati dal SSRI citalopram. Questa

prova è ulteriormente supportata dall'osservazione che la LTD può anche essere aumentata da perfusione con l'agonista specifico 5-HT₂.

E' stato recentemente dimostrato che la 5-HT aumenta l'attività degli interneuroni GABA-ergici nel NAc attraverso i recettori 5-HT_{2C}, tramite inibizione dei NSM (Blomely e Bracci, 2009). Si potrebbe sostenere che la LTD dipendente dai 5-HT₂ osservata in questo studio possa derivare da un aumento di segnale GABA-ergico. Questa possibilità sembra improbabile, poiché gli esperimenti sono stati svolti in presenza costante dell'antagonista dei recettori GABA_A picrotossina. Piuttosto, questi dati supportano l'idea che l'attivazione dei recettori 5-HT₂ possa causare la produzione ed il rilascio di eCB, in accordo con un'osservazione precedente nell'oliva dorsale principale (Best e Regehr, 2008).

Abbiamo anche indagato il coinvolgimento dei VGCC di tipo L sia nella LFS-4Hz che nella LTD indotta da 5-HT, in quanto sono particolarmente importanti per la transizione da down- ad up-state dei NSM (Carter e Sabatini, 2004); inoltre studi condotti *in vivo* hanno dimostrato che questi canali giocano un ruolo critico nel comportamento indotto da psicostimolanti e nella plasticità neuronale in diverse regioni del sistema dopaminergico mesolimbico, incluso il NAc (Gnegy, 2000; Licata e Pierce, 2000). La nifedipina previene sia la LTD indotta dal LFS-4Hz che da 5-HT, indicando che questi canali giocano un ruolo critico in questo processo, come precedentemente osservato nell'LTD indotta dagli eCB nei NSM dello striato dorsale (Kreitzer e Malenka, 2005), così come in altre forme di plasticità sinaptica in altre aree del cervello, incluso l'ippocampo (Bolshakov e Siegelbaum 1994; Grover e Teyler 1992; Morgan e Teyler 1999), l'amigdala laterale (Weisskopf et al., 1999) e la corteccia peririnale (Seoane et al., 2009). E' stato dimostrato che un forte

aumento di Ca^{2+} intracellulare (10-50 μM) è necessario per attivare la fosfolipasi D e la biosintesi di AEA; se l'aumento di Ca^{2+} è più basso, si attiva la PLC e DAG, che causa la produzione di 2-AG (Brenowitz e Regehr, 2003; Hashimoto et al., 2005).

Sembra ragionevole supporre che l'attivazione dei recettori 5-HT₂ da parte della 5-HT (sia endogena rilasciata in risposta alla stimolazione LFS-4Hz, che applicata esogenamente) possa stimolare la produzione di 2-AG aumentando sia l'attività della DGL che la permeabilità dei VGCC di tipo L, causando quindi un aumento di Ca^{2+} intracellulare compatibile con la produzione e rilascio di 2-AG.

Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che la stimolazione delle afferenze glutammatergiche induce una nuova forma di eCB-LTD nel core del NAc, che coinvolge il rilascio di 5-HT, che agisce a livello dei recettori 5-HT₂ postsinaptici aumentando l'influsso di Ca^{2+} attraverso i canali di tipo L e la produzione ed il rilascio di 2-AG; l'eCB viaggia a ritroso e lega il recettore CB₁ presinaptico, causando una riduzione permanente e duratura del rilascio di glutammato che risulta in LTD (Fig. 21).

Le disfunzioni della neurotrasmissione serotoninergica hanno un ruolo critico in diverse patologie psichiche, come la dipendenza da droghe, la depressione maggiore, i disordini alimentari, l'emesi, il dolore cronico, i disordini del sonno, l'autismo e la schizofrenia (Malison et al., 1998; Mann et al., 1995; Pacher et al., 2006; Shahsvand-Ananloo et al., 2013).

Perciò queste osservazioni potrebbero essere utili per comprendere i meccanismi che sottendono queste patologie, e potrebbero contribuire allo sviluppo di nuovi trattamenti farmacologici. Inoltre, queste osservazioni aggiungono alcuni elementi conoscitivi al numero crescente

di prove che indicano un coinvolgimento del sistema eCB nella plasticità sinaptica a breve e a lungo termine nelle aree cerebrali coinvolte nella mediazione della ricompensa.

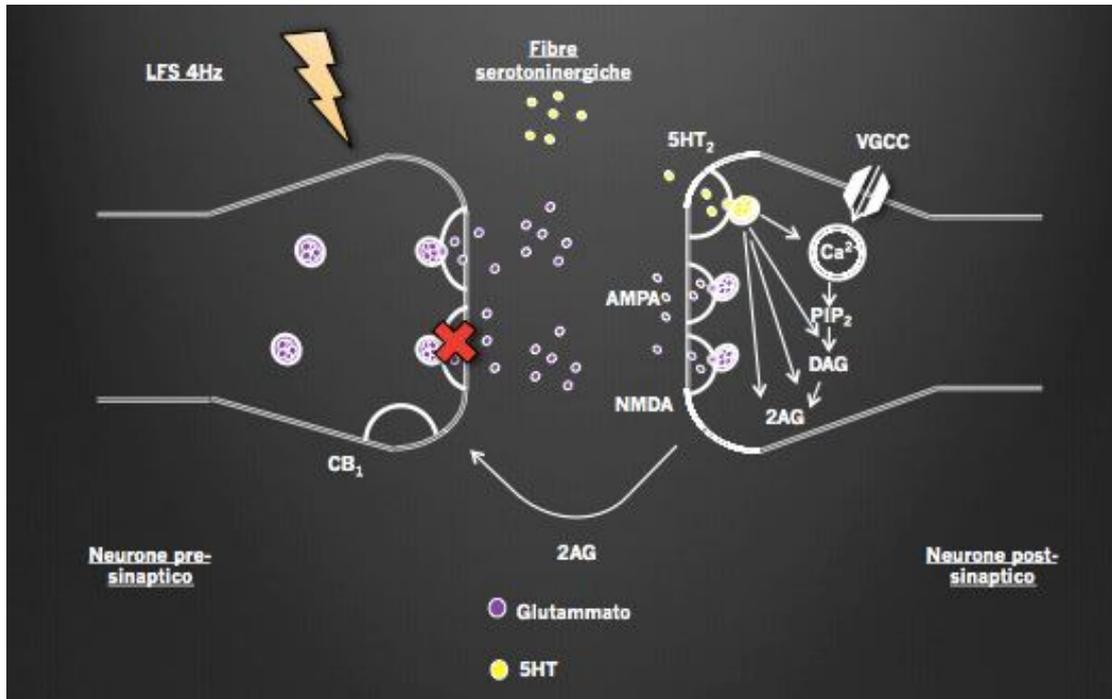


Figura 21. Diagramma della cascata di segnale sottostante alla LTD indotta da LFS-4Hz a livello delle sinapsi glutammatergiche nel core del NAc. La stimolazione LFS-4Hz delle fibre glutammatergiche nel core del NAc aumenta il rilascio di 5-HT che agisce a livello dei recettori 5-HT₂, causando un aumento di influsso di Ca²⁺ attraverso i VGCC di tipo L unito alla produzione e rilascio di 2-AG; l' eCB viaggia a ritroso e lega il recettore CB₁ presinaptico, causando una riduzione duratura del rilascio di glutammato che risulta in una LTD. Abbreviazioni: GLU= glutammato; AMPA= acido α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolepropionico recettore del glutammato; NMDA= recettore N-metil-D-aspartato; 5-HT= 5-idrossitriptamina (o 5-hydroxytryptamina o serotonina); 5-HT₂= recettore per la 5-idrossitriptamina (o 5-hydroxytryptamina o serotonina) di tipo 2; VGCC= canali del Ca²⁺ a dipendenza di voltaggio; G= proteina G; PIP₂= fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato; DAG= diacilglicerolo; 2-AG= 2-arachidonoilglicerolo; CB₁= recettore endocannabinoide di tipo 1.

I risultati riportati in questa tesi sono pubblicati nell'articolo Burattini et al. 2014.

8. Bibliografia

Aicardi G, Argilli E, Cappello S, Santi S, Riccio M, Thoenen H, Canossa M. Induction of long term potentiation and depression s reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neutrophic factor. *Pnas.* 15788-15792. **2004**

Alex KD, Yavanian GJ, McFarlane HG, Pluto CP, Pehek EA. Modulation of dopamine release by striatal 5-HT_{2C} receptors. *J Neurosci.* 306 (5697):879-81. **2011**

Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol.* 58:315-348. **1999**

Ameri A, Simmet T. Effects of 2-arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361: 265-272. **2000**

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083-152. **1999**

Barrionuevo G, Schottler F, Lynch G. The effects of repetitive low frequency stimulation on control and “potentiated” synaptic responses in the hippocampus. *Life Sci.* 27(24):2385-91. **1980**

Biegon A., Kerman I.A. Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. *Neuroimage*. 14:1463-1468. **2001**

Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*. 25:3306-3311. **2000**

Best AR, Regehr WG. Serotonin evokes endocannabinoid release and retrogradely suppresses excitatory synapses. *J Neurosci* 28: 6508-15. **2008**

Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 377-380. **1999**

Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell HC. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol*. 196:263-81. **1994**

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 232:357-374. **1973**

Blomeley CP, Bracci E. Serotonin excites fast-spiking interneurons in the striatum. *Eur J Neurosci* 29: 1604-14. **2009**

Brebner K, Wong TP, Liu L, Liu Y, Campsall, Gray S, Phelps L, Phillips AG, Wang YT. Nucleus accumbens long-term depression and the expression of behavioral sensitization. *Science*. 310:1340-3. **2005**

Brenowitz SD, Regehr WG. Calcium dependence of retrograde inhibition by endocannabinoids at synapses onto Purkinje cells. *J Neurosci* 23: 6373-84. **2003**

Bockaert J, Fozard JR, Dumuis A, Clarke DE. The 5-HT₄ receptors: a place in the sun. *Trends Pharmacol Sci*. 13(4):141-5. **1992**

Bolshakov VY, Siegelbaum SA. Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression. *Science* 264: 1148-52. **1994**

Calabresi P, Maj R, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. Long term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci*. 12:4224-33. **1992**

Carroll RC, Beattie EC, von Zastrov M, Malenka RC. Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nature Rev Neurosci*. 2,315-324. **2001**

Carter AG, Sabatini BL. State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron* 44: 483-49. **2004**

Chevalere V, Castillo PE. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38: 461-72. **2003**

Choi S, Lovinger DM. Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long term depression and postnatal development of corticostriatal synapses. *Prot Natl Acad Sci USA.* 94:2665-70. **1997**

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 384:83-87. **1996**

De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett* 483: 52–56. **2000**

De Petrocellis L, Bisogno T, Maccarone M, Davis JB, Finazzi-Agro A, Di Marzo V. The activity of anandamide at vanilloid VR₁ receptors required facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J Biol Chem.* 276:12856-63. **2001**

De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br F Pharmacol.* 141:765-74. **2004**

De Ponti R. Pharmacology of serotonin: what a clinician should know. *Gut*. 53(10):1520-35. **2004**

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 372: 686-691. **1994**

Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*. 21:521-528. **1998**

Dinh TP, Freund TF, Piomelli D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem and Phys of lipids*. 149-158. **2002**

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*.258:1946-49. **1992**

Edwards D.A., Kim J., Alger B.E. Multiple mechanisms of endocannabinoid response initiation in hippocampus. *J Neurophysiol* 95: 67-75. **2006**

Faleiro LJ, Jones S, Kauer JA. Rapid synaptic plasticity of glutamatergic synapses on dopamine neurons in the ventral tegmental

area in response to acute amphetamine injection.
Neuropsychopharmacology. 29(129):2115-25. **2004**

Fibiger HC, Phillips AG. Mesocorticolimbic dopamine system and reward. *Ann N Y Acad Sci*. 537:206-15. **1988**

Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signalling. *Physiol Rev*. 83:1017-66. **2003**

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocytes subpopulation. *Eur J Biochem* 232:54-61. **1995**

Gerdeman G, Lovinger DM CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 85: 468-7. **2001**

Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Nat Neurosci*. 13: 1519-25. **2002**

Genoux D, Montgomery JM. Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 34: 1058-1063. **2007**

Glass M., Dragnunow M., Faull R.L. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neurosci.* 77:299-318. **1997**

Gnegy ME. Ca²⁺/calmodulin signaling in NMDA-induced synaptic plasticity. *Crit Rev Neurobiol* 14: 91-129. **2000**

Grover LM, Teyler TJ. N-methyl-D-aspartate receptor-independent long-term potentiation in area CA1 of rat hippocampus: input-specific induction and preclusion in a non-tetanized pathway. *Neuroscience* 49: 7-11. **1992**

Grueter BA, Brasnjo G, Malenka RC. Postsynaptic TRPV₁ triggers cell type-specific long term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci.* 13:1519-25. **2010**

Gu Q. Neuromodulatory transmitter system in the cortex and their roles in cortical plasticity. *Neuroscience.* 111, 815-835. **2002**

Gubellini P, Saulle E, Centonze D, Bonsi P, Pisani A, Bernardi G, Conquet F, Calabresi P. Selective involvement of mGlu₁ receptors in corticostriatal LTD. *Neuropharmacology.* 40:839-46. **2001**

Hamon N, Gallissot MC, Menard F, Gozlan H, Bourgoin S, Vergè D. 5-HT₃ receptor binding sites are on capsaicin-sensitive fibres in the rat spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 19;164(2):315-22. **1989**

Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, Araishi K, Shin HS, Kano M. Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* Jan 45: 257-68. **2005**

Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci* 27: 1211-9. **2007**

Hebb DO. The organization of behavior. *Wiley*. **1949**

Heimer L, Wilson RD. The subcortical projections of the allocortex: similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex and the neocortex. *Golgi Centennial Symposium: Perspective in Neurobiology*. 177-193. **1995**

Heimer L, Alheid GF, De Olmos JS, Groenewegen HJ, Haber SN, Harlan RE, Zahmn DS. The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 9(3):354-81. **1997**

Herkenham M, Lynn A, Little M, Johnson M, Melvin L, De Costa B, Rice K. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:1932. **1990**

Hillard CJ, Wilkison DM, Edgemond WS, Campbell WB. Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochem Biophys.* 1257:249-56. **1995**

Hoffman AF, Lupica CR. Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. *J Neurophysiol* 85: 72-83. **2001.**

Hoffman AF, Oz M, Caulder T, Lupica CR. Functional tolerance and blockade of long-term depression at synapses in the nucleus accumbens after chronic cannabinoid exposure. *J Neurosci* 23: 4815-20. **2003.**

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54:161-202. **2002**

Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology.* 47:345-58. **2004**

Hyman SE, Malenka RC. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci.* 2(10):695-703. **2001**

Humphrey PP, Harting P, Hoyer D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 14(6):233-6. **1993**

Inoue T, Kusumi I, Yoshioka M. Serotonin transporters. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 1(5):519-29. **2002**

Jonnakuty C, Gragnoli C. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol.* 217(2):301-6. **2008**

Ji X, Martin GE. New rules governing synaptic plasticity in core nucleus accumbens in medium spiny neurons. *Eur J Neurosci* vol.36: 3615-3627. **2012**

Kahn L, Alonso G, Robbe D, Bockaert J, Manzoni OJ. Group 2 metabotropic glutamate receptors induced long term depression in mouse striatal slices. *Neurosci Lett.* 316(3):178-182. **2001**

Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nature.* 8:844-858. **2007**

Kaumann AJ, Hall JA, Murray KJ, Wells FC, Brown MJ. A comparison of the effects of adrenaline and noradrenaline on human heart: the role of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the stimulation of adenylate cyclase and contractile force. *Eur Heart.* 29-37. **1989**

Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ. A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol.* 100(4):879-85. **1990**

Kelley AE. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron*. 44,161-179. **2007**

Kombian SB, Malenka RC. Simultaneous LTP of non-NMDA and LTD of NMDA-receptor-mediated responses in the nucleus accumbens. *Nature* 368: 242-6. **1994**

Krasnova IN, Cadet JL. Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Res Rev*. 60:379-407. **2009**

Kreitzer AC, Malenka RC. Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long term depression in the striatum. *J Neurosci*. 25:10537-45. **2005**

Lee HK, Kameyama K, Huganir RL, Bear MF. NMDA induces long term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron*. 21:1151-1162. **1998**

Licata SC, Pierce RC. The roles of calcium/calmodulin-dependent and Ras/mitogen-activated protein kinases in the development of psychostimulant-induced behavioral sensitization. *J. Neurochem* 85: 14-22. **2003**

Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMK II function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*. 3:175-190. **2002**

Llano I, Leresche N, Marty A. Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron*. 6:565-74. **1991**

Lu KT, Gean PW. Masking of forskolin-induced long term potentiation by adenosine accumulation in area CA1 of the rat hippocampus. *Neuroscience*. **1999**

Lovinger DM, Tyler EC, Merritt A. Short and long term synaptic depression in rat neostriatum. *J Neurophysiol*. 70:1937-49. **1993**

Maejima T, Oka S, Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Aiba A, Wu D, Waku K, Sugiura T, Kano M. Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca²⁺-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C β 4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci* 25: 6826–6835. **2005**

Mailleux P, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ. Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. *Neurosci Lett*. 143:200–204. **1992**□

Malison RT, Price LH, Berman R, van Dyck CH, Pelton GH, Carpenter L, Sanacora G, Owens MJ, Nemeroff CB, Rajeevan N, Baldwin RM, Seibyl JP, Innis RB, Charney DS. Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by

[123I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry* 44: 1090–1098. **1998**

Mann JJ, McBride PA, Malone KM, DeMeo M, Keilp J. Blunted serotonergic responsivity in depressed inpatients. *Neuropsychopharmacology* 13: 53–64. **1995**

Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem* 80: 448-56. **2002**

Massey PV, Bashir ZI. Long term depression: multiple forms and implications for brain function. *J Neurosci.* 28:7548-54. **2007**

Mathur BN, Capik NA, Alvarez VA, Lovinger DM. Serotonin induces long-term depression at corticostriatal synapses. *J Neurosci* 31: 7402-11. **2011**

M^cKinney MK, Cravatt BF. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem.* 74:411-32. **2005**

M^cKrittick CR, Abercrombie ED. Catecholamine mapping within the nucleus accumbens: differences in basal and amphetamine-stimulated efflux of norepinephrine and dopamine in shell and core. *J Neurochem.* 100(5):1247-56. **2007**

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50:83-90. **1995**

Melis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, Lutz B, Marsicano G, Di Marzo V, Gessa GL, Pistis M. Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci* 24: 10707–10715. **2004**

Micale V, Cristino L, Tamburella A, Petrosino S, Leggio GM, Drago F, Di Marzo V. Altered responses of dopamine D3 receptor null mice to excitotoxic or anxiogenic stimuli: Possible involvement of the endocannabinoid and endovanilloid systems. *Neurobiol Dis* 36: 70-80. **2009**

Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther.* 31(3):187-99. **2008**

Monferini E, Gaetani P, Rodriguez y Baena R, Giraldo E, Parenti M, Zocchetti A, Rizzi CA. Pharmacological characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor coupled to adenylyl cyclase stimulation in human brain. *Life Sci.* 52(9):PL61-5. **1993**

Morgan SL, Teyler TJ. VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in CA1 hippocampus in vivo. *J Neurophysiol* 82: 736-40. **1999**

Morshita W, Marie H, Malenka RC. Distinct triggering and expression mechanisms underlie LTD of AMPA and NMDA synaptic responses. *Nature Neurosci.* 8,1043-1050. **2005**

Nestler EJ. Molecular basis of long term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2:119-128. **2001**

Nguyen PV, Woo NH. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol.* 71(6):401-37. **2003**

Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58: 389-462. **2006**

Pennartz CM, Ameerun RF, Groenwegen HJ, Lopes da Silva FH. Synaptic plasticity in an *in vitro* slice preparation of the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci.* 5:107-117. **1993**

□

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74: 129-80. **1997.**

Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res.* Feb 1;51(3):391- 402. **1998**

Pfeiffer BE, Huber KM. Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. *J Neurosci.* 26,1747-1750. **2006**

Pitler TA, Alger BE. Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci.* 12:4122-32. **1992**

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 4, 873-884. **2003**

Plassat JL, Boschert U, Amlaiky N, Hen R. The mouse 5-HT₅ receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5-HT_{1D} receptor family. *Embo.* 11(13):4779-86. **1992**

Pratt GD, Bowery NG, Kilpatrick GJ, Leslie RA, Barnes NM, Nylor RJ, Jones VJ, Nelson DR, Palacids JM, Slater P. Consensus meeting agrees distribution of 5-HT₃ receptors in mammalian hindbrain. *Trends Pharmacol Sci.* 11(4):135-7. **1990**

Prins NH, Briejer MR, Van Bergen PJ, Akkermans LM, Schuurkes JA. Evidence for 5-HT₇ receptors mediating relaxation of human colonic circular smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 128(4):849-52. **1999**

Puente N, Cui Y, Lassalle O, Lafourcade M, Georges F, Venance L, Grandes P, Manzoni OJ. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci* 6: 1542-7. **2011**

Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ. Localization and mechanisms of action of endocannabinoid receptors at

the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci* 21: 109-16. **2001**.

Robbe D, Alonso G, Chaumont S, Bockaert J, Manzoni OJ. Role of P/Q-Ca²⁺ channels in metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent presynaptic long term synaptic depression in the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 22(11):4346-4356. **2002a**

Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. Endogenous cannabinoids mediate long term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Pnas.* 99(12):8384-8388. **2002b**

Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron.* 37(4):577-582. **2003**

Safo PK, Regehr WG. Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron* 48: 647–659. **2005**

Savinainen JR, Jarvinen T, Laine K, Laitinen JT. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB(1) receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *Br J Pharmacol* 134: 664-672. **2001**

Schotanus SM, Chergui K. Dopamine D1 receptors and group I metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term

potentiation in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 54: 837-44, **2008**.

Selig DK, Hjelmstad GO, Herron C, Nicoll RA, Malenka RC. Independent mechanisms for long term depression of AMPA and NMDA responses. *Neuron*. 15,417-426. **1995**

Seoane A, Massey PV, Keen H, Bashir ZI, Brown MW. L-type voltage-dependent calcium channel antagonists impair perirhinal long-term recognition memory and plasticity processes. *J Neurosci* 29: 9534-44. **2009**

Shahsavand-Ananloo E, Berenji F, Sadeghniaat K, Alimadadi A, Zahiroddin AR, Tabatabaee M, Abbasi-Asl M, Ghaeli P. Comparing effects of citalopram with fluoxetine on sleep quality in patients with major depressive disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17: 1155-61. **2013**

Shih JC. Molecular basis of human MAO A and B. *Neuropsychopharmacology*. **1991**

Sjöström PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron* 39: 641-54. **2003**

Song I, Huganir RL. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 25:578-588. **2002**

Spiller R. Serotonin and GI disorders. *Neuropharmacology*. 55(6):1072-80. **2008**

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long term potentiation. *Nature*. 388:773-78. **1997**

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 215:89-97. **1995**

Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Miyashita T, Kondo S, Suhara Y, Takayama H, Waku K, Seki C, Baba N, Ishima Y. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem* 274: 2794-2801. **1999**

Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 45: 405–446. **2006**

Sung KW, Choi S, Lovinger DM. Activation of group I mGluRs is necessary for induction of long term depression at striatal synapses. *J Neurophysiol*. 86:2405-12. **2001**

Sweatt JD. Toward a molecular explanation for long term potentiation. *Learning and memory.* 6:399-416. **1999**

Szabo B, Urbanski MJ, Bisogno T, Di Marzo V, Mendiguren A, Baer WU, Freiman I. Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol* 577: 263–280. **2006**

Thomas MJ, Malenka RC, Bonci A. Modulation of long term depression by dopamine in the mesolimbic system. *J Neurosci.* 20:5581-5586. **2000**

Thomas MJ, Beurrier C, Bonci A, Malenka RC. Long term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat Neurosci.* 4:1217-23. **2001**

Thomas MJ, Malenka RC. Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358:815-819. **2003**

Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *British Journal of Pharmacology.* 154,327-342. **2008**

Tonini M, Vicini R, Cervio E, De Ponti F, De Giorgio R, Barbara G, Stanghellini V, Dellabianca A, Sternini C. 5-HT₇ receptors modulate peristalsis and accommodation in the guinea pig ileum. *Gastroenterology.* 129(5):1557-66. **2005**

Tzounopoulos T, Janz R, Südhof TC, Micoll RA, Malenka RC. A role for cAMP in long-term depression at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 21: 837-45. **1998**

Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A. Single cocaine exposure in vivo induces long term potentiation in dopamine neurons. *Nature*. 411(6837):583-7. **2001**

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science*. Oct 14;310(5746):329. **2005**

Vane JR. The relative activities of some triptamine analogues on the isolated rat stomach strip preparation. *Br J. Pharmacol Chemoter*. 14(1):87-98. **1959**

Walsh JP. Depression of excitatory synaptic input in rat striatal neurons. *Brain Res*. 608:123-28. **1993**

Wang Y, Yu YQ, Xu JG. Inhibition of intracellular calcium elevation and blunting of vasopressor response due to serotonin by ginkgolide B. *Planta Med*. 68(6):501-4. **2002**

Yakel JL, Jackson MB. 5-HT₃ receptors mediate rapid responses in cultured hippocampus and a clonal cell line. *Neuron*. 1(7):615-21. **1988**

Yu W, Calos M, Pilitsis J, Shin DS. Deconstructing the neural and ionic involvement of seizure-like events in the striatal network. *Neurobiol Dis* 52: 128-36. **2013**

Waeber C, Hoyer D, Palacios JM. 5-hydroxytryptamine₃ receptors in the human brain: autoradiographic visualization using [³H]ICS 205-930. *Neuroscience*. 31(2):393-400. **1989**

Weisskopf MG, Bauer EP, LeDoux JE. L-type voltage-gated calcium channels mediate NMDA-independent associative long-term potentiation at thalamic input synapses to the amygdala. *J Neurosci* 19: 10512-9. **1999**

Wilson CJ. The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Program Brain Research*. 99:277-97. **1993**

Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoid mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*. 410:588-92. **2001**