

# 13. Dipendenza da cannabinoidi: dalla morfologia alla funzione cerebrale

---

Spiga Saturnino <sup>1</sup>, Lintas Alessandra <sup>2</sup>, Migliore Michele <sup>3</sup>, Diana Marco <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia ed Ecologia Animale, Università di Cagliari

<sup>2</sup> Laboratorio di Neuroscienze Cognitive "G.Minardi", Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Sassari

<sup>3</sup> Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche

## Introduzione

I preparati della cannabis sono stati per lungo tempo considerati moderatamente dannosi e leggermente additivi probabilmente perché fino a poco tempo fa non esisteva alcuna chiara descrizione della sindrome astinenziale. Secondo studi clinici recenti invece, il consumo cronico quotidiano di derivati della cannabis anche in dosaggi lievi determinerebbero, all'interruzione dell'uso, chiari sintomi astinenziali (Haney et al. 1999, 2004; Budney & Hughes 2006), e tali osservazioni sono supportate da studi di neuroimmagine strutturali e funzionali inerenti l'uso di cannabis (Iversen 2003; Quickfall & Crockford 2006). Questa sindrome astinenziale è significativa dal punto di vista clinico (Cooper & Haney 2008), simile all'inizio e nel tempo a quella di altre sostanze d'abuso, e anche per la sindrome astinenziale da cannabis sono stati proposti i criteri diagnostici (Haney et al. 1999, 2004). Allo stesso modo, evidenti segni somatici dell'astinenza da cannabinoidi si possono ricavare da modelli sperimentali della dipendenza da cannabinoidi somministrando l'antagonista del recettore cannabinoide CB1, l' SR141716A (SR) (Rinaldi – Carmona et al. 1994; Aceto et al. 1996; Diana et al. 1998; Gonzalez et al. 20014) ad animali esposti a regime cronico di cannabinoidi, offrendo perciò la possibilità di indagare gli effetti neurobiologici delle sostanze additive in una condizione che mima il comportamento additivo umano (Pulvirenti & Diana 2001; Melis, Spiga & Diana 2005).

L'analisi morfologica dei neuroni e dei dendriti (Zito & Svoboda 2002; Zito et al. 2004) ha di recente evidenziato un'esplosione di studi relativi alle conseguenze della somministrazione a lungo termine delle sostanze (Sklair-Tavron et al. 1996; Robinson & Kolb 1997, 2004; Spiga et al. 2003, 2005) poiché si presume che queste misurazioni riflettano la plasticità delle sinapsi attive e quindi il rimodellamento sinaptico come conseguenza dell'esperienza e dell'esposizione alle sostanze (Robinson & Kolb 2004). La dipendenza in questo senso, come condizione caratterizzata dall'esposizione a lungo termi-



ne alle sostanze, può essere concettualizzata come un esempio di plasticità dipendente dall'esperienza, per mezzo della quale l'esperienza (cioè l'esposizione a lungo termine alle sostanze additive) potrebbe influire in modo permanente sul comportamento e sulle funzioni cognitive e psicologiche (Robinson & Kolb 2004; Melis et al. 2005).

L'astinenza da cannabis produce una notevole riduzione dell'attività elettrofisiologica dei neuroni contenenti dopamina (DA) proiettanti nel nucleo accumbens (NAcc) di ratto (Diana et al. 1998) ed una riduzione del flusso di dopamina nella "conchiglia" del nucleo accumbens (Tanda, Loddo & Di Chiara 1999). Questa evidenza funzionale indica che l'astinenza da cannabinoidi potrebbe modificare strutturalmente gli elementi cellulari del sistema mesolimbico, come è stato di recente dimostrato per la dipendenza da oppiacei (Spiga et al. 2003, 2005; Diana, Spiga & Acquas 2006). Di conseguenza, un trattamento cronico con tetraidrocannabinolo (THC) si è dimostrato in grado di aumentare la lunghezza dei dendriti così come il numero dei tronchi dendritici nella conchiglia del nucleo accumbens e nella corteccia mediale prefrontale ma non in altre aree cerebrali (Kolb et al. 2006). Tuttavia, poiché le valutazioni morfologiche sono state effettuate molto dopo l'interruzione della sostanza (30 giorni), è impossibile accertare da queste osservazioni la relazione tra cambiamenti strutturali e l'inizio dell'astinenza.

Perciò, nel presente studio vengono indagate le alterazioni morfologiche che interessano i neuroni dell'area ventrosegmentale del ratto (VTA), la parte compatta della sostanza nera (SNc) e le loro controparti postsinaptiche nelle sottoaree del Nucleo Accumbens. I neuroni TH-positivi e i neuroni medi spinosi (MSN) sottoposti ad impregnazione argentea secondo il metodo di Golgi-Cox sono stati valutati dopo trattamento cronico con cannabinoidi e astinenza al fine di ottenere ulteriori informazioni sulle caratteristiche morfologiche del sistema dopaminergico mesolimbico e del suo coinvolgimento nella dipendenza da cannabis, mentre il ruolo dei cannabinoidi endogeni è stato indagato attraverso la somministrazione dell'antagonista SR del recettore CB1. Al fine di esplorare ulteriormente la rilevanza funzionale dei cambiamenti morfologici dopo l'astinenza, è stato utilizzato un modello biofisico per valutare l'alterazione nell'attività dei MSN prodotta dalla dipendenza da cannabis.

## Materiali e metodi

### *Soggetti, sostanze e trattamento con cannabinoidi*

Sono stati utilizzati ratti maschi albini Sprague-Dawley ( $n = 48$ ; Charles River, Como, Italia), del peso di 200–225 g all'inizio del trattamento. I ratti sono stati tenuti 12 ore alla luce e 12 ore al buio con somministrazione "ad libitum" di cibo e acqua. I protocolli sperimentali sono stati approvati dal Comitato Etico (EC) dell'Università di Sassari e realizzati in stretto accordo con le normative CEE relative all'uso di animali sperimentali (CEE N°86/609), e le con le linee guida per il trattamento e l'uso di animali sperimentali raccomandate e approvate dalla Società di Neuroscienze.

Ai ratti veniva somministrato D9-THC (Sigma, Milano, Italia) o CP55 940 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) emulsionate con 1% di Tween 80 poi diluite in soluzione salina e somministrate i.p. in un volume di 3 ml/kg.

La somministrazione avveniva due volte al giorno (alle 8.00 e alle 20.00), una

alla luce e una al buio per 6,5 giorni.

Gli animali sono stati assegnati ai seguenti gruppi: salina cronica (1% Tween) (CTRL) (n = 6); CP cronica (0.4 mg/kg) (CP-Chr) (n = 6); D9-THC cronico (15 mg/kg) (THC-Chr) (n = 6); 24 ore di astinenza spontanea dal CP cronico (CP-Sw) (n = 6); 24 ore di astinenza spontanea da THC cronico (THC-Sw) (n = 6); SR (5 mg/kg) astinenza precipitata da CP cronico (0.4 mg/kg/somministrazione) (CP-SR) (n = 6); SR (5 mg/kg) precipitato astinenza da D9-THC (15 mg/kg/somministrazione) (THC-SR) (n = 6); e SR (5 mg/kg) in CTRL (SR) (n = 6) (Diana et al. 1998). Al mattino del 7° giorno, i ratti hanno ricevuto la prima somministrazione quotidiana (veicolo, CP o THC) e 1 ora prima di essere sacrificati sono stati testati per verificare segni di astinenza spontanea e di astinenza precipitata da SR (dati non riportati, vedi Diana et al. 1998).

### *Istologia*

Gli animali sono stati anestetizzati con uretano (1,3 g/kg i.p.) prima della perfusione transcardiaca con 100 ml di soluzione salina ghiacciata seguita immediatamente da 400 ml di paraformaldeide al 4% ghiacciata. Il cervello è stato suddiviso in due parti a -2 mm dal bregmata.

### *Immunomarcatura della tirosina idrossilasi nell'area ventrotegmentale (VTA) e nella parte compatta della sostanza nera (SNc)*

La parte posteriore del cervello (contenente l'area ventrotegmentale e la parte compatta della sostanza nera (Figura 1) è stata lasciata postfissare per 24 ore nella soluzione al 4% di paraformaldeide e crioprotetta nella soluzione di saccarosio al 30% in salina tamponata al fosfato (PBS). Sezioni coronali tra 5.80 mm e 6.30 mm del VTA-SN (25 mm spessore) dal bregmata secondo Paxinos & Watson (1998) (Figura 1) sono state ottenute per mezzo di un criostato (Micron Cryo-Star HM 560, Walldorf, Germania). Le sezioni per l'immunomarcatura della tirosina idrossilasi sono state lavate per 3 x 5 minuti in PBS, immerse per 30 minuti in siero normale di capra al 10% (NGS) in 0.1 M PBS addizionato con 0.5% Triton X-100 (PBS-TX) e incubate per due ore con un anticorpo di un topo monoclonale anti-tirosina idrossilasi (1:500; Chemicon, Temecula, CA, USA) in PBS-TX. Le sezioni sono state poi lavate (3 x 5 minuti) in PBS-TX e incubate con topocida biotinilato gG (1:300, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in PBS-TX e 1% NGS per 30 minuti, sciacquate (3 x 5 minuti) in PBS-TX e incubate con avidin-TRITC (1:200, Sigma- Aldrich) in PBS-TX e 1% NGS durante la notte a 4°C. Tutte le sezioni sono state poi lavate (3 x 20 minuti) in PBS-TX e ricoperte con soluzione di Glycergel mounting (Dako, Milano, Italia).

### *Impregnazione argentea del Nucleo accumbens secondo il metodo di Golgi-Cox*

Dopo la perfusione, la parte anteriore del cervello (contenente il nucleo accumbens) è stata immediatamente risciacquata (Figura 1) (15 minuti x 3 volte) in PBS 0.1 M e immersa in una soluzione Golgi-Cox (Glaser & Van der Loos 1981) composta dal 5% di bicromato di potassio, dal 5% di cloruro di mercurio e dal 5% di cromato di potassio (pH 6.5). La soluzione è stata cambiata

una volta dopo due giorni, e il cervello è stato lasciato in soluzione fresca Golgi-Cox per altri 14 giorni.

Dopo questo periodo, i cervelli sono stati crioprotetti con una soluzione di saccarosio al 30% per due-tre giorni. Sono state ottenute, con un criostato, fette coronali di 50  $\mu$ m di spessore, partendo a 1.70 mm dal bregmata e terminando a 0.70 mm, secondo Paxinos & Watson (1998).

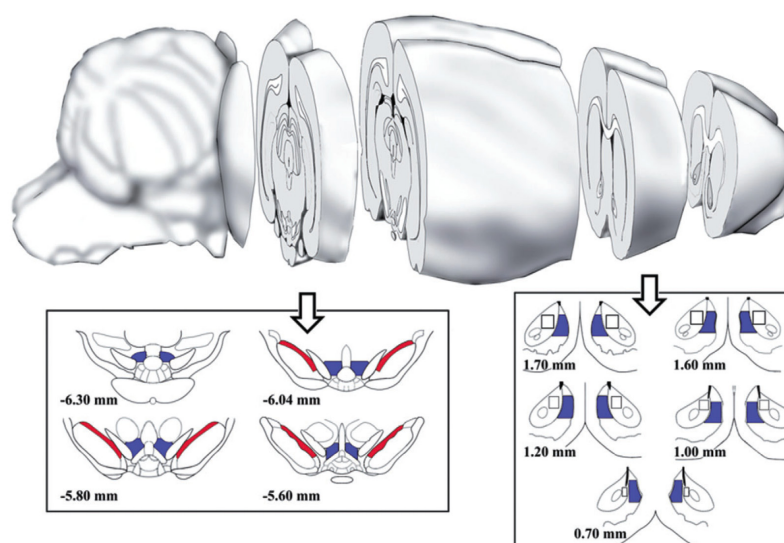
Le fette galleggianti sono state sciacquate in acqua distillata per un minuto e poste al buio in idrossido di ammonio (30%). Dopo il risciacquo (1 minuto), sono state collocate in soluzione Kodak Fix Film (Ilford, UK) al buio per 40 minuti, in seguito sono state risciacquate ancora (due minuti) e fissate per 10 minuti con carta fissante Kodak 1:7.

Dopo il risciacquo e la disidratazione con scala ascendente alcolica (da 50° a 100°), sono state collocate in xilene (tre minuti). Infine, sono state ricoperte con balsamo del Canada.

### *Elaborazione dell'immagine: tecniche di resa della superficie*

E' stato utilizzato un microscopio confocale a scansione laser Leica 4-D (Leica Microsystems, Heidelberg, Germania) con laser argon-krypton utilizzato per analizzare i neuroni TH-positivi e le sezioni impregnate d'argento secondo il metodo Golgi-Cox. Sono state generate immagini confocali utilizzando 40x in olio ( $n_a = 1.00-0.5$ ) e 100x in olio ( $n_a = 1.3$ ). Ciascuna immagine è stata acquisita otto volte e poi fatta una media per ottenere immagini senza rumore. Sezioni ottiche, in genere ad intervalli consecutivi di 0.5  $\mu$ m in asse z, sono state raffigurate attraverso la profondità dei neuroni marcati e salvate come immagini come descritto precedentemente (Tredici et al. 1993; Spiga et al. 2003, 2005). E' stato utilizzato un algoritmo della massima intensità (ImageJ) per ricostruzioni tridimensionali delle cellule immunomarcate alla tirosina idrossilasi, mentre un algoritmo dal focus esteso è stato utilizzato per ricostruzioni 3-D dei neuroni impregnati d'argento secondo il metodo Golgi-Cox (Bitplane Imaris V.5.7.2).

**Figura 1** - Illustrazione schematica, modificata da Paxinos & Watson (1998), del posizionamento dei neuroni campionati. VTA-SNc (riquadro sinistro) e shell/core del Nucleo accumbens (riquadro destro). E' indicata la distanza dal bregmata.



### *Determinazioni morfometriche*

#### *Morfometria del corpo cellulare*

Le analisi morfometriche sono state effettuate da due osservatori indipendenti che non conoscevano i trattamenti farmacologici in corso. Sono stati raccolti i soma immunomarcati alla tirosina idrossilasi ( $n = 80/\text{gruppo}$ ) di un'area quadrata (circa 200 mm<sup>2</sup>/parte). Quando incluse totalmente nelle sezioni, i neuroni TH-positivi sono stati ricostruiti in 3-D e utilizzati per misurazioni e analisi statistiche utilizzando un software Bioscan Optimas (v 6.5.1; Media Cybernetics Inc., MD, USA). I corpi cellulari sono stati marcati manualmente seguendo il loro profilo escludendo tutti i tronchi dendritici, per misurare la loro area ( $\mu\text{m}^2$ ), il perimetro, la lunghezza principale (MJ) e la lunghezza dell'asse minore (min).

#### *Conteggio delle spine dendritiche*

Per ciascun gruppo ( $n = 80$ ), i segmenti dendritici (lunghi almeno 20  $\mu\text{m}$ ) dei dendriti di secondo ordine sono stati raccolti per l'analisi da 0.7–1.70  $\mu\text{m}$  dal bregmata e identificati attraverso cellule confocali. La densità delle spine dendritiche è stata calcolata tracciando una linea di 10–15  $\mu\text{m}$  di lunghezza lungo il tronco dendritico e contando il numero di spine lì presente. La procedura è stata ripetuta per tutta la lunghezza dendritica dalla biforcazione dal primo ramo dei dendriti principali alla biforcazione successiva. L'analisi statistica è stata effettuata attraverso un'analisi di varianza unidirezionale (ANOVA) seguita dal test Student  $t$ , per confronto post hoc.

### *Modellazione computazionale*

Per la modellazione computazionale sono stati ricostruiti i neuroni mediali spinosi (MSNs) utilizzando una versione modificata del Neuron Morpho plugin per l'immagine J v1.1.6 e Neuromantic v1.6.3.

Tutte le simulazioni sono state effettuate con il programma NEURON (v7, 61; Yale University, CT, USA). Per tutte è stata utilizzata una ricostruzione in 3D di un neurone medio spinoso composto da 519 segmenti, comprensivi esplicitamente di 216 spine dendritiche (31% della membrana dendritica). Utilizzando i valori medi sperimentali per la costante di tempo della membrana [7 ms, ottenuti dai neuroni della conchiglia del nucleo accumbens a temperatura fisiologica (O'Donnell & Grace 1993) e un valore standard per la capacità della membrana (1 mF/cm<sup>2</sup>], il modello neuronale ha portato ad una resistenza all'input di 160 M $\Omega$ . Per modellare le proprietà attive di base sono stati utilizzati modelli di canali scaricati dal registro pubblico - Modello DB (<http://senselab.med.yale.edu/ModelDB/>), realizzato per riprodurre le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni spinali mediali del nucleo accumbens (Wolf et al. 2005). Su tutte le sinapsi è stato effettuato l'input eccitatorio sinaptico (amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate [AMPA]) utilizzando un meccanismo doppio esponenziale di cambiamento della conduttività con aumento e di diminuzione delle costanti di tempo rispettivamente di 0.5 and 3 ms. Lo stesso picco di conduttanza sinaptica (0.15 nS) è stato utilizzato per tutte le sinapsi e sono stati testati diversi valori (0.2–0.6 nS) ottenendo gli stessi risultati qualitativi (dati non riportati). Gli stati up and



down osservati in questi neuroni in vivo (Gruber & O'Donnell 2009) sono stati realizzati attivando le sinapsi in modo asincrono e casuale (Poissonian) ad una frequenza media di 3 Hz per il down (nel range dei ritmo di  $\theta$ ) o a 40 Hz (nel range  $\gamma$ ). Lo stato up è stato attivato a 0.8 Hz con una durata di 400 ms (Gruber & O'Donnell 2009). I livelli medi di emissione in diverse condizioni sono stati calcolati dagli ultimi 20 secondi di stimolazione della durata di 22 secondi. Viene mostrato come materiale supplementare una pellicola dei primi quattro secondi dalle stimolazioni sotto controllo dopo l'astinenza (vedi film S1 nelle informazioni supplementari). Sono disponibili per la consultazione pubblica il modello completo e i file di simulazione nel database del Modello DB.

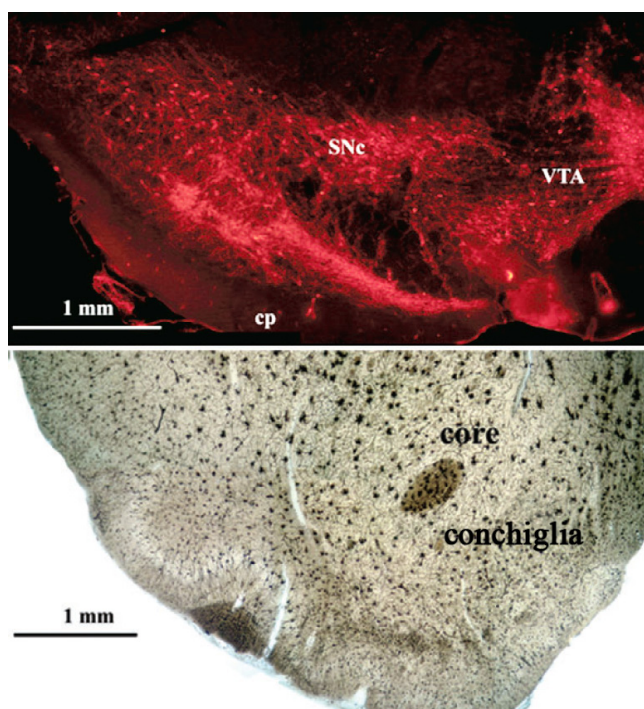
## Risultati

### *Dimensione delle cellule del VTA e del SNc*

Al fine di valutare gli effetti del trattamento sono stati analizzati morfometricamente dati confocali dei neuroni immunomarcati alla TH presenti nel VTA e nella parte dorsomediale della SNc (Figure 1 e 2) (Gonzalez-Hernandez & Rodriguez 2000). Secondo precedenti pubblicazioni questi neuroni mostravano notevole variabilità nella forma e nelle dimensioni (ovoidale, poligonale o fusiforme) (Grace & Bunney 1983; Oades & Halliday 1987; Tepper, Sawyer & Groves 1987; Spiga et al. 2003) in entrambe le aree (Tabella 1, Figura 3). ANOVA ha evidenziato differenze anatomiche tra i gruppi sperimentali nel VTA dell'area media calcolata ( $F_{639} = 82.83$ ;  $P < 0.0001$ ) del perimetro ( $F_{639} = 71.35$ ;  $P < 0.0001$ ), MJ ( $F_{639} = 37.71$ ;  $P < 0.0001$ ) e della lunghezza minima ( $F_{639} = 32.76$ ;  $P < 0.0001$ ). L'analisi post hoc ha rivelato che i corpi cellulari nel VTA mostravano soma più piccoli dopo entrambe le condizioni di astinenza. In particolare, una riduzione media, rispetto al gruppo di controllo CTRL, è stata riscontrata per area [(t158 = 15.2;  $P < 0.0001$ ); (t158 = 10.9;  $P < 0.0001$ )], perimetro [(t158 = 14.3;  $P < 0.0001$ ); (t158 = 11.6;  $P < 0.0001$ )], MJ [(t158 = 11.6;  $P < 0.0001$ ); (t158 = 7.6;  $P < 0.0001$ )] e la lunghezza minima [(t158 = 8.43;  $P < 0.0001$ ); (t158 = 6.88;  $P < 0.0001$ )] del CP-Sw e del THC-Sw, rispettivamente. Inoltre, simili risultati sono stati riscontrati per astinenza precipitata su ratti trattati con l'antagonista SR del CB1 dopo CP cronico [area (t158 = 12.3;  $P < 0.0001$ ), perimetro (t158 = 12.8;  $P < 0.0001$ ), MJ (CP-SR t158 = 9.45;  $P < 0.0001$ ), min (CP-SR t158 = 7.06;  $P < 0.0001$ ) e THC [area (t158 = 13.5;  $P < 0.0001$ ), perimetro (t158 = 12.8;  $P < 0.0001$ ), MJ (t158 = 11.1;  $P < 0.0001$ ), min (t158 = 7.22;  $P < 0.0001$ )]. Nello specifico, CP-SR e THC-SR hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa dei parametri morfometrici rispetto al gruppo di controllo CTRL. Inaspettatamente, sono stati rinvenuti anche cambiamenti nel gruppo SR simili qualitativamente alle altre condizioni di astinenza [area (t158 = 12.1;  $P < 0.0001$ ), perimetro (t158 = 13.2;  $P < 0.0001$ ), MJ (t158 = 10.4;  $P < 0.0001$ ), min (t158 = 6.9;  $P < 0.0001$ )]. Al contrario, nessun cambiamento significativo è stato osservato nei gruppi CP-Chr [area (t158 = 0.82;  $P = 0.41$ ), perimetro (t158 = 0.39;  $P = 0.69$ ), MJ (t158 = 0.29;  $P = 0.77$ ), min (t158 = 0.39;  $P = 0.7$ )] and nel THC-Chr [area (t158 = 0.70;  $P = 0.48$ ), perimetro (t158 = 1.83;  $P = 0.068$ ), MJ (t158 = 1.92;  $P = 0.055$ ), min (t158 = 0.77;  $P = 0.44$ )]. Nessuna differenza statistica è stata rinvenuta nei neuroni positivi alla TH dalla SNc [area ( $F_{639} = 0.58$ ;  $P = 0.77$ ), perimetro ( $F_{639} = 1.17$ ;  $P = 0.31$ ), MJ ( $F_{639} = 1.68$ ;  $P = 0.11$ ), Min ( $F_{639} =$

1.41;  $P = 0.19$ )] (Figura 4, Tabella 1).

**Figura 2** - Le Sezioni istologiche raffigurano le aree campionate. I neuroni positivi alla TH nella sezione coronale del mesencefalo dei ratti (parte superiore) e nei MSN sotto posti a metodo Golgi nel NAcc (parte inferiore). Le abbreviazioni indicano: cp, peduncolo cerebrale, parte basale; VTA, area ventrale tegmentale; SNc, sostanza nera, parte compatta.



**Tabella 1** - Effetto dei trattamenti e risultati ANOVA ad una via, sui cambiamenti morfometrici dei neuroni dopaminergici (a) e della densità spinale (b) dei neuroni spinosi mediali accumbali.

(a) Morfometria dei neuroni mesencefalici TH-positivi				
	Area (µm <sup>2</sup> ) (%)	Perimetro (%)	MJ lunghezza (%)	Lunghezza minima (%)
<b>SNC</b>				
CTRL	156.4 ± 3.4 (100.0)	53.2 ± 0.7 (100.0)	20.7 ± 0.3 (100.0)	11.5 ± 0.2 (100.0)
CP-Chr	158.2 ± 2.3 (101.2)	52.8 ± 0.5 (99.2)	21.2 ± 0.3 (102.8)	11.1 ± 0.2 (97.0)
THC-Chr	157.7 ± 4.5 (100.8)	52.2 ± 0.8 (98.0)	21.3 ± 0.4 (103.3)	11.3 ± 0.2 (98.8)
CP-Sw	156.6 ± 3.1 (100.1)	53.3 ± 0.7 (100.1)	20.9 ± 0.4 (101.1)	11.1 ± 0.2 (96.7)
THC-Sw	156.3 ± 3.9 (99.9)	51.1 ± 0.7 (96.0)	20.1 ± 0.3 (97.2)	11.5 ± 0.2 (100.4)
CP-SR	157.1 ± 2.9 (100.4)	52.9 ± 0.6 (99.4)	21.3 ± 0.3 (102.9)	10.9 ± 0.2 (95.2)
THC-SR	158.4 ± 2.8 (101.3)	52.4 ± 0.6 (98.5)	20.1 ± 0.3 (97.3)	11.6 ± 0.2 (100.6)
SR	150.6 ± 2.7 (96.3)	52.0 ± 0.7 (97.7)	20.7 ± 0.4 (100.2)	11.0 ± 0.3 (96.2)
<b>VTA</b>				
CTRL	181.5 ± 3.6 (100)	56.2 ± 0.7 (100)	21.9 ± 0.4 (100)	12.4 ± 0.3 (100)
CP-Chr	177.4 ± 3.5 (97.7)	56.5 ± 1.0 (100.7)	21.2 ± 0.6 (96.8)	12.5 ± 0.2 (101.0)
THC-Chr	177.2 ± 4.2 (97.6)	54.4 ± 0.7 (96.8)	20.4 ± 0.3 (93.2)	12.6 ± 0.3 (102.2)
CP-Sw	116.3 ± 2.4 (64.1)	44.5 ± 0.6 (79.2)	17.2 ± 0.4 (78.2)	10.0 ± 0.2 (80.6)
THC-Sw	130.7 ± 3.0 (72.0)	46.6 ± 0.8 (83.0)	18.7 ± 0.3 (85.4)	10.3 ± 0.2 (83.5)
CP-SR	124.1 ± 2.3 (68.4)	45.4 ± 0.5 (80.9)	17.5 ± 0.5 (79.7)	10.2 ± 0.3 (82.4)
THC-SR	124.7 ± 2.9 (68.7)	45.4 ± 0.6 (80.9)	17.7 ± 0.2 (80.6)	10.1 ± 0.3 (82.1)
SR	128.4 ± 2.5 (70.7)	46.1 ± 0.9 (82.1)	17.7 ± 0.4 (80.7)	10.4 ± 0.2 (84.2)
(b) Densità delle spine dei neuroni medi spinosi accumbali (spine/10 mm)				
	Conchiglia (%)		Core (%)	
CTRL	8.065 ± 0.096 (100)		10.741 ± 0.138 (100)	
CP-Chr	8.431 ± 0.164 (106.54)		10.565 ± 0.143 (98.36)	
THC-Chr	7.885 ± 0.151 (97.76)		10.590 ± 0.156 (98.59)	
CP-Sw	5.383 ± 0.132 (66.75)		10.433 ± 0.162 (97.13)	
THC-Sw	5.121 ± 0.186 (63.49)		10.443 ± 0.148 (97.22)	
CP-SR	4.611 ± 0.144 (57.17)		10.706 ± 0.216 (99.67)	
THC-SR	6.113 ± 0.121 (75.79)		10.617 ± 0.173 (98.85)	
SR	8.98 ± 0.149 (73.12)		10.427 ± 0.131 (97.08)	

I dati sono espressi come valore medio ± l'errore standard.

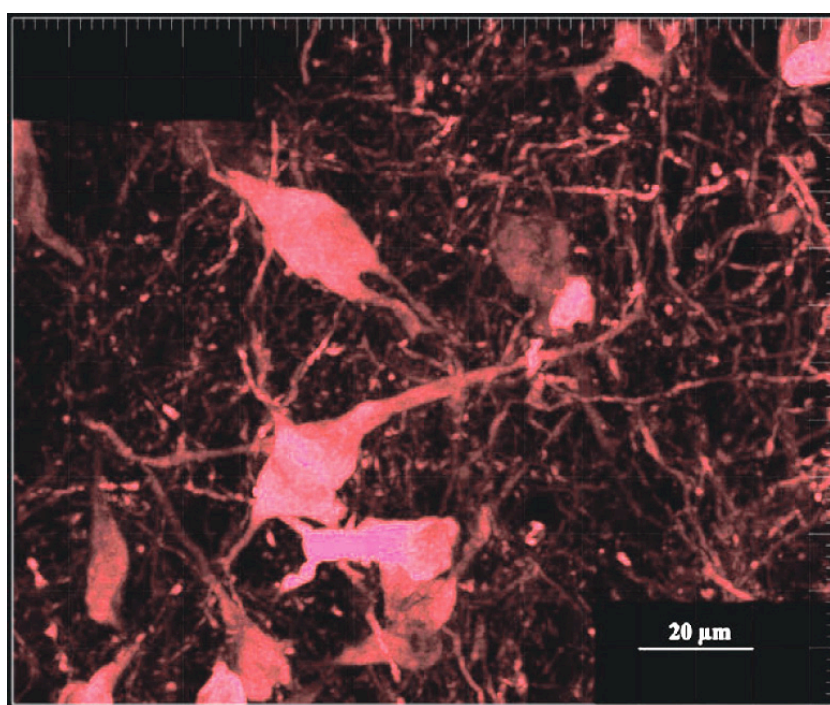
### Densità delle spine dei MSN nel NAcc

La figura 5 mostra gli effetti di tutti i trattamenti sulla densità delle spine dendritiche dei MSN accumbali (guscio e cuore) rispetto al gruppo di controllo CTRL. La densità delle spine del gruppo di controllo CTRL era notevolmente diversa tra conchiglia e core (Figura 6). Un ANOVA unidirezionale ha rivelato un effetto significativo sulla conchiglia ( $F_{639} = 107.2$ ;  $P < 0.0001$ ) ma non nel core ( $F_{639} = 0.58$ ;  $P = 0.77$ ) sulla densità spinale nei gruppi sperimentali.



L'analisi post hoc ha mostrato una riduzione selettiva sulla densità spinale per l'astinenza spontanea [CP-Sw ( $t_{158} = 16.4$   $P < 0.0001$ ), THC-Sw ( $t_{158} = 14.4$   $P < 0.0001$ )] e precipitata farmacologicamente [CP-SR ( $t_{158} = 19.9$   $P < 0.0001$ ), THC-SR ( $t_{158} = 12.6$   $P < 0.0001$ )] così come gruppi SR ( $t_{158} = 12.2$ ;  $P < 0.0001$ ) rispetto al gruppo di controllo CTRL. Queste riduzioni sono risultate essere circa il 33% per CP-Sw, il 36% per THC-Sw, il 42% forCP-SR, il 24% per THC-SR e il 26% per SR. Inoltre, l'analisi post hoc non ha rivelato alcuna differenza significativa tra la densità spinale nei MSN della conchiglia per i gruppi P-Chr ( $t_{158} = 1.2$ ;  $P = 0.056$ ) e THC-Chr ( $t_{158} = 1$ ;  $P = 0.32$ ) rispetto al gruppo di controllo CTRL.

**Figura 3** - Figura rappresentativa confocale dei neuroni positivi alla TH nel VTA, ottenuti da una proiezione di 53 scansioni per un totale di 26.5  $\mu\text{m}$  nell'asse z.



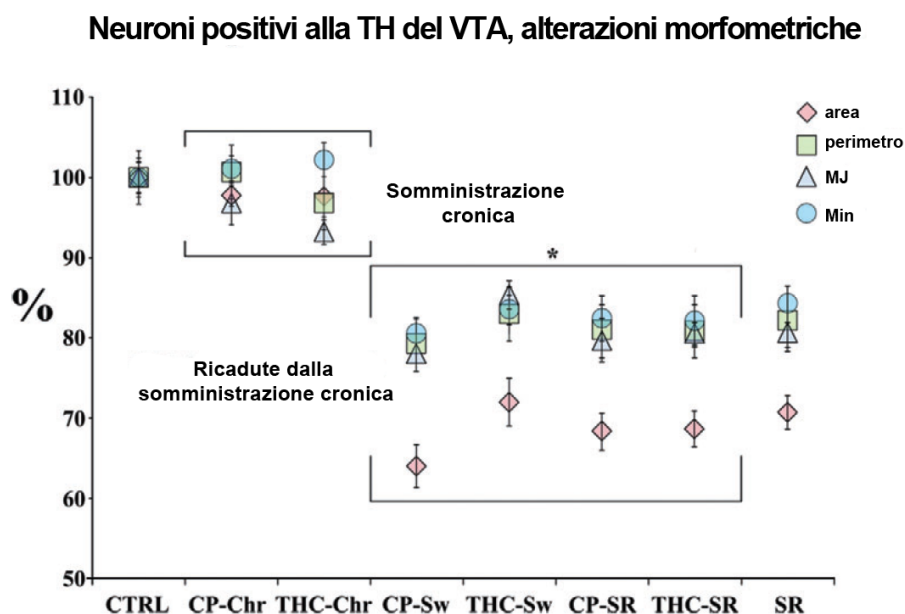
### *Modelling computazionale*

Sono state indagate le possibili conseguenze funzionali dei cambiamenti morfologici utilizzando un modello computazionale realistico dei neuroni della conchiglia del NAcc per studiare in che modo il livello medio di trasmissione del segnale potrebbe esser modificato dopo l'astinenza dalla sostanza. Per modellare gli effetti dell'astinenza dalla sostanza, sono stati confrontati i risultati della simulazione in una condizione di controllo supponendo che tutte le sinapsi fossero attive, con i risultati dalle due simulazioni in cui il 30% dei compartimenti sinaptici scelti a random sono stati cancellati dalla morfologia. Inoltre, per modellare i ben noti cambiamenti nell'input dopaminergico D2, e in particolare il suo effetto inibitorio sulle correnti AMPA (fino al 15% di riduzione del picco corrente, Hernández-Echeagaray et al. 2004), sono stati testati i possibili effetti di diverse quantità di riduzione dell'input dopaminergico, aumentando i picchi di conduttanza sinaptica fino al 115% del valore

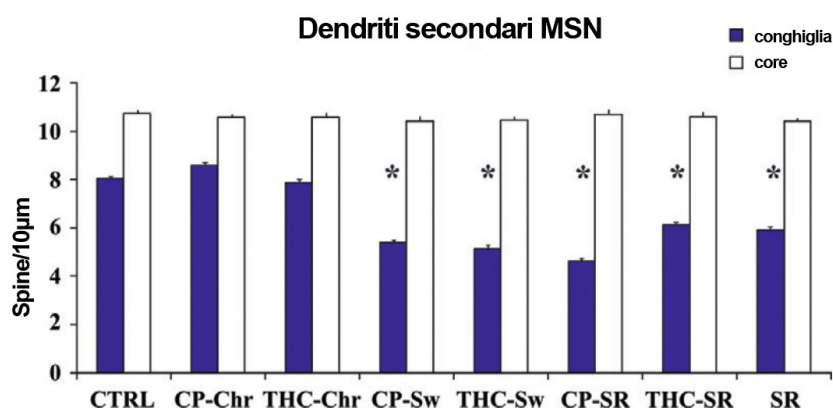
di controllo.

Nella Figura 7b vengono mostrate tracce tipiche, e nella Figura 7c sono sintetizzati i risultati del modelling. Una riduzione del 30% nelle sinapsi attive ha causato una diminuzione ~45% nel livello medio di trasmissione (figura 7c, input DA 100%). Il modello comunque suggerisce che questa riduzione potrebbe essere progressivamente bilanciata da una riduzione nell'input della DA poiché questo ridurrebbe l'effetto inibitorio dell'attivazione dei recettori D2 sui canali AMPA (Hernández-Echeagaray et al. 2004). La riduzione dell'input dopaminergico dopo l'astinenza potrebbe essere considerato come una specie di segnalazione omeostatica (illustrato in Davis 2006) per mantenere il ruolo funzionale di questi neuroni in condizioni patologiche.

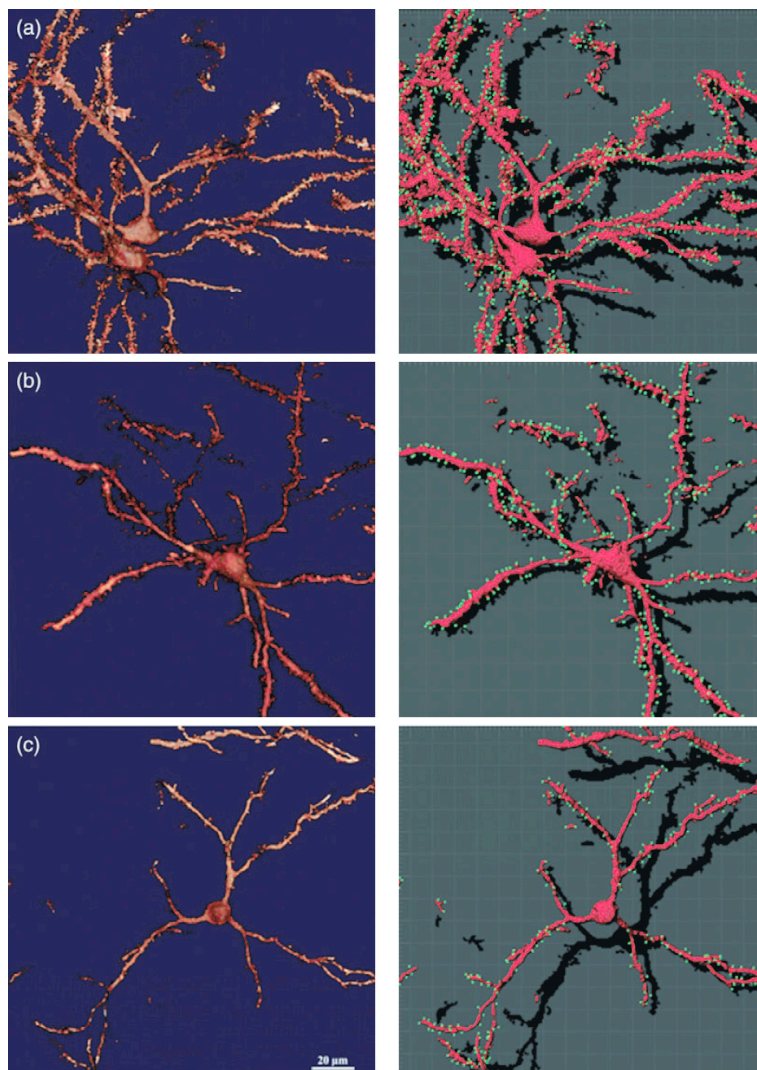
**Figura 4** - Misure morfometriche dei neuroni positivi alla TH del VTA. I dati sono presentati come % di controllo  $\pm$ SEM. \* indica  $P < 0.05$  rispetto al gruppo di controllo CTRL.



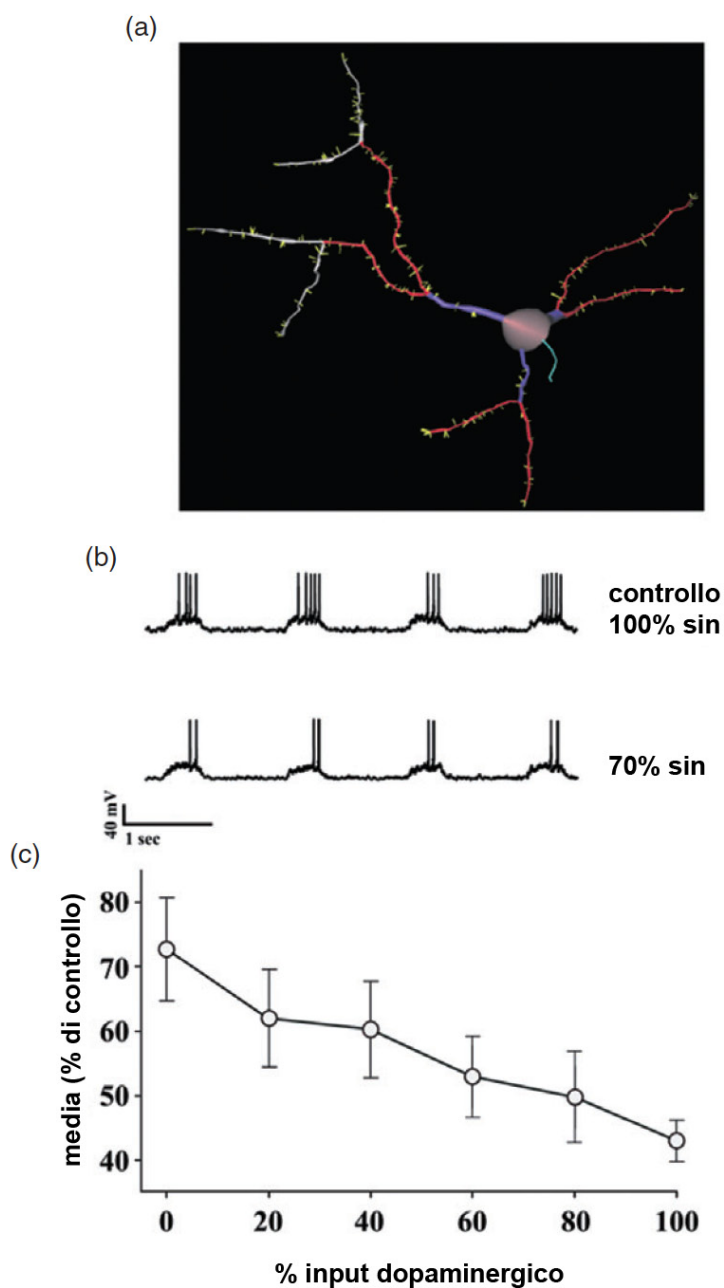
**Figura 5** - Gli istogrammi rappresentano la media  $\pm$ SEM della densità delle spine dendritiche (numero di spine/10  $\mu$ m dei dendriti di secondo ordine) dei MSN della conchiglia e del core del NAcc. \* indica  $P < 0.05$  rispetto al gruppo di controllo CTRL (analisi t-test post hoc).



**Figura 6** - Ricostruzioni confocali rappresentative che sintetizzano i principali risultati nel NAcc. (a) MSN sottoposti al metodo Golgi-Cox dal cuore del gruppo di controllo, (b) MSN dalla shell del gruppo di controllo e (c) MSN dalla conchiglia del gruppo THC-Sw, utilizzando un algoritmo esteso (parte sinistra) con Voxblast v3 (SGI Iris). I riquadri a destra mostrano gli stessi neuroni ricostruiti sulla sinistra, utilizzando 'Surpass' e 'Filament Tracer' con software Bitplane Imaris v 5.7.2 software. 'Filament Tracer' viene utilizzato per il rilevamento automatico di filamenti in oggetti in 3-D (microscopio confocale), e si basa sulla soglia interattiva e sulle proprietà anatomiche e geometriche (lunghezza e radio) dei filamenti come rami dendritici. Dal database che ne è emerso è possibile estrarre varie informazioni tra cui il numero dei "punti terminali". Questa caratteristica può offrire una rappresentazione delle spine dendritiche (punti verdi) dei neuroni scansionati.



**Figura 7** - Risultati della simulazione. (a) La ricostruzione in 3-D di un neurone medio spinoso della conchiglia del NAcc utilizzata in tutte le simulazioni; (b) tracce somatiche tipiche in 5 secondi durante le simulazioni in condizioni di controllo (in alto), e dopo una riduzione del 30% delle sinapsi attive (in basso); (c) numero medio di APs (rispetto al gruppo di controllo) in funzione dell'input dopaminergico.



## Discussione

I risultati del presente studio mostrano che l'astinenza dalla somministrazione di un regime cronico di cannabinoidi agisce in modo profondo sulle caratteristiche morfologiche dei neuroni positivi alla TH della densità dei neuroni del VTA e delle spine dendritiche della conchiglia del nucleo accumbens. Al contrario, i neuroni positivi alla TH della SNc e la densità delle spine del core non hanno subito alcuna influenza.

In particolare, l'astinenza da somministrazione cronica del CP, agonista sintetico del CB1 ha determinato il restringimento dell'area somatica dei neuroni del VTA TH-positivi come valutato dalla diminuzione dell'area, del perimetro  $mj$  e  $min$ . Questi cambiamenti sono stati messi in parallelo con una riduzione della densità delle spine dendritiche nella conchiglia del nucleo accumbens. Perciò, l'astinenza spontanea sembra responsabile dei cambiamenti morfologici rilevati nella VTA e nella conchiglia del nucleo accumbens. La specificità di questi effetti può essere attribuita ragionevolmente alla sospensione improvvisa dell'uso cronico di cannabinoidi poiché quando l'uso cronico è stato interrotto farmacologicamente, attraverso la somministrazione dell'antagonista SR del recettore CB1, tali valori morfologici sono stati influenzati in modo simile. Supportando ulteriormente questa affermazione, l'astinenza da THC spontanea e affrettata ha prodotto risultati simili sia nella VTA che nella conchiglia del nucleo accumbens. Al contrario, la somministrazione cronica di entrambi i composti non influisce sulla morfologia dei neuroni del VTA e sulla densità spinale nel nucleo accumbens, indicando perciò un ruolo cruciale dell'astinenza da cannabinoidi nel restringimento dei neuroni mesencefalici e nella perdita delle spine nella conchiglia del nucleo accumbens. La perdita spinale descritta nel presente studio è in linea, e ne rappresenta un approfondimento, con studi precedenti (Kolb et al. 2006) che riferiscono un allungamento dei dendriti così come dei rami dendritici nella conchiglia del nucleo accumbens e nella corteccia mediale frontale ma non in altre aree cerebrali. Questo rafforza ulteriormente l'idea che l'astinenza da uso cronico di cannabinoidi provoca modifiche potenti e durature (Kolb et al. 2006) nelle strutture cerebrali principali influenzate da composti che provocano dipendenza. In particolare, la perdita di spine qui osservata, oltre a contribuire a ridurre la trasmissione dopaminergica già ridotta, potrebbe aiutare a spiegare la diminuzione dei recettori CB1 dopo l'astinenza da THC (Breivogel et al. 2003) così come l'inibizione mediata dal CB1 della trasmissione sinaptica eccitatoria delle sinapsi tra la corteccia prefrontale e il nucleo accumbens (Mato et al. 2005).

La somministrazione di SR, antagonista del CB1, nei ratti trattati con soluzione salina ha prodotto effetti qualitativamente simili a quelli osservati nei soggetti trattati con cannabinoidi esogeni CP e THC in entrambe le aree esaminate (ossia la VTA e la conchiglia del nucleo accumbens). Questo risultato inaspettato sembrerebbe indicare che i cannabinoidi endogeni sono coinvolti nel controllo trofico degli elementi chiave del sistema mesolimbico quali i neuroni del VTA e il loro sito postsinaptico fisiologico. Anche se sono necessari ulteriori studi per rafforzare questa ipotesi, il presente studio supporta l'idea di un ruolo trofico e protettivo dell'endocannabinoide (Galve-Roperh et al. 2006, 2007) a livello del sistema dopaminergico (Melis et al. 2006). Gli endocannabinoidi modulano la plasticità sinaptica nella VTA (Meli set al. 2004), nella SN reticolata (Szabo et al. 2000) e nello striato (Gerderman & Lovinger 2001). In alternativa, dovrebbe essere considerata la possibilità che SR possa agire come agonista inverso (Rubino et al. 2000; Bass et al. 2002) nel



qual caso saranno necessari ulteriori esperimenti per chiarire questo aspetto. Indipendentemente dai meccanismi alla base dei cambiamenti indotti da SR, le osservazioni strutturali qui riportate è probabile che abbiano profonde conseguenze sulla trasmissione dopaminergica nella conchiglia del nucleo accumbens, sia a livello pre che post sinaptico. Effettivamente, la ridotta trasmissione della dopamina (Diana et al. 1998) è accompagnata da un restringimento della regione somatica, rendendo perciò la cellula più eccitabile in linea con il “principio della misura” (Shepherd 1994; Spiga et al. 2003). Sul lato postsinaptico, il ridotto numero di spine dendritiche ridurrebbe la superficie totale della membrana (Gray 1959; Rall 1962), diminuendo perciò la resistenza della stessa (Wilson 1984) che porterebbe alla fine ad una alterazione dell’eccitabilità. Questa possibilità è in linea con le predizioni teoriche classiche (Chang 1952) e i successivi test sperimentali di conferma (Wilson 1984), che hanno attribuito alla spina dendritica un effetto attenuante sui potenziali sinaptici. E, cosa assai importante, recenti studi (Hoffman et al. 2003) che utilizzano un regime cronico di THC molto simile a quello qui adottato, hanno riferito che un’esposizione a lungo termine e una successiva astinenza (le registrazioni sono state effettuate 24 ore dopo l’ultimo trattamento) del principio attivo della marijuana, blocca la plasticità sinaptica nel nucleo accumbens e riduce la sensibilità delle sinapsi gabaergiche e glutamatergiche. Quale potrebbe essere la conseguenza funzionale derivante dalla perdita di circa il 30% delle sinapsi? Ci sono due meccanismi direttamente correlati alla riduzione del numero di sinapsi che possono influenzare la percentuale complessiva di trasmissione neuronale. Da una parte, la perdita della membrana neuronale associata alla perdita delle sinapsi (~9% delle membrane totali nel nostro modello morfologico) aumenta la resistenza dell’input del neurone, e in principio, ciò determina un neurone più eccitabile; dall’altro lato, il neurone potrebbe diminuire il suo livello di emissione poiché viene ridotto l’input eccitatorio complessivo. Il risultato del modello indica che una riduzione dell’input eccitatorio con l’astinenza potrebbe essere il meccanismo dominante, almeno nelle condizioni sperimentate in questo studio. Tuttavia, il modello indica anche un possibile meccanismo compensatorio: a causa del ridotto input dopaminergico su questi neuroni in seguito all’astinenza, anche l’effetto inibitorio dell’attivazione del recettore D2 sui canali AMPA verrà ridotto, amplificando l’effetto delle sinapsi rimanenti (Figura 7).

Complessivamente, i dati presenti suggeriscono che l’alterazione della struttura del sistema dopaminergico che si estendono alla conchiglia del nucleo accumbens qui documentati altererebbero profondamente l’equilibrio sinaptico che influisce sui vari neurotrasmettitori coinvolti nei meccanismi neurobiologici della dipendenza da cannabis (Pulvirenti & Diana 2001; Melis et al. 2005).

Sulla base del presente e dei precedenti risultati (Spiga et al. 2003, 2005; Diana 1996; Diana et al. 1995, 1999, 2006) si suggerisce che il restringimento dei neuroni dopaminergici e la riduzione delle densità delle spine dendritiche nei loro elementi postsinaptici (cioè MSN) durante l’astinenza dall’uso cronico di cannabinoidi, potrebbe rappresentare un correlato morfologico dei deficit funzionali rilevati attraverso mezzi elettrofisiologici (Diana et al. 1998) e neurochimici (Tanda et al. 1999) che potrebbe in ultima analisi contribuire alle proprietà motivazionali negative dell’astinenza da sostanze d’abuso (Koob & Le Moal 2001; Di Chiara 2002; Meis et al. 2005).

In generale, i dati presentati supportano l’idea che la dipendenza da sostanze può essere vista come una aberrante forma di plasticità neurale indotta da sostanze (Nesler & Aghajanian 1997; Nestler 2001; Pulvirenti & Diana 2001;

Robinson & Kolb 2004; Melis et al. 2005), di cui i neuroni dopaminergici che hanno origine nella VTA rappresentano il substrato cellulare principale a livello molecolare (Nestler 2001), cellulare (White 1996; Pulvirenti & Diana 2001; Diana & Tepper 2002) e comportamentale (Koob & Le Moal 1997, 2001; Berridge & Robinson 1998; Di Chiara 1999; Robinson & Berridge 2001) e sono coerenti con recenti ipotesi (Melis et al. 2005) che sostengono uno stato ipodopaminergico come caratteristica distintiva del “cervello dipendente” da sostanze.

## Bibliografia

- Aceto MD, Scates S, Lowe JA, Martin BR (1996) Dependence on D9-Tetrahydrocannabinol: studies on precipitated and abrupt withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* 278:1290–1295.
- Bass CE, Griffin G, Grier M, Mahadevan A, Razdan RK, Martin BR (2002) SR-141716A-induced stimulation of locomotor activity. A structure–activity relationship study. *Pharmacol Biochem Behav* 74:31–40.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning or incentive salience? *Brain Res Rev* 28:309–369.
- Breivogel CS, Scates SM, Beletskaya IO, Lowery OB, Aceto MD, Martin BR (2003) The effects of delta9-tetrahydrocannabinol physical dependence on brain cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol* 459:139–150.
- Budney AJ, Hughes JR (2006) The cannabis withdrawal syndrome. *Curr Opin Psychiatry* 19:233–238. Review.
- Chang HT (1952) Cortical neurons with particular reference to the apical dendrites. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 17:189–202.
- Cooper ZD, Haney M (2008) Cannabis reinforcement and dependence: role of the cannabinoid CB1 receptor. *Addict Biol* 13:188–195.
- Davis GW (2006) Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu Rev Neurosci* 29:307–323.
- Di Chiara G (1999) Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 375:13–30. Review.
- Di Chiara G (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Eur J Pharmacol* 137:75–114.
- Diana M (1996) Dopaminergic neurotransmission and drug withdrawal: relevance to drug craving. In: Ohye VC, Kimura M, McKenzie J, eds. *The Basal Ganglia Adv. Behav. Biol.*, pp. 123–130. New York: Plenum Press.
- Diana M, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL (1998) Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10269–10273.
- Diana M, Muntoni AL, Pistis M, Melis M, Gessa GL (1999) Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal. *Eur J Neurosci* 11:1037–1041.
- Diana M, Pistis M, Muntoni A, Gessa G (1995) Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *J Pharmacol Exp Ther* 272:781–785.
- Diana M, Spiga S, Acquas E (2006) Persistent and reversible morphine withdrawal-induced morphological changes in the nucleus accumbens. *Ann NY Acad Sci* 1074:446–457.
- Diana M, Tepper JM (2002) Electrophysiological pharmacology of mesencephalic dopaminergic neurons. In: Di Chiara G, ed. *Handbook of Experimental Pharmacology* 154/II, pp. 1–62. Berlin: Springer-Verlag.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M (2007) The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* 13:109–114.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Rueda D, Velasco G, Guzmán M (2006) Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development. *Curr*



- Pharm Des 12:2319–2325.
- Gerdeman G, Lovinger DM (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 85:468–471.
  - Glaser EM, Van der Loos H (1981) Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi–Nissl stain. *J Neurosci Methods* 4:117–125.
  - Gonzalez S, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V, Hernandez M, Arevalo C, Nicanor C, Cascio MG, Ambrosio E, Ramos JA (2004) Behavioral and molecular changes elicited by acute administration of SR141716 to Delta9-tetrahydrocannabinol tolerant rats: an experimental model of cannabinoid abstinence. *Drug Alcohol Depend* 74:159–170.
  - Gonzalez-Hernandez T, Rodriguez M (2000) Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol* 421:107–135.
  - Grace AA, Bunney BS (1983) Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons-2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. *Neuroscience* 10:317–331.
  - Gray EG (1959) Axi-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 93:420–433.
  - Gruber AJ, O'Donnell P (2009) Bursting activation of prefrontal cortex drives sustained up states in nucleus accumbens spiny neurons in vivo. *Synapse* 63:173–180.
  - Haney M, Hart CL, Vosburg SK, Nasser J, Bennett A, Zubarán C, Foltin RW (2004) Marijuana withdrawal in humans: effects of oral THC or divalproex. *Neuropsychopharmacology* 29:158–170.
  - Haney M, Ward AS, Comer SD, Foltin RW, Fischman MW (1999) Abstinence symptoms following oral THC administration to humans. *Psychopharmacology* 141:395–404.
  - Hernández-Echeagaray E, Starling AJ, Cepeda C, Levine MS (2004) Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: are dendrites necessary? *Eur J Neurosci* 19:2455–2463.
  - Hoffman AF, Oz M, Caulder T, Lupica CR (2003) Functional tolerance and blockade of long-term depression at synapses in the nucleus accumbens after chronic cannabinoid exposure. *J Neurosci* 23:4815–4820.
  - Iversen L (2003) Cannabis and the brain. *Brain* 126:1252–1270.
  - Kolb B, Gorny G, Limebeer CL, Parker LA (2006) Chronic treatment with delta-9-tetrahydrocannabinol alters the structure of neurons in the nucleus accumbens shell and medial prefrontal cortex of rats. *Synapse* 60:429–436.
  - Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52–58.
  - Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97–129.
  - Mato S, Robbe D, Puente N, Grandes P, Manzoni OJ (2005) Presynaptic homeostatic plasticity rescues long-term depression after chronic delta 9-tetrahydrocannabinol exposure. *J Neurosci* 25:11619–11627.
  - Melis M, Pillolla G, Bisogno T, Minassi A, Petrosino S, Perra S, Muntoni AL, Lutz B, Gessa GL, Marsicano G, Di Marzo V, Pistis M (2006) Protective activation of the endocannabinoid system during ischemia in dopamine neurons. *Neurobiol Dis* 24:15–27.
  - Melis M, Pistis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, Gessa GL (2004) Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J Neurosci* 24:53–62.
  - Melis M, Spiga S, Diana M (2005) The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int Rev Neurobiol* 63:101–154.
  - Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119–128.
  - Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278:58–63.
  - O'Donnell P, Grace AA (1993) Physiological and morphological properties of accumbens core and shell neurons recorded in vitro. *Synapse* 13:135–160.
  - Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117–165.
  - Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd edn. Sydney: Academic Press.
  - Pulvirenti L, Diana M (2001) Drug dependence as a disorder of neural plasticity: focus on dopamine and glutamate. *Rev Neurosci* 12:141–158.
  - Quickfall J, Crockford D (2006) Brain neuroimaging in cannabis use: a review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 18:318–332.
  - Rall W (1962) Electrophysiology of a dendritic neuron model. *Biophys J* 2:145–167.
  - Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S,

- Maruani J, Néliat G, Caput D et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350:240–244.
- Robinson TE, Berridge KC (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96:103–114.
  - Robinson TE, Kolb B (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* 17:8491–8497.
  - Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47(Suppl. 1):33–46.
  - Rubino T, Viganò D, Zagato E, Sala M, Parolaro D (2000) In vivo characterization of the specific cannabinoid receptor antagonist, SR141716A: behavioral and cellular responses after acute and chronic treatments. *Synapse* 35:8–14.
  - Shepherd GM (1994) *Neurobiology*, 3rd edn. Oxford: University Press.
  - Sklair-Tavron L, Shi WX, Lane SB, Harris HW, Bunney BS, Nestler EJ (1996) Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11202–11207.
  - Spiga S, Puddu MC, Pisano M, Diana M (2005) Morphine withdrawal-induced morphological changes in the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 22:2332–2340.
  - Spiga S, Serra GP, Puddu MC, Foddai M, Diana M (2003) Morphine withdrawal-induced abnormalities in the VTA: confocal laser scanning microscopy. *Eur J Neurosci* 17:605–612.
  - Szabo B, Wallmichrath I, Mathonia P, Pfreundtner C (2000) Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 97:89–97.
  - Tanda G, Loddo P, Di Chiara G (1999) Dependence of mesolimbic dopamine transmission on D9-tetrahydrocannabinol. *Eur J Pharmacol* 376:23–26.
  - Tepper JM, Sawyer SF, Groves PM (1987) Electrophysiologically identified nigral dopaminergic neurons intracellularly labeled with HRP: light-microscopic analysis. *J Neurosci* 7:2794–2806.
  - Tredici G, Di Francesco A, Miani A, Pizzini G (1993) Real complete three-dimensional reconstruction of Golgi-impregnated neurons by means of a confocal laser scanning microscope. *Neuroimage* 1:87–93.
  - White FJ (1996) Synaptic regulation of mesocorticolimbic dopamine neurons. *Annu Rev Neurosci* 19:405–436.
  - Wilson CJ (1984) Passive cable properties of dendritic spines and spiny neurons. *J Neurosci* 4:281–297.
  - Wolf JA, Moyer JT, Lazarewicz MT, Contreras D, Benoit-Marand M, O'Donnell P, Finkel LH (2005) NMDA/AMPA ratio impacts state transitions and entrainment to oscillations in a computational model of the nucleus accumbens medium spiny projection neuron. *J Neurosci* 25:9080–9095.
  - Zito K, Knott G, Shepherd GM, Shenolikar S, Svoboda K (2004) Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. *Neuron* 44:321–334.
  - Zito K, Svoboda K (2002) Activity-dependent synaptogenesis in the adult Mammalian cortex. *Neuron* 35:1015–1017. Review.

