

MECCANISMI MOLECOLARI E CELLULARI DELLA DIPENDENZA DA OPIACEI E COCAINA: REVISIONE STORICA*

Eric J. Nester

Department of Psychiatry and center for Basic Neuroscience, The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA

Il National Institute of drug Abuse (NIDA) è stato fondato nel 1974, e da allora sono stati fatti progressi significativi nella comprensione dei meccanismi attraverso i quali l'abuso di sostanze causa "addiction". Per quasi tutte le sostanze di abuso si conoscono ora i targets proteici iniziali. Sono inoltre disponibili modelli sperimentali che riproducono aspetti fondamentali dell'"addiction", e tramite tali modelli è stato possibile caratterizzare le regioni cerebrali coinvolte nei meccanismi responsabili dell'"addiction" e di altri effetti della droga, come ad esempio la dipendenza psichica. In queste aree cerebrali sono stati identificati numerosi cambiamenti a livello molecolare e cellulare indotti dalle droghe. Inoltre, si stanno facendo importanti progressi nel tentativo di correlare, in modelli sperimentali di "addiction", cambiamenti individuali con anomalie comportamentali. La sfida attuale consiste nel trasferire l'impressionante aumento delle conoscenze nel campo della neurobiologia di base dell'"addiction" ai soggetti con problemi di dipendenza, e di identificare geni specifici responsabili della particolare vulnerabilità od al contrario resistenza alla "addiction" da sostanze. In questo articolo verrà presentata una revisione storica della ricerca di base sull'"addiction" da oppiacei e cocaina.

Torniamo indietro di 30 anni. Si conoscevano una varietà di droghe che determinavano addiction in alcuni soggetti. Si disponeva di una buona quantità di informazioni relative alle alterazioni comportamentali determinate da queste droghe in modelli animali e, in qualche caso, si conoscevano i sistemi di neurotrasmettitori con i quali le droghe interferivano. Si ipotizzò che dopo somministrazioni ripetute, le droghe inducessero cambiamenti di lunga durata nel cervello responsabili dell'addiction, ma la natura di questi cambiamenti, e le aree cerebrali nelle quali si verificavano, rimanevano quasi completamente sconosciute. Negli Stati Uniti di America si cominciò a ritenere l'addiction come una causa crescente ed importante di mortalità, di morbilità e di perdita di produttività. La necessità urgente, sia clinica che sociale, di interventi nel campo delle dipendenze, assieme allo sviluppo delle neuroscienze quali area di ricerca biomedica, ha portato, nel 1974, alla creazione del National Institute of drug abuse (NIDA) all'interno del Alcohol, drug abuse, and Mental health Administration (ADAMHA). Bisogna però arrivare al 1992 per vedere il NIDA ed altri istituti ADAMHA (National Institute of Mental health and National Institute of alcohol abuse and alcoholism) confluire nel NIH (National In-

Tratto da: *Trends in Pharmacological Sciences* - Vol. 25 n. 4, April 2004 - "Historical review: molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction".

stitute of health). Sebbene ancora adesso vi siano carenze di conoscenze fondamentali relative alle cause dell'addiction, e sicuramente mancano terapie e cure risolutive per molti pazienti, non c'è dubbio che negli ultimi tre decenni si sono fatti progressi straordinari nei nostri sforzi per contrastare la dipendenza da droghe.

BERSAGLI INIZIALI DELLE SOSTANZE DI ABUSO

Dal 1974 si conosce il modello di base attraverso il quale molte sostanze di abuso producono i loro effetti immediati sul sistema nervoso. Si riteneva che gli oppiacei agissero sui recettori endogeni degli oppiacei, sebbene tali recettori non fossero stati ancora ben definiti biochimicamente, e tanto meno clonati a livello molecolare. Si pensava che agenti psicostimolanti quali cocaina e amfetamina regolassero il reuptake o il rilascio della monamina. Tuttavia, il preciso bersaglio molecolare delle droghe era sconosciuto, così come non si sapeva quale monoamina risultasse la più importante per le proprietà delle droghe in termini di generare addiction. Si riteneva che la nicotina attivasse i recettori nicotinici dell'acetilcolina (nACh), sebbene a quel tempo tali recettori fossero stati caratterizzati in Torpedo electroplax e preparazioni correlate, ma poco si sapeva dei nACh nell'encefalo. Si sapeva che l'alcool interferiva con numerosi processi biochimici cerebrali, ma i meccanismi precisi dei suoi effetti erano sconosciuti. I principali allucinogeni erano stati caratterizzati per i loro effetti sul sistema della 5-idrossitriptamina cerebrale, ma poco si sapeva dei loro target proteici iniziali. Inoltre, non si sapeva pressoché nulla sui meccanismi d'azione di altre sostanze di abuso comunemente utilizzate, quali cannabinoidi, fenciclidina e inalanti.

Tabella 1. Targets iniziali delle sostanze di abuso.

Sostanza	Proprietà
Oppiacei	Antagonisti dei recettori peptidici μ , δ e κ degli oppiacei ^a
Cocaina	Agonista indiretto dei recettori della dopamina mediante l'inibizione dei trasportatori della dopamina ^b
Amfetamina e stimolanti correlati ^c	Agonista indiretto dei recettori dopaminergici mediante la stimolazione del rilascio di dopamina ^b
Etanolo	Facilita la funzione dei recettori GABA _A ed inibisce quella del recettore NMDA glutammato ^d
Nicotina	Agonista dei recettori acetilcolinici per la nicotina
Cannabinoidi	Agonisti per i recettori cannabinoidi CB ₁ e CB ₂ ^e
Fenciclidina	Antagonisti dei recettori NMDA glutammato
Allucinogeni	Agonisti parziali dei recettori 5-HT _{2A}
Inalanti	sconosciuto

^a L'attività sui recettori peptidici μ (e probabilmente δ) degli oppiacei è responsabile degli effetti degli oppiacei sull'addiction. Il recettore peptidico κ per gli oppiacei è responsabile delle azioni avversative.

^b La cocaina e l'amfetamina esercitano azioni analoghe sui sistemi della 5-idrossitriptamina e noradrenalina, che possono contribuire agli effetti di queste droghe sull'addiction.

^c Ad esempio, metamfetamina e metilfenidato

^d L'etanolo interferisce con molti altri canali "ligand-gated" e, ad alte concentrazioni, con canali "voltage-gated". Inoltre, si ritiene che l'etanolo influenzi molti altri sistemi di neurotrasmissione.

^e L'attività sui recettori CB₁ dei cannabinoidi è responsabile dei fenomeni di addiction ai cannabinoidi; i recettori CB₂ sono espressi solo perifericamente. Tra i ligandi endogeni che sono stati proposti per il recettore CB₁ sono da ricordare i metaboliti dell'acido arachidonico anandamide e il 2-arachinodilglicerolo.

Uno dei più importanti progressi nella ricerca nel campo dell'addiction nelle ultime tre decadi è stato l'identificazione definitiva del target molecolare per quasi tutte le principali sostanze e abuso (tabella 1). Questo progresso è stato reso possibile dall'introduzione di tecniche radio-ligand-binding e dalla caratterizzazione biochimica dei siti di legame per i farmaci e, in ultima analisi, dall'applicazione della biologia molecolare per clonare ed isolare questi targets.

A posteriori, visto che le sostanze d'abuso differiscono sostanzialmente per la struttura chimica, non è sorprendente osservare che ciascuna molecola agisce su un target specifico ed unico. È inoltre sorprendente che tutti i targets sinora identificati per le sostanze di abuso siano proteine implicate nella trasmissione sinaptica, sebbene droghe differenti interferiscano con differenti sistemi neurotrasmettitori. Il processo di identificazione dei targets iniziali delle droghe è stato recentemente revisionato [1, 2] e non viene ulteriormente discusso in questo articolo. Tuttavia, è importante sottolineare che, oltre ad aver migliorato la nostra conoscenza sull'azione della droga, queste scoperte hanno esercitato un'impatto importante nel campo delle neuroscienze in generale. In particolare, definendo alcuni nuovi sistemi di neurotrasmettitori e di recettori che influenzano le funzioni cerebrali ed il comportamento, hanno aumentato la nostra conoscenza sulle modalità di trasmissione chimica dell'encefalo. Allo stesso modo, tali scoperte sono andate di pari passo allo sviluppo di nuovi farmaci per una varietà di disturbi psichiatrici e neurologici, e continuano a indirizzare l'attuale sviluppo di farmaci attivi sul sistema nervoso centrale.

Una delusione iniziale nel settore è stata la difficoltà nel rendersi conto di alcuni punti salienti nel campo delle dipendenze, sulla base della regolazione della droga al target iniziale. Ad esempio, alla metà degli anni 1970 era stato ampiamente teorizzato che la tolleranza alla droga (diminuzione dell'effetto con l'uso ripetuto) e la dipendenza dalla droga (uno stato di alterazione fisiologica che determina sindrome da astinenza quando si sospende la droga) potevano essere spiegate con una semplice "upregulation" o "downregulation" del target della sostanza. Tuttavia, molte delle ricerche iniziali non avevano evidenziato consistenti variazioni nei recettori per gli oppiacei, trasportatori di monoamine ed altri targets che potevano spiegare i fenomeni di tolleranza e dipendenza. Paradossalmente, lavori più recenti hanno identificato importanti adattamenti in alcuni dei targets che sembrano giocare un ruolo cruciale nell'addiction (vedi ad esempio voci bibliografiche 3 e 4). Ciononostante, i fallimenti iniziali hanno indirizzato la ricerca oltre i recettori, focalizzandola su possibili modificazioni indotte dalle droghe nelle vie metaboliche della traduzione del segnale post-recettoriale, man mano che queste venivano scoperte nell'encefalo.

La via metabolica cAMP nella dipendenza e tolleranza da oppiacei.

Il ruolo di cAMP e della proteino-chinasi cAMP-dipendente (PKA) nel mediare gli effetti dei b-adrenocettori sul metabolismo del glicogeno nei muscoli scheletrici e nel fegato è stato descritto negli anni 1950 e 1960. Solo alla fine degli anni 1960 ed all'inizio del 1970 si iniziò a ritenere che cAMP e PKA fossero implicati in fenomeni neuro-specifici, ed in particolare nella regolazione della trasmissione sinaptica [5]. Sebbene a quel tempo vi fossero controversie, tale ruolo del cAMP e PKA è stato largamente riconosciuto nel decennio successivo, ed allargato anche a numerose famiglie di secondi messaggeri e protein-kinasi.

Nel 1975, l'evoluzione nella comprensione delle basi molecolari della trasmissione sinaptica è stata applicata alla dipendenza da sostanze di abuso. Sharma, Klee e Nirenberg [6] aggiunsero morfina a cellule di neuroblastoma x glioma in coltura, dimostrando che la morfina diminuiva

inizialmente i livelli cellulari di cAMP. Tuttavia, continuando l'esposizione, i livelli di cAMP ritornavano alla normalità e, quando si aggiungeva un antagonista del recettore degli oppiacei, i livelli di cAMP aumentavano notevolmente rispetto ai controlli. Queste osservazioni, che sono schematizzate nella figura 1, indicano che fenomeni simili alla tolleranza e dipendenza possono essere osservati a livello della singola cellula. Su questa base gli Autori hanno ipotizzato che adattamenti nella via metabolica del cAMP contribuivano alla tolleranza e dipendenza da oppiacei. Collier e collaboratori hanno poi fornito indipendentemente linee simili di evidenza relative al coinvolgimento della via metabolica cAMP nella dipendenza da oppiacei [7].

Un successivo importante progresso è rappresentato dall'applicazione di questa ipotesi all'encefalo e, in particolare, ai neuroni del locus coeruleus (LC), che è il nucleo cerebrale maggiormente ricco in noradrenalina. Si dimostrò che questi neuroni sviluppavano tolleranza e dipendenza da oppiacei a livello cellulare: in maniera repentina, gli oppiacei diminuivano la percentuale di neuroni attivati nel LC; la percentuale di attivazione ritornava ai valori normali se l'esposizione agli oppiacei continuava, mentre la percentuale di attivazione aumentava di molte volte sopra i livelli di normalità quando venivano somministrati antagonisti dei recettori per gli oppiacei [8].

Figura 1. Sovreregolazione della via metabolica del cAMP come possibile meccanismo della tolleranza e dipendenza agli oppiacei. Gli oppiacei inibiscono in modo importante le attività funzionali della via metabolica del cAMP (indicate dai livelli cellulari di cAMP e dalla fosforilazione di proteine cAMP-dipendenti). Con la continua esposizione ad oppiacei, l'attività funzionale della via metabolica del cAMP viene recuperata gradualmente, ed aumenta oltre i limiti nel caso l'oppiaceo venga rimosso (ad esempio con la somministrazione di antagonisti per il recettore degli oppiacei quali il naloxone). Questi cambiamenti nello stato funzionale della via metabolica del cAMP sono mediati attraverso l'induzione dell'adenil ciclasi e della protein-chinasi A (PKA) in risposta alla somministrazione cronica di oppiacei. L'induzione di questi enzimi è responsabile del progressivo recupero della attività funzionale della via metabolica del cAMP che si osserva in occasione di esposizione cronica ad oppiacei (tolleranza e dipendenza), ed anche dell'attivazione della via metabolica del cAMP che si verifica quando gli oppiacei vengono sospesi (astinenza).

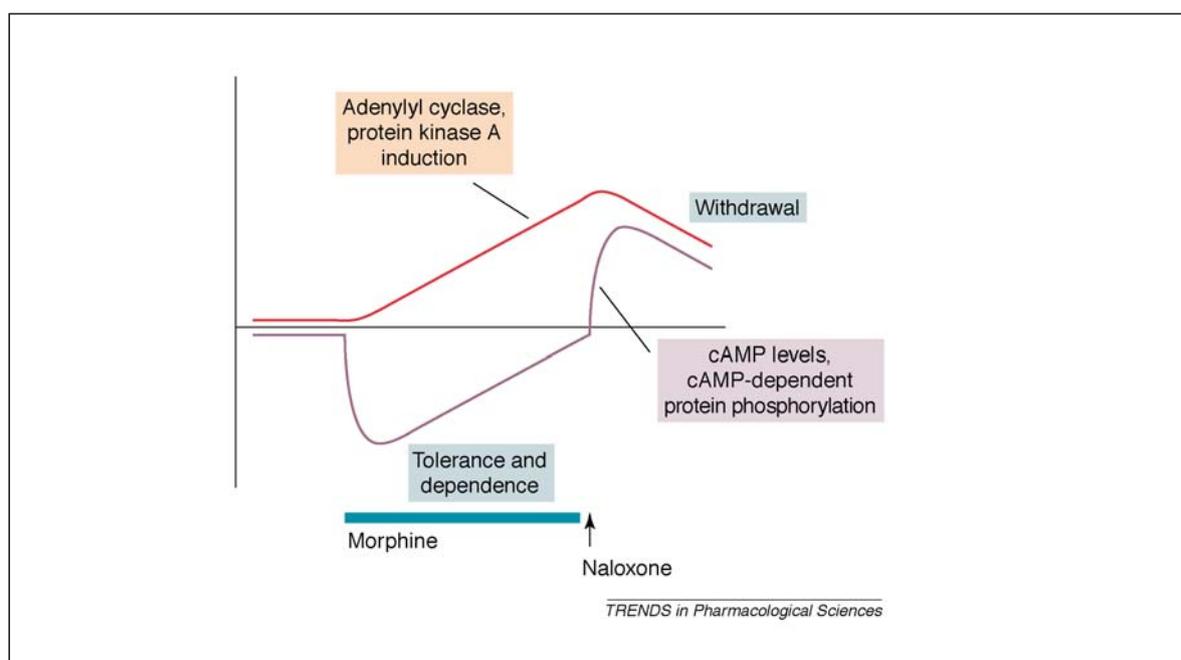


Tabella 2. Sovraregolazione della via metabolica del cAMP nell'addiction da oppiacei.

Sito di sovraregolazione	Conseguenze funzionali
Locus coeruleus ^a	Dipendenza fisica ed astinenza
Area ventrale tegmentale ^b	Disforia durante gli stadi di astinenza precoce
Sostanza grigia periacqueduttale ^b	Disforia durante gli stadi di astinenza precoce, dipendenza fisica e astinenza
Nucleus accumbens	Disforia durante gli stadi di astinenza precoce
Amigdala	Aspetti condizionati dell'addiction
Corno dorsale del midollo spinale	Tolleranza all'analgesia indotta dagli oppiacei
Plesso mioenterico intestinale	Tolleranza alla riduzione della motilità intestinale indotta da oppiacei ed aumento della motilità in fase di astinenza

^a Il circuito cAMP è sovraregolato nei principali neuroni contenenti noradrenalina presenti in questa regione

^b Vi è evidenza indiretta che il circuito cAMP è sovraregolato nei neuroni contenenti GABA che innervano i neuroni contenenti dopamina e 5-idrossitriptamina (5-HT), rispettivamente nell'area ventrale segmentale e nella sostanza grigia periacqueduttale. Durante l'astinenza, questa sovraregolazione del circuito cAMP potrebbe divenire pienamente funzionale e contribuire allo stato di disforia attraverso un aumento del rilascio del GABA, che potrebbe inibire i neuroni contenenti dopamina e 5-HT [27-30].

Inoltre, è stato ipotizzato un ruolo, almeno parziale, del cAMP nel mediare l'azione elettrofisiologia acuta degli oppiacei su questi neuroni [9]. Queste informazioni hanno spinto il nostro gruppo a studiare più approfonditamente gli effetti degli oppiacei sulla via metabolica del cAMP nel LC. In tal modo abbiamo dimostrato che anche *in vivo*, così come in precedenza era stato dimostrato in colture cellulari, si verificano alcuni cambiamenti generali in questa via metabolica nel LC: gli oppiacei inibiscono in maniera acuta l'adenil ciclasi e la fosforilazione delle proteine cAMP-dipendente; questa inibizione si riduce con la somministrazione cronica di oppiacei (tolleranza), ed aumenta di molto rispetto alla norma dopo somministrazione di un antagonista dei recettori per gli oppiacei (dipendenza ed astinenza) [10, 12]. Altri lavori sul LC hanno fornito informazioni su altri possibili meccanismi molecolari responsabili di questi cambiamenti. In questo modo, in corso di somministrazione cronica di oppiacei, diverse isoforme di adenil-ciclasi e di sub-unità di PKA vengono indotte in neuroni nel LC. Questo potrebbe essere responsabile dei cambiamenti nella attività funzionale della via metabolica del cAMP che si osservano quando si sviluppano fenomeni di tolleranza e dipendenza, e durante le fasi di astinenza (figure 1 e 2) [10-14].

È da tempo risaputo che il LC è un importante substrato neuronale per la dipendenza fisica da oppiacei [15-17]. Per contro, altri nuclei cerebrali contenenti adrenalina sono stati solo più recentemente implicati in aspetti motivazionali dell'addiction [18]. Nel corso degli anni, è stato possibile correlare direttamente la sovraregolazione della via metabolica del cAMP nel LC con le modificazioni elettrofisiologiche che si osservano in questi neuroni a seguito di somministrazione cronica di oppiacei, ed anche con la dipendenza fisica e l'astinenza [15-23]. Il ruolo del LC e della via metabolica cAMP nell'astinenza da oppiacei è stato confermato da numerosi gruppi, anche se viene messo in discussione da qualche autore [24]. Inoltre, la conoscenza dell'azione degli oppiacei nel LC ha portato all'introduzione della clonidina, un agonista α_2 adrenergico, come prima terapia non a base di oppiacei della sindrome da astinenza da oppiacei [25]. Oltre a ciò, il contributo del cAMP alla dipendenza da oppiacei nel LC ha indirizzato in maniera importante gli studi sull'addiction da oppiacei e da altre droghe in altre aree cerebrali.

In seguito, dopo le scoperte fatte nel LC, molti laboratori hanno dimostrato che simili sovraregolazioni della via metabolica del cAMP si verificano in numerose aree del SNC e del SNP

e, di conseguenza, sono responsabili di diversi aspetti dell'azione degli oppiacei mediate da questi circuiti neuronali (tabella 2) [26-30]. Ad esempio, sebbene la sovraregolazione della via metabolica del cAMP contribuisca alla dipendenza fisica da oppiacei, adattamenti biochimici simili in aree cerebrali di gratificazione [ad es. il nucleus accumbens (Nac)] contribuiscono ai cambiamenti nella gratificazione da droga e nell'addiction (vedi poi).

Base Molecolare della dipendenza da oppiacei nel LC

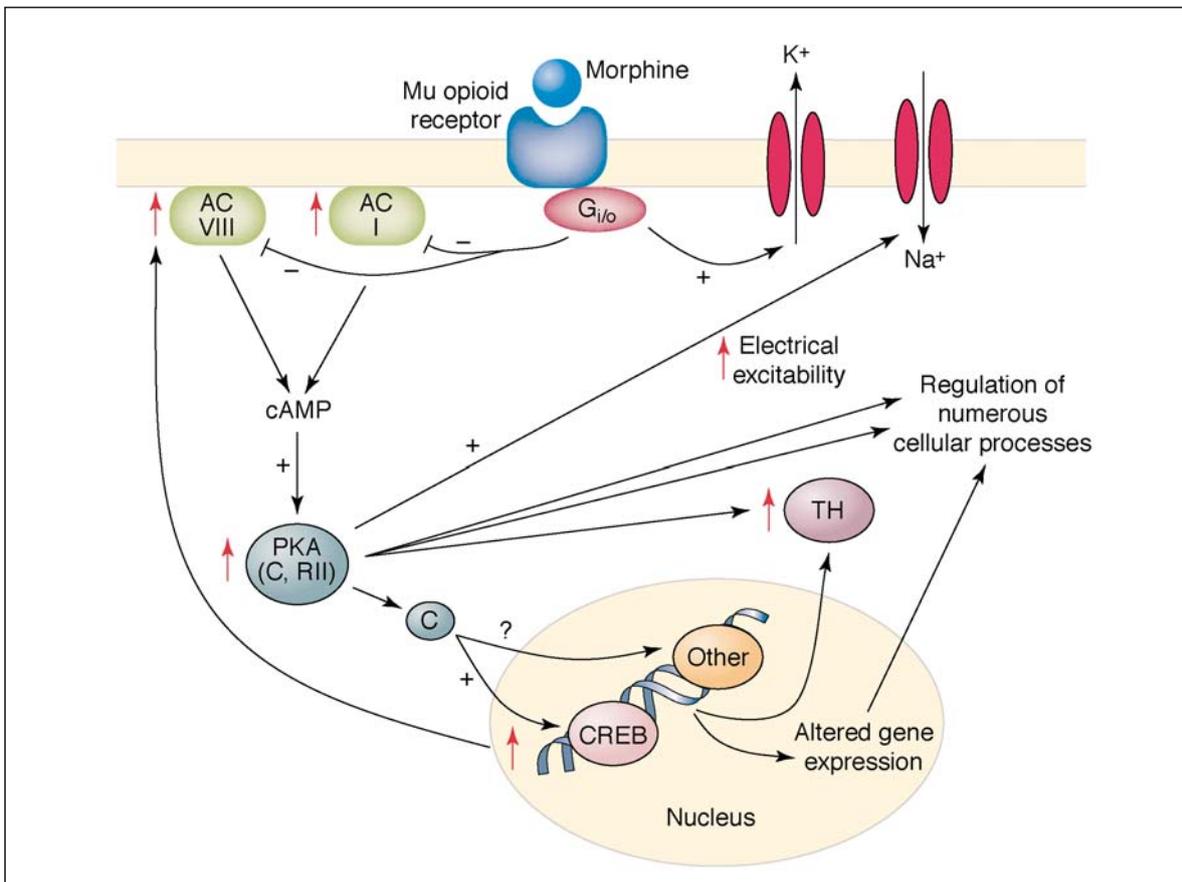
Una sfida attuale in questo campo è rappresentata da una miglior comprensione del meccanismo attraverso il quale la somministrazione cronica di oppiacei determini una sovraregolazione dell'adenil-ciclastasi e del PKA. Vi sono numerosi dati a favore del ruolo di un fattore di trascrizione proteico CREB (cAMP-response-element-binding). Gli oppiacei inibiscono in maniera acuta la fosforilazione del CREB nel LC, mentre la terapia cronica della dipendenza la aumenta, e l'astinenza la fa aumentare oltre ai valori normali [31]. Queste modificazioni funzionali potrebbero essere legate, almeno in parte, all'induzione dell'espressione del CREB mediata dalla morfina in queste aree cerebrali, in maniera simile a quella illustrata nella figura 1 [32]. Allo stesso modo la trascrizione CREB mediata è aumentata nel LC ed in altre aree durante la somministrazione cronica di oppiacei, ed aumenta ancor di più in corso di astinenza [33]. Inoltre, l'abbattimento dei livelli di CREB nel LC utilizzando oligonucleotidi blocca la capacità degli oppiacei somministrati cronicamente di sovraregolazione di alcuni, ma non tutti, i componenti del circuito cAMP (figura 2). [14] Questa diminuzione blocca anche alcuni degli effetti della morfina sullo stato elettrofisiologico dei neuroni del LC, ed attenua lo sviluppo di dipendenza fisica agli oppiacei e l'astinenza. Risultati simili sono stati ottenuti più recentemente sia aumentando che diminuendo i livelli di CREB nel LC utilizzando transfer di geni mediato da virus [34]. Questi dati sono in accordo con osservazioni che dimostrano che topi totalmente carenti di CREB sviluppano livelli più bassi di dipendenza agli oppiacei e di astinenza [35] Un aspetto ancora misterioso, tuttavia, rimane il meccanismo attraverso il quale l'esposizione agli oppiacei determina un passaggio da un'inibizione acuta dei circuiti cAMP e CREB alla sovraregolazione cronica.

Circuiti Neuronal di rinforzo e dipendenza.

I nostri concetti sull'addiction alle sostanze di abuso è rimasta poco chiara per decenni, in virtù del fatto che le principali sostanze di abuso, come gli oppiacei e l'alcool, causano dipendenza fisica oltre che "addiction". Per tale motivo, la definizione clinica di "addiction" è stata intrecciata con quella di dipendenza. Permangono tuttora residui di questa mescolanza, al punto che il Diagnostic and Statistical Manual dell'associazione Americana degli Psichiatri [36] continua a categorizzare l'"addiction" come dipendenza da droghe.

Tuttavia, nel corso degli anni 1970 e 1980 è divenuto sempre più evidente che la dipendenza fisica è un fenomeno ampiamente differenziabile dall'addiction. Alcune sostanze che determinano addiction in modo importante (ad esempio la cocaina) non producono elevata dipendenza fisica. Inoltre, Old e collaboratori [37] hanno dimostrato che i roditori si adoperano per stimolare elettricamente aree relativamente distinte del cervello, a dimostrazione dell'esistenza delle cosiddette aree cerebrali di gratificazione. In seguito numerosi gruppi di ricerca hanno evidenziato che i roditori si adoperano anche per autosomministrarsi la sostanza di abuso (ma non altre droghe) e che questo comportamento di autosomministrazione viene interrotto nel caso ven-

Figura 2. Azione degli oppiacei nel locus coeruleus (LC). Gli oppiacei inibiscono in modo acuto i neuroni del LC aumentando la conduttanza di un canale del potassio attraverso l'accoppiamento con sottotipi di $G_{i/o}$ e, probabilmente, diminuendo la conduttanza del canale del sodio, con conseguente inibizione dell'adenil ciclasi (AC), riduzione dei livelli di protein chinasi (PKA), e riduzione della fosforilazione del canale o della pompa responsabili. L'inibizione del circuito cAMP determina inoltre una diminuzione della fosforilazione di molte altre proteine e, di conseguenza,, interferisce con numerosi processi neuronali. Ad esempio, viene ridotto lo stato di fosforilazione del CREB (cAMP response element-binding protein), che potrebbe iniziare alcuni dei cambiamenti a lungo termine nelle funzioni del LC. La somministrazione cronica di morfina aumenta i livelli di ACI, ACVIII, la sub-unità catalitica e regolatoria (RII) del PKA, ed alcune fosfoproteine, incluso il CREB e la tirosino-idrossilasi [TH (l'enzima rate-limiting nella biosintesi della nora-drenalina)] (indicato da frecce rosse). Questi cambiamenti contribuiscono all'alterato fenotipo nello stato di "addiction" alla droga. Ad esempio, l'eccitabilità intrinseca dei neuroni LC è aumentata dall'attività facilitante del circuito cAMP e dalla corrente verso l'interno del sodio, che contribuisce alla tolleranza, alla dipendenza ed alla astinenza evidenziata da tali neuroni. La sovraregolazione di ACVIII e TH è mediata attraverso il CREB, mentre la sovraregolazione di ACI e delle sub-unità di PKA sembrano essere in relazione ad una via non identificata, con meccanismo CREB indipendente. Riprodotta con permesso da [38], 1997. American Association of Advancement of Science.



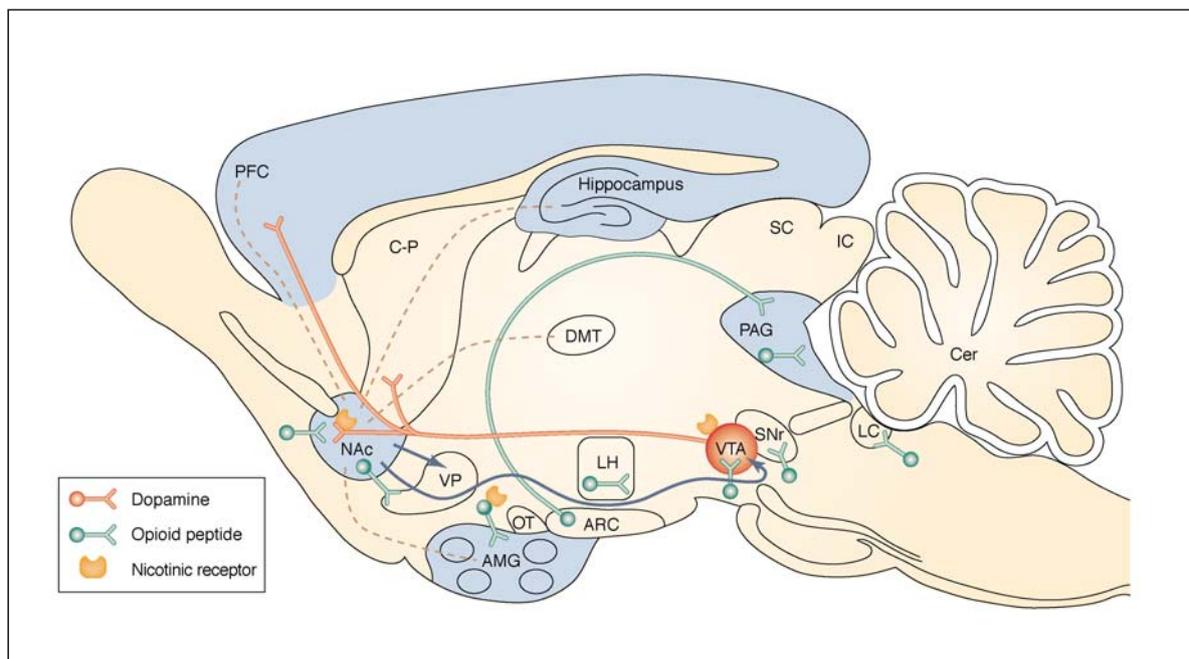
gano danneggiate le aree cerebrali di gratificazione [38-42]. Al contrario, la dipendenza fisica e l'astinenza da oppiacei ed alcool sono in gran parte mediate da regioni distinte del SNC. Al momento si sa che i circuiti cerebrali di gratificazione più importanti coinvolgono i neuroni contenenti dopamina nell'area ventrale segmentale (VTA) del mesencefalo e le loro aree target nel sistema limbico prosencefalico, in particolare, le regioni NAc e frontali della corteccia cerebrale (figura 3). In effetti, il circuito VTA-Nac sembra rappresentare un sito dove teoricamente

tutte le sostanze di abuso convergono nel produrre gli stimoli immediati di gratificazione. Due sono i meccanismi principali: primo, tutte le sostanze di abuso aumentano la trasmissione mediata dalla dopamina nel NAc, sebbene con meccanismi molto differenti; secondo, alcune droghe agiscono anche direttamente sui neuroni NAc con meccanismi indipendenti dalla dopamina [38-42].

L'evoluzione delle conoscenze dell'azione delle droghe sul circuito VTA-NAc rappresenta un importante progresso in questo campo. Fornisce inoltre approfondimenti sui meccanismi dell'addiction da sostanze e, più generalmente, sulla neurobiologia della motivazione [42, 43].

L'importanza primaria di tale circuito di gratificazione è inoltre supportata dalla scoperta che anche specie meno evolute, quali vermi e mosche, hanno dei meccanismi che regolano la risposta al cibo e all'abuso di sostanze legati a neuroni contenenti dopamina [45, 46]. Questi dati

Figura 3. circuiti neuronali chiave nell'addiction. Le vie limbiche afferenti al nucleus accumbens (NAc) sono evidenziate con la linea spezzata marrone. Le frecce blu rappresentano le vie efferenti dal NAc che si ritiene siano coinvolte nella gratificazione indotta dalle droghe. In rosso sono evidenziate le proiezioni del sistema dopaminergico mesolimbico, che si ritiene essere fondamentale substrato per la gratificazione da droga: questo sistema origina nell'area ventrale segmentale (VTA) e si proietta sino al NAc ed ad altre strutture limbiche, che includono la corteccia prefrontale (PFC), la porzione ventrale del caudato-putamen (C-P), il tubercolo olfattorio (OT) e l'amigdala (AMG) (le proiezioni al OT e AMG non sono illustrate). In verde sono evidenziati i neuroni che contengono oppiacei peptidici e che sono coinvolti nei meccanismi di gratificazione da oppiacei, etanolo e, probabilmente, nicotina. Questo sistema di oppiacei peptidici include i circuiti locali encefalinerfici (segmenti corti) ed il circuito ipotalamico mesencefalico b-endorfinico (segmenti lunghi). La distribuzione approssimativa dei complessi recettoriali GABAA, che potrebbe contribuire alla gratificazione indotta da etanolo, è evidenziata dalle aree blu pallide. Sono inoltre indicati i recettori nicotinici dell'acetilcolina, che si ritiene siano localizzati in neuroni contenenti dopamina o oppiacei peptidici. Abbreviazioni: ARC, nucleo arcuato; Cer, cervelletto; DMT, talamo dorso-mediale; IC, collicolo inferiore; LC, locus coeruleus; LH, ipotalamo laterale; PAG, sostanza grigia peri-acqueduttale; SC, collicolo superiore; SNr, pars reticolata della sostanza nigra; VP, pallido ventrale. Basato su [16]. Riprodotto con permesso da: Nature reviews Neuroscience (<http://www.nature.com/reviews>) [30]. " 2001. Macmillan Magazine Ltd.



hanno inoltre focalizzato l'attenzione dei ricercatori su possibili substrati neuronali di comportamenti compulsivi per gratificazioni non legate alle droghe, in situazioni quali i disturbi patologici da iper-alimentazione, gambling patologico, e sex addiction. Recentemente, anomalie in queste regioni cerebrali di gratificazione sono state implicate in deficit motivazionali in corso di depressione [46].

Nonostante questi progressi, si può affermare che il campo dell'addiction è stato eccessivamente focalizzato (si potrebbe dire reso dipendente) su di un singolo circuito. Anche i supporti finanziari del NIDA sono stati eccessivamente indirizzati a ricerche finalizzate al circuito VTA-NAc, nonostante questo sia solo una parte di circuiti paralleli che controllano la gratificazione e la motivazione (Figura 3). Allo stesso modo, in questo campo di ricerca ci si è eccessivamente basati sul paradigma dell'auto-somministrazione per studiare la gratificazione da droga. Svitati studi hanno valutato la capacità di agenti dopaminergici e di altri agenti farmacologici di regolare il comportamento di auto-somministrazione della sostanza. Questa focalizzazione è persistita, nonostante la consapevolezza che l'addiction alle droghe non è, fondamentalmente, un disturbo legato alla gratificazione immediata fornita dalla droga. Piuttosto, l'aspetto fondamentale dell'addiction è la ricerca e l'assunzione compulsiva della droga, e il persistere del rischio di ricaduta anche dopo anni di astinenza. Nonostante i ricercatori abbiano iniziato ad utilizzare modelli animali di drug craving e ricaduta già dal 1981 [47], è solo dalla metà degli anni 1990 che tali approcci vengono utilizzati per studiare i circuiti neuronali ed i sistemi di neurotrasmettitori responsabili del craving e delle ricadute [47-50]. Questo lavoro ha confermato l'importanza del circuito VTA-NAc quale fondamentale reostato di gratificazione, ed ha ulteriormente enfatizzato il ruolo fondamentale svolto dai relativi circuiti limbici (ad esempio, amigdala, ippocampo e corteccia frontale) nel controllare gli aspetti di lunga durata dell'addiction e che sono critici per le ricadute [50-54]. In questo momento, questi nuovi approcci comportamentali stanno fornendo potenti modelli per sviluppare nuovi farmaci per l'addiction alle droghe.

MECCANISMI MOLECOLARI E CELLULARI DELL'ADDICTION NELLA VIA METABOLICA VTA-NAc.

Agli inizi del 1990, l'identificazione delle regioni cerebrali di ricompensa e lo sviluppo di modelli sperimentali progressivamente più sofisticati di addiction hanno reso possibile la ricerca di modificazioni indotte dalle droghe nelle regioni responsabili delle complesse anomalie comportamentali alla base della condizione di addiction. Al momento, come indicato in precedenza, la maggior parte dei lavori si sono focalizzati su VTA-NAc, sebbene importanti sforzi siano ora diretti verso altre regioni critiche.

Ruolo del circuito cAMP e CREB.

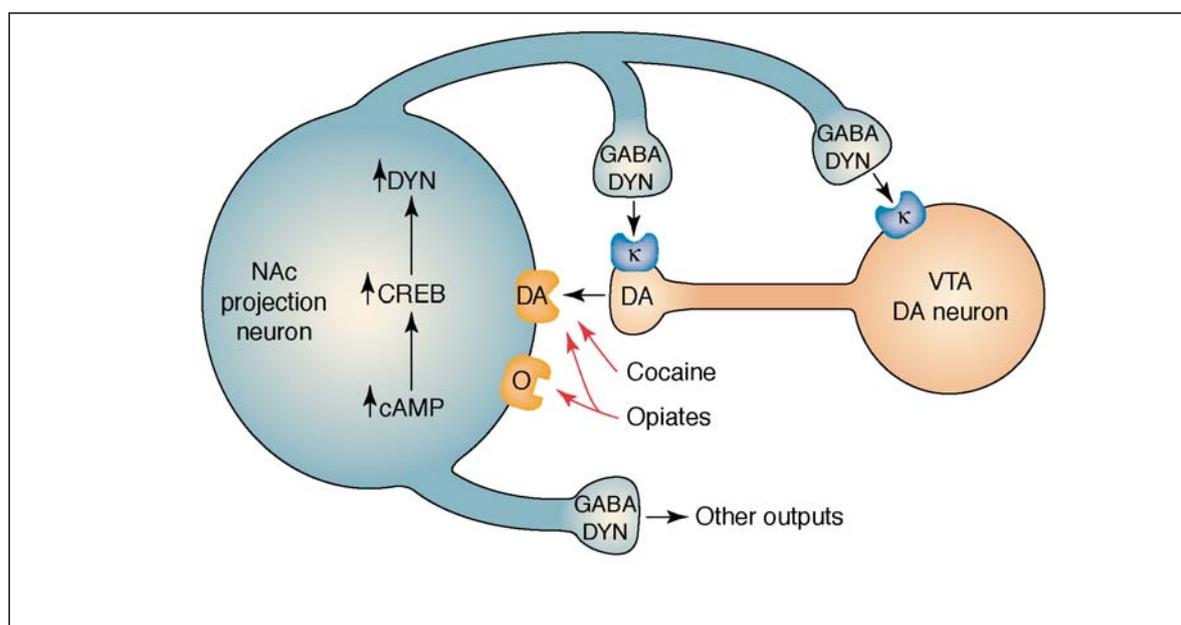
Una delle prime osservazioni a proposito è stata la scoperta che, al pari degli oppiacei, la somministrazione cronica di cocaina o alcool determina una sovraregolazione del circuito cAMP nel NAc [26, 55]. Come ci si poteva aspettare, le droghe attivavano inoltre il CREB in queste regioni cerebrali [33, 56-58]. Attualmente vi è forte evidenza che la sovraregolazione del circuito cAMP e CREB nel NAc rappresenti un meccanismo di " tolleranza e dipendenza motivazionale": questi meccanismi molecolari diminuiscono la sensibilità individuale agli effetti di gratificazione di successive esposizione a droghe (tolleranza) ed alterano il circuito gratificante (dipen-

denza) al punto che dopo l'interruzione dell'assunzione della sostanza il soggetto rimane in uno stato di demotivazione e simil- depressivo [59-64]. L'importanza della tolleranza motivazionale e della dipendenza per il problema dell'addiction nell'uomo è descritta altrove [39].

La possibilità di mettere in correlazione un semplice fattore di trascrizione con un endpoint comportamentale complesso richiede lo sviluppo di nuovi strumenti per manipolare l'espressione di geni in aree cerebrali localizzate di animali adulti. Strumenti quali il transfer di geni mediato da virus, e le mutazioni inducibili con target cellulare nei topi hanno drammaticamente accelerato lo sviluppo di una relazione causale tra molecole, quali il CREB, e particolari anomalie comportamentali che si associano all'addiction.

Mediante l'identificazione di geni target nel NAc attraverso i quali il circuito cAMP e CREB produce anomalie comportamentali [65], potrebbe essere possibile sviluppare nuove terapie in grado di far regredire queste modificazioni. È da notare a tal proposito che un oppioide peptidico, la dinorfina, normalmente sopprime l'attività nel circuito di ricompensa VTA-NAc attraverso la stimolazione del recettore per l'oppioide peptidico kappa (κ) ed in tal modo la liberazione di dopamina [66]. C'è sempre maggior evidenza che l'induzione di dinorfina rappresenti un importante mediatore del fenotipo di comportamento del CREB in questo circuito (figura 4) [57, 59, 61, 64]. Questi dati hanno indirizzato la ricerca allo studio dell'impiego di antagonisti dei recettori KOP per il trattamento dei sintomi emotivi negativi che caratterizzano l'astinenza precoce.

Fig. 4. Regolazione della risposta CREB (cAMP response element-binding protein) attuata dalle sostanze di abuso. La figura mostra neuroni contenenti dopamina (DA) dell'area ventrale segmentale (VTA) che innervano un gruppo di proiezioni neuronali contenenti GABA nel nucleo accumbens (NAc) e che esprimono dinorfina (DYN). DYN agisce in questo circuito con un meccanismo di feedback negativo. Il DYN liberato dalle terminazioni neuronali dal NAc va ad agire sul recettore per l'oppioide peptidico kappa (κ) su terminazioni nervose e corpi cellulari di neuroni contenenti DYN, inibendone l'attività. L'esposizione cronica a cocaina, oppiacei e, probabilmente, ad altre sostanze di abuso sovraregola questo circuito di feedback negativo attraverso la sovraregolazione del circuito cAMP, che attiva il CREB ed induce la formazione di DYN. Abbreviazioni: O, recettori per gli oppiacei. Riprodotto con permesso da Nature Reviews Neuroscience (<http://www.nature.com/reviews>) [30]. " 2001. Macmillan Magazine Ltd.



Substrati molecolari comuni nell'addiction.

Quasi contemporaneamente alla dimostrazione che molte sostanze di abuso sovraregolavano il circuito cAMP nel NAc, molti gruppi riportavano numerose adattamenti addizionali nel circuito VTA-NAc, alcuni dei quali sono in comune con differenti sostanze di abuso. Queste includono alterazioni nei livelli di subunità di G-proteine, tiroxina idrossilasi (l'enzima che limita la produzione nella biosintesi della dopamina), proteine neurofilamentose, recettori del glutammato e sistemi neuropeptidici [55, 68, 72]. Un corollario di questi dati è che il circuito cAMP è solo uno dei numerosi circuiti di segnale intracellulare che vengono alterati dall'esposizione alla droga. Sebbene le esatte conseguenze funzionali della maggior parte di questi adattamenti rimanga da chiarire, il lavoro fatto ha portato al concetto che l'abuso di droghe converge, almeno in parte, verso comuni substrati neuronali e molecolari per produrre gratificazione immediata e cambiamenti cronici nei meccanismi di gratificazione che contribuiscono all'addiction [68].

Ruolo del DFosB.

Un'azione, comune e cronica, dell'addiction a droghe, è l'induzione di un altro fattore di trascrizione, il DFosB, nel NAc. Nel 1991, 2 gruppi hanno evidenziato che la somministrazione acuta di cocaina induceva c-Fos ed altre proteine della famiglia Fos nel NAc e dorsale striato [73, 74]. Queste proteine ed i rispettivi mRNA sono instabili, e ritornano al livello di normalità entro 8-12 ore dall'esposizione alla droga. Nel 1992 abbiamo studiato gli effetti della somministrazione cronica di cocaina su questa famiglia di fattori di trascrizione. Basandoci sulla capacità della cocaina di indurre una sensibilizzazione a molti dei suoi effetti sul comportamento, avevamo previsto che le ripetute esposizioni a cocaina avrebbero progressivamente condizionato una maggior induzione di proteine Fos. In effetti si osservò il contrario: la somministrazione cronica di cocaina riduceva drasticamente la capacità di indurre c-Fos ed altre proteine Fos in occasione di successive somministrazioni. Al contrario, determinava l'accumulo di alti livelli di complessi activator protein 1 (AP-1) (che rappresentano dimeri trascrizionali di Fos e proteine correlate della famiglia Jun) [75]. Questi risultati indicano che la somministrazione cronica di cocaina induce una nuova proteina Fos responsabile dell'attività persistente di AP-1. Negli anni a seguire abbiamo poi dimostrato che le proteine Fos responsabili di questi complessi AP-1 di lunga durata rappresentano isoforme modificate di DFosB, una variante del gene *FosB* [76-79]. Inoltre, la longevità di questo complesso è causata dalla straordinaria stabilità delle isoforme di DFosB, in netto contrasto con altri membri della famiglia Fos. La base molecolare di questa stabilità singolare è oggetto ora di ricerca.

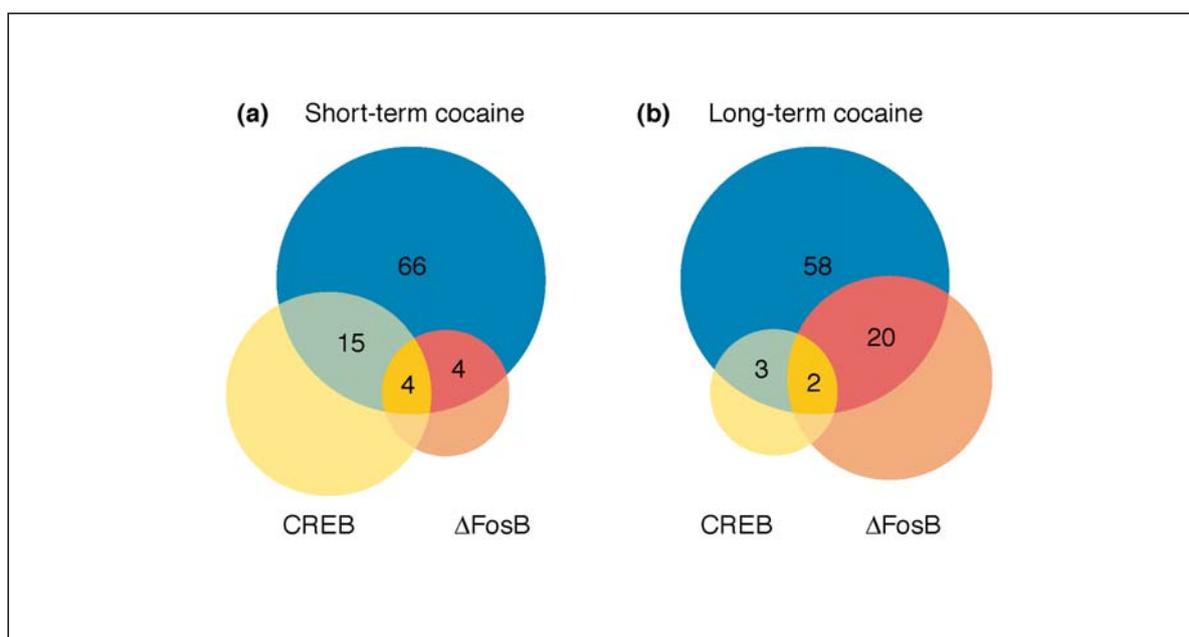
Più recentemente, noi ed altri gruppi abbiamo trovato che potenzialmente tutte le sostanze di abuso inducono DFosB nel NAc (ed in qualche caso nel dorsale striato) dopo somministrazione cronica [76, 80-83]. Inoltre, l'accedere ripetutamente a gratificazioni non legate a droga, come ad esempio tramite eccessi di attività motorie (far girare la ruota- "wheel-running) o di assunzione di bevande zuccherine, induce allo stesso modo DFosB in queste regioni [84, 85]. Approfondimenti sul ruolo svolto dall'induzione di DFosB da parte di droghe od altri comportamenti gratificanti derivano da studi in topi transgenici nei quali DFosB o antagonisti dominanti-negativi di DFosB ed altre proteine Fos sono iper-esprese in animali adulti con qualche selettività nel NAc e dorsale striato [86, 87]. L'iper-espressione di DFosB aumenta la sensibilità agli effetti di attivazione locomotoria e di gratificazione indotti da cocaina e morfina, au-

menta l'autosomministrazione di cocaina. [86, 88-90]. L'iperpressione aumenta anche le pratiche motorie (wheel-running) e l'intake di sucrosio [84, 90]. Per contro, l'espressione del dominante negativo DFosB diminuisce la sensibilità a cocaina e morfina [87, 89]; sono inoltre in corso studi sul dominante negativo DFosB in altre prove comportamentali. Nell'insieme, questi dati supportano l'idea che DFosB sia necessario e sufficiente per sensibilizzare l'animale a gratificazioni da droghe e di altro tipo. Inoltre, dal momento che DFosB è stabile, può mantenere questi cambiamenti comportamentali per settimane o mesi dopo l'ultima somministrazione di droga. A tal scopo, DFosB può essere considerato un importante promotore molecolare che inizia e mantiene lo stato di addiction (figura 5) [65].

Meccanismi di plasticità "permanente" dell'addiction

Anche l'induzione di DFosB non è di durata illimitata come altre anomalie comportamentali che si associano allo stato di addiction, e che possono perdurare per l'intera vita. Di conseguenza, una sfida fondamentale nel campo dell'addiction è la comprensione delle modalità attraverso le quali la somministrazione ripetuta di droghe determini cambiamenti straordinariamente stabili nel cervello. Un'ipotesi è che la somministrazione cronica di droga determini modificazioni nei neuroni dei meccanismi di gratificazione. La somministrazione cronica di morfina causa una riduzione ed una diminuzione della densità nelle dimensioni di neuroni contenenti dopamina nel VTA [91], riducendo inoltre la densità delle spine dendritiche di neuroni nel NAc [92]. Per

Figura 5. Ruolo del CREB (cAMP response element-binding protein) e DFosB nella regolazione dell'espressione genica indotta dalla cocaina. I Topi erano trattati con cocaina per (a) 5 giorni, oppure (b) per 4 settimane; in seguito l'RNA, isolato dal nucleo accumbens, veniva analizzato con metodiche di DNA microarray. Il diagramma di Venn mostra il numero di geni la cui regolazione per periodi più corti o più lunghi di somministrazione di cocaina (cerchi blu) è sotto il controllo di DFosB (rosso) e di CREB (giallo). CREB ha un ruolo importante nelle fasi precoci di esposizione alla cocaina, mentre DFosB ha un ruolo progressivamente dominante nelle fasi più prolungate di somministrazione della droga. Riprodotto con permesso da Nature (<http://www.nature.com>) [65].



contro, la somministrazione cronica determina un'espansione delle arborizzazioni dendritiche di neuroni nel NAc che possono persistere per mesi dopo l'ultima esposizione alla droga [93]. Quali sono i meccanismi molecolari responsabili di tali cambiamenti nella morfologia dei neuroni indotti dalla droga? Una possibilità è che alcuni adattamenti molecolari, anche se transitori, possano dar inizio ad adattamenti strutturali di durata maggiore. Vi è ad esempio evidenza che l'induzione mediata da DFosB della Kinasi 5 ciclino-dipendente sia in grado di mediare in parte l'aumento nella densità delle spine dendritiche nei neuroni nel NAc a seguito di somministrazione cronica di cocaina [94, 95]. L'identificazione di altri target genici per DFosB potrà fornire ulteriori spunti sui meccanismi alla base delle modifiche permanenti nell'encefalo.

Anche se importante in termini euristici, non vi è diretta evidenza che le modificazioni strutturali che si osservano nei neuroni VTA-NAc siano alla base della permanente plasticità comportamentale indotta dall'esposizione alle droghe. La sfida alla comprensione delle basi molecolari e cellulari delle modificazioni comportamentali quasi permanenti che accompagnano l'addiction è simile a quella nel campo dell'apprendimento e della memoria, nel quale, nonostante l'esistenza di modelli cellulari e molecolari, vi sono scarsi approfondimenti sulle basi neurobiologiche della memoria comportamentale. Questa sfida comune è interessante perché, nell'ultimo decennio, per i circuiti cellulari e molecolari dell'addiction da una parte, e dell'apprendimento e della memoria dall'altra, sono state trovate vie comuni [96-98]. L'apprendimento, la memoria e l'addiction sono modulati dagli stessi fattori neurotrofici (ad esempio, fattori neurotrofici di derivazione cerebrale), condividono la stessa cascata di segnali intracellulari, e dipendono dall'attivazione del CREB. Essi sono associati con adattamenti simili nella morfologia neuronale (ad esempio cambiamenti nella densità delle spine dendritiche), ed entrambi sono accompagnate da alterazioni nella plasticità sinaptica (ad esempio, potenziamento a lungo termine e depressione a lungo termine) in particolari sinapsi glutamatergiche encefaliche [50, 99-101]. Recentemente vi sono state inoltre convergenze sulle regioni encefaliche ritenute importanti per la plasticità molecolare e cellulare alla base dei fenomeni dell'addiction e della memoria. Pertanto, mentre il campo delle addiction si è concentrato abbondantemente sui circuiti VTA-NAc, e quello dell'apprendimento e della memoria sull'ippocampo, amigdala e corteccia, adesso si sa che tutte queste regioni contribuiscono a circuiti interconnessi e che sono essenziali nei fenomeni di addiction, apprendimento e mnemonici. Questa connessione molecolare tra addiction e memoria sono in accordo con lavori di alcuni decenni fa, che dimostrano l'interessamento di apprendimento associativo ed operativo nei fenomeni di addiction.

DIREZIONI FUTURE

Con la disponibilità di strumenti genomici e proteomici, la rapidità nell'identificare modificazioni molecolari indotte dalle droghe nel VTA-NAc ed in molte altre regioni cerebrali importanti per l'addiction è aumentata drasticamente negli ultimi 5 anni. Questi studi hanno validato il concetto che le sostanze di abuso producono alcune azioni croniche e comuni in regioni cerebrali di gratificazione e, come ci si poteva aspettare, hanno evidenziato come ogni droga eserciti i suoi specifici effetti. Ad esempio, importanti progressi sono stati fatti nella comprensione di come somministrazioni ripetute di oppiacei alterino i flussi dei recettori degli oppiacei, e di come tali alterazioni contribuiscano all'addiction (non rivisto in questa sede) [3, 4]. Una sfida fondamentale per la fase successiva della ricerca sull'addiction da droghe è data dall'interpretazione e dall'utilizzazione dell'ampia quantità di dati generati dalla genomica e proteomica. In ultima analisi, nuove indicazioni sui substrati molecolari dell'addiction potrebbero emergere

prendendo in considerazione modificazioni coordinate in molteplici proteine in varie regioni cerebrali, qualcosa di non fattibile al momento con le tecnologie disponibili.

Un'altra lacuna in questo settore è la difficoltà nell'esatta comprensione delle modalità con le quali modificazioni molecolari e cellulari nei neuroni dei circuiti di gratificazione nelle aree cerebrali siano in grado di mediare realmente i fenomeni comportamentali di ricompensa e di addiction. Ancora non conosciamo, ad esempio, come la diminuzione della suscettibilità dei neuroni del NAc determini fenomeni comportamentali di ricompensa, e di come l'alterata attività di queste cellule contribuisca al craving e alle ricadute. Tali conoscenze richiedono la comprensione di come il NAc, e le strutture cerebrali di ricompensa collegate, funzionino come complessi circuiti neuronali.

C'è inoltre necessità di capire i motivi per cui alcuni individui sono particolarmente vulnerabili all'addiction, mentre altri sono relativamente resistenti. Indagini epidemiologiche indicano che circa il 50 % del rischio di addiction alle droghe (incluso l'addiction ad oppiacei, cocaina, nicotina ed alcool) è su base genetica, anche se i geni specifici responsabili non sono ancora stati identificati. Solamente quando questi geni verranno identificati sarà possibile capire come fattori genetici e non interagiscono nel determinare il rischio individuale di addiction.

Da ultimo, vi è la necessità di trasferire progressivamente l'impressionante mole di informazioni relative alle basi neurobiologiche dell'addiction da studi in modelli animali alla pratica clinica. Sono stati fatti passi da gigante negli studi clinici in campo di addiction, ed in particolare nell'area del brain imaging e della genetica, cosicché negli ultimi 30 anni sono stati sviluppati numerosi trattamenti, medici e non, dell'addiction. Ciononostante, i trattamenti disponibili sono inadeguati per molti soggetti con problemi di addiction. Il nostro desiderio e la speranza ed è che il miglioramento nella comprensione dell'addiction a livello molecolare e cellulare porterà a trattamenti risolutivi dell'addiction ed, in fasi successive, alla cura e a misure preventive. Rimane tuttavia molta strada da fare.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato finanziato con fondi del National Institute on Drug Abuse.

BIBLIOGRAFIA

1. Gainetdinov, R.R. and Caron, M.G. (2003) Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 261–284
2. Snyder, S.H. and Pasternak, G.W. (2003) Historical review: opioid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 198–205
3. Whistler, J.L. et al. (1999) Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* 23, 737–746
4. Bohn, L.M. et al. (2000) m-Opioid receptor desensitization by b-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408, 720–723
5. Nestler, E.J. and Greengard, P. (1984) *Protein Phosphorylation in the Nervous System*, J. Wiley & Sons
6. Sharma, S.K. et al. (1975) Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3092–3096

7. Collier, H.O. and Francis, D.L. (1975) Morphine abstinence is associated with increased brain cyclic AMP. *Nature* 255, 159–162
8. Aghajanian, G.K. (1978) Tolerance of locus coeruleus neurons to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature* 276, 186–188
9. Alreja, M. and Aghajanian, G.K. (1991) Pacemaker activity of locus coeruleus neurons: whole-cell recordings in brain slices show dependence on cAMP and protein kinase A. *Brain Res.* 556, 339–343
10. Nestler, E.J. and Tallman, J.F. (1988) Chronic morphine treatment increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in the rat locus coeruleus. *Mol. Pharmacol.* 33, 127–132
11. Duman, R.S. et al. (1988) Acute and chronic opiate regulation of adenylate cyclase in brain: Specific effects in locus coeruleus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246, 1033–1039
12. Guitart, X. and Nestler, E.J. (1989) Identification of morphine- and cyclic AMP-regulated phosphoproteins (MARPPs) in the locus coeruleus and other regions of rat brain: regulation by acute and chronic morphine. *J. Neurosci.* 9, 4371–4387
13. Matsuoka, I. et al. (1994) Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA. *Eur. J. Pharmacol.* 268, 215–221
14. Lane-Ladd, S.B. et al. (1997) CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: Biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J. Neurosci.* 17, 7890–7901
15. Taylor, J.R. et al. (1988) Clonidine infusions into the locus coeruleus attenuate behavioral and neurochemical changes associated with naloxone-precipitated withdrawal. *Psychopharmacology (Berl.)* 96, 121–134
16. Koob, G.F. et al. (1992) Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends Neurosci.* 15, 186–191
17. Maldonado, R. and Koob, G.F. (1993) Destruction of the locus coeruleus decreases physical signs of opiate withdrawal. *Brain Res.* 605, 128–138
18. Delfs, J.M. et al. (2000) Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 403, 430–434
19. Rasmussen, K. et al. (1990) Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: Behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J. Neurosci.* 10, 2308–2317
20. Kogan, J.H. et al. (1992) Elevated basal firing rates and enhanced responses to 8-Br-cAMP in locus coeruleus neurons in brain slices from opiate-dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.* 211, 47–53
21. Maldonado, R. et al. (1995) Protein kinases in the locus coeruleus and periaqueductal gray matter are involved in the expression of opiate withdrawal. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 352, 565–575
22. Punch, L. et al. (1997) Opposite modulation of opiate withdrawal behaviors upon microinfusion of a protein kinase A inhibitor versus activator into the locus coeruleus or periaqueductal gray. *J. Neurosci.* 17, 8520–8527
23. Aston-Jones, G. et al. (1997) Local opiate withdrawal in locus coeruleus in vivo. *Brain Res.* 765, 331–336
24. Christie, M.J. et al. (1997) Where is the locus in opioid withdrawal? *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 134–140
25. Gold, M.S. et al. (1978) Clonidine blocks acute opiate withdrawal symptoms. *Lancet* 2, 599–602
26. Terwilliger, R.Z. et al. (1991) A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal func-

- tion. *Brain Res.* 548, 100–110
27. Bonci, A. and Williams, J.T. (1997) Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J. Neurosci.* 17, 796–803
 28. Nestler, E.J. and Aghajanian, G.K. (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278, 58–63
 29. Jentsch, J.D. et al. (2002) Stimulation of protein kinase A activity in the rat amygdala enhances reward-related learning. *Biol. Psychiatry* 52, 111–118
 30. Nestler, E.J. (2001) Molecular basis of neural plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128
 31. Guitart, X. et al. (1992) Regulation of cAMP response element-binding protein phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J. Neurochem.* 58, 1168–1171
 32. Widnell, K.L. et al. (1994) Regulation of expression of cAMP response element binding protein in the locus coeruleus in vivo and in a locus coeruleus-like (CATH.a) cell line in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10947–10951
 33. Shaw-Lutchman, T.Z. et al. (2002) Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. *J. Neurosci.* 22, 3663–3672
 34. Han, M-H. et al. (2003) Direct evidence for a role of CREB in the locus coeruleus in opiate dependence. *Soc. Neurosci. Abstr.* 29, 644.6
 35. Maldonado, R. et al. (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 273, 657–659
 36. American Psychiatric Association, (2000) Diagnostic and Statistical Manual, American Psychiatric Press
 37. Olds, M.E. (1982) Reinforcing effects of morphine in the nucleus accumbens. *Brain Res.* 237, 429–440
 38. Kuhar, M.J. et al. (1991) The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci.* 14, 299–302
 39. Koob, G.F. et al. (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron* 21, 467–476
 40. Wise, R.A. (1998) Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend.* 51, 13–22
 41. Di Chiara, G. and Imperato, A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5274–5278
 42. Everitt, B.J. and Wolf, M.E. (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J. Neurosci.* 22, 3312–3320
 43. Kelley, A.E. and Berridge, K.C. (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J. Neurosci.* 22, 3306–3311
 44. Sawin, E.R. et al. (2000) *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron* 26, 619–631
 45. McClung, C. and Hirsh, J. (1998) Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 8, 109–112
 46. Nestler, E.J. et al. (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13–25
 47. Shaham, Y. et al. (2000) Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. *Brain Res. Rev.* 33, 13–33
 48. Markou, A. et al. (1993) Animal models of drug craving. *Psychopharmacology (Berl.)* 112,

- 163–182
49. Self, D.W. et al. (1996) Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonists. *Science* 271, 1586–1589
 50. Baker, D.A. et al. (2003) Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat. Neurosci.* 6, 743–774
 51. Burns, L.H. et al. (1996) Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: implication for limbic-striatal interactions. *Behav. Neurosci.* 110, 60–73
 52. White, F.J. and Kalivas, P.W. (1998) Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend.* 51, 141–153
 53. Kalivas, P.W. and Nakamura, M. (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 223–227
 54. Volkow, N.D. and Fowler, J.S. (2000) Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb. Cortex* 10, 318–325
 55. Ortiz, J. et al. (1995) Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse* 21, 289–298
 56. Shaw-Lutchman, T.Z. et al. (2003) Regulation of CRE-mediated transcription in mouse brain by amphetamine. *Synapse* 48, 10–17
 57. Cole, R.L. et al. (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* 14, 813–823
 58. Asher, O. et al. (2002) Ethanol stimulates cAMP-responsive element (CRE)-mediated transcription via CRE-binding protein and cAMP-dependent protein kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 66–70
 59. Carlezon, W.A. Jr et al. (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* 282, 2272–2275
 60. Self, D.W. et al. (1998) Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. *J. Neurosci.* 18, 1848–1859
 61. Pliakas, A.M. et al. (2001) Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 21, 7397–7403
 62. Walters, C.L. and Blendy, J.A. (2001) Different requirements for cAMP response element binding protein in positive and negative reinforcing properties of drugs of abuse. *J. Neurosci.* 21, 9438–9444
 63. Barrot, M. et al. (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11435–11440
 64. Newton, S.S. et al. (2002) Inhibition of cAMP response element binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. *J. Neurosci.* 22, 10883–10890
 65. McClung, C.A. and Nestler, E.J. (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and *DFosB*. *Nat. Neurosci.* 11, 1208–1215
 66. Shippenberg, T.S. and Rea, W. (1997) Sensitization to the behavioral effects of cocaine: modulation by dynorphin and kappa-opioid receptor agonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 449–455
 67. Butelman, E.R. et al. (2001) GR89,696: a potent kappa-opioid agonist with subtype selectivity in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1049–1059
 68. Nestler, E.J. (1992) Molecular mechanisms of drug addiction. *J. Neurosci.* 12, 2439–2450

69. Striplin, C.D. and Kalivas, P.W. (1992) Correlation between behavioral sensitization to cocaine and G protein ADP-ribosylation in the ventral tegmental area. *Brain Res.* 579, 181–186
70. Hanson, G.R. et al. (1992) Responses of limbic and extrapyramidal neurotensin systems to stimulants of abuse. Involvement of dopaminergic mechanisms. *Ann. New York Acad. Sci.* 668, 165–172
71. Fitzgerald, L.W. et al. (1996) Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among crosssensitizing agents. *J. Neurosci.* 16, 274–282
72. Carlezon, W.A. Jr and Nestler, E.J. (2002) Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci.* 25, 610–615
73. Graybiel, A.M. et al. (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6912–6916
74. Young, S.T. et al. (1991) Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1291–1295
75. Hope, B. et al. (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5764–5768
76. Hope, B.T. et al. (1994) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13, 1235–1244
77. Chen, J.S. et al. (1995) Regulation of DFosB and FosB-like proteins by electroconvulsive seizure and cocaine treatments. *Mol. Pharmacol.* 48, 880–889
78. Chen, J. et al. (1997) Chronic Fos-related antigens: stable variants of DFosB induced in brain by chronic treatments. *J. Neurosci.* 17, 4933–4941
79. Hiroi, N. et al. (1997) FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10397–10402
80. Nye, H. et al. (1995) Pharmacological studies of the regulation of chronic Fos-related antigen induction by cocaine in the striatum and nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 1671–1680
81. Moratalla, R. et al. (1996) Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron* 17, 147–156
82. Nye, H.E. and Nestler, E.J. (1996) Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration. *Mol. Pharmacol.* 49, 636–645
83. Pich, E.M. et al. (1997) Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* 275, 83–86
84. Werme, M. et al. (2002) DFosB regulates wheel running. *J. Neurosci.* 22, 8133–8138
85. Nestler, E.J. et al. (2001) DFosB: a molecular switch for addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11042–11046
86. Kelz, M.B. et al. (1999) Expression of the transcription factor DFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401, 272–276
87. Peakman, M.C. et al. (2003) Inducible, brain region specific expression of a dominant negative mutant of c-Jun in transgenic mice decreases sensitivity to cocaine. *Brain Res.* 970, 73–86

88. Colby, C.R. et al. (2003) Striatal cell type-specific overexpression of delta-FosB enhances incentive for cocaine. *J. Neurosci.* 23, 2488–2493
89. Zachariou, V. et al. (2003) DFosB in the nucleus accumbens modulates morphine reward, tolerance, and dependence. *Soc. Neurosci. Abstr.* 29, 112.16
90. Olausson, P. et al. (2002) Enhanced incentive motivation in DFosB overexpressing mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* 28, 502–514
91. Sklair-Tavron, L. et al. (1996) Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11202–11207
92. Robinson, T.E. and Kolb, B. (1999) Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* 33, 160–162
93. Robinson, T.E. and Kolb, B. (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J. Neurosci.* 17, 8491–8497
94. Bibb, J.A. et al. (2001) Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* 410, 376–380
95. Norrholm, S.D. et al. (2003) Cocaine-induced proliferation of dendritic spines in nucleus accumbens is dependent on the activity of cyclin-dependent kinase-5. *Neuroscience* 116, 19–22
96. Berke, J.D. and Hyman, S.E. (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25, 515–532
97. Hyman, S.E. and Malenka, R.C. (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 695–703
98. Nestler, E.J. (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78, 637–647
99. Jones, S. et al. (2000) Amphetamine blocks long-term synaptic depression in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 20, 5575–5580
100. Thomas, M.J. et al. (2001) Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat. Neurosci.* 4, 1217–1223
101. Saal, D. et al. (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37, 577–582