

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA  
FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA

Ciclo XXII

**Settore scientifico disciplinare di afferenza BIO 14**

TITOLO TESI

Ruolo biologico del sistema neuropeptidergico N/OFQ-NOP  
in fenomeni di degenerazione neuronale e  
tossicodipendenza

**Presentata da: Dott.ssa CHIARA CAVINA**

**Coordinatore Dottorato**

**Chiar.mo Prof.**

**GIORGIO CANTELLI FORTI**

**Relatore**

**Chiar.ma Prof.ssa**

**PATRIZIA ROMUALDI**

**Esame finale anno 2010**

## INDICE

---

<i>RIASSUNTO</i> .....	1
1. <i>INTRODUZIONE</i> .....	4
1.1 IL SISTEMA NEUROPEPTIDERGICO N/OFQ-NOP.....	4
1.1.1 IL RECETTORE NOP.....	4
1.1.2 IL NEUROPEPTIDE NOCICETTINA .....	9
1.1.3 INTERAZIONE DEL SISTEMA N/OFQ-NOP CON ALTRI SISTEMI NEURONALI.....	20
1.2 TOSSICODIPENDENZE .....	26
1.2.1 BASI MOLECOLARI DELLE TOSSICODIPENDENZE .....	26
1.2.2 TOSSICODIPENDENZA ED ESPRESSIONE GENICA .....	27
1.2.3 BASI NEURONALI DELLE TOSSICODIPENDENZE.....	28
1.3 LA COCAINA .....	36
1.3.1 STRUTTURA DELLA COCAINA.....	36
1.3.1 MECCANISMO D'AZIONE DELLA COCAINA.....	38
1.3.3 EFFETTI DELLA COCAINA.....	41
1.3.4 TERAPIA FARMACOLOGICA.....	45
1.3.5 NOCICETTINA E COCAINA.....	46
1.4 LA MDMA.....	49
1.4.1 STORIA E DIFFUSIONE ATTUALE .....	49
1.4.2 EFFETTI DELLA MDMA SULL'UOMO.....	51
1.4.3 MECCANISMI D'AZIONE DELLA MDMA.....	52
1.4.4 EFFETTI DELLA MDMA SULL'ANIMALE DA ESPERIMENTO. ....	56
1.4.5 TOSSICITA' DELLA MDMA NELL'UOMO.....	63
1.4.6 MDMA E PARKINSON.....	66
1.5 PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE: IL MORBO DI PARKINSON..	71
1.5.1 MODELLI DI PARKINSON NELL'ANIMALE DA	



6. *DISCUSSIONE*.....104

7. *BIBLIOGRAFIA*.....111

# RIASSUNTO

---

Il sistema neuropeptidergico nocicettina/recettore NOP è coinvolto in numerose funzioni biologiche, come la trasmissione degli impulsi nocicettivi, alcuni processi cognitivi, la memoria, la funzione motoria e la gratificazione da farmaci d'abuso. A questo proposito è stato indagato il possibile coinvolgimento del sistema N/OFQ-NOP negli effetti indotti da due sostanze d'abuso quali la cocaina e la MDMA .

Da dati riportati in letteratura, emerge una stretta correlazione tra il sistema oppioide e gli effetti indotti da cocaina. Vista l'analogia della nocicettina con i peptidi oppioidi endogeni e vista la capacità della cocaina di indurre alterazioni sull'espressione genica di questi ultimi, è stata indagata l'esistenza di una relazione tra questa sostanza d'abuso e l'espressione genica del sistema N/OFQ-NOP. In particolare sono stati indagati gli effetti dell'esposizione cronica a cocaina (50 mg/Kg/die per 7 giorni) sull'espressione genica del sistema N/OFQ-NOP mediante RT-PCR nelle aree cerebrali di ratto maggiormente interessate dai fenomeni di gratificazione, tolleranza e dipendenza.

Poiché il sistema N/OFQ-NOP mostra un'elevata omologia di sequenza con i sistemi oppioidi classici, specialmente con il sistema DYN-KOP e data la presenza in letteratura di evidenze riguardo al coinvolgimento del sistema DYN-KOP negli effetti indotti dalla cocaina, allo studio dell'espressione genica del sistema N/OFQ-NOP è stata affiancata l'indagine di una possibile variazione dell'espressione genica del sistema DYN-KOP.

Nel loro insieme i risultati hanno evidenziato che la cocaina è in grado di alterare entrambi i sistemi: N/OFQ-NOP e DYN-KOP.

In particolare, nella SN tale sostanza d'abuso down-regola l'espressione genica del recettore KOP; nel NA è possibile ipotizzare che l'up-regulation del recettore NOP rappresenti un meccanismo compensatorio alla diminuzione del precursore della N/OFQ. Inoltre è molto interessante osservare che nelle medesime condizioni l'espressione della pro-dinorfina sia aumentata.

Infine, lo studio del caudato putamen laterale distinto dal mediale è stato utile per evidenziare effetti opposti esercitati dalla cocaina sulla espressione genica del recettore NOP e della pro-dinorfina.

In conclusione i dati ottenuti da questo studio sperimentale evidenziano che i sistemi neuropeptidergici N/OFQ-NOP e DYN-KOP intervengono nei meccanismi alla base degli effetti indotti dalla cocaina.

La seconda parte della ricerca ha riguardato un altro farmaco d'abuso di largo impiego: la MDMA più comunemente conosciuta come ecstasy. I potenti effetti della MDMA sul sistema serotoninergico sembrano essere i maggiori responsabili delle sue azioni, tuttavia essa interferisce anche con la trasmissione dopaminergica incrementando il rilascio di dopamina.

Studi condotti dal nostro laboratorio hanno dimostrato come anche la MDMA sia in grado di alterare l'espressione genica della prodinorfina in diverse aree cerebrali di ratto evidenziando il coinvolgimento del sistema oppioide endogeno negli effetti di tale sostanza d'abuso.

Data la relazione tra il sistema oppioide ed il sistema N/OFQ-NOP, si è quindi indagato il possibile coinvolgimento di quest'ultimo negli effetti indotti da MDMA.

Inoltre, poiché recentemente è stato ipotizzato il coinvolgimento della nocicettina nel morbo di Parkinson e data la presenza in letteratura di articoli contrastanti sui potenziali effetti terapeutici della MDMA nella stessa patologia, è stata ipotizzata una relazione della neurodegenerazione Parkinsoniana sia con il sistema neuropeptidergico N/OFQ-NOP che con i meccanismi molecolari attivati da MDMA.

Sulla base di quanto esposto, sono state valutate le variazioni della biosintesi del sistema N/OFQ-NOP in ratti trattati con MDMA e in un modello animale di Parkinson sottoposto in seguito a somministrazione di MDMA.

La MDMA è stata somministrata alla dose di 8 mg/kg (0,2 ml/100g i.p) mentre la deplezione dopaminergica è stata indotta mediante la somministrazione ICV della neurotossina MPP<sup>+</sup>.

Lo studio ha riguardato sia alcune aree del circuito dopaminergico mesolimbico quali il nucleus accumbens (NA) e l'area ventrale tegmentale (VTA), sia il midollo allungato (BS) in quanto in quest'area si trovano i corpi

neuronal dei neuroni serotoninergici, ed infine la substantia nigra (SN) e il caudato putamen (CP) in quanto componenti della via motoria nigro-striatale. Dall'analisi dei risultati, emerge che la MDMA ha effetti diversi sull'espressione genica del sistema N/OFQ-NOP a seconda dell'area cerebrale considerata. Si conferma il coinvolgimento dello stesso sistema neuropeptidergico nel modello sperimentale di Parkinson indotto con la neurotossina MPP<sup>+</sup>.

Per la prima volta si evidenzia un'azione dell'ecstasy sul sistema N/OFQ-NOP in condizioni di deplezione indotta con MPP<sup>+</sup>, azione che risulta diversa a seconda dell'area cerebrale considerata. In particolare il dato più interessante che emerge dai risultati ottenuti è l'evidenza che la dopamina esercita un tono inibitorio sui livelli di espressione genica della nocicettina nella SN e nella VTA, mentre esercita un tono eccitatorio nel CP.

Inoltre, in queste tre aree cerebrali la dopamina sembra esercitare un tono eccitatorio sui livelli del recettore NOP; al contrario nel NA la dopamina esercita un tono inibitorio sui livelli dello stesso recettore.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo studio permettono di chiarire i meccanismi molecolari tramite cui la MDMA agisce, valutando se alcuni tra questi possano essere sfruttati per scopi terapeutici in patologie neurodegenerative quali il morbo di Parkinson.

# INTRODUZIONE

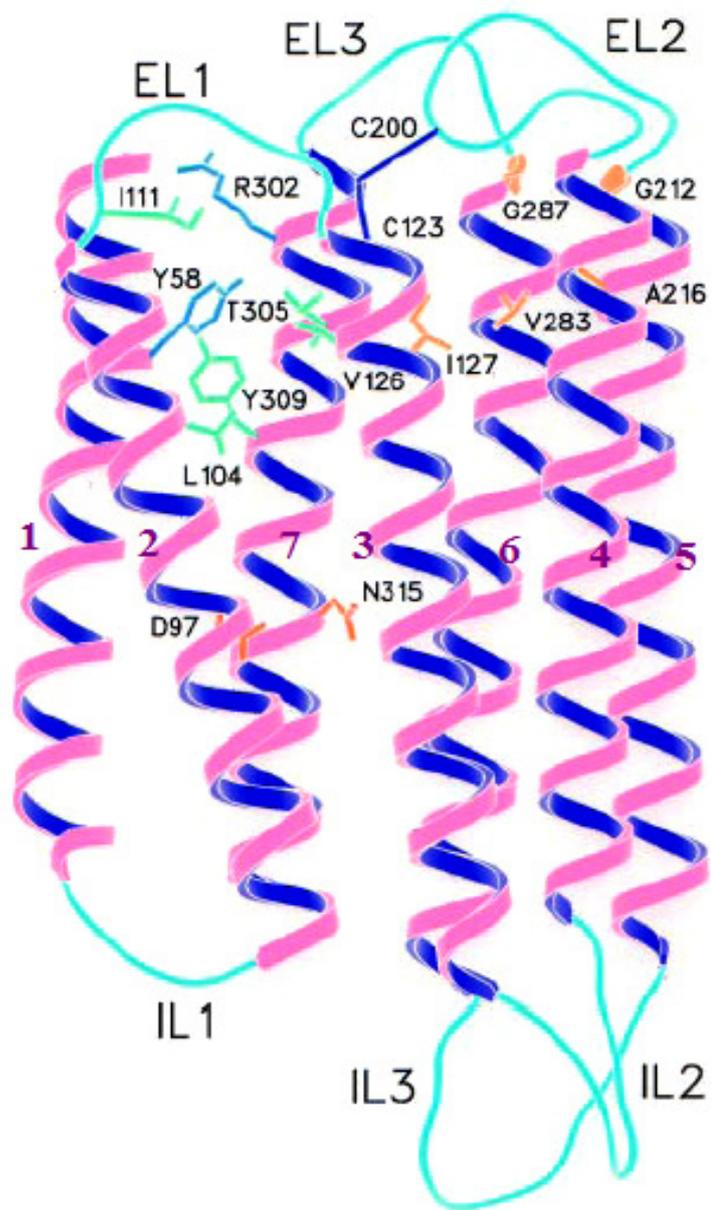
---

## 1.1 Il sistema neuropeptidergico Nocicettina/NOP

Negli ultimi anni la ricerca scientifica nel campo delle neuroscienze ha fatto importanti passi in avanti grazie alla scoperta di un nuovo neuropeptide coinvolto nella modulazione del processo nocicettivo: la nocicettina / orfanina (N/OFQ). Questo peptide è il ligando endogeno di un recettore precedentemente identificato ed inizialmente denominato “recettore orfano”. Successivamente questo recettore è stato denominato ORL-1 (Opioid Receptor-Like receptor), sulla base delle caratteristiche di sequenza, e più recentemente NOP (opioide-like nociceptin peptide receptor) proprio in seguito alla scoperta della nocicettina.

### 1.1.1 Il recettore NOP

Nell’arco di un biennio (1994-1995) due differenti gruppi di ricerca, utilizzando tecniche di biologia molecolare, hanno messo in evidenza l’esistenza di sequenze geniche codificanti per una proteina di circa 370 amminoacidi, con struttura primaria a 7 domini transmembranari (1, 2) (Fig. 1). Questo recettore, i cui geni sono stati identificati nel topo, nell’uomo (3) e nel ratto (4), presenta marcate analogie di sequenza aminoacidica con i differenti tipi di recettore per gli oppioidi (Fig. 2), ma tuttavia non è in grado di interagire efficacemente con i ligandi per tali recettori, quali la diprenorfina (5). In particolare, il confronto delle sequenze aminoacidiche del “recettore orfano” con quelle dei recettori oppioidi  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ , ha evidenziato un’identità superiore all’80% nel II, III e VII dominio transmembranario e leggermente inferiore nelle anse citoplasmatiche. Il livello di omologia risulta molto inferiore nella porzione N-terminale, nonché nella II e nella III ansa extracellulare (Fig. 3).



**Figura 1** Modello del recettore NOP. I domini transmembrana sono in *rosa e blu* mentre i loop intra-extracellulari sono in *azzurro*. L'immagine è stata ottenuta con i programmi di grafica molecolare SETOR e SETORPLOT.

```

NOP                               MESLF 5
□                               MDSSTGPGNTSDCSDPLAQASC-PA 25
K                               MESPIQIFRGEPEGPTC 16
□                               MELVPS 6

-   ^   ^   ^
NOP PAPHWEVLYGSHFQGNLSLLN[■]TVPH[■]LLLNASHSA[■]LPLGLKVTIVGLY 55
□ -GSWLNLSHVDGN-SDPCG--R-GLGGNDSLCPQTGSPSMVTAI--MA-- 75
K APSACLLPNS-SWFP-WAESDSNGSVGSEDQQLLEP-HISPAIP-I-TAV- 66
□ARAELQSSPLVNLSDAFPSAFPSAGANASGSPGARSA--A-AIA-TA-- 56

-                               *
NOP LAVCIGLLGNCLV MYVILRHTKMKTATNIYIFNLALAD[■]LVLLTLFPQG 105
□ SI--VV--F--F--V-Y-----A-ATS-----S 125
K SV-FVV--V--S--F--I-Y-----A--TT-M-----S 116
□ S--AV-----V--FG-V-Y--L-----A-ATS-----S 106
                               TM1             TM2

=   *
NOP TDILLGFWPFGNALCKTVIAI[■]YYNMF[■]STFTLTAMSVDRYVAICHPIRA 155
□ VNY-M-T---TI---I-S-----I--CT---I-V--VK- 175
K AVY-MNS---DV--I-S-----I--M---I-V--VK- 166
□ AKY-MET---ET--A-LS-----I--M---I-V--VK- 156
TM3
$                               =
NOP LDVRTS[■]KAQAVNVAIWALASVVGVPVAIMGSAQVEDEEIEC[■]EIPAPQ 205
□ -F--PRN-KI--CN-I-S-AI-L--MF-ATTKYRQGS-D-TLTFSH-T 225
K -F--PL--KII-IC--L--S--ISAIVL-GTK-REDVDVIECSLQF-D 216
□ -F--PA--KLI-IC--V--G---IMV-AVT-PR-GAVV-MLQF-S-S 206
                               TM4

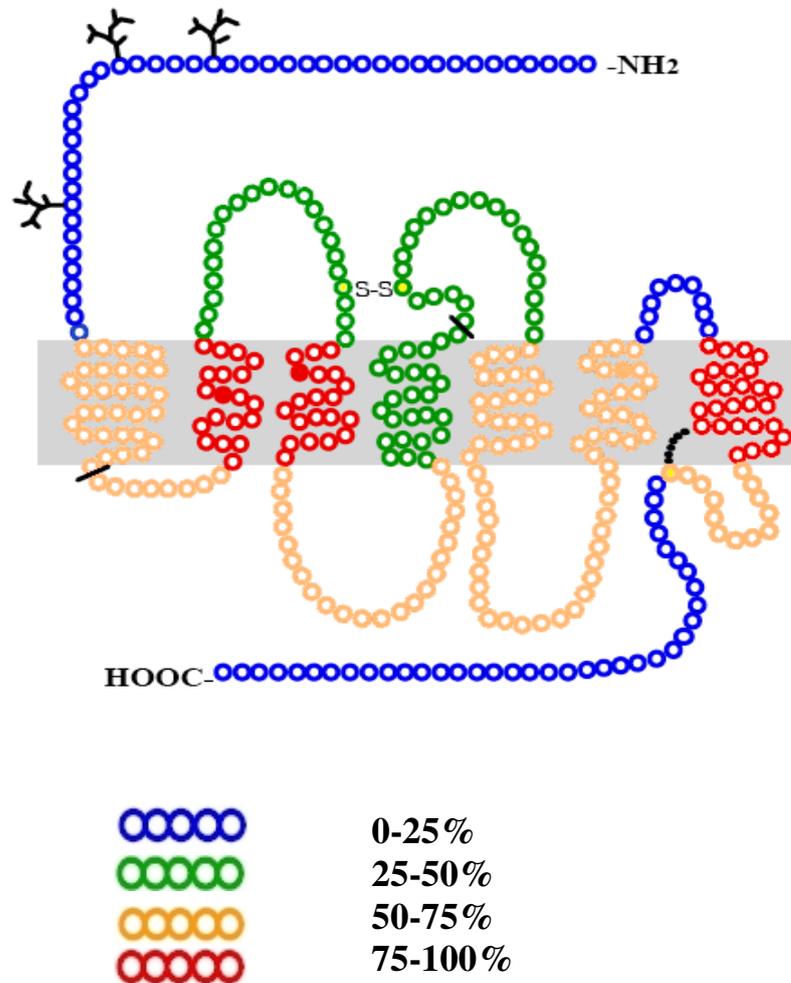
NOP DY WGPVFAICIFLFSFIIPVLIISVCYSLMIRRLRGVRLLSGSREKD 252
□ W- -ENLLK--V-I-A--M-I--T--G--L--KS--M--K-- 272
K -EYSW-DLFMK--V-V-A-V-----I--T--L--KS----- 266
□ W- -DT-TK--V--A-VV-I--T--G--LL--S-----K-- 253
TM5
°
NOP RNLRRITRLVLVVVAVFVGCWTPVQ[■]VFLVQGLGVQPGSETAVAILRF C 301
□ -----M-----IV---IHIY-IIKA-ITI-ETTFQTVSWH- - 321
K -----K-----II---IHI-I-EA--STSH-TAVLSSYY- - 315
□ -S-----M---GA--V--A-IHI--I-WT-VDINRRDPL-VAALHL- 303
                               TM6

#   $
NOP TALGYVNSCLNPILYAFL[■]NFKACFRKFC[■]SSLHREMQVSDRVRSAK 315
□ I---T---V-----R---E--IPT-STI-Q-N-T--QNTR 371
K I---T--S--V-----R--D-FPIKMRM-R-STN--NTVQ 365
□ I---A--S--V-----R--QL-RTPCGRQ-PGSLR-P-QATT 353
                               TM7

NOP DVGLGCKTSETVPRPA                               367
□ EHPSTAN-VDRTNHQLENLEAETAPL                               398
K -PASMRDVGGMNKPV                               380
□ RERVTAC-PSDG-GGGRAA                               372

```

**Figura 2** Allineamento delle sequenze del recettore NOP con quelle dei tre recettori oppioidi. (-) aminoacidi identici; i 7 domini idrofobici transmembranari sono in blu e sono indicati da (■) residui di cisteina probabilmente coinvolti in legami disolfuro; (T) residui di acido aspartico che possono interagire con gruppi amminici primari di ligandi; (^) potenziali siti di glicosilazione; (\$) potenziali siti per la PKC; (°) potenziale sito per protein-chinasi cAMP.



**Figura 3** Rappresentazione grafica dell'omologia di sequenza del recettore NOP con quella dei recettori oppioidi  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ .

Il recettore ORL-1 e il recettore oppioide  $\kappa$  mostrano un'elevata preferenza di legame rispettivamente per la nocicettina e per la dinorfina A, ma è stato recentemente osservato che recettori chimerici ORL1- recettore oppioide  $\kappa$  legano la nocicettina e la dinorfina A con elevata affinità e sono attivati dal legame dei due peptidi con la stessa efficacia (6) fornendo un'ulteriore conferma del fatto che la nocicettina e la dinorfina A legano i rispettivi recettori in maniera differente (7).

Benché esistano alcune differenze di sequenza tra le varie forme di recettore per la nocicettina isolate in differenti specie, permane tuttavia un'omologia superiore al 90%.

Gli studi relativi alla distribuzione del recettore in oggetto, ne hanno rilevato la presenza sia a livello del SNC (cervello e midollo spinale), sia in alcuni tessuti periferici. In particolare per quanto riguarda il SNC, studi di ibridizzazione in situ hanno evidenziato che i livelli più elevati di mRNA del recettore NOP compaiono nell'ipotalamo, nell'amigdala, nella corteccia piriforme, nel rafe dorsale e nel locus coeruleus. Il recettore è inoltre presente nella corteccia, nel talamo, nell'ippocampo, nella sostanza grigia periacqueduttale e nel midollo spinale (8-9-10-11). Per quanto concerne invece i tessuti periferici, il recettore NOP sembra essere presente nell'intestino, nei vasi deferenti, nel fegato e nella milza, ma non nel muscolo scheletrico, nell'esofago, nel rene, nei testicoli e nelle ghiandole surrenali (12). In contrasto con quanto noto per i recettori oppioidi, l'mRNA per il "recettore orfano" (indicando così le varie forme con cui è stato identificato il recettore per la nocicettina) non è stato ancora evidenziato a livello dello striato.

Malgrado la già citata incapacità del recettore orfano di legare ligandi oppioidi, esiste un'interessante omologia funzionale con i classici recettori  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ . Infatti, il potente agonista oppioide etorfina è in grado di diminuire l'accumulo di cAMP stimolato con forskolina in cellule CHO (Chinese Hamster Ovary) stabilmente transfettate con il gene che codifica per ORL-1 (4); tuttavia, questo avviene con concentrazioni di etorfina tre ordini di grandezza superiori a quelle necessarie per l'interazione con i recettori oppioidi.

Questi dati hanno permesso di determinare che il recettore NOP è un recettore accoppiato a proteine G di tipo inibitorio nei confronti dell'enzima adenilatociclastasi e che gli oppioidi endogeni non rappresentano i ligandi fisiologici per questo recettore. Nonostante questo però l'attivazione dei recettori oppioidi e del recettore ORL-1 determina degli effetti analoghi:

- inibizione della sintesi di cAMP (13, 14);
- chiusura dei canali del  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio dipendenti (15);
- apertura dei canali del tipo "inward rectifier" per il potassio (16);

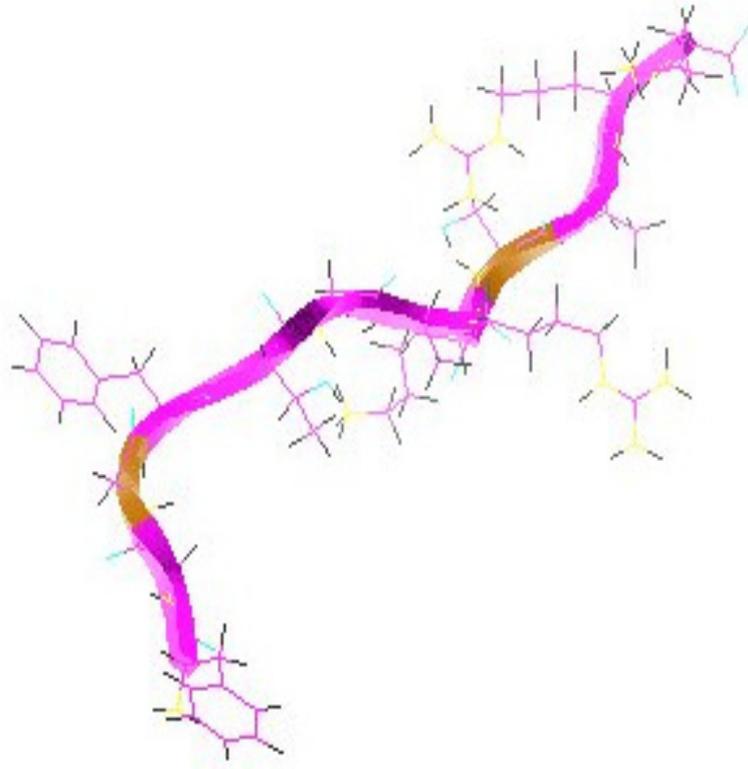
Queste analogie, sia a livello molecolare che cellulare, non si riscontrano però negli effetti farmacologici indotti da nocicettina e ligandi oppioidi, che risultano spesso essere opposti. In particolare, in contrasto con l'effetto analgesico degli agonisti oppioidi, l'attivazione del recettore ORL-1 ad opera della nocicettina causa iperalgesia (13, 14) e/o riduzione dello stress e dell'analgesia indotta da oppioidi (17).

## 1.1.2 Il neuropeptide Nocicettina

Nel 1995, due gruppi di ricerca indipendenti sono giunti all'isolamento di un agonista endogeno per il recettore orfano (13, 14) (Fig. 4). Meunier e collaboratori (13) hanno impiegato purificazioni cromatografiche successive di un estratto acido di cervello di ratto, mentre Reinscheid (14) e collaboratori hanno utilizzato l'ipotalamo di suino come materiale di partenza. Per rivelare la presenza di materiale biologico attivo nelle diverse frazioni cromatografiche, entrambi i gruppi hanno utilizzato la stessa strategia consistente nel dosaggio biologico dell'inibizione dell'accumulo di cAMP in cellule che esprimono il "recettore orfano". Il successivo sequenziamento del materiale biologico ha rivelato che la struttura di questo agonista corrisponde a quella di un eptadecapeptide strutturalmente omologo ad altri peptidi oppioidi, come la dinorfina A (Fig. 5).

Questo peptide è stato nominato nocicettina sulla base di somministrazioni intracerebroventricolari nel topo in quanto queste causano iperalgesia (13) ed orfanina FQ (14) facendo riferimento al recettore orfano di cui il neuropeptide costituisce l'agonista endogeno e agli aminoacidi N- e C-terminali, costituiti da fenilalanina e glutammina (rispettivamente F e Q nel codice a singola lettera per gli aminoacidi).

Nonostante tale omologia il recettore NOP (Fig. 6) non riconosce la maggior parte dei ligandi oppioidi e la nocicettina ha solo bassa affinità per i classici recettori oppioidi (13, 14). Ciò probabilmente è dovuto alla mancanza di un residuo di tirosina all'estremità N- terminale essenziale per il legame dei peptidi ai recettori oppioidi classici  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  (18).



**Figura 4** *Il neuropeptide nocicettina*

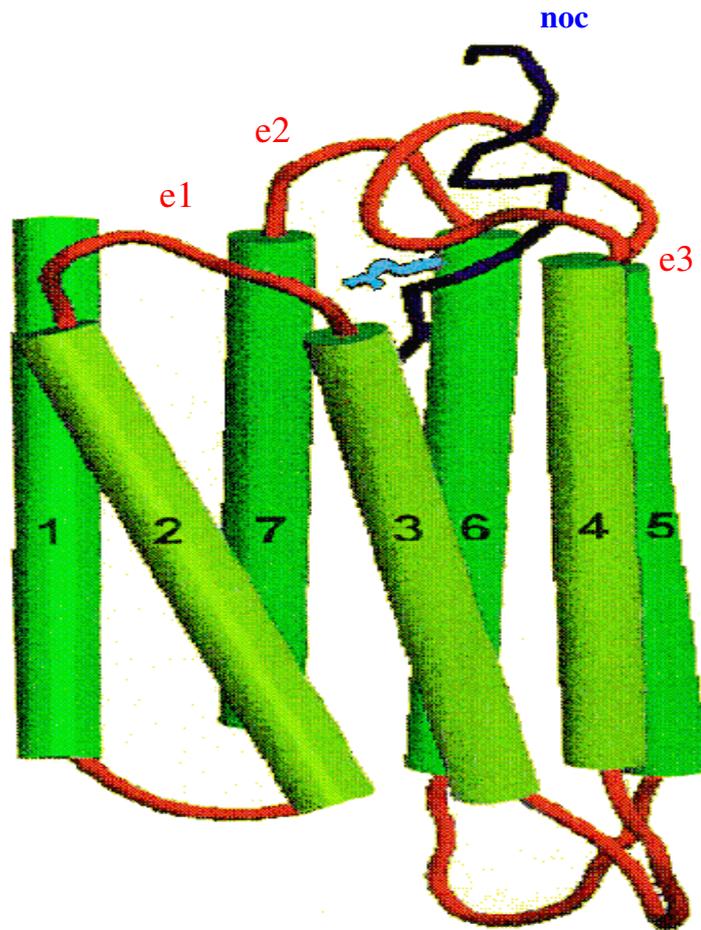
*Nocicettina* Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Le-Ala-Asn-Gln

*DinorfinaA* Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln

$\gamma$ *Endorfina* Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu

*Met-enkefalina* Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

**Figura 5:** *Sequenza aminoacidica della nocicettina confrontata con quella di alcuni peptidi oppioidi. Le omologie di sequenza e posizione sono evidenziate dai colori.*



**Figura 6.** *Rappresentazione schematica di un modello tridimensionale del complesso nocicettina / recettore NOP. Le eliche transmembranalì sono numerate a 1 a 7; e : loop extracellulari; noc : nocicettina; visibile al C-terminale dell'elica transmembranale 6 c'è la catena laterale del Gln 286 (numerazione del recettore umano). Il diagramma è stato prodotto usando il programma SETOR (4 bis).*

A seguito dell'isolamento del gene che codifica per la nocicettina, è stato possibile dedurre la sequenza del polipeptide precursore da cui essa deriva (13) (Fig. 7). Nella sequenza del precursore, la nocicettina è affiancata dall'usuale coppia di aminoacidi basici lisina-arginina ma la tirosina N-terminale è sostituita da una fenilalanina.

001 CTCTCCAGCGTGTTCAGGAGCTGTCCCGAGGACTGCCTCACCTGCCAGGAGAGGCTCCAC 060  
001 L S S V F S S C P E D C L T C Q E R L H 020

061 GCGGCTCCGGGCAGCTTCAACCTGAAGCTGTGCATCCTCCAGTGTGAAGAGAAGGTCTTC 120  
021 P A P G S F H L K L C I L Q C E E K V F 040

121 CCCGGCCCTCTCTGGACTCTTTGCACCAAAGCCATGGCCAGTGACTCTGAGCAGCTCAGC 180  
041 P R P L W T L C T K A H A S D S E Q L S 060

181 CCTGCTGATCCAGAGCTCACGTCCGGTGTCTTTACCAGTCGAAAGCCTCGGAGATGCAG 240  
061 P A D P E L T S A A L Y Q S K A S E M Q 080

241 CACCTGAAGAGAATGCCGCGTGTCCAGGAGTGTGGTGCAAGCCCGAGACGCAGAGCCTGAG 300  
81 H L KR H P R V R S V V Q A R D A E P E 100

301 GCAGATGCAGAGCCTGTGCGCAGATGAGGCCGATGAGGTGGAGCAGAAGCAGTGCAGAAA 360  
101 A D A E P V A D E A D E V E Q K Q L Q K 120

361 AGGTTTGGGGGCTTCACTGGGGCCCGGAAGTCAGCCCGGAAGTTGGCCAACCAGAAGCGG 420  
121 R F G G F T G A R K S A R K L A N Q KR 140

421 TTCAGTGAGTTTATGAGGCAGTACCTGGTCTCTGAGCATGCAGTCAAGCCAACGCCGGCGC 480  
141 F S E F H R Q Y L V L S H Q S S Q R R R 160

481 ACTCTGCACCAGAATGGTAATGTGTAGCCAGAAGGAGCCCCTCCAGCTGCACCGGCCAC 540  
161 T L H Q H G H V \* 168

**Figura 7** Sequenza nucleotidica del cDNA di ratto codificante per la pronocicettina e sequenza aminoacidica del precursore stesso. La sequenza del peptide nocicettina è sottolineata in modo continuo; due altre possibili sequenze sono sottolineate in modo tratteggiato. I riquadri indicano gli aminoacidi basici, possibili siti di taglio enzimatico.

Poco prima della nocicettina, è presente una sequenza peptidica di 35 aminoacidi corrispondente alla nocistatina (Fig. 8), un peptide non ancora completamente caratterizzato dal punto di vista farmacologico, ma che pare svolgere un'azione di antagonismo funzionale nei confronti della nocicettina stessa.

A valle della nocicettina si ritrovano invece altre due sequenze:

- una sequenza di 17 aminoacidi avente anch'essa la fenilalanina e la glutammina rispettivamente in posizione N- e C-terminale; questo peptide è stato denominato orfanina OFQ<sub>2</sub> e pare avere un ruolo nella nocicezione; tuttavia, così come la sua estensione C-terminale fino a 28 aminoacidi, manca di affinità per il recettore orfano (14).
- un peptide costituito da 8 aminoacidi, noto come CT, le cui azioni fisiologiche non sono ancora note.



**Figura 8** Sequenza schematica del precursore della nocicettina *preproNocicettina/orfaninaFQ* (*ppN/OFQ*). I colori evidenziano i diversi peptidi potenzialmente prodotti per *splicing alternativo*, durante il processo di maturazione del precursore.

Gli studi compiuti per indagare le relazioni struttura-attività della sequenza aminoacidica della nocicettina, hanno rivelato che la nocicettina [1-13] è il frammento più corto in grado di mantenere la completa attività biologica (19, 20, 21) mentre l'affinità cala drasticamente con i frammenti nocicettina [1-11] e nocicettina [1-7], (20, 22). Risultati simili sono stati ottenuti in vitro per quanto riguarda l'attività biologica di tali frammenti (23). Inaspettatamente, anche la nocicettina [6-17] e nocicettina [12-17] mostrano un'elevata affinità per il recettore NOP (2, 23).

Queste osservazioni, nel loro insieme, indicano che la porzione significativa della nocicettina, sia per quanto riguarda il riconoscimento sia l'attivazione del suo recettore, è quella interna molto basilica.

Tutto ciò suggerisce che, nonostante l'omologia strutturale di NOP con i recettori oppioidi e dei peptidi oppioidi con la nocicettina, quest'ultima non

sembra legarsi al suo recettore nello stesso modo in cui la dinorfina A lega i recettori oppioidi. In particolare, l'evidenza di un'affinità della nocicettina (2, 4, 23) per NOP indica che la teoria del "message-address", finora utilizzata per i peptidi oppioidi, potrebbe non essere applicabile in questo caso (25). Infatti, se la fenilalanina della nocicettina viene sostituita con una tirosina (come negli oppioidi classici) il neuropeptide da ligando selettivo per NOP diventa ligando oppioide non selettivo (26) anche se questo aspetto è in realtà ancora oggetto di discussione (27, 28).

A livello del S.N.C., la distribuzione di questo eptadecapeptide sembra essere più limitata rispetto a quella del suo recettore. In particolare, la nocicettina è presente nell'area preottica, nel setto, nell'amigdala e nell'eminenza mediana; invece, bassi livelli del peptide sembrano presenti in numerose aree in cui il recettore risulta altamente espresso, come ad esempio nella corteccia, nel nucleo soprachiasmaottico, nei nuclei sopraottico, paraventricolare e ventromediale dell'ipotalamo e nel rafe dorsale (25); infine, livelli elevati sono stati riscontrati negli strati superficiali delle corna dorsali del midollo spinale, nel complesso trigeminale ed in altre aree coinvolte nella trasmissione del dolore, come la sostanza grigia periacqueduttale (29, 30).

### **1.1.2.1 Effetti farmacologici della nocicettina**

Le risposte evocate dalla nocicettina a livello cellulare sono simili a quelle ottenute da altri agonisti di recettori appartenenti alla superfamiglia a 7 domini transmembranari ed accoppiati alle proteine  $G_i / G_o$ . Tuttavia è opportuno ricordare che, in mancanza di antagonisti nei confronti del recettore orfano, le sole azioni della nocicettina finora attribuibili con certezza all'interazione con NOP, sono solamente quelle osservate in cellule transfettate con questo recettore, mentre quelle in tessuti neuronali non transfettati il coinvolgimento di questo recettore è da considerarsi tutt'oggi solo come probabile. In cellule transfettate, la nocicettina inibisce marcatamente l'enzima adenilatociclastasi (13, 14) stimolato con forskolina e determina l'apertura del canale del  $K^+$  del tipo "inward rectifier" (31). Quest'ultima azione sui canali

del  $K^+$  è stata osservata anche nel rafe dorsale, locus coeruleus e sostanza grigia periacqueduttale (15, 16, 32).

Inoltre in linee cellulari derivanti da neuroblastoma umano, la stimolazione di NOP da parte della nocicettina determina una riduzione dell'accumulo di cAMP stimolato dalla forskolina (33).

Il neuropeptide è inoltre in grado di inibire l'entrata di  $Ca^{2+}$  attraverso i canali voltaggio-dipendenti in colture cellulari SH-SY5Y (15) ed in colture di neuroni piramidali ippocampali (34). L'inibizione di canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio-sensibili a livello ippocampale coinvolge le proteine  $G_i$  dal momento che è prevenuto da un pretrattamento con tossina della pertosse e coinvolge più tipi di canali per il  $Ca^{2+}$  (di tipo N, L e P/Q).

A livello del SNC è stato osservato che la nocicettina inibisce, con meccanismi ancora da chiarire, sia la liberazione di glutammato che di GABA dai terminali nervosi (32, 35).

Per quanto riguarda la periferia, la nocicettina è in grado di bloccare la liberazione di acetilcolina causata dalla stimolazione luminosa nella retina di coniglio (36).

Relativamente al sistema nervoso simpatico, questo neuropeptide è in grado di bloccare efficacemente la trasmissione neuromuscolare nel vas deferens di ratto, coniglio (37) e topo (38, 23).

In relazione al sistema parasimpatico, alcuni risultati indicano (39) che la nocicettina è in grado di inibire parzialmente la liberazione di acetilcolina da terminazioni nervose a livello della trachea. Inoltre si è osservato che la nocicettina determina effetti bradicardici ridotti da vagotomia. Questo dimostra che la nocicettina è in grado di aumentare l'attività parasimpatica a livello cardiaco (40).

Riguardo gli effetti a carico della trasmissione nocicettiva, le stesse indagini che hanno condotto all'isolamento e caratterizzazione di questo peptide (13, 14) hanno anche evidenziato come la sua somministrazione intracerebroventricolare nel topo produca un abbassamento della soglia nocicettiva sia nel test della piastra calda (13), sia in quello del "tail-flick" (14). Inoltre, la natura pro-nocicettiva del neuropeptide, sembra ulteriormente avvalorata dall'osservazione che, riducendo l'espressione del recettore orfano,

mediante la somministrazione di oligonucleotidi antisenso per NOP, si ottiene un effetto opposto, vale a dire un innalzamento della soglia nocicettiva (23).

Tuttavia, con il procedere degli studi effettuati, il quadro generale delle azioni prodotte dalla nocicettina a carico della trasmissione nocicettiva si è rivelato più complesso. Somministrazioni intracerebroventricolari di nocicettina provocano stress nell'animale determinando così il rilascio di peptidi oppioidi endogeni centrali, il cui effetto viene contrastato dalla dose somministrata di nocicettina che svolge quindi un'azione anti- oppioide o iperalgesica. Il sito neuroanatomico per questa azione anti- oppioide della nocicettina è la parte rostroventromediale del tronco dell'encefalo dove si trovano due differenti tipi cellulari : le cellule "on" e le cellule "off" (41, 42). Le cellule "on" inibiscono l'azione delle cellule "off" e vengono a loro volta inibite dall'attivazione da parte della morfina dei recettori  $\mu$ . Le cellule "off" proiettano sulle corna dorsali spinali riducendo l'ascesa dell'informazione nocicettiva lungo i neuroni di terzo ordine del tratto spino-talamico. Quando la morfina inibisce le cellule "on", le cellule "off" sono libere di dare l'effetto antinocicettivo. La nocicettina invece inibisce sia le cellule "on" sia le "off" determinando così un aumento della trasmissione nocicettiva. Ovviamente l'inibizione delle cellule "off" andrà a revertire ogni azione degli oppioidi endogeni o esogeni sulle cellule "on" spiegando così quella che viene definita l'azione anti- oppioide della nocicettina (42, 43, 44).

L'azione esercitata dalla nocicettina a livello spinale è invece opposta in quanto determina un effetto antinocicettivo (45, 46).

E' stato osservato che la nocicettina è in grado di diminuire la liberazione di tachichinine a livello del terminale periferico di neuroni afferenti primari con un'azione non modificata dal naloxone (47). Questi risultati, oltre ad indicare che la nocicettina può essere efficace nel sopprimere i fenomeni infiammatori neurogeni (che comportano cioè liberazione di tachichinine), suggerisce anche che la stessa azione di inibizione di neurotrasmettitori possa verificarsi anche a livello delle terminazioni centrali delle medesime fibre afferenti primarie, vale a dire nel midollo spinale.

Gli effetti evocati da questo neuropeptide sull'attività locomotoria, risultano ancora controversi. Infatti, mentre alcuni gruppi hanno osservato una diminuzione, alcuni dati depongono a favore di un incremento della

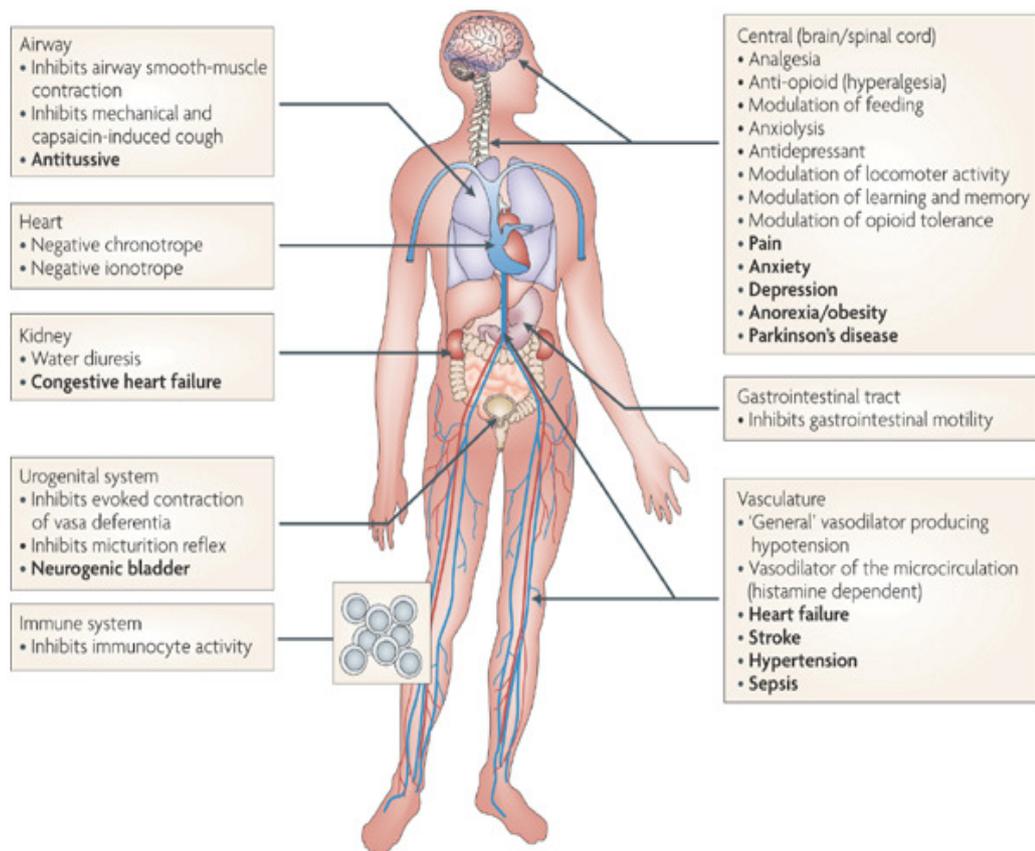
locomozione a seguito di somministrazioni intracerebroventricolare di basse dosi del peptide (48).

Per quanto riguarda l'attività motivazionale, la nocicettina non sembra produrre effetti gratificanti o avversivi (49), benché nel nucleo accumbens sia stata dimostrata la presenza di alti livelli di mRNA per il suo recettore e che il peptide sia in grado di diminuire la liberazione di dopamina nello stesso nucleo (50). Infatti è noto da tempo che il nucleus accumbens è implicato in numerose funzioni che includono il rinforzo, la gratificazione da farmaco e il comportamento locomotore (51). I ratti hanno dimostrato di sviluppare tolleranza agli effetti locomotori indotti da nocicettina (52). Recenti risultati hanno suggerito che la nocicettina sia in grado di sopprimere l'attività delle vie di gratificazione dopaminergiche del sistema mesocorticolimbico, non producendo tuttavia, come già accennato, né avversione, né preferenza, nei test di place preference. Tuttavia, in studi più recenti sempre riguardanti test di scelta condizionata, la nocicettina si è dimostrata capace di modificare in senso inibitorio condizioni di preferenza indotte da altre sostanze, quali alcool e morfina (53). È stato recentemente osservato che l'uso cronico di alte dosi di morfina accelera la liberazione e la biosintesi di nocicettina nel cervello di ratto per antagonizzare l'effetto degli oppioidi. Questo effetto sembra che possa giocare un ruolo nello sviluppo della tolleranza alla morfina. È stato inoltre suggerito che la nocicettina possa servire come controllo a feed-back negativo ritardato sull'analgesia oppioide (54, 55).

Alcuni risultati indicano che la nocicettina diminuisce l'attività dei neuroni dopaminergici mesocorticolimbici attraverso un'azione nell'area ventrale tegmentale (VTA). Quest'effetto, non solo è transitorio, ma dimostra anche rapida tolleranza e quindi è insufficiente a prevenire lo sviluppo di sensibilizzazione alla cocaina. La capacità del peptide di indurre sensibilizzazione alla cocaina quando somministrato da solo, nonostante i suoi effetti inibitori acuti, è unica e richiede ulteriori studi per delucidare i meccanismi responsabili (56).

Un comportamento di rinforzo influenzato dal nucleus accumbens e dall'ipotalamo è quello della nutrizione. È stato dimostrato un chiaro aumento nell'effetto centrale gratificante delle sostanze d'abuso negli animali sottoposti a restrizione di cibo (57). Più recentemente è stato dimostrato che

somministrazioni di nocicettina nel nucleo ipotalamico ventromediale o nel nucleus accumbens, aumentano l'assunzione di cibo nei ratti (58). Il ruolo della nocicettina nella stimolazione del comportamento di alimentazione è sostenuto, inoltre, da un recente studio che dimostra una riduzione dell'iperfagia, indotta da nocicettina, in seguito ad una somministrazione centrale di una sonda antisenso nei confronti di NOP (59).



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figura 9** Effetti farmacologici e fisiologici della nocicettina

Negli studi citati si è ravvisata più volte la necessità di disporre di nuove molecole, possibilmente di natura non peptidica, in grado di attivare selettivamente (agonisti) o di bloccare (antagonisti) il recettore NOP.

Per quel che riguarda gli agonisti sono stati identificati numerosi peptidi che derivano da modificazioni a livello di specifici aminoacidi della nocicettina (60). Tra gli agonisti di natura non peptidica citiamo la buprenorfina, un agonista della Roche (derivato 8-sostituito-1,3,8 triazaspiro[4,5]-decan-4-one del composto J-113397) (60) e, lo ZP120 (61).

Al fine di dimostrare in maniera definitiva che gli effetti della nocicettina sono prodotti dalla sua interazione con il recettore NOP, più utile risulta disporre di antagonisti puri e selettivi per il recettore NOP. A tale scopo, al momento, vengono principalmente impiegate alcune molecole che possono antagonizzare il recettore NOP, anche se nessuna di esse ha dimostrato di avere proprietà di selettività e antagonismo puro necessarie a fornire risultati chiari. Tali composti sono:

- Il Naloxone benzoilidrazone (NalBzOH), un ligando dei recettori oppioidi non selettivo che è stato osservato essere in grado di bloccare in maniera competitiva alcuni effetti della nocicettina, con bassa potenza ( $pA_{2} \cong 6.0-6.5$ ) (22, 62, 63). Tuttavia questo farmaco non è ideale poiché possiede affinità anche per i recettori oppioidi  $\kappa$  e  $\mu$ , ed inoltre svolge nei confronti di tali recettori un'azione mista agonista-antagonista, in particolare si comporta come agonista nei confronti del recettore  $\mu$ . Tale effetto può essere antagonizzato dalla presenza di naloxone, tuttavia l'impiego di tale sostanza può dimostrarsi inappropriato in studi sugli effetti farmacologici della nocicettina, poiché, pur avendo bassa affinità per il recettore NOP, in alcuni saggi in vivo si è dimostrata essere un antagonista indiretto degli effetti prodotti dalla nocicettina (64).
- la  $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{-NH}_2)\text{Gly}^2]\text{nocicettina}[1-13]\text{NH}_2$ , anche detta  $[\text{F/G}]\text{NC}[1-13]\text{NH}_2$ , uno pseudopeptide selettivo per il recettore NOP, rispetto ai recettori oppioidi  $\delta$  e  $\kappa$  (65), ma non rispetto al recettore  $\mu$ , in quanto il suo fattore di selettività nei confronti di tale recettore è inferiore a 100 (66). Questo composto è stato visto comportarsi come antagonista selettivo del recettore NOP in uno studio in vitro sul vas deferens di topo e sull'ileo di cavia stimolati elettricamente (65). Tuttavia, da allora, molti studi, sia in vivo che in vitro, sono stati

pubblicati sull'azione di questo pseudo peptide, dimostrando che esso in realtà può agire come antagonista, agonista parziale (67) o agonista pieno a seconda delle preparazioni.

- la [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin[1-13]NH<sub>2</sub>, un peptide di recente scoperta che sembra aver dimostrato un'attività come antagonista puro in vari saggi in vivo ed in vitro (68, 69). Tuttavia recentissimi studi in vivo hanno prodotto risultati contrastanti, che vedono tale composto agire come agonista parziale.
- il J-113397, un potente antagonista selettivo nei confronti del recettore NOP con struttura chimica strutturalmente non correlata alla nocicettina (70).
- la [Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]nociceptin-NH<sub>2</sub> (UFP-101), un peptide di recente scoperta, potente e selettivo antagonista del recettore NOP, attivo sia in vitro che in vivo. Ha mostrato di possedere effetti antinocicettivi e di prevenire la depressione dell'attività locomotoria e gli effetti nocicettivi indotti dalla nocicettina (71).

## **1.1.3 Interazione del sistema nocicettina/NOP con altri sistemi neuronali**

### ***1.1.3.1 Sistema noradrenergico***

Molti studi hanno dimostrato che la nocicettina è in grado di inibire la liberazione di noradrenalina in fettine di corteccia cerebrale di ratto, topo e cavia (62, 72, 73) ed in fettine di ippocampo e ipotalamo di topo (74). Ciò è in accordo anche con la distribuzione del recettore NOP, che viene espresso in varie regioni cerebrali ricche di fibre noradrenergiche, quali l'ippocampo, il tratto del nucleo solitario e il nucleo reticolare laterale (75). In particolare, la presenza del recettore NOP in alcune formazioni ippocampali è stata messa in relazione con un possibile coinvolgimento del recettore NOP nei processi cognitivi e nella memoria.

### ***1.1.3.2 Sistema dopaminergico***

Studi in vitro su fettine di corteccia cerebrale di topo, hanno dimostrato che la nocicettina inibisce la liberazione di dopamina (73).

Studi in vivo hanno mostrato che la nocicettina, somministrata per via intracerebroventricolare (50), oppure mediante sonde di microdialisi direttamente nell'area ventrale tegmentale (76), riduce il rilascio di dopamina nel nucleus accumbens di ratti anestetizzati. Altri studi in vivo hanno al contrario dimostrato che la nocicettina, somministrata per via intracerebroventricolare, di per sé non è in grado di modificare la liberazione di dopamina nel nucleus accumbens e nel nucleo caudato, ma previene l'aumento della liberazione di dopamina, provocato dalla morfina somministrata per via sistemica, sia nel nucleus accumbens che, in misura minore, nel nucleo caudato (77, 78). L'inibizione delle fibre mesocortico- limbiche dopaminergiche da parte della nocicettina ben si accorda con altre osservazioni sperimentali che la vedono coinvolta nei meccanismi di gratificazione, cognitivi e della motilità, che trovano sede principale proprio nel sistema mesocortico- limbico (75).

Infine degli studi in vivo hanno dimostrato che la nocicettina, somministrata mediante una sonda da microdialisi direttamente nello striato di ratti non anestetizzati, è in grado di aumentare la liberazione di dopamina in maniera naloxone sensibile (79). Questo ruolo facilitatorio della nocicettina sui neuroni dopaminergici nigro-striatali è in perfetto accordo con studi di distribuzione funzionale del recettore NOP, che lo vedono espresso nelle proiezioni nigro-striatali implicate nella coordinazione del movimento (75).

### ***1.1.3.3 Sistema serotoninergico***

La nocicettina è in grado di inibire la liberazione di serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) da sinaptosomi (69), da fettine della corteccia di ratto (72, 80) e da fettine di corteccia di topo (81). Tutto ciò è stato messo in relazione con l'azione ansiolitica di cui il recettore NOP e la nocicettina sembrano essere responsabili (69). Infatti la nocicettina e il suo recettore sono localizzati anche in aree cruciali per il controllo dell'umore come amigdala, ippocampo, talamo e corteccia cerebrale (82). Attualmente il meccanismo d'azione che sottende all'azione ansiolitica della nocicettina non è ancora chiaro: secondo alcuni studiosi è ascrivibile alla modulazione della serotonina (83), per altri all'antagonismo nei confronti del fattore per il rilascio di corticotropina (CRP) (84) e per altri ancora all'azione sul recettore GABA<sub>A</sub> (85).

Inoltre recenti studi hanno dimostrato che il sistema nocicettina/recettore NOP antagonizza l'effetto analgesico indotto dal paracetamolo e ciò sembra essere dovuto proprio all'abbassamento dei livelli di serotonina da parte della nocicettina (86).

### ***1.1.3.4 Sistema oppioide endogeno***

Dal punto di vista molecolare, basandosi su criteri genetici, non vi è alcun dubbio che il recettore NOP e i recettori oppioidi appartengano alla stessa famiglia e che i precursori dei loro ligandi endogeni, rispettivamente la nocicettina e i neuropeptidi oppioidi, possiedano un'elevata omologia sotto il profilo genetico.

Tuttavia, dal punto di vista funzionale, il recettore NOP non è un recettore oppioide: non lega i ligandi dei recettori oppioidi con elevata affinità e, cosa ancor più importante, gli effetti farmacologici da esso mediati sono per lo più insensibili agli antagonisti dei recettori oppioidi.

Inoltre, la nocicettina non è un peptide oppioide: non lega i recettori oppioidi con elevata affinità e gli effetti farmacologici da essa mediati sono insensibili agli antagonisti dei recettori oppioidi.

La marcata analogia strutturale tra il recettore NOP e i recettori oppioidi (specialmente il recettore  $\kappa$ ) e tra la nocicettina e i peptidi oppioidi (in

particolare la dinorfina A) non è però riflessa sul piano anatomico, poiché la nocicettina e i peptidi oppioidi sembrano essere localizzati in circuiti neuronali separati.

Inoltre, la nocicettina ha in comune con i peptidi oppioidi la stessa via di trasduzione del segnale mediata da proteine G, in particolare stimolano entrambi correnti di  $K^+$  “outward” e/o inibiscono canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio dipendenti, tramite i quali riducono l'efficacia sinaptica. Tuttavia, nonostante questa sia la stessa via di trasduzione del segnale dei recettori oppioidi, essa può dar luogo ad effetti opposti. Infatti la morfina, sopprimendo l'inibizione tonica operata dal GABA nell'area ventrale tegmentale sulle fibre dopaminergiche mesocorticolimbiche, diminuisce l'attività di tali neuroni, al contrario la nocicettina è in grado di antagonizzare tale effetto aumentando l'attività dei neuroni gabaergici (87, 88). Nella linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, la via di trasduzione del segnale mediata da cAMP e proteine kinasi A, riduce i livelli di mRNA che codificano per il recettore oppioide  $\mu$ , ma non ha significativi effetti sulla biosintesi del recettore NOP (89).

Infine, non sorprende che il profilo farmacologico in vivo della nocicettina differisca in molti aspetti e in alcuni addirittura si opponga a quello dei peptidi oppioidi.

Quindi se sotto il profilo genetico il sistema nocicettina/recettore NOP appartiene alla stessa famiglia dei sistemi recettoriali oppioidi, sotto il profilo farmacologico-funzionale si comporta come un sistema anti-oppioide.

### ***1.1.3.5 Sistema gabaergico***

La nocicettina non è in grado di modulare la liberazione di GABA (acido  $\gamma$ -amminobutirrico) in sinaptosomi di corteccia cerebrale di ratto. Tuttavia studi in vivo hanno dimostrato che essa è in grado di aumentare i livelli di GABA nell'area ventrale tegmentale (76). Tutto ciò è correlabile con la capacità della nocicettina di diminuire la liberazione di dopamina nel nucleus accumbens quando somministrata tramite sonde da microdialisi nell'area ventrale tegmentale. Infatti i neuroni gabaergici e glutammatergici presenti nell'area ventrale tegmentale sono in grado di modulare in senso inibitorio le fibre dopaminergiche che dall'area ventrale tegmentale proiettano al nucleus accumbens (76, 78).

In conclusione, è possibile affermare che il recettore NOP è presente in strutture cerebrali che non sono associate con singole funzioni fisiologiche o con singoli sistemi neurotrasmettitoriali, bensì in aree coinvolte in vari processi, come il dolore e la percezione sensoriale, la memoria, lo stress, la motilità, la regolazione endocrina, la gratificazione. Questa distribuzione ampia può riflettersi nel coinvolgimento del recettore NOP in un grande numero di risposte fisiologiche, o, più probabilmente il recettore NOP contribuisce, come anche altri sistemi, all'omeostasi generale modulando contemporaneamente diversi circuiti neuronali. Ciò può spiegare perché l'eliminazione del gene per il recettore NOP nei topi (topi knock-out) non ha che un lieve impatto (90) sulle citate funzioni fisiologiche ed anche perché gli effetti farmacologici della nocicettina siano talvolta contraddittori.

### ***1.1.3.6 Sistema glutammatergico***

In studi in vitro la nocicettina inibisce la liberazione di glutammato in fettine di corteccia di ratto (34), ma non è in grado di modularla in sinaptosomi provenienti dalla medesima area cerebrale (81).

In vivo, al contrario, la nocicettina aumenta la liberazione di glutammato nell'area ventrale tegmentale e ciò è stato messo in relazione con i risultati ottenuti da esperimenti simili nel nucleus accumbens con la dopamina e nell'area ventrale tegmentale con il GABA.

L'interazione del sistema recettoriale nocicettina/recettore NOP con il sistema glutammatergico è stata messa in evidenza anche da studi che hanno dimostrato l'effetto proepilettico di tale neuropeptide.

## **1.2 TOSSICODIPENDENZE**

La tossicodipendenza viene definita come un disturbo comportamentale la cui caratteristica essenziale consiste nella perdita del controllo da parte di un individuo in seguito all'assunzione di una sostanza, detta farmaco d'abuso. Questo disturbo comportamentale si sviluppa nel corso di somministrazioni ripetute della sostanza e può persistere per mesi o anni anche dopo l'interruzione della somministrazione. La ricerca della sostanza acquista rapidamente un carattere compulsivo e l'interruzione brusca dell'assunzione può causare sintomi negativi (psicologici o fisici) che culminano molto spesso in una "ricaduta".

La tossicodipendenza può essere considerata, da un punto di vista neurobiologico, come una forma di plasticità sinaptica indotta dalla sostanza d'abuso. Da un punto di vista neurochimico può essere descritta come un insieme di adattamenti "farmaco-dinamici" (tolleranza e sensibilizzazione) delle trasmissioni sinaptiche nei confronti delle azioni farmacologiche della sostanza stessa. Infine, da un punto di vista cognitivo, è considerabile come un disturbo della capacità decisionale, unito ad una ipersensibilità nei confronti della gratificazione indotta dalla sostanza.

### **1.2.1 Basi molecolari delle tossicodipendenze**

La tossicodipendenza, in quanto fenomeno biologico, risulta dalle modificazioni cellulari e molecolari indotte in specifiche aree del cervello dalla sostanza d'abuso.

L'elevata stabilità dei cambiamenti indotti dal farmaco d'abuso nel cervello suggerisce, nel corso di somministrazioni ripetute, l'entrata in gioco di una riorganizzazione persistente del pattern di espressione genica. Tale modificazione viene attivata direttamente o indirettamente dall'assunzione della sostanza e culmina nei fenomeni di adattamento neuronale necessari per l'instaurarsi della tossicodipendenza.

In termini generali, si può affermare che l'evento fondamentale che avvia questa riorganizzazione dell'espressione genica sia l'attivazione di particolari

vie di trasduzione del segnale intracellulare (cAMP, Ca<sup>++</sup>, MAPK) e la conseguente attivazione di fattori di trascrizione (CREB, DARPP).

## 1.2.2 Tossicodipendenza ed espressione genica

L'alterazione dell'espressione genica procede in seguito alla stimolazione di una cascata cellulare secondo una cinetica che per alcuni geni può essere ben individuata e seguita in maniera molto precisa (91).

Solitamente, all'attivazione del primo fattore di trascrizione, dipendente dalla stimolazione di una data cascata intracellulare, segue l'espressione di un insieme di geni detti "immediati-precoci" (*Immediate-Early Genes*, IEGs). Gli IEGs hanno un picco d'espressione immediatamente dopo lo "stimolo" extracellulare costituito dal farmaco d'abuso stesso o da un'alterazione nella neurotrasmissione e sono costituiti essenzialmente da altri fattori di trascrizione (c-Fos) che inducono a loro volta l'espressione di altri geni detti precoci e poi tardivi (*Early e Late genes*, Es, Ls) (92).

In generale, per la progressione attraverso le varie popolazioni di geni, è necessario che lo stimolo sia sostenuto nel tempo come si verifica nel caso di assunzione cronica di un farmaco d'abuso (93).

La trascrizione dei vari fattori di trascrizione può essere regolata con un meccanismo a feedback negativo che consente di spegnere l'intero processo, a meno che non vi sia una stimolazione continua della via che ne sostenga l'attivazione; ciò, per l'appunto, succede in caso di abuso di una determinata sostanza (94).

Tra gli IEGs sono stati evidenziati, oltre a fattori di trascrizione, anche subunità recettoriali, proteine per il traffico vescicolare e neuropeptidi.

Tra i geni *Late* si trovano proteine del citoscheletro e fattori trofici che si reputano responsabili delle modificazioni strutturali delle sinapsi sottostanti ai cambiamenti duraturi della funzione (95).

## **1.2.3 Basi neuronali delle tossicodipendenze**

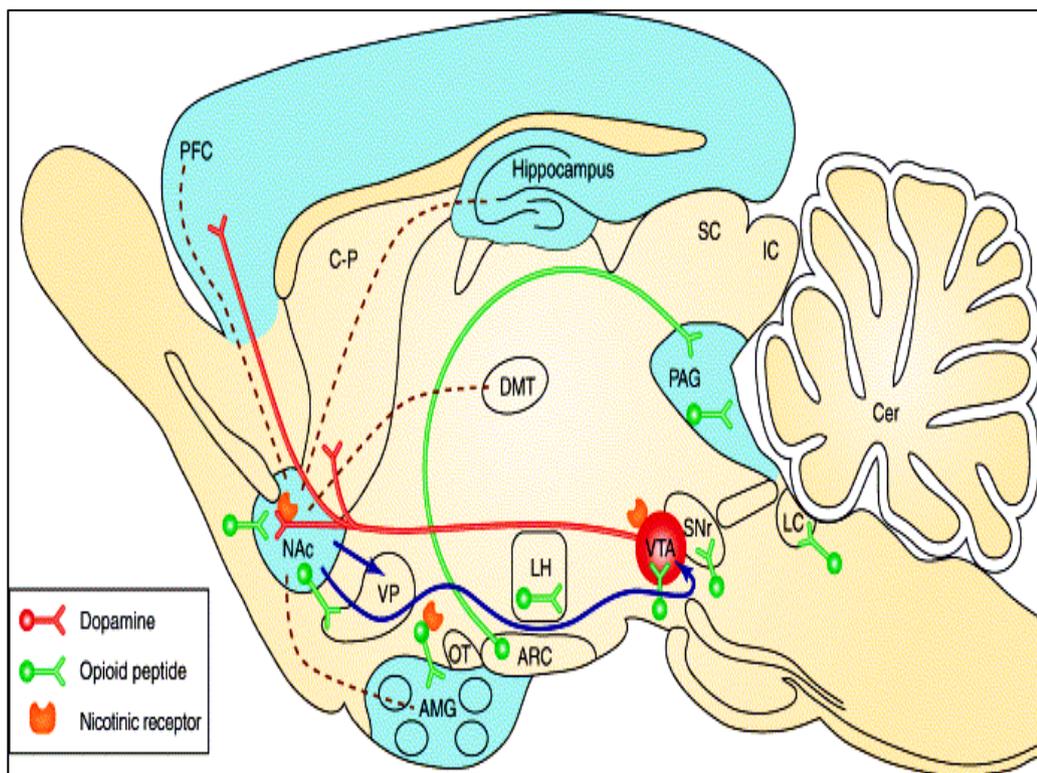
### **1.2.3.1 Il circuito della ricompensa**

I farmaci d'abuso causano dipendenza agendo principalmente sul sistema mesocorticolimbico che comprende un insieme di neuroni traenti origine dall'area ventrale tegmentale nel mesencefalo e proiettanti, soprattutto, nel nucleus accumbens, nella corteccia prefrontale, nel tubercolo olfattivo, nell'amigdala e nell'area del setto.

Il maggiore sistema di conduzione afferente ed efferente tra queste aree cerebrali, ed altre come l'ipotalamo, è costituito da un insieme complesso di fibre neuronali ad elevata densità dopaminergica (96). La caratteristica più importante, comune a tutte le sostanze d'abuso, è quella di indurre gratificazione; in altri termini, all'assunzione della sostanza consegue un "rinforzo positivo" che si traduce nella tendenza a ripetere l'esperienza.

E' stato ampiamente dimostrato che il circuito della gratificazione, o ricompensa, è costituito dalla via dei neuroni dopaminergici che dall'area ventrale tegmentale (VTA) proiettano le loro terminazioni nervose nel nucleo accumbens (NA), proseguendo poi verso la corteccia prefrontale (PFC) (97) (Fig. 10).

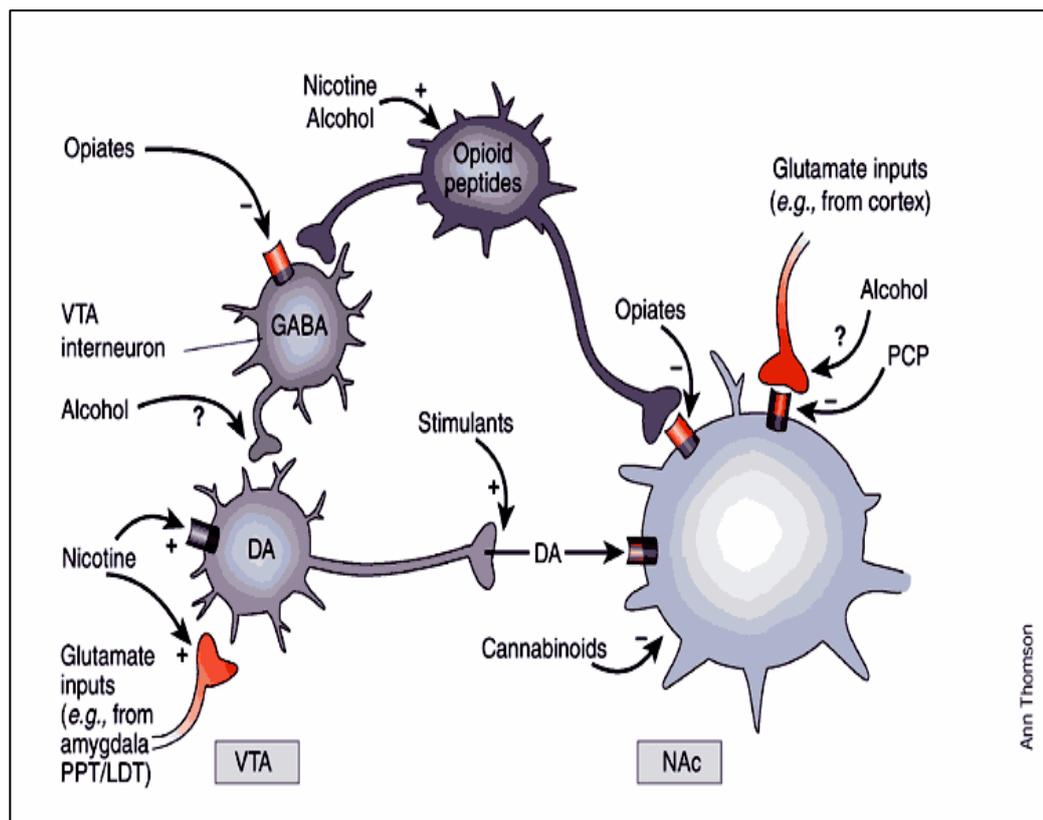
La prima evidenza che il nucleus accumbens fosse cruciale per la gratificazione venne da uno studio di autostimolazione intracraniale. Il protocollo sperimentale di questo esperimento prevedeva l'impianto di un elettrodo in zone specifiche dell'encefalo di ratto e l'erogazione di miniscariche elettriche quando l'animale, sveglio e libero di muoversi, premeva una leva. Si osservò che, solo quando l'elettrodo veniva impiantato in modo da stimolare elettricamente il NA, l'animale dava luogo ad autosomministrazione delle scariche. Successivamente venne evidenziato il ruolo della dopamina come mediatore di questo processo tramite un esperimento simile al precedente in cui l'animale, però, era in grado di autosomministrarsi una soluzione di neurotrasmettitori talmente diluita che la loro diffusione poteva essere considerata limitata al luogo di impianto della microcannula (98). Da questo secondo esperimento si notò che solo la DA microiniettata selettivamente nella VTA o nel NA induceva autosomministrazione da parte dell'animale.



**Figura 10** L'immagine rappresenta una schematizzazione del circuito mesocorticolimbico del cervello di ratto (VTA = area ventrale tegmentale, NAc = nucleus accumbens, PFC = corteccia prefrontale, AMG = amigdala).

Per quanto riguarda i farmaci d'abuso si è osservato che tutte le sostanze d'abuso sembrano condividere, almeno per quanto riguarda l'induzione di gratificazione, lo stesso circuito. Questa osservazione, fatta per mezzo di tecniche di microdialisi, mostra che tutte le sostanze capaci di indurre dipendenza inducono un rilascio di DA nel NA (99). Altre evidenze hanno confermato chiaramente che i farmaci d'abuso agiscono sullo stesso sistema neuronale della ricompensa (100). Ad esempio diverse sostanze d'abuso, in particolari condizioni sperimentali, possono dare luogo a sensibilizzazione crociata rispetto alle loro proprietà di attivazione locomotoria e di gratificazione, inoltre le loro proprietà rinforzanti possono essere abolite da un antagonista dopaminergico. Questo aumento del rilascio di DA si può ottenere agendo direttamente sul neurone dopaminergico, stimolandone la liberazione (amfetamina, alcol, nicotina), o impedendone la ricaptazione (cocaina,

metamfetamina, MDMA); o in maniera indiretta tramite la sospensione dell'inibizione che i neuroni dopaminergici della VTA subiscono al livello del corpo cellulare da parte dei neuroni GABAergici. Questi neuroni GABAergici della VTA presentano recettori oppioidi la cui stimolazione endogena (enkefaline) o esogena (morfina e simili), comporta la riduzione della loro funzione inibitrice che si traduce in una disinibizione della trasmissione dopaminergica VTA-NA. E' noto quindi che, attraverso una varietà di meccanismi, tutti i farmaci d'abuso provocano un'attivazione anomala del circuito della ricompensa, che si concretizza in un eccesso di attività dopaminergica nel NA (101). Crescenti evidenze indicano inoltre che il sistema VTA-NA insieme con le altre aree citate sopra, mediano gli effetti emotivi positivi anche dei rinforzi naturali, quali sesso, cibo e contatto sociale in certe specie d'animali (102) (Figura 11).



**Figura 11** La figura illustra schematicamente i meccanismi attraverso cui alcune sostanze d'abuso inducono il rilascio di dopamina nel NA.

In risposta all'attivazione anomala della trasmissione dopaminergica nel NA da parte delle sostanze d'abuso, si mettono in atto tutta una serie di risposte adattative finalizzate alla conservazione dell'omeostasi. Alla consumazione cronica della sostanza, infatti, conseguono una riduzione dei livelli basali della trasmissione dopaminergica, una diminuzione del numero di recettori D<sub>1</sub> postsinaptici ed una minore espressione della Tiroxina-idrossilasi (TH), principale enzima della biosintesi della DA (103). Questi adattamenti sono alla base del fenomeno della tolleranza che può essere definita come la minore reattività dell'organismo agli effetti farmacologici di una sostanza in seguito ad una prolungata esposizione. Quando si sviluppa tolleranza per ottenere l'effetto iniziale sono necessarie dosi maggiori della sostanza.

La riduzione compensativa del livello basale della trasmissione dopaminergica fa sì che in assenza della sostanza, in condizioni normali, i rinforzi naturali, non essendo in grado di produrre un rilascio di DA paragonabile, perdano di attrattiva inducendo il consumatore a ripetere l'assunzione.

La sensibilizzazione è un altro fenomeno che si può manifestare nel corso di somministrazioni ripetute della sostanza d'abuso e consiste, al contrario della tolleranza, in un aumento delle risposte a parità di dose.

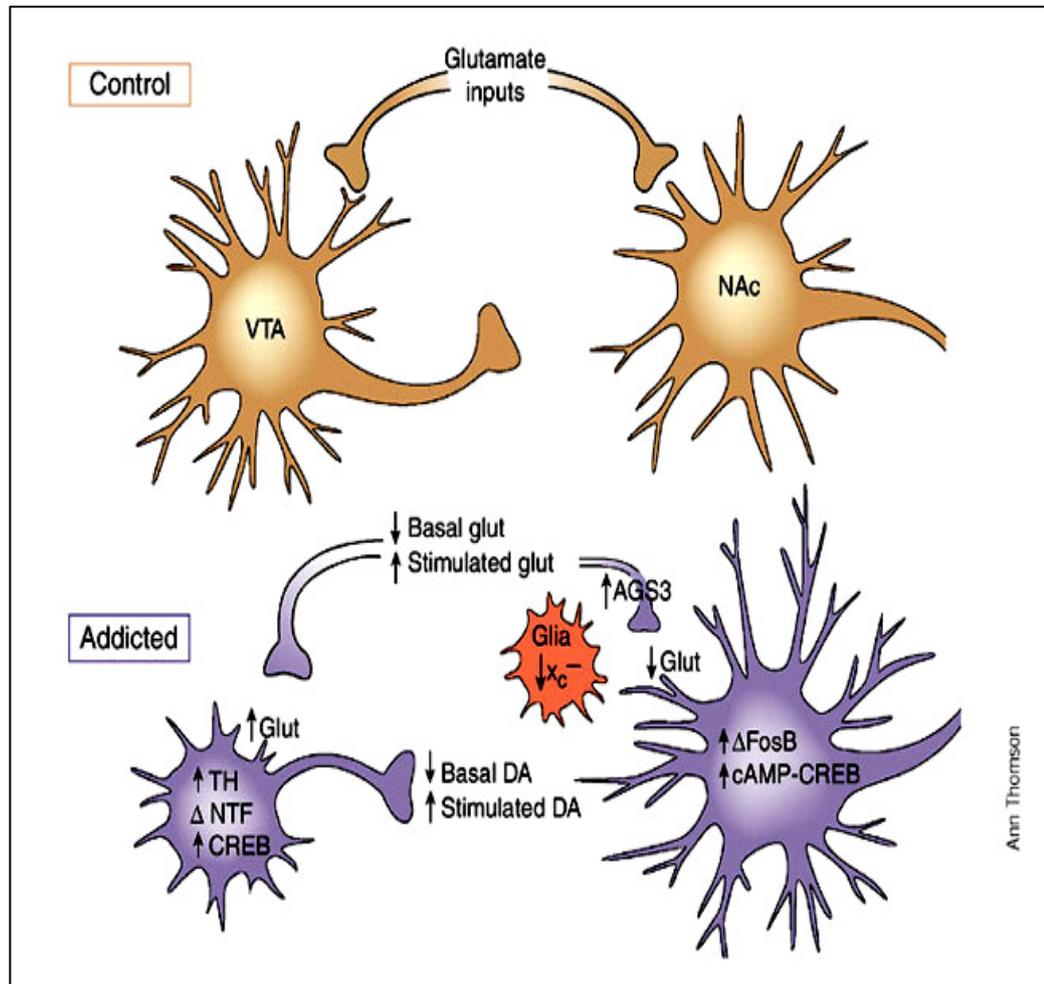
Sensibilizzazione e tolleranza non sono mutualmente esclusive e certe sostanze, a seconda dell'effetto farmacologico considerato, possono indurle contemporaneamente.

Constatando che il processo della gratificazione sembrerebbe legato maggiormente alle variazioni nella concentrazione di DA piuttosto che al suo valore assoluto, si potrebbe pensare che anche questo fenomeno possa andare incontro a sensibilizzazione (104) (Fig. 12).

Vi sono anche altre aree cerebrali, sempre appartenenti al circuito mesocorticolimbico e comunicanti con il NA e la VTA, che, pur non operando sul circuito della ricompensa, sono fondamentali per altri aspetti del processo che conduce alla tossicodipendenza. Tra queste aree vi sono l'amigdala, responsabile dell'apprendimento associativo ad alto contenuto emotivo, e l'ippocampo, importante nella memoria esplicita delle sensazioni legate alla sostanza (105).

Molto importante è anche il sistema dopaminergico che dalla substantia nigra va al caudate putamen comunicante con la corteccia. Questo sistema è

considerato molto importante per l'espressione degli effetti psicomotori di molte sostanze e per l'apprendimento delle abitudini e degli automatismi a queste legate (100). La componente della memoria legata al farmaco d'abuso sembra giocare un ruolo fondamentale nel fenomeno della ricaduta.



**Figura 12** In questa immagine sono schematizzati alcuni degli adattamenti neuronali alla base dei fenomeni di tolleranza e sensibilizzazione.

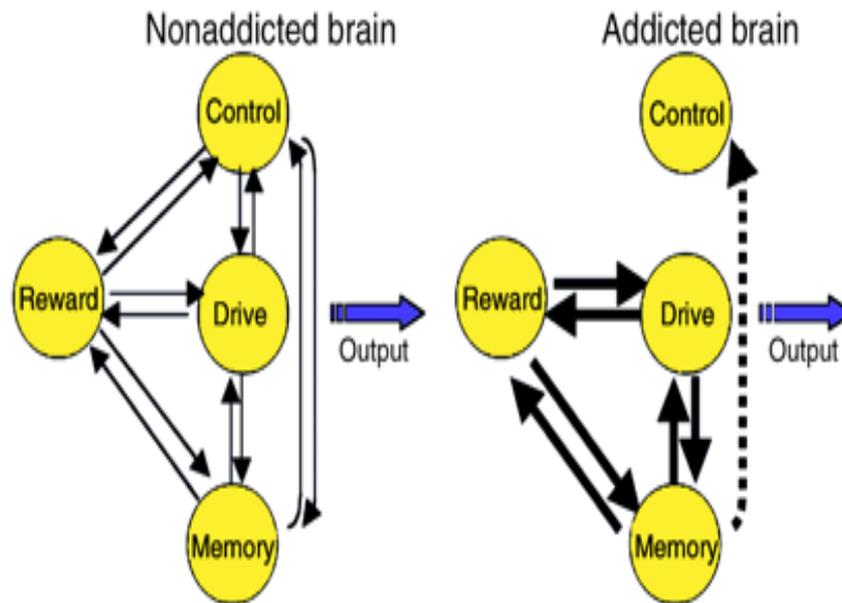
### **1.2.3.2 Il fenomeno della dipendenza da un punto di vista cognitivo**

La tossicodipendenza è un'alterazione comportamentale profonda che si sviluppa per gradi e culmina nella consumazione compulsiva della sostanza che l'ha indotta (106). Nel corso di tale processo varie funzioni cerebrali quali gratificazione, motivazione, memoria, pianificazione e controllo cognitivo, vengono alterate in funzione dell'esperienza acquisita in seguito all'assunzione della sostanza (104).

Quando un soggetto si trova di fronte ad una scelta, il sistema motivazionale lo indirizzerà verso la situazione con una maggiore aspettativa di gratificazione che viene valutata in base a previsioni ed analogie con le esperienze precedenti (memorie) che hanno condizionato l'individuo. Il sistema motivazionale risente inoltre dello stato interno dell'organismo rapportando il valore degli stimoli alle necessità dell'organismo stesso.

I farmaci d'abuso hanno proprietà tali da spiazzare totalmente i rinforzi naturali, infatti essi inducono un rilascio di dopamina e quindi di gratificazione, molto più forte di quello che si verifica nel caso di rinforzi naturali (107) i cui effetti non vanno incontro ad abitudine (99) ed inoltre la depressione compensativa della via dopaminergica fa sì che la soglia minima di DA per indurre ricompensa risulti molto più elevata e quindi difficilmente superabile dai rinforzi naturali (108).

Secondo il modello proposto, a partire dalla prime esposizioni, le sostanze d'abuso acquistano un valore elevato per l'individuo grazie alle loro proprietà di gratificazione e alla sensazione di benessere provocata. L'elevata gratificazione conseguente all'uso della sostanza fa sì che l'esperienza venga memorizzata grazie ad un meccanismo di apprendimento condizionato (101). Il confronto con il "ricordo" che la sostanza evoca nell'individuo causerà la perdita di interesse nei confronti delle gratificazioni quotidiane che non sarebbero in grado di attivare in maniera comparabile il circuito della ricompensa. A partire da quest'alterazione nell'attribuzione dei "valori", il sistema motivazionale non troverà più alternative altrettanto gratificanti verso cui indirizzare l'azione se non la sostanza d'abuso stessa la cui assunzione diventerà rapidamente di tipo compulsivo (Fig. 13).



**Figura 13** La figura illustra un modello delle relazioni intercorrenti tra i vari circuiti coinvolti nella tossicodipendenza. Questi circuiti lavorano insieme e sono plasmati dall'esperienza (Control: controllo prefrontale, Reward: ricompensa, Drive: motivazione, Emoty: memoria, Output: azione dell'individuo).

Un altro modello psicopatologico propone la tossicodipendenza come il prodotto di uno squilibrio tra due sistemi neuronali distinti, ma interagenti, che controllano la scelta decisionale: uno impulsivo, dipendente dall'amigdala, sensibile alle conseguenze negative o gradevoli in una prospettiva immediata; l'altro riflessivo, dipendente dalla corteccia prefrontale, sensibile ai vantaggi e agli svantaggi delle azioni a lungo termine (109). Il primo sistema è collegato all'apprendimento implicito condizionato verso tutti gli stimoli che hanno alto valore emotivo, mentre il sistema di controllo prefrontale fa maggiormente riferimento alla memoria esplicita che costituisce l'aspetto culturale e razionale. Prime evidenze neuropsicologiche in tal senso derivano dall'osservazione che pazienti tossicodipendenti producono dei risultati molto bassi in test cognitivi sulla presa di rischi (*risk taking*) e sull'impulsività (110,

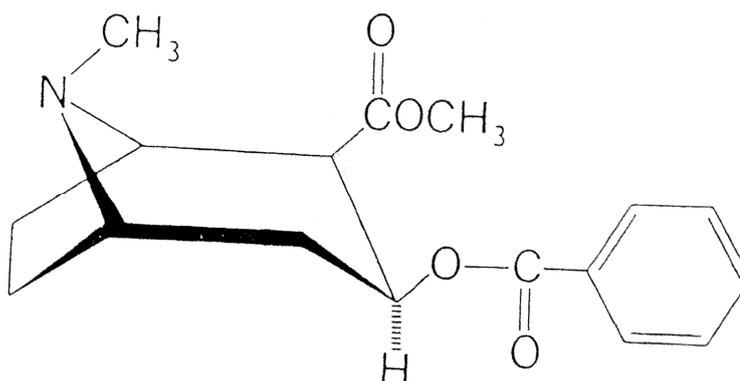
111, 112). Questi esperimenti suggeriscono una generale “sordità” del tossicodipendente nei confronti delle conseguenze future, eventualmente dannose, delle sue azioni.

Successivamente mediante studi di Positron Emission Tomography (PET) e di Functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI), si è osservato che la corteccia prefrontale risulta danneggiata nei soggetti tossicodipendenti (113). Quindi, si è ipotizzato che questo ipofunzionamento prefrontale sia alla base del disequilibrio tra i due sistemi citati sopra e del successivo indirizzamento di tutte le scelte verso quelle azioni automatiche guidate emotivamente dal maggiore rinforzo. Nonostante ciò, è difficile stabilire se sono le sostanze d’abuso ad essere capaci di determinare l’ipofunzionamento della corteccia prefrontale o se, al contrario, un deficit funzionale “*primario*” della corteccia predisponga allo sviluppo della dipendenza.

## 1.3 La Cocaina

### 1.3.1 Struttura della Cocaina

La cocaina è fra i più potenti stimolanti del sistema nervoso centrale presente in natura. E' uno dei 14 alcaloidi estratti da due piante che crescono spontaneamente in Sud America: la *Eritroxylum Coca*, che cresce nei climi umidi della foresta tropicale delle Ande Peruviane Orientali (Perù, Ecuador, Bolivia), e la *Eritroxylum Novogranatense*, che cresce nelle regioni montuose aride della Colombia, della costa caraibica e della costa settentrionale del Perù (114). Strutturalmente la cocaina è un estere del tropano, precisamente una benzoilmetilecgonina corrispondente alla formula:



In quanto estere dell'acido benzoico e base azotata, la cocaina viene idrolizzata a benzoilecgonina, ecgonina metilestere ed ecgonina. La forma più diffusa è la cocaina base cloridrato, scarsamente volatile. La cocaina viene rapidamente e facilmente assorbita per via nasale, orale, endovenosa e polmonare; può essere infatti assunta in tre modi: fiutata o inalata per via nasale mediante un cannello di carta, fumata sottoforma di "base libera" ed è diventato comune l'uso per via endovenosa, specialmente tra gli eroinomani (114, 115). L'assunzione della cocaina per via nasale è la più abituale: i cristalli vengono finemente tritati fino a formare strisce lineari, ciascuna delle quali contiene da 10 a 40 mg di cocaina in dipendenza al grado di purezza che, nel mercato clandestino, varia

largamente. L'effetto euforizzante inizia dopo pochi minuti dall'inalazione e può durare 20-45 minuti. Al termine di questa prima fase appare una sindrome caratterizzata da irritabilità, agitazione e depressione che contribuisce alla riassunzione di cocaina da parte del consumatore. Per via endovenosa la cocaina determina una serie di tipici effetti farmacocinetici associabili a quelli del "crack". Con questo termine si intende l'assunzione di cocaina per via inalatoria; la cocaina inalata è il sale cloridrato della base libera, ed è proprio questa, sottoforma di piccoli cristalli opalescenti, che viene denominata "crack" per il caratteristico rumore che produce quando viene fumata in una sigaretta o in una pipa ad acqua. In questa forma la cocaina viene assorbita ad altissima velocità e produce effetti psicostimolanti molto intensi; inoltre in questa forma la cocaina ha il massimo potenziale d'abuso con ampie oscillazioni dell'umore, da uno stato maniacale ad una disforia agitata (114). Una combinazione di cocaina ed eroina assunta per via endovenosa ("*speed ball*": palla rapida) raddoppia il "*rush*", ma può annullare altri effetti. Soggetti che hanno in corso programmi di mantenimento con metadone che non vengono più a godere dei piaceri dell'eroina, passano a volte alla cocaina, i cui effetti euforizzanti non vengono alterati dal metadone.

La cocaina si elimina soprattutto per via renale e si distribuisce ai reni, al cervello, al plasma, al fegato e alla bile (in ordine decrescente). Livelli plasmatici di cocaina sono rintracciabili per 4-6 ore dopo l'ultima assunzione per via nasale; inoltre, la cocaina passa facilmente la barriera ematoencefalica: raggiunto il picco plasmatico il rapporto plasma-cervello è 1:4.

La cocaina viene metabolizzata da colinesterasi epatiche e plasmatiche a metaboliti inattivi; la conversione della cocaina a narcotina avviene per metilazione. Meno del 10% è escreta immodificata nelle urine, può essere riscontrata nelle urine per 8-12 ore dopo una dose nasale di 1.5 mg/kg; la benzoilecgonina è invece dosabile per cromatografia o dosaggio radioimmunologico fino a 144 ore dall'assunzione (114).

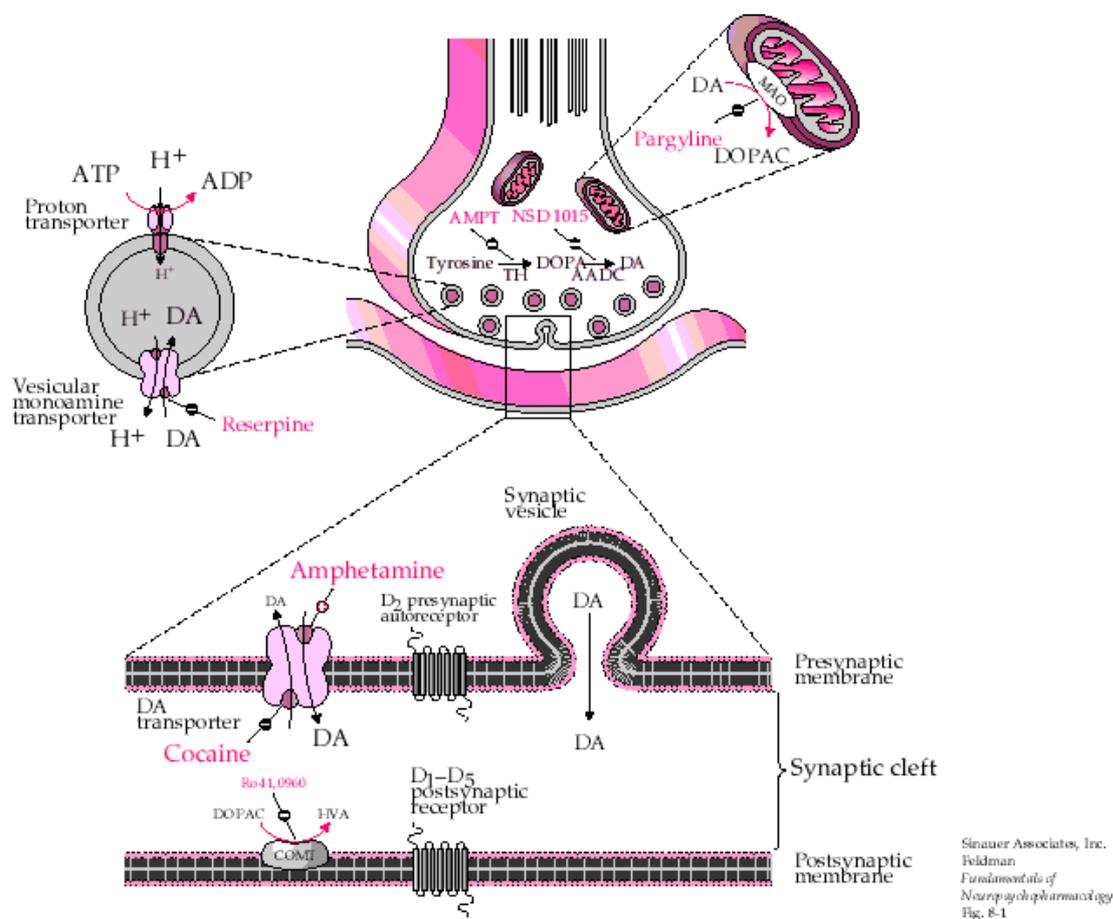
### **1.3.2 Meccanismo d'azione della cocaina**

La cocaina, come altre sostanze d'abuso, attiva direttamente il fascio mesocorticolimbico potenziando, con la liberazione di dopamina, gli eventi associati alla sua somministrazione. Il sistema mesocorticolimbico, che consiste in un insieme di neuroni che traggono origine dall'Area Ventrale Tegmentale dell'encefalo e proiettano soprattutto nel Nucleus Accumbens, nella Corteccia Frontale, nel Tubercolo Olfattivo nell'Amigdala e nell'Area del Setto, media il rinforzo agli effetti positivi quali piacere e gratificazione legati alla somministrazione di farmaci d'abuso (116).

Più precisamente, è stato recentemente evidenziato che la cocaina si legherebbe alla molecola trasportatrice della dopamina, denominata DAT (dopamine transporter), che a livello delle sinapsi neuronali, provvede alla sua ricaptazione. In tal modo, la cocaina impedirebbe alla dopamina di venire ricaptata all'interno del neurone (117) (Fig. 14).

Mediante inserimento di un catetere nella vena giugulare di ratto, collegato ad una siringa contenente cocaina, è stato anche osservato che l'animale da esperimento impara a premere la leva che dispensa cocaina e, pur di autosomministrarsi la droga, trascura anche il cibo e l'acqua. Così, utilizzando modelli animali è stato possibile evidenziare che la cocaina coinvolge una famiglia di cellule nervose definite come neuroni dopaminergici del sistema mesolimbico, originati in una zona del cervello, il mesencefalo (114, 118).

La somministrazione di cocaina, quindi, provocherebbe un aumento della concentrazione di dopamina, in modo più accentuato rispetto ad altri stimoli naturali facendo trascurare all'animale il cibo e l'acqua, e all'uomo necessità naturali quali l'accoppiamento e il nutrimento (118).

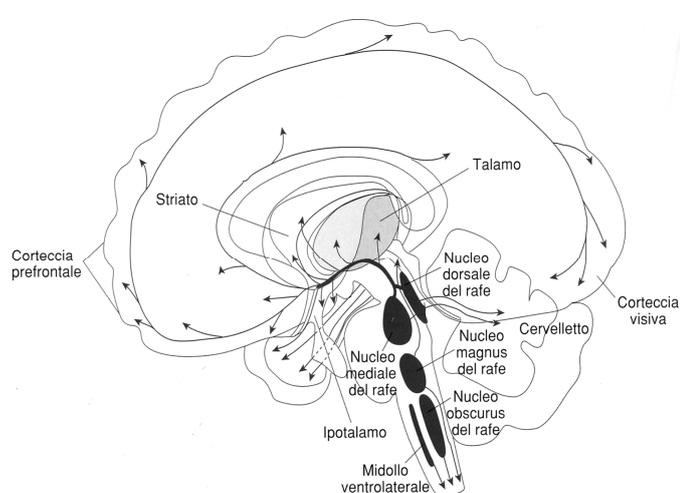


**Fig.14:** Rappresentazione di una sinapsi dopaminergica: sono illustrati i processi di sintesi e metabolismo della dopamina (DA), la ricaptazione vescicolare e presinaptica, e il rilascio vescicolare.

Nonostante il sistema dopaminergico giochi un ruolo fondamentale negli effetti della cocaina, le teorie che il blocco del DAT fosse il solo responsabile degli effetti di gratificazione dovuti alla cocaina sono state sostituite da una nuova teoria che presume un coinvolgimento di diversi trasportatori al fine di spiegare gli effetti avversi e di gratificazione indotti dalla cocaina. A questo proposito un fortissimo interesse è suscitato dallo studio del contributo dei sistemi serotoninergico e noradrenergico in questi effetti. E' noto da molto tempo che il trasportatore della serotonina è uno dei bersagli principali della cocaina nel cervello e che tale farmaco d'abuso causa un aumento dell'attività della 5-HT in molte regioni cerebrali (Fig. 15). In genere il sistema

serotonergico gioca un ruolo importante nell'organizzazione dei comportamenti spontanei come la locomozione, l'assunzione di cibo e acqua ed è anche coinvolto negli stati emozionali (116). Studi su topi knock out hanno evidenziato che il DAT sembra essere il trasportatore maggiormente associato alle proprietà di reward, il NET (norephineprine transporter) invece contribuisce più agli effetti avversi ed il SERT (serotonin transporter) può costituire una sorta di bilanciamento tra gli effetti avversi e di reward evocati da cocaina (119).

L'Area Ventrale Tegmentale è coinvolta negli effetti di molti farmaci d'abuso, inclusa la cocaina. Infatti, in quest'area, la cocaina esercita la sua azione attraverso il blocco della ricaptazione oltre che della dopamina anche della serotonina ed infine, in maniera dose-dipendente, inibisce il rilascio del GABA (118).



**Fig.15 :** *Principali vie serotonergiche nel sistema nervoso centrale umano.*

### 1.3.3 Effetti della cocaina

La neurotrasmissione dopaminergica mesolimbica gioca un ruolo critico negli effetti locomotori degli psicostimolanti ed è coinvolta nella sensitizzazione a lungo termine indotta dalla cocaina (120). Questo circuito neuronale è modulato dal legame del peptide dinorfina ai recettori oppioidi  $\kappa$ , perciò le interazioni tra dinorfina, dopamina e recettori oppioidi  $\kappa$  potrebbero essere un target per lo sviluppo di agenti terapeutici per la schizofrenia e per gli effetti dei farmaci d'abuso. I recettori oppioidi  $\kappa$ , infatti, giocano un ruolo importante nella regolazione presinaptica di rilascio di dopamina all'interno del Nucleus Accumbens e la somministrazione di agonisti  $\kappa$  sintetici o di dinorfina (ligando endogeno di tali recettori) può prevenire lo sviluppo di sensitizzazione, gli effetti locomotori e gli effetti di rinforzo provocati dalla cocaina. A conferma di quanto detto numerosi studi hanno dimostrato che iniezioni ripetute di agonisti sintetici selettivi nei confronti del recettore  $\kappa$  influenzano la sensibilizzazione comportamentale indotta da cocaina (121, 122) e bloccano lo stimolo della ricerca compulsiva del farmaco. Somministrazioni ripetute dell'agonista U-69593 riducono l'attività motoria indotta da cocaina, i livelli del trasportatore della dopamina, la densità del recettore D2 ed aumentano i livelli di tiroxina idrossilasi (123). Tali effetti risultano attenuati quando l'agonista viene somministrato ad intervalli lunghi e fanno supporre che la modulazione della sensitizzazione a cocaina ad opera dell'antagonista sia mediata dalla perturbazione del sistema dopaminergico.

E' stato ampiamente dimostrato che la densità del recettore  $\mu$  aumenta nel Nucleus Accumbens in seguito a continue somministrazioni di cocaina attraverso minipompe osmotiche impiantate a livello sottocutaneo per 7 giorni (124) o a ripetute iniezioni giornaliere (125), come pure aumenta nel Caudato Putamen rostrale dopo trattamento intermittente di cocaina. Similmente, in seguito a esposizione cronica al farmaco d'abuso la densità dei recettori oppioidi  $\kappa$  aumenta nel Caudato Putamen, nel Nucleus Accumbens shell, nel Claustrum e nel Nucleo Endopiriforme (126, 127). In definitiva la somministrazione cronica di cocaina causa una up-regulation dei recettori oppioidi  $\mu$  e  $\kappa$  nel sistema mesocorticolimbico (126, 128).

E' inoltre noto che gli psicostimolanti e i farmaci d'abuso possano alterare l'espressione genica dei peptidi oppioidi interagendo con tale sistema: somministrazioni acute di amfetamina e cocaina causano un incremento dell'attività comportamentale e dell'espressione genica di preprodinorfina, sostanza P e preproenkefalina (128). Somministrazione cronica intracerebroventricolare di cocaina induce differenti effetti di regolazione dell'espressione genica della prodinorfina in alcune aree cerebrali di ratto (129, 130): un'inibizione dei livelli di mRNA della prodinorfina nell'Ipotalamo e nella Corteccia Prefrontale di ratto e un aumento nello striato e nell'Area Ventrale Tegmentale. Il meccanismo con il quale la cocaina produce alterazioni a livello del sistema oppioide endogeno è ancora sconosciuto, ma evidenze sperimentali suggeriscono che tale effetto è mediato almeno in parte dalla dopamina. Infatti la somministrazione cronica di cocaina sembra produrre una up-regulation dei recettori  $\mu$  attraverso l'inibizione del re-uptake di dopamina e l'attivazione dei recettori dopaminergici D2 (131).

A differenza di quanto si verifica in seguito a trattamento con cocaina, la somministrazione di GBR 12909, inibitore selettivo del re-uptake di dopamina, provoca riduzione dell'espressione genica della prodinorfina nell'Ipotalamo senza però provocare variazioni a livello dello Striato (132). Tanto la cocaina quanto il GBR-12909, per somministrazione cronica, aumentano la stimolazione locomotoria e riducono i livelli di tiroxina idrossilasi (133) benché questi effetti vadano incontro a parziale tolleranza. Tuttavia l'inibitore selettivo della ricaptazione di dopamina a differenza della cocaina, non è in grado di incrementare in maniera significativa la densità del recettore oppioide  $\kappa$ . Tali risultati sembrano suggerire che la modulazione della densità recettoriale operata dalla cocaina sia dovuta anche al coinvolgimento dei sistemi serotoninergico e noradrenergico (127).

Un recente studio ha coinvolto la proteina DARPP-32 la quale gioca un ruolo importante nella trasmissione dopaminergica come pure nella mediazione delle azioni di un vasto numero di farmaci d'abuso i quali, per somministrazione acuta, stimolano la fosforillazione della treonina-34 della proteina DARPP-32 nello striato e nelle aree corticali. Una iniezione singola di cocaina induce un significativo incremento della fosforillazione di DARPP-32 nell'Ippocampo, nel Caudato Putamen e nella Corteccia Prefrontale. Il pretrattamento con U-69593 inibisce tali modificazioni (134). Da questi risultati emerge la capacità

degli agonisti oppioidi  $\kappa$  nel ridurre gli effetti comportamentali e neurochimici causati dalla cocaina.

Indagini autoradiografiche hanno evidenziato la presenza, mediante l'utilizzo di agonisti selettivi per il recettore oppioide  $\kappa$ , di siti recettoriali  $\kappa$  nel sistema mesocorticolimbico (135).

I recettori oppioidi di tipo  $\kappa$  sono accoppiati a proteine G di tipo inibitorio e l'effetto cellulare è probabilmente legato alla chiusura dei canali del calcio; altri studi hanno invece dimostrato che i recettori oppioidi  $\kappa$  possono determinare anche un incremento della conduttanza del potassio (136).

Anche se il fenomeno è molto controverso, alcune evidenze sperimentali suggeriscono che anche per la cocaina, come per la maggior parte dei farmaci d'abuso, si possa assistere allo sviluppo del fenomeno della tolleranza solo ad alcuni dei suoi effetti (137). Dal punto di vista farmacologico si definisce "tolleranza" il progressivo decremento dell'effetto di una sostanza in seguito a somministrazioni ripetute della stessa. Ne consegue la necessità di aumentare la dose per ottenere lo stesso effetto, con il risultato di raggiungere dosaggi molto alti, certamente letali se somministrati in un individuo normale, non in stato di tolleranza. In particolare, per alcune sostanze d'abuso quali la cocaina e le amfetamine si osservano due fenomeni opposti a seconda del tipo di somministrazione utilizzata: se nell'animale da esperimento si inietta cronicamente cocaina ad intervalli regolari, si osserva un aumento degli effetti provocato dalla droga (tolleranza inversa), come nell'uomo, mentre se si somministra per infusione continua si osserva un decremento di alcuni effetti (tolleranza), quali quelli motori o stereotipati (138).

Recentemente è stato inoltre evidenziato che la somministrazione cronica di cocaina provoca il fenomeno della dipendenza, soprattutto di tipo psichico.

Intorno al 1987, Gawin, Ellinwood e Kleber hanno osservato come l'uso di dosi elevate di cocaina per periodi prolungati dia luogo a rilevanti cambiamenti neurofisiologici nelle strutture cerebrali che regolano processi correlati con la risposta edonica o il piacere. Le modificazioni in questi sistemi neurofisiologici producono una sorta di "dipendenza fisiologica e astinenza", la cui espressione clinica si manifesta soprattutto a livello psicologico e non a livello fisico.

Nonostante le limitazioni connesse alle differenze tra il cervello del ratto e quello dell'uomo, gli studi neurochimici basati sugli indici periferici del funzionamento dopaminergico e gli studi elettroencefalografici nei

cocainomani attivi, suggeriscono che l'abuso di cocaina possa determinare fenomeni di neuroadattamento.

La dipendenza da cocaina non provoca rilevanti sintomi fisiologici di astinenza. Non sono ancora noti i meccanismi con cui i sintomi psicologici di astinenza, in particolari stati di umore spiacevoli e "desideri compulsivi" legati all'euforia indotta dalla droga (craving), inducano per lungo tempo il mantenimento della dipendenza da cocaina. Il "craving" per la cocaina potrebbe essere determinato da modificazioni neurofisiologiche attribuibili a ripetute alterazioni del sistema nervoso centrale. Poiché questi adattamenti avvengono in sistemi del cervello che regolano unicamente processi psicologici e non fisici, si è erroneamente sostenuto per molto tempo, che la dipendenza fosse puramente psicologica piuttosto che fisiologica.

A livello del sistema nervoso centrale la cocaina produce piacere o gratificazione aumentando la neurotrasmissione dopaminergica mesolimbica e mesocorticale del cervello; questo provoca un aumento nella concentrazione extracellulare di dopamina nei nuclei del cervello che controllano il comportamento di ricompensa.

La cocaina, come altre sostanze d'abuso quali le amfetamine, produce attraverso l'inibizione del reuptake della dopamina, l'attivazione delle vie dopaminergiche e noradrenergiche associate al tono dell'umore e all'attivazione dei sistemi serotoninergici associati all'umore e alla vigilanza (137).

La potente azione vasocostrittrice della cocaina può portare a gravi attacchi ipertensivi che terminano poi in infarti del miocardio e/o ictus cerebrali. L'azione di anestetico locale della cocaina può portare alla comparsa di convulsioni. I sovradosaggi sono generalmente e rapidamente fatali, ma se la sopravvivenza supera le tre ore si ha la ripresa completa (139).

Alcuni studi hanno dimostrato che la somministrazione cronica di cocaina inibisce lo stimolo serotoninergico dell'ormone adrenocorticotropo, la secrezione di corticosterone (138) e inoltre blocca la regolazione serotoninergica che media il rilascio di prolattina e la secrezione di renina (140).

Recenti scoperte hanno evidenziato che il trattamento cronico con cocaina induce un incremento di glutammato, neurotrasmettitore eccitatorio, sui terminali nervosi della porzione "shell" del Nucleus Accumbens ma non del

“core”. Questi dati supportano l’ipotesi che le sinapsi glutammatergiche siano differentemente regolate dalla cocaina nel Nucleus Accumbens (141).

### **1.3.4 Terapia farmacologica**

Per quanto riguarda la dipendenza da cocaina, in base all’ipotesi che la pulsione per la cocaina sia in relazione con la deplezione della dopamina o la desensitizzazione dei sistemi dopaminergici di ricompensa, sono state condotte sperimentazioni cliniche con levodopa, con agonisti dopaminergici come la bromocriptina e l’amantadina: si sono ottenute diminuzioni della pulsione per il farmaco nelle fasi acute dell’astinenza, ma con effetti non molto rilevanti.

Attualmente l’approccio farmacologico più utilizzato prevede l’uso di antidepressivi triciclici come l’imipramina. Si pensa che gli antidepressivi facciano aumentare l’attività funzionale nei sistemi di ricompensa modificando la supersensibilità indotta a livello degli autorecettori dopaminergici.

Molti altri farmaci sono stati sperimentati nella terapia per il recupero dei tossicodipendenti da cocaina, quali la carbamazepina, usato nelle crisi epilettiche, la buprenorfina, analgesico a funzione mista agonista-antagonista oppioide, alcuni calcio-antagonisti quali la nifedipina e il verapamil, ma nessuno ha dato risultati sufficienti a garantire l’efficacia (142).

Recentemente il nostro laboratorio ha messo in evidenza il ruolo svolto da agonisti  $\kappa$ , quali U69593, sugli effetti dei farmaci d’abuso come la cocaina evidenziando che tali agonisti  $\kappa$  alterano gli effetti locomotori e le modificazioni che la cocaina esercita sul sistema oppioide dinorfinergico. Questi dati suggeriscono il possibile ruolo terapeutico di farmaci agonisti  $\kappa$  nella cura della tossicodipendenza.

### 1.3.5 Nocicettina e cocaina

E' stato ampiamente dimostrato che la nocicettina regola gli effetti comportamentali indotti dalla cocaina.

Somministrazioni croniche di nocicettina riducono la stimolazione motoria e le variazioni della dopamina extracellulare causati da cocaina (143). Quando questo neurotrasmettitore viene somministrato attraverso iniezione a livello dell'Area Ventrale Tegmentale in associazione con la cocaina, gli effetti comportamentali di quest'ultima vengono attenuati nel primo giorno di trattamento ma non nei giorni successivi. Se invece la nocicettina viene somministrata da sola per tre giorni, la sensitizzazione alla cocaina si manifesta 5-7 giorni dopo. Questi risultati dimostrano che la nocicettina riduce l'attivazione dei neuroni dopaminergici mesolimbici agendo a livello dell'Area Ventrale Tegmentale con un effetto che dimostra una rapida tolleranza e che quindi risulta insufficiente per prevenire lo sviluppo di sensitizzazione a cocaina (144). Se però la nocicettina viene somministrata per via intracerebroventricolare o direttamente nell'Area Ventrale Tegmentale a dosi crescenti nel tentativo di impedire lo sviluppo della tolleranza, risulta in grado di bloccare lo sviluppo della sensitizzazione motoria indotta da cocaina (145). Inoltre gli effetti della nocicettina sulla stimolazione motoria e sull'adattamento comportamentale indotti da cocaina vengono bloccati da J-113397, un antagonista del recettore NOP (146), dimostrando che la nocicettina esplica la sua attività mediante una interazione specifica con il recettore NOP.

Un'iniezione singola di nocicettina nell'Area Ventrale Tegmentale o nel Caudato Putamen induce un incremento dell'attività locomotoria causata dalla cocaina 23 ore dopo; se si procede con una ulteriore iniezione nel secondo giorno seguita da una successiva iniezione di cocaina, gli effetti causati da quest'ultima vengono bloccati. Non si verificano cambiamenti dell'attività locomotoria indotta da cocaina se le iniezioni avvengono a livello della Substantia Nigra o del Nucleus Accumbens (147).

In uno studio successivo si è voluto valutare il contributo delle regioni del corpo cellulare e delle estremità terminali dei neuroni dopaminergici sulla soppressione dell'attività motoria indotta da nocicettina. Questo effetto è

risultato evidente quando l'iniezione veniva effettuata a livello dell'Area Ventrale Tegmentale e in minor grado quando interessava il Nucleus Accumbens. Mentre non si verificava una significativa riduzione dell'attività motoria dopo iniezione nella Substantia Nigra e nel Caudato Putamen. La somministrazione di J-113397 10 minuti prima della nocicettina attenuava questo effetto (148). L'Area Ventrale Tegmentale risulta quindi l'area maggiormente interessata nella mediazione di questo effetto che vede diretta interazione della nocicettina con il recettore NOP.

Facendo un confronto tra la nocicettina e Ro 65-6570, un agonista del recettore NOP, si è visto che iniezioni intracerebroventricolari di nocicettina (10 e 20 microgrammi/ratto) sopprimono in maniera significativa la conditioned place preference indotta da cocaina, a differenza dell'agonista sintetico; inoltre mentre la prima sopprime l'iperattività motoria, l'analogo sintetico la incrementa (149). Questo porta a supporre che gli effetti indotti dalla nocicettina a questo livello sono dovuti all'influenza che la stessa esercita sulla neurotrasmissione dopaminergica nelle strutture cerebrali mesolimbiche piuttosto che sul recettore. Recenti studi hanno dimostrato che la somministrazione di 0,06 nmol di nocicettina da sola stimolano l'attività locomotoria nella fase di condizionamento senza provocare piacere, la somministrazione di 6 nmol riduce l'attività locomotoria basale durante la fase di condizionamento e provoca una blanda place aversion. La marcata place preference indotta tanto dalla morfina quanto dalla cocaina viene soppressa in maniera dose dipendente dalla nocicettina, la quale però è in grado di bloccare solo debolmente e solo impiegando la massima dose testata la place aversion indotta da naloxone. La nocicettina è quindi in grado di bloccare il circuito di ricompensa degli analgesici narcotici e degli psicostimolanti ma mostra solo un blando effetto sullo stato affettivo negativo indotto dal naloxone (150).

In un recente studio condotto nel nostro laboratorio in collaborazione l'università di Miami sono state valutate le variazioni dell'espressione genica della nocicettina e del suo recettore NOP in specifiche aree cerebrali di ratto in seguito a trattamento cronico con cocaina utilizzando tecniche quali l'immunoautoradiografia e la RIA ed ottenendo un buon riscontro tra i risultati ottenuti mediante le due diverse tecniche. In primo luogo queste hanno evidenziato una più alta densità di nocicettina nella sezione mediale del Caudato Putamen rispetto alla parte laterale dello stesso, come pure una

maggiore densità nella porzione shell rispetto alla core del Nucleus Accumbens. La RIA ha evidenziato una significativa riduzione dei livelli di peptide nel Caudato Putamen mediale dopo trattamento con cocaina, e questi risultati hanno trovato riscontro con quelli ottenuti mediante l'immunoautoradiografia la quale ha rilevato un significativo decremento dell'immunoreattività associata a nocicettina sia nella regione dorsomediale che in quella ventromediale del Caudato Putamen. Non si verificano variazioni significative dell'espressione genica della nocicettina nella regione laterale del Caudato Putamen. L'immunoreattività della nocicettina subisce una significativa riduzione nel Nucleus Accumbens shell ma non nel core; la riduzione dei livelli del peptide nel Nucleus Accumbens misurati con la RIA, seppure presente, non risulta statisticamente significativa. Entrambe le tecniche vedono una significativa riduzione dei livelli di nocicettina nella Substantia Nigra, tanto nella porzione reticolata che in quella compacta. Invece per quanto riguarda l'Area Ventrale Tegmentale, dalle misure di immunoreattività si evince una significativa riduzione mentre con il RIA questo andamento decrescente non rivela variazioni statisticamente significative (151).

Questi studi mettono in evidenza una interessante correlazione tra il sistema nocicettina-NOP e la cocaina, probabilmente attraverso regolazione del sistema dopaminergico.

## 1.4 La MDMA

### 1.4.1 Storia e diffusione attuale

La 3,4-metilendiossimetamfetamina, principale sostanza psicoattiva delle compresse (“pasticche”) (Fig. 16), vendute sotto il nome di “ecstasy”, è stata sintetizzata per la prima volta nel 1912 dall’azienda farmaceutica Merck, senza mai entrare in commercio.



**Figura 16** Alcuni esempi di “pasticche di ecstasy” presenti sul mercato illegale.

La diffusione moderna della sostanza è dovuta al fatto che negli anni sessanta negli Stati Uniti il chimico Alexandre Shulgin la risintetizzò e la fece provare ad un amico psicologo il quale la promosse tra i colleghi come adiuvante in psicoterapia dal momento che era in grado di migliorare l’abilità comunicativa del paziente.

Alla fine degli anni ottanta, l’ecstasy raggiunse poi l’Europa dove trovò ampia diffusione soprattutto nel Regno Unito e il suo utilizzo restò, in un primo momento, strettamente legato all’ambiente festivo techno-rave. Ultimamente la sua diffusione è in progressivo aumento in tutta Europa. L’uso ricreativo di questa droga interessa soprattutto una popolazione giovane (età media 26 anni), di sesso maschile (tre uomini contro una donna) e ben inserita socialmente.

Il termine ecstasy è stato coniato nel 1980 ed è oggi impiegato come sinonimo di MDMA pur includendo anche altre sostanze come la MDA (3,4-metilendiossiamfetamina) e la MDE (3,4-metilendiossietilamfetamina) (152).

Nel 1985, anche in seguito ad un articolo di G. Ricaurte (1985), che dimostrava nel ratto la tossicità serotoninergica della MDA, composto correlato alla MDMA, la DEA (*Drug Enforcement Agency*) intraprese la procedura giuridica che portò alla classificazione della MDMA tra le sostanze comportanti una forte dipendenza e nessun effetto terapeutico.

Dal 1993 la FDA (*Food and Drug Administration*) ha autorizzato la ripresa della sperimentazione della MDMA sull'uomo e attualmente sono stati condotti degli studi clinici concernenti la sua utilizzazione in psicoterapia, in particolare nel trattamento dello stress post-traumatico.

La MDMA pura è una polvere cristallina bianca e insapore che può essere fumata, iniettata o inalata ma più comunemente viene assunta per via orale sotto forma di compresse; il contenuto di MDMA per ogni compressa di ecstasy è solitamente variabile tra 50 e 150 mg.

Raramente l'ecstasy è consumata da sola, spesso i consumatori l'associano con altre sostanze psicoattive come cannabis, cocaina e alcool, per modulare gli effetti ricercati e ridurre gli effetti negativi.

L'eccessivo consumo, insieme al fatto che raramente le "pasticche" contengono solo MDMA pura ma un mix di varie sostanze (quali amfetamine, cocaina, caffeina, benzodiazepine, etc.), fa sì che i dati provenienti dalla sperimentazione in laboratorio e condotti sulla sostanza pura possano essere applicati solo con molta cautela alle osservazioni cliniche. Per colmare questo divario tra protocolli sperimentali e consumazione reale, si intraprendono con sempre maggiore frequenza studi sperimentali di associazione con THC (principio attivo della cannabis) o alcool al fine di simulare il più possibile le condizioni di reale utilizzo della sostanza (152).

Le proprietà di ricompensa dell'ecstasy e di altre sostanze psicostimolanti come la cocaina sono correlate alla loro abilità di aumentare il rilascio di dopamina nel nucleus accumbens (152).

La MDMA induce inoltre un aumento di serotonina o 5-idrossitriptamina (5-HT) nella stessa area. DA e serotonina interagiscono con recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) espressi in differenti strutture cerebrali, compresi

l'ippocampo e la zona mesolimbicocorticale, zone coinvolte nella ricompensa da sostanze d'abuso.

### **1.4.2 Effetti della MDMA sull'uomo**

Gli effetti ricercati dai consumatori di ecstasy sono essenzialmente di due tipi: un effetto stimolante ed un effetto empatico.

Per la peculiarità degli effetti causati da questa sostanza è stata conosciuta una nuova classe farmacologica, quella degli "entactogeni", termine di derivazione greco-latina che indica il "miglioramento dei contatti" successivi alla sua assunzione (153).

Gli effetti compaiono con una latenza di una mezz'ora dall'assunzione orale della MDMA e si protraggono per un periodo di 3-4 ore. Questo periodo è caratterizzato principalmente da una disinibizione nelle relazioni sociali, una maggiore apertura di spirito, una migliore accettazione degli altri (effetti empatici), un'aumentata stima e fiducia in se stessi, una sensazione di euforia, una maggiore vigilanza e l'abolizione del senso di stanchezza (effetti stimolatori). Inoltre, si osservano miglioramento del tono dell'umore, da cui maggior senso di benessere, una moderata spersonalizzazione e disturbi del pensiero (154). Oltre a ciò la MDMA favorisce i movimenti ripetitivi e ritmati della musica ed i consumatori possono sperimentare delle alterazioni visive, sotto forma di "flash", ma senza che si possa parlare di vere e proprie allucinazioni (155).

Si può verificare, specie nel caso di assunzioni ripetute e ravvicinate nel tempo, un fenomeno di tolleranza nei riguardi degli effetti desiderati a cui in genere si sopperisce con un incremento della dose.

Sul piano fisiologico, la MDMA provoca nell'uomo effetti simpaticomimetici come l'aumento della pressione arteriosa, della frequenza cardiaca e molteplici effetti ormonali; si hanno picchi plasmatici di cortisolo, prolattina, ormone adrenocorticotropo (ACTH) e ADH (156). La MDMA causa, inoltre, un'alterazione del funzionamento del sistema immunitario che ritorna nelle condizioni normali dopo 24 ore (157).

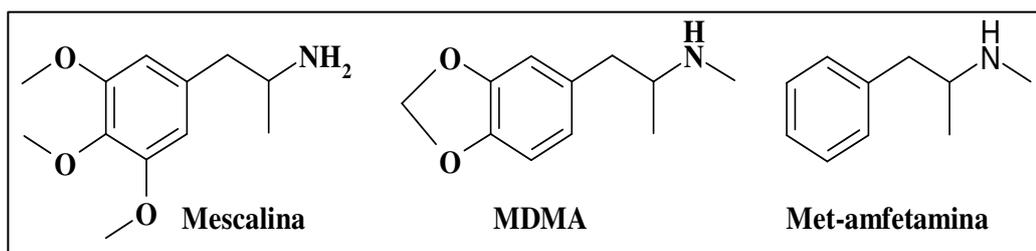
Sul piano fisico, tra gli effetti collaterali più comuni della MDMA, vi sono bocca secca, nausea, alternanza di caldo e freddo, perdita di appetito, tremori, trismus (contrazione intensa delle mascelle), bruxismo (digrignare i denti), sudorazione elevata e dolori muscolari (155).

Sul piano psicologico, dopo la fase iniziale di stimolazione, si verifica molto spesso uno stato di “sfinimento” e depressione che si protrae per circa otto ore, ma che in soggetti più fragili psicologicamente può dare luogo a reazioni psichiche più gravi come crisi d’angoscia acuta e attacchi di panico che possono perdurare a lungo (giorni o settimane) (154).

Nell’uomo, la maggior parte degli effetti psicologici mediati dalla MDMA sembrerebbe derivare dalla stimolazione della trasmissione serotoninergica e, solo parzialmente (effetti euforizzanti), dalla stimolazione dopaminergica. Anche sul piano fisiologico gli effetti come l’ipertensione e la tachicardia sono imputabili all’alterazione della trasmissione serotoninergica (158).

### 1.4.3 Meccanismi d’azione della MDMA

Chimicamente la MDMA è l’N-metil-1-(3,4-metilendioossifenil)-2-aminopropano; strutturalmente è correlata alle amfetamine stimolanti psicomotorie e all’allucinogeno mescalina (Fig. 17).



**Figura 17** Formule di struttura di: mescalina, MDMA e metamfetamina

Da un rapido paragone delle strutture in questione, si può osservare che le sostituzioni metossiliche a carico dell’anello aromatico sono responsabili dell’attività serotoninergica (entactogena), mentre quelle sull’ammina sono responsabili degli effetti sull’attività dopaminergica (stimolante).

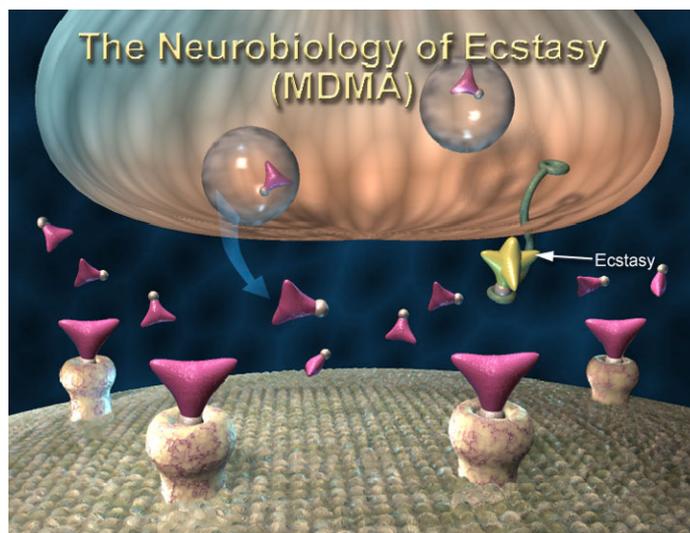
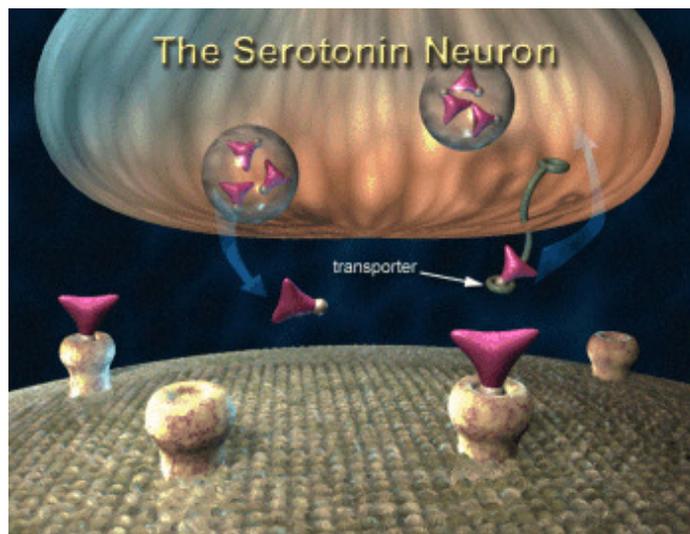
Come le amfetamine, la MDMA ha un centro chirale corrispondente all’atomo di carbonio  $\alpha$  che determina l’esistenza di due isomeri ottici (153, 159).

La MDMA lega tutti e tre i trasportatori presinaptici delle monoamine, esibendo una maggiore affinità ( $K_d = 0,61 \mu\text{M}$ ) per quello della 5-HT. Il legame ai trasportatori di DA e 5-HT è stereo-selettivo, con l'isomero S(+) più attivo (159).

La MDMA presenta anche una certa affinità per i classici recettori postsinaptici. In particolare, lega con una  $K_d$  compresa tra 1 e  $10 \mu\text{M}$  i recettori serotoninergico 5-HT<sub>2</sub>, adrenergico  $\alpha_2$  e colinergico M<sub>1</sub>. Questa osservazione è interessante perché si pensa che la concentrazione media di MDMA raggiunta nel cervello in seguito ad una somministrazione standard rientri in valori tali per cui non può escludersi il legame con questi recettori.

I potenti effetti della MDMA sul sistema serotoninergico sembrerebbero essere i maggiori responsabili delle azioni di questa sostanza e per questo sono stati oggetto di numerosi studi. Il meccanismo della liberazione massiccia di serotonina è dovuto essenzialmente all'azione della MDMA sul trasportatore della serotonina (SERT). La MDMA, avendo una forte affinità per il SERT, si comporta come un substrato, bloccando la ricaptazione della serotonina e facilitando lo scambio 5-HT/MDMA attraverso il trasportatore (160). Una volta nella terminazione nervosa, la MDMA potrebbe anche causare la liberazione della serotonina contenuta nelle vescicole permettendo in questo modo di aumentare il pool di 5-HT disponibile per lo scambio via SERT (Fig. 18).

La MDMA interferisce anche con la trasmissione dopaminergica incrementando il rilascio di dopamina nello striato, nel nucleus accumbens e nella corteccia prefrontale. Oltre ad un'azione diretta della MDMA sul trasportatore della dopamina, sembra che il rilascio della DA sia determinato principalmente dall'azione sul recettore 5-HT<sub>2A/2C</sub> da parte della serotonina i cui livelli sinaptici sono significativamente aumentati in risposta al trattamento con la sostanza d'abuso in esame. Un altro fattore che interviene nella facilitazione del rilascio di DA nello striato e nella substantia nigra è la riduzione del rilascio di GABA mediato dai recettori 5-HT<sub>2</sub> e ciò determina l'attenuazione del controllo a feedback esercitato dal neurotrasmettitore GABA sul rilascio della DA.



**Figura 18** *Meccanismo d'azione della MDMA sul sistema serotoninergico*

Recenti studi hanno evidenziato un'azione della MDMA anche sul sistema colinergico con incremento del rilascio di acetilcolina (Ach) in varie regioni cerebrali tra cui lo striato, la corteccia prefrontale e l'ippocampo. Il meccanismo con cui la MDMA determina un aumento cerebrale di Ach pare essere associato all'attivazione dei sottotipi recettoriali D<sub>1</sub> e 5-HT<sub>4</sub>; ciò è stato confermato da vari studi condotti con gli antagonisti di questi due recettori che

hanno dimostrato una riduzione del rilascio di Ach, al contrario con gli agonisti è stato evidenziato un incremento.

Gli enantiomeri S(+) e R(-) della MDMA hanno la stessa potenza nel determinare il rilascio della serotonina e dell'Ach, mentre l'enantiomero R(-) è più potente nella stimolazione del rilascio di DA rispetto all'altro enantiomero (161).

La MDMA subisce metabolismo ossidativo epatico: la N-demetilazione a MDA (3,4-metilendiossiamfetamina) è predominante nel ratto, la O-demetilazione prevale nell'uomo in cui la HHMA (3,4-diidrossimetamfetamina) e la HMMA (4-idrossi-3-metossimetamfetamina) sono i principali metaboliti. Un aspetto importante del metabolismo è che l'enzima CYP2D6, appartenente al sistema del citocromo P-450, è soggetto a polimorfismo genetico e ciò determina nella popolazione l'esistenza di almeno due distinti sottogruppi o fenotipi con differente capacità metabolica: i metabolizzatori lenti e i metabolizzatori rapidi. La presenza di varianti enzimatiche ad attività ridotta o nulla o, al contrario, ad attività molto elevata, ha importanti risvolti clinici e tossicologici. L'attività enzimatica del CYP2D6, inoltre, può essere inibita da numerosi farmaci (antiaritmici, beta-bloccanti, vari psicofarmaci) e/o da vari fattori ambientali (stile di vita, fumo, alcool). La stessa MDMA è in grado di inattivare questo enzima epatico entro la prima ora dalla sua somministrazione e ciò comporta un incremento dei suoi livelli plasmatici con conseguente prolungamento della durata degli effetti; il recupero dell'attività enzimatica si ha nell'arco di 10 giorni (152).

Pur non potendo escludere che differenze metaboliche condizionino la comparsa di manifestazioni tossiche, nel ratto Dark Agouti le alterazioni indotte dalla MDMA sono comparabili nei due sessi, sebbene il metabolismo CYP2D6 sia significativamente più veloce nei maschi rispetto alle femmine (Fig. 19).

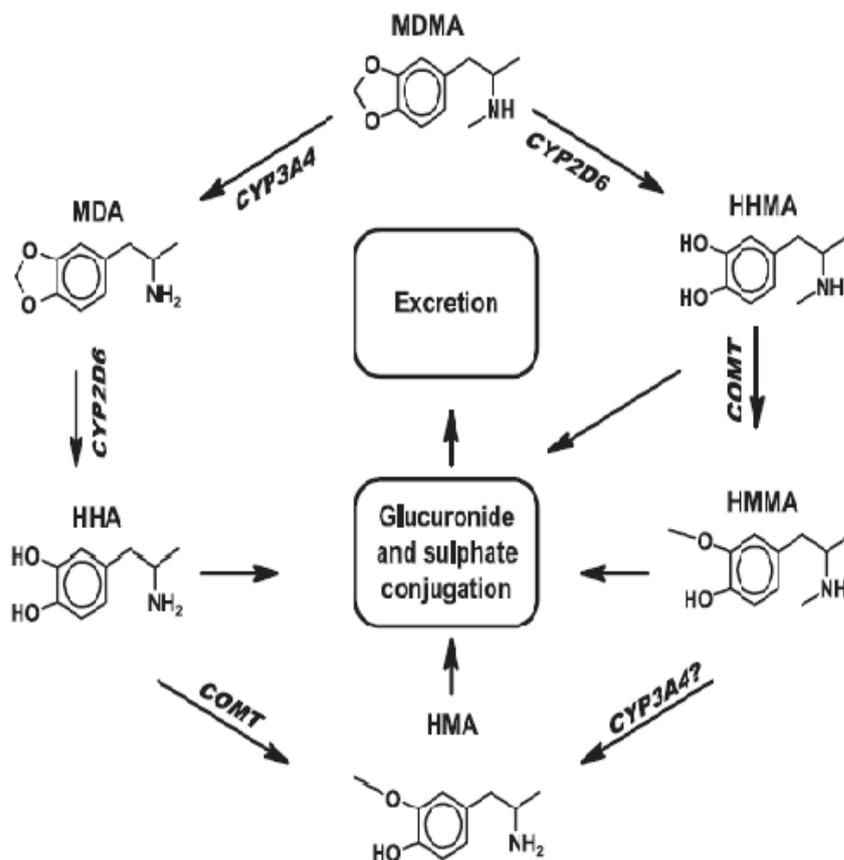


Figura 19 *Metabolismo dell' MDMA*

## 1.4.4. Effetti della MDMA sull'animale da esperimento

### 1.4.4.1 Effetti neurochimici

L'animale da esperimento sul quale gli effetti della MDMA sono stati più ampiamente studiati è il ratto. La maggior parte degli esperimenti riportati in letteratura riguardano per lo più effetti a carico del sistema serotonergico. La somministrazione di MDMA causa nel ratto un rilascio acuto di 5-HT, scientificamente dimostrato con esperimenti di microdialisi (160). Ciò determina una rapida riduzione della concentrazione di 5-HT nei tessuti durante le prime ore che seguono l'assunzione della sostanza (162). Il rilascio di 5-HT nell'ippocampo e nello striato è notevolmente inibito dal

pretrattamento con fluoxetina, un inibitore del SERT, indicando che questo processo coinvolge il trasporto del neurotrasmettitore mediato dal carrier.

Un altro dei più evidenti effetti neurochimici acuti della MDMA è l'inibizione della triptofano-idrossilasi (TPH), l'enzima limitante la biosintesi della 5-HT. E' stato dimostrato che l'attività della TPH nel neostriato, nella corteccia prefrontale, nell'ippocampo e nell'ipotalamo inizia a declinare 15 minuti dopo la somministrazione di MDMA ed un'inibizione residua è stata rilevata fino a due settimane dopo un'unica somministrazione (163). Il blocco della funzione dopaminergica nel SNC, per mezzo di reserpina o 6-OHDA, attenua l'inibizione della TPH indotta da MDMA, facendo ipotizzare un coinvolgimento della DA nell'espressione di questo effetto acuto (164). La somministrazione centrale di MDMA non è in grado di indurre l'inibizione della TPH e questo suggerisce che un metabolita prodotto a livello periferico sia necessario per l'inibizione dell'enzima. E' stato ipotizzato che la MDMA, metabolizzata in chinone, possa legarsi ai gruppi sulfidrilici della TPH determinandone l'inibizione. Questa ipotesi è supportata dal fatto che la funzione enzimatica può essere ristabilita con agenti riducenti in ambiente anaerobio.

Come le altre amfetamine, anche la MDMA induce un'inibizione delle monoamino-ossidasi, con una maggiore selettività verso la MAO-A rispetto alla MAO-B, e nel ratto induce anche un rilascio di DA (165). Vi sono evidenze derivanti dall'utilizzo di GBR 12909, inibitore del trasportatore della DA (DAT) (166), che indicano che il rilascio della DA sia mediato dal DAT, anche se su questa ipotesi restano comunque delle riserve. Infatti il trattamento con fluoxetina blocca significativamente il rilascio di DA, indotta da MDMA, nello striato che, al contrario, è potenziato dal pre-trattamento con un agonista del recettore 5-HT<sub>2</sub> (DOI) (167, 168). Queste evidenze indicano che il rilascio di DA non sia mediato, almeno in questa area, da un'azione diretta della MDMA ma indirettamente dagli effetti sulla trasmissione serotoninergica.

La MDMA è anche capace di indurre il rilascio di noradrenalina in vitro, ma in assenza di dati di microdialisi a riguardo, la rilevanza in vivo di questo meccanismo resta da confermare (160).

#### **1.4.4.2 Effetti comportamentali**

La MDMA induce nel ratto un insieme di manifestazioni, complessivamente indicate come “sindrome comportamentale serotoninergica” (SBS). La SBS è stata per la prima volta osservata in relazione agli inibitori delle MAO e, successivamente, anche in relazione ad agonisti serotoninergici. La SBS comprende numerosi sintomi quali: iperattività, iperpiressia oltre 41°C, disidratazione, secchezza delle fauci, ondeggiamento della testa, piloerezione, midriasi, eiaculazione e diarrea. La MDMA è in grado di indurre, in maniera dose dipendente, iperlocomozione insieme a quasi tutti i sintomi della SBS (169).

Ad ulteriore prova dell'implicazione della 5-HT nell'espressione di questi effetti, è stata dimostrata l'inibizione dell'iperlocomozione ad opera della fluoxetina (170).

Sono stati inoltre indagati gli effetti della MDMA sull'ansia, ma nel ratto, a seconda del test utilizzato, gli esperimenti condotti hanno dato risultati discordanti e hanno evidenziato un effetto ansiogeno nei confronti del comportamento esplorativo ed un effetto ansiolitico nei confronti di quello sociale (171).

Infine, la capacità della MDMA di indurre gratificazione è stata ampiamente dimostrata nel ratto con esperimenti di preferenza condizionata (CPP), di auto-stimolazione e auto-somministrazione (172).

#### **1.4.4.3 Effetti neuroendocrini ed immunomodulanti**

La MDMA è responsabile di alterazioni neuroendocrine che persistono anche dopo molti mesi dalla sospensione del suo utilizzo e ciò indicherebbe o la difficile reversibilità del danno indotto o la presenza di elementi psicobiologici di vulnerabilità preesistenti all'assunzione della sostanza e forse anche capaci di condizionare il ricorso ad essa.

Il diffuso consumo della MDMA è largamente attribuibile al suo unico effetto acuto psicologico ossia l'incremento del desiderio del soggetto di comunicare e interagire con gli altri.

Uno studio condotto su ratti Wistar trattati con MDMA (5mg/Kg) ha evidenziato la loro maggiore tendenza a stabilire relazioni sociali e a trascorrere a stretto contatto lunghi periodi di tempo. Questo effetto è associabile all'aumento, indotto dalla MDMA, dei livelli plasmatici di ossitocina; tale neuropeptide, oltre a stimolare le contrazioni uterine nella fase finale della gestazione e favorire l'eiezione del latte dalle ghiandole mammarie, ha un ruolo fondamentale nell'influenzare la vita di relazione in varie specie animali. La MDMA agisce a livello del nucleo supraottico e del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo dove sono presenti i corpi cellulari dei neuroni che secernono l'ossitocina e proiettano i loro assoni alla neuroipofisi (ipofisi posteriore) da cui l'ormone viene rilasciato in circolo. La MDMA stimola i recettori 5-HT<sub>1A</sub> di tali nuclei promuovendo il rilascio dell'ormone. Il coinvolgimento dei recettori serotoninergici nell'effetto "prosociale" della sostanza d'abuso è stato confermato da uno studio che prevedeva un pretrattamento con WAY100,635, antagonista 5-HT<sub>1A</sub>, in seguito al quale è stata evidenziata l'inibizione del rilascio dell'ossitocina indotto dalla MDMA. Questo importante effetto studiato nei ratti è stato recentemente riscontrato nei consumatori abituali di ecstasy i cui livelli plasmatici di ossitocina sono di gran lunga superiori alla norma (173).

La MDMA determina un aumento dose-dipendente dei livelli plasmatici dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e del cortisolo per l'azione che essa esercita sull'asse ipotalamo-ipofisi-corteccia surrenalica (HPA). La MDMA agisce sul sistema nervoso centrale stimolando la liberazione del fattore di rilascio della corticotropina dall'eminenza mediana dell'ipotalamo e attivando l'asse HPA. L'iperattività dell'asse HPA e la ridotta reattività in risposta a vari tipi di stress possono essere associati ai sintomi depressivi determinati dalla disfunzione del sistema serotoninergico. Anche il deficit nella funzionalità dopaminergica è associabile alla disfunzione dell'asse HPA; il trattamento con l'agonista dopaminergico apomorfina determina, infatti, un significativo aumento dei livelli di ACTH e cortisolo e ciò potrebbe essere dovuto al controllo da parte del sistema dopaminergico sul rilascio degli ormoni implicati nella risposta allo stress (174).

La MDMA altera, inoltre, la concentrazione plasmatica degli ormoni implicati nella regolazione dell'assunzione di cibo; da tempo è noto che tale sostanza

d'abuso, sia in seguito ad una somministrazione acuta che cronica, induce riduzione dell'appetito, perdita di peso e nei casi più gravi anoressia. Questo effetto è imputabile all'azione delle monoammine biogene sul nucleo paraventricolare (PVN), sui nuclei ventromediale e chiasmatico dell'ipotalamo che regolano l'assunzione quotidiana di cibo e l'equilibrio energetico.

L'aumento del rilascio della serotonina e della dopamina, indotto dalla MDMA, è responsabile dell'ipofagia che si traduce in un ridotto apporto di nutrienti, in particolare di carboidrati, e un senso di sazietà immediato.

La MDMA inibisce l'espressione del neuropeptide Y a livello del PVN determinando l'effetto anoressigeno; è stato dimostrato che tale riduzione si ha a varie dosi di MDMA (5, 20, 40 mg/Kg) in ratti Sprague-Dawley e rimane costante nell'arco di 48 ore dalla somministrazione. In questo studio sono stati analizzati anche i livelli sierici di leptina che risultano ridotti e di ghrelina che risultano aumentati; entrambi, però, ritornano ai livelli normali nelle 24 ore per cui hanno un effetto limitato (175).

Oltre agli effetti neuroendocrini, degni di nota sono gli effetti sulla funzionalità del sistema immunitario. È stato sperimentalmente dimostrato che l'esposizione in vitro all'ecstasy altera alcuni parametri immunitari quali la funzione regolatoria delle cellule T (valutata come produzione di citochine), l'attività citotossica dei linfociti T, l'attività delle cellule Natural Killer (NK) e la funzione dei macrofagi (misurata come produzione delle citochine IL-6 e del fattore di necrosi tumorale o TNF). Gli studi in vitro di cui sopra sono stati condotti su splenociti, macrofagi peritoneali e leucociti mononucleati murini di sangue periferico. È emerso che la MDMA ad alte dosi (100 mM) induce una soppressione della produzione di IL-2 da parte delle cellule CD4, sopprime l'attività citotossica dei linfociti T e stimola la funzione delle cellule NK; nei macrofagi esposti alla MDMA è stata osservata una riduzione dose-dipendente della produzione del TNF. Nel ratto, la somministrazione di MDMA riproduce molti dei risultati osservati in vitro quali una soppressione rapida (30 min) e prolungata (6 ore) della risposta linfo-proliferativa e una diminuzione dei linfociti circolanti, accompagnata da un aumento del corticosterone plasmatico che supporta l'ipotesi di un'azione diretta della MDMA sui linfociti. Sia l'asse ipotalamo-ipofisi-corteccia surrenalica che il sistema nervoso simpatico sono fattori modulanti la funzione e la distribuzione dei leucociti.

Nell'uomo, in seguito all'assunzione di ecstasy, si osservano i seguenti fenomeni:

- diminuzione nel rapporto linfociti T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>;
- riduzione delle cellule T-helper, decremento dose-dipendente nella risposta funzionale dei linfociti alla stimolazione fitogenica;

L'alterazione dell'omeostasi immunologica da parte della MDMA è particolarmente interessante in quanto le stesse reazioni da parte del sistema immunitario sono state osservate nella risposta ad alcuni tipi di stress psicologico e fisico provocati in volontari sani. Pertanto, la MDMA può essere considerata un "*chemical stressor*"(176).

#### **1.4.4.4 Neurotossicità**

Vi sono numerosissime evidenze che la MDMA, in seguito a somministrazione singola o ripetuta, causa una deplezione a lungo termine del contenuto di 5-HT in diverse aree cerebrali. Una ricerca ha dimostrato che esiste un andamento temporale del contenuto in serotonina nella corteccia in seguito ad una somministrazione singola, ed è stato così possibile individuare due fasi distinte. Una prima massiccia riduzione del contenuto di 5-HT si ha 3-6 h dopo la somministrazione (16 % del controllo). Successivamente a questa prima fase si ha un rapido recupero, che porta i valori alla normalità 24 h dopo la somministrazione. Dal primo al settimo giorno, infine, si ha un declino graduale che porta la concentrazione di 5-HT al 76% del controllo (163).

La MDMA sembra causare maggiori danni se somministrata frequentemente, infatti dosi ripetute molto diluite nel tempo non sono in grado di indurre un danno duraturo (177). Diversi sono gli studi che hanno rilevato segni evidenti di danno neuronale a carico del sistema serotoninergico.

L'analisi immuno-citochimica di sezioni di cervello di ratto due settimane dopo l'assunzione di MDMA ha evidenziato una riduzione della densità degli assoni serotoninergici, particolarmente marcata nella neocorteccia, nello striato e nell'ipotalamo. La porzione terminale degli assoni è stata mostrata essere più vulnerabile al danno indotto da MDMA; le fini arborizzazioni serotoninergiche risultano, infatti, notevolmente più ridotte rispetto alle fibre di conduzione e i

corpi cellulari nel nucleo del rafe sono essenzialmente risparmiati. Questi dati morfologici concordano con l'analogia riduzione dei siti di trasporto per la 5-HT (178).

Nel ratto la deplezione di 5-HT e del suo metabolita 5-HIAA sembra andare incontro a recupero completo al massimo 52 settimane dopo il trattamento con MDMA. Anche i siti di trasporto della 5-HT si recuperano nello striato e nella corteccia (32 settimane), mentre nell'ippocampo si riscontra una diminuzione significativa anche 52 settimane dopo (179).

La neurotossicità viene totalmente annullata dalla somministrazione di fluoxetina, anche se questa avviene quattro giorni prima del trattamento con MDMA. Ciò ha indotto a pensare che la 5-HT, o un suo metabolita, siano alla base del processo che conduce al danno neurotossico (180).

La somministrazione a livello centrale di MDMA non produce la stessa neurotossicità che si rileva in seguito a somministrazioni a livello periferico (181); ciò ha indotto a pensare che la produzione di un metabolita sia necessaria per l'espressione degli effetti tossici.

I fattori antiossidanti, come l'acido ascorbico, somministrati 1 ora prima di ogni somministrazione di MDMA, prevengono la comparsa di effetti tossici, suggerendo che lo stress radicalico sia una componente essenziale (182) di questo meccanismo. Tra i fattori di protezione contro gli effetti tossici, vi è anche la prevenzione dell'ipertermia (180), e si pensa che ciò sia dovuto al fatto che la formazione di radicali, favorita dalle temperature più alte, sia un passaggio chiave della tossicità indotta da MDMA. Anche il rilascio di DA sembra essere una tappa importante per la manifestazione degli effetti tossici della MDMA (164).

## **1.4.5 Tossicità della MDMA nell'uomo**

### **1.4.5.1 Tossicità acuta**

Esistono nell'uomo quattro grandi tipi di tossicità acuta severa dovuti alla MDMA: sindrome d'ipertermia, tossicità epatica, tossicità cardiovascolare e tossicità vascolare. Queste complicazioni non sono mutuamente esclusive e possono manifestarsi in alcuni pazienti associazioni di diversi tipi di tossicità.

La MDMA (in caso di intossicazione acuta) è in grado di causare una sindrome d'ipertermia caratterizzata da rabdomiolisi, coagulazione intravascolare disseminata e scompenso viscerale multiplo, rapidamente fatale. L'ipertermia compare quattro o cinque ore dopo l'assunzione, la temperatura corporea può velocemente raggiungere 42 °C e se supera questa soglia il rischio di decesso è fortemente elevato.

La sintomatologia clinica dell'epatite fulminante causata da MDMA non è specifica e spesso non è distinguibile da un'epatite di tipo virale (ittero, aumento del tasso degli enzimi epatici) (183). L'epatite può guarire spontaneamente, ma nei consumatori cronici può dare luogo ad una forma fulminante, potenzialmente fatale, per la cui risoluzione risulta necessario il trapianto di fegato (184). Uno studio condotto in Spagna tra il 1994 e il 1996 indica che l'ecstasy rappresenta la seconda causa di epatite nei giovani con meno di 25 anni (183). L'origine di questa epatite non è chiara; potrebbe essere dovuta ad una reazione allergica alla sostanza o ad uno dei suoi contaminanti, oppure essere una conseguenza del metabolismo epatico della MDMA che si svolge principalmente ad opera del citocromo P-450 (184). I prodotti di questa via metabolica condurrebbero alla formazione di specie reattive responsabili di stress ossidativo e morte cellulare.

Le complicazioni cardiovascolari dell'ecstasy sembrerebbero dovute soprattutto agli effetti sul sistema noradrenergico. Tra questi sono stati descritti diversi casi di accidente cardiovascolare cerebrale e di emorragie cerebrali.

### 1.4.5.2 Tossicità cronica

Malgrado in diverse specie di animali da esperimento la tossicità della MDMA sul sistema serotoninergico sia chiaramente dimostrata, nell'uomo è ancora in discussione. Il fatto che le dosi utilizzate dall'uomo siano inferiori rispetto a quelle che si usano sull'animale, ha fatto pensare che non si possano riscontrare danni irreversibili nei soggetti umani. Un solo studio *post-mortem* su un uomo di 26 anni, consumatore di MDMA da 9 anni, ha mostrato una deplezione di 5-HT e del suo metabolita 5-HIAA a livello dello striato (185). La disfunzione serotoninergica nei consumatori di MDMA si può evidenziare principalmente attraverso tre tipi di indagine: il dosaggio del metabolita 5-HIAA nel liquido cefalo-rachidiano, le tecniche di *imaging cerebrale* e le tecniche neuroendocrine. La prima ha mostrato che il metabolismo della serotonina è selettivamente intaccato in seguito alla consumazione di MDMA poichè la concentrazione di 5-HIAA risulta essere notevolmente ridotta (186). Al contrario tramite analisi del liquido cefalo-rachidiano non si riscontrano alterazioni a livello dei metaboliti della dopamina e della noradrenalina. La NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) permette invece di valutare il numero di cellule intatte. Nei consumatori di ecstasy non si riscontra una diminuzione di neuroni (marker: N-acetilaspargato), bensì l'aumento di cellule gliali (marker: myo-inositolo). Questo aumento delle cellule gliali potrebbe indicare un processo di riparazione in atto, relativo all'eventuale danno indotto nei neuroni dalla sostanza (187). La tomografia ad emissioni di positroni (PET) e la tomografia ad emissione di fotone singolo (SPECT) consentono di ottenere delle immagini cerebrali sulla distribuzione e densità di recettori, grazie all'ausilio di molecole marcate con un'alta affinità verso il recettore in esame. Studi di questo tipo hanno dimostrato, tra i consumatori di ecstasy, una marcata diminuzione del SERT e del recettore 5-HT<sub>2A</sub>, quest'ultimo solo nelle regioni corticali. Risulta interessante uno studio SPECT che ha invece rivelato negli ex-consumatori un aumento di 5HT<sub>2A</sub> rispetto al controllo. Questo effetto bifasico sulla densità dei recettori 5-HT<sub>2A</sub> potrebbe essere spiegato ipotizzando che la riduzione iniziale sia dovuta ad una risposta compensativa al massiccio rilascio di sostanza, mentre, a lungo termine, la deplezione degli stocks di 5-HT causerebbe un aumento con lo scopo di mantenere la trasmissione

serotoninergica a livelli omeostatici (188). La perdita di recettori 5-HT sembra andare incontro a remissione in consumatori astinenti da più di un anno. La rigenerazione assonale che si verifica porta ad una riarborizzazione eccessiva. Questa arborizzazione, che avviene in maniera parzialmente incontrollata, potrebbe non permettere il recupero di tutte le connessioni precedenti e potrebbe giustificare l'osservazione clinica del danno permanente nei confronti di certe funzioni cognitive. Nonostante ciò, gli studi clinici che mirano a correlare certe psicopatologie con il consumo di ecstasy, hanno come limite il fatto che, come accennato, per il singolo individuo è difficile valutare la consumazione esatta di MDMA, vista la composizione assai variabile delle compresse, e quindi discriminarne gli effetti rispetto ad eventuali associazioni con altri farmaci psicoattivi.

Oltre a queste riserve esiste una mole di dati provenienti da studi neuropsicologici, che hanno dimostrato un impatto negativo della MDMA nelle performance di memoria di lavoro, memoria a breve termine, riconoscimento semantico e ragionamento verbale (189, 190). Altri studi hanno evidenziato una correlazione tra il consumo di ecstasy ed i disturbi del sonno.

Infine, per quanto riguarda la possibilità della sostanza di indurre dipendenza nell'uomo, sono stati osservati solo pochi casi e ciò pare essere dovuto al consumo della sostanza strettamente legato a contesti festivi (186).

## 1.4.6 MDMA e Parkinson

Negli ultimi anni in letteratura sono apparsi alcuni casi di problemi neurologici in giovani pazienti che potrebbero essere ricondotti all'uso ricreazionale di ecstasy. In particolare sono stati riportati tre casi di sintomi Parkinson- simili in consumatori abituali o occasionali di ecstasy (191, 192, 193). Un primo caso, descritto da Mintzer e collaboratori, riguarda un ventinovenne consumatore di ecstasy, che aveva sviluppato un rapido e progressivo Parkinsonismo che non rispondeva alla classica terapia con sostituenti dopaminergici (192). Un secondo caso, descritto da O'Suilleabhain and Giller (191), descrive il caso di un uomo di 38 anni consumatore abituale di ecstasy anch'egli con un rapido e progressivo Parkinsonismo, ma rispondente, anche se solo parzialmente, alla L-DOPA e al trattamento con agonisti dopaminergici (191).

La spiegazione più semplice e intuitiva per cui si è cercato di correlare il Parkinson in giovane età con il consumo di ecstasy è data dal fatto che la comparsa di questi casi in giovane età e l'aumentato consumo di ecstasy per uso ricreazionale sembrano essere a livello temporale completamente coincidenti. Nonostante la pubblicazione di questi tre casi, però, l'evidenza che l'ecstasy potesse causare la malattia di Parkinson si era basata esclusivamente sui risultati ottenuti in studi su primati non umani (194) condotti da Ricaurte e collaboratori, risultati che poi sono stati ritrattati dallo stesso gruppo di ricerca (195). Nella ritrattazione inoltre sono stati aggiunti nuovi dati che dimostrano che l'ecstasy non danneggia i neuroni dopaminergici nei primati non umani (195). In realtà non esistono evidenze epidemiologiche che il Parkinson o altre alterazioni neurologiche (con la possibile eccezione della perdita della memoria a breve termine) (196) siano una conseguenza persistente dell'esposizione a questa sostanza.

In contrapposizione, nei primi anni del 2000, è stato riportato un singolo caso di un giovane malato di Parkinson in trattamento con L-DOPA in cui l'uso ricreazionale di ecstasy aveva determinato un miglioramento della disabilità motoria e della discinesia. Il meccanismo attraverso cui la MDMA potrebbe dare questi effetti benefici è però sconosciuto, anche se si suppone che l'aumento della serotonina extracellulare, mediata dalla MDMA, possa essere

alla base dei suoi effetti farmacologici (197). Sulla base della loro distribuzione, localizzazione e funzione nei gangli basali i recettori 5HT<sub>1a</sub>, 5-HT<sub>1b/d</sub> e 5-HT<sub>2a</sub>, 5-HT<sub>1c</sub> sono collegati alla modulazione del pathway nigrostriatale (198). Nello striato si ritrovano solo bassi livelli di recettori 5-HT<sub>1a</sub> (199) e inoltre la loro distribuzione e densità è soggetta a modificazioni, infatti si è registrata una up-regulation di questi recettori in scimmie trattate con MPTP (199). I recettori 5-HT<sub>1a</sub> sono coinvolti nel controllo dei comportamenti motori, come dimostrano i trattamenti con sarizotan (200) e tandospirone (201) che sopprimono la discinesia indotta da L-DOPA nei primati trattati con MPTP e in pazienti con Parkinson. Effetto che risulta completamente reversibile con la somministrazione dell'antagonista 5-HT<sub>1a</sub> WAY100635 nei primati trattati con MPTP (200). Inoltre l'antipsicotico atipico Quetiapina, che ha un'attività antagonista nei confronti di 5-HT<sub>2a/c</sub> e D<sub>2/3</sub>, riduce la discinesia indotta da L-DOPA quando somministrata insieme a L-DOPA nei macachi trattati con MPTP (202). Da questi dati si può concludere che i recettori 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> sono i sottotipi coinvolti nella modulazione della discinesia. Quale sia però il sottotipo esatto non è chiaro dato che nessuno dei composti utilizzati è dotato di una sufficiente selettività. Nei roditori sia MDMA che RU24969 (un agonista non selettivo per 5-HT<sub>1</sub>, con una preferenza per 5-HT<sub>1b</sub>) aumentano l'attività motoria ed entrambe le sostanze si ipotizza che lo facciano per azione sui 5-HT<sub>1b</sub> (203).

Scimmie della specie Common Marmosets trattate con MPTP, L-DOPA e RU24969 mostrano anomalie posturali, ma non presentano corea e distonia. L'assenza della discinesia potrebbe essere una conseguenza dell'attivazione dei 5-HT<sub>1a</sub> e 5-HT<sub>2b</sub> da parte di RU24969 e questo potrebbe riflettere l'inibizione dei movimenti involontari da parte della MDMA.

E' stato dimostrato che la MDMA è in grado di prolungare l'azione della L-DOPA e di sopprimere la discinesia in un singolo paziente affetto da morbo di Parkinson (204). Le basi cliniche di questo effetto sono sconosciute, ma si pensa possano essere correlate con l'azione dopaminergica o serotoninergica della MDMA nel cervello. Nei ratti naive la somministrazione di MDMA sopprime l'attività motoria e il comportamento esplorativo. Nei ratti precedentemente trattati con MPTP, la MDMA si è dimostrata in grado di ridurre la disabilità motoria, ma dopo un periodo di 60 minuti si osserva un

peggioramento dei sintomi motori. Inoltre la MDMA riduce la discinesia indotta da L-DOPA o dall'agonista dopaminergico D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> pramipexolo. Questo aspetto è molto importante perché la discinesia può diventare un fattore limitante nei trattamenti a lungo termine dei pazienti affetti da Parkinson con L-DOPA.

Gli studi condotti da Iravani e collaboratori su scimmie della specie Common Marmosets hanno mostrato che la MDMA può risolvere la discinesia indotta da L-DOPA e ridurre l'attività motoria (204). Infatti la somministrazione di dosi elevate di MDMA nelle scimmie non aumenta l'attività motoria in contrasto con l'effetto che si ottiene con altri agenti dopaminergici come la amfetamine (205). La MDMA infatti determina una soppressione dell'attività motoria che si manifesta con un ridotto movimento della testa, un'inibizione della vocalizzazione ed un'attenuazione della risposta agli stimoli uditivi. Questi comportamenti sono riconducibili a quella che viene definita "sindrome serotoninergica" (206). Queste osservazioni suggeriscono una predominanza degli effetti sul sistema serotoninergico della MDMA in condizioni di sistema dopaminergico intatto.

La soppressione dell'attività motoria, osservata nelle scimmie, è nettamente in contrasto con gli effetti che si registrano in ratti trattati con MDMA che mostrano un'iperattività nel test chamber (207, 208). Questa iperattività è dovuta ad un aumento dei livelli di serotonina a livello cerebrale, come dimostrato dall'attenuazione di questi effetti in seguito a somministrazione di p-clorofenilalanina (209).

Nelle scimmie trattate con MPTP la somministrazione di MDMA causa un netto aumento dell'attività motoria e un provvisorio miglioramento della disabilità motoria dose dipendente. Questi effetti sono seguiti da una ritardata e dose dipendente riduzione dell'attività motoria. Quindi, la disabilità motoria viene migliorata immediatamente dalla MDMA, ma successivamente subisce un peggioramento. Questi effetti sono in contrasto con quello che si ottiene somministrando agonisti dopaminergici ai primati preventivamente trattati con MPTP (210) suggerendo che la MDMA debba agire con un meccanismo d'azione completamente diverso.

Nelle scimmie (common marmosets) trattate con MPTP somministrando preventivamente MDMA, la discinesia indotta da L-DOPA viene meno, ma

non viene intaccata l'abilità della L-DOPA di ridurre la disabilità motoria (204). Questo aspetto è molto importante perché l'iperattività motoria è correlata con gli effetti collaterali di un trattamento a lungo termine del Parkinson, mentre il miglioramento della disabilità motoria rappresenta l'effetto terapeutico della L-DOPA.

Una spiegazione degli effetti della MDMA potrebbe essere un'alterazione della conversione della L-DOPA in DA sostenuta dal fatto che la diminuzione della discinesia e dell'attività motoria indotti da MDMA vengono superati da un aumento delle dosi di L-DOPA. Inoltre il fatto che la MDMA non abbia effetti sui miglioramenti della disabilità motoria indotti da L-DOPA suggerisce che questi effetti siano indipendenti dalla trasmissione dopaminergica. Oltre a ciò la MDMA è in grado di diminuire l'attività motoria e la discinesia prodotte dal pramipexolo senza influenzare il miglioramento della disabilità (204). Dato che l'azione del pramipexolo è sui recettori dopaminergici post- sinaptici è ovvio che l'azione della MDMA sulla L-DOPA sia mediata dall'alterazione della sua conversione in DA. E questo indica che la MDMA non va ad interagire con gli aumentati livelli di DA da parte della L-DOPA (204).

Recentemente, è stato inoltre ipotizzato che i principali metaboliti della MDMA potrebbero attivare i recettori 5-HT<sub>1ab</sub> e 5-HT<sub>2c</sub> oltre a stimolare il rilascio di ossitocina e vasopressina (211, 212, 213).

Sono stati condotti anche ulteriori esperimenti con la MDMA su ratti maschi Sprague- Dawley per cercare di identificare un componente della MDMA con possibile attività anti- Parkinsoniana. Nei ratti sono stati indotti sintomi Parkinson- simili con l'aloiperidolo. Per valutare l'azione della MDMA si è preso come parametro la catalessi (rigidità e acinesia). Somministrando MDMA si osserva un'inversione dose- dipendente della catalessi indotta da aloiperidolo (214). Gli effetti neurochimici principali della MDMA sono dovuti al rilascio di serotonina e solo in parte minore al rilascio di dopamina (215). Da questo profilo neurochimico non è possibile predire un effetto anti- Parkinsoniano, infatti il rilascio di serotonina non dovrebbe influenzare il Parkinson. Al contrario però in letteratura ci sono dati che dimostrano che l'aumentato rilascio di serotonina o l'inibizione del suo reuptake mediante fluoxetina o clomipramina contribuiscono ad un miglioramento della catalessi (216). Inoltre nell'uomo alcuni inibitori selettivi del reuptake della serotonina,

come il citalopram, possono occasionalmente causare sintomi Parkinsoniani (217).

In realtà però il fatto che la MDMA causi un miglioramento dei sintomi del Parkinson per la sua azione sulla trasmissione nigriostriatale dopaminergica non può ancora essere completamente escluso anche se il legame diretto della MDMA ai recettori D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> nello striato mostra solo una bassa affinità (218).

## **1.5 PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE: il Morbo di Parkinson**

Il morbo di Parkinson (PD) idiopatico è una malattia neurodegenerativa cronica e progressiva caratterizzata da degenerazione progressiva dei neuroni dopaminergici. La sua eziologia è tutt'oggi ancora sconosciuta e la degenerazione dei neuroni dopaminergici è stata osservata su tessuto cerebrale post- mortem (219).

Recenti studi hanno dimostrato che alcuni dei neuroni dopaminergici sopravvissuti alla degenerazione presentano delle inclusioni citoplasmatiche di eosinofili, dette corpi di Lewy, costituite in gran parte da proteine. L'accumulo di proteine, secondo alcuni ricercatori, avrebbe un ruolo importante nella patogenesi del Parkinson (220, 221, 222, 223). In realtà però la sola presenza dei corpi di Lewy non rappresenta un fattore di malattia (220).

I tipi di sintomi presenti e la loro gravità dipendono significativamente dalla lunghezza del tempo di manifestazione della patologia, dalla rapidità del declino funzionale e dalle cure ricevute dal paziente. In generale i sintomi più caratteristici sono bradicinesia, rigidità, tremore e instabilità posturale, sintomo che solitamente appare solo nella fase avanzata della malattia (224, 225). I disturbi motori possono essere distinti in sintomi positivi, che consistono in comportamenti che normalmente non si manifestano in soggetti sani, e sintomi negativi, che consistono in una diminuzione o perdita delle normali capacità motorie (226). I sintomi motori positivi associati al morbo di Parkinson sono tremore, rigidità muscolare e movimenti involontari dovuti a trattamento con L-DOPA, mentre i sintomi negativi sono dati da bradicinesia e difetti di postura. Oltre a disturbi motori, i pazienti affetti da morbo di Parkinson spesso esibiscono disfunzioni cognitive e nei casi più gravi, gli individui soffrono di demenza, che si presenta con gravi disturbi della memoria, del pensiero, del linguaggio e di altri processi cognitivi. Nel 40% dei pazienti sono state riscontrate anche sintomatologie depressive (227).

La diagnosi di morbo di Parkinson può essere fatta soltanto quando l'individuo ha già la malattia da un certo tempo, poiché il sistema nigrostriatale è in grado

di resistere alla perdita di oltre il 50% dell'innervazione dopaminergica senza manifestare sintomi. Infatti, questi non compaiono finchè sono ancora presenti il 50-60% dei neuroni della substantia nigra e circa il 20% dell'innervazione dopaminergica nel caudato putamen (228); è ritenuta necessaria una perdita sostanziale (approssimativamente dell'80%) dei livelli di dopamina nello striato, prima che i sintomi si evidenzino (229). Ciò è dovuto a risposte compensatorie dei neuroni dopaminergici sopravvissuti ed anche delle cellule postsinaptiche dello striato, che aiutano a mitigare la progressiva perdita di tale innervazione. Inoltre, sono state osservate risposte compensatorie da afferenze ai dendriti dei neuroni dopaminergici nella substantia nigra (230). Un tipo di risposta compensatoria è dato da un aumento del riciclo (turn-over) metabolico e quindi da un'intensificata attività delle rimanenti cellule dopaminergiche. Un secondo tipo di risposta compensatoria consiste in una aumentata densità e sensibilizzazione dei recettori postsinaptici dopaminergici.

Studi cerebrali postmortem indicano, in genere, modesti ma significativi aumenti dei recettori D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> nel putamen di malati di Parkinson (231). La severa acinesia che si osserva negli stadi tardivi della malattia è comunemente associata ad una perdita di neuroni nella substantia nigra, in media tra il 60% e l'80%. Inoltre, i livelli di dopamina sono ridotti del 95% nel putamen ma solo del 60-90 % nel nucleo caudato (232). Nel cervello umano il nucleo caudato ed il putamen sono segregati anatomicamente all'interno della capsula; al contrario, il cervello di ratto manca di questa struttura anatomica e quindi viene chiamato dai ricercatori "complesso caudato-putamen".

Il morbo di Parkinson è spesso ritenuto un disordine dopaminergico specifico; però, numerosi studi istologici hanno dimostrato una perdita di cellule non dopaminergiche, che includono neuroni noradrenergici del locus coeruleus, neuroni serotoninergici del nucleo dorsale del rafe e neuroni colinergici all'interno della substantia innominata, in particolare nei nuclei basali di Meynert (233). Il danno a questi importanti sistemi neuronali può svolgere un significativo ruolo in alcuni degli aspetti del Parkinsonismo non correlati al movimento, come ad esempio cognizione e depressione.

A livello farmacologico il trattamento più utilizzato per questa patologia è la somministrazione del precursore della dopamina L-DOPA, sostanza che però determina come effetti collaterali una fluttuazione delle risposte motorie e

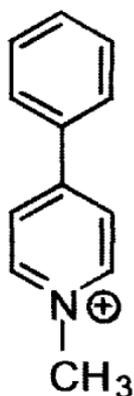
discinesia (234). Questo trattamento però, così come quello con altri agonisti dopaminergici, non è in grado di prevenire la progressione della malattia (235).

### 1.5.1 Modelli di Parkinson nell'animale da esperimento

I modelli sperimentali per il morbo di Parkinson sono necessari per investigare i possibili meccanismi patologici della malattia e per sviluppare nuove strategie terapeutiche. Sono disponibili alcuni modelli genetici che utilizzano topi transgenici, ma è più comune l'uso di neurotossine specifiche che riproducono in vivo caratteristiche del morbo di Parkinson. Agenti che selettivamente distruggono i sistemi catecolaminergici, come la 6-idrossidopamina (6-OHDA) e la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), sono stati utilizzati al fine di sviluppare modelli di Parkinson (236). Recentemente, è stato evidenziato che anche sostanze chimiche utilizzate in agricoltura come il rotenone, il paraquat ed il maneb, quando somministrate a livello sistemico, possono indurre determinate caratteristiche del morbo di Parkinson (237).

#### **MPTP**

L'MPTP è un contaminante chimico di droghe sintetiche in grado di produrre

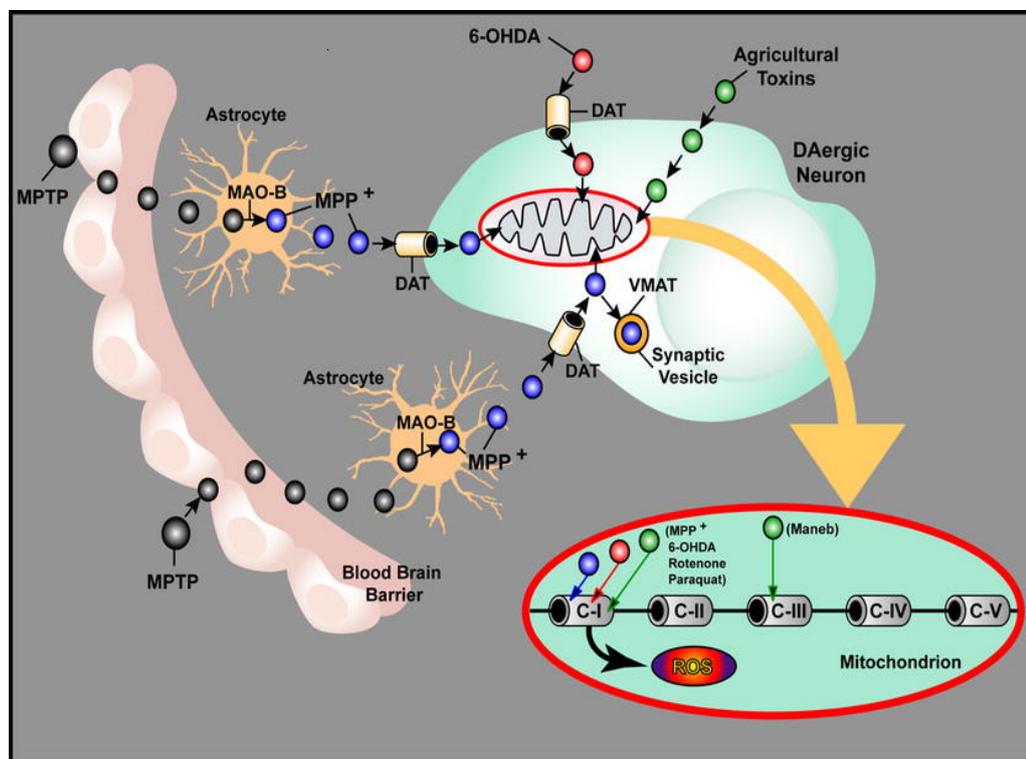


**MPP<sup>+</sup>**

sintomi clinici molto simili al morbo di Parkinson nell'uomo. Dopo la somministrazione, attraversa la barriera ematoencefalica e viene convertito, a livello degli astrociti, nel suo metabolita attivo, lo ione 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridinio (MPP<sup>+</sup>) (Fig. 20). MPP<sup>+</sup> è selettivamente captato nei neuroni dopaminergici grazie alla sua affinità per il

**Figura 20** formula di struttura di MPP<sup>+</sup>

trasportatore della dopamina (DAT), ed è quindi selettivamente tossico per i neuroni dopaminergici (238). La tossicità dell'MPP<sup>+</sup> sembra essere dovuta all'inibizione del complesso I della catena mitocondriale di trasferimento degli elettroni, che dà origine a stress ossidativo (239) (Fig. 21). Questo meccanismo d'azione dell'MPP<sup>+</sup> suggerisce un ruolo della disfunzione mitocondriale nel PD: infatti, in pazienti malati di Parkinson è stata riscontrata una diminuzione dell'attività del complesso I (240). L'esposizione ad MPTP provoca degenerazione dopaminergica in varie specie, tra cui topi, gatti e primati (241).



**Figura 21** Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione di differenti neurotossine. Tali sostanze, una volta entrate in vario modo all'interno dei neuroni dopaminergici, vengono accumulate nei mitocondri dove danneggiano la catena di trasferimento di elettroni (ETC), che consiste nel complesso I-V. Più precisamente MPP<sup>+</sup>, danneggia direttamente la subunità C1 provocandone l'inibizione e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Nell'insieme, queste intossicazioni mitocondriali aumentano la produzione di radicali liberi e diminuiscono la sintesi di ATP, determinando il danno neuronale.

La suscettibilità all'MPTP varia a seconda della specie animale e, per ragioni sconosciute, i ratti sono resistenti alla tossicità prodotta da questa tossina ma non alle somministrazioni intracerebroventricolari del suo metabolita attivo MPP<sup>+</sup>. L'esposizione acuta ad MPTP provoca una degenerazione specifica delle vie nigrostriatali dopaminergiche con perdita del 50-93% nella parte compatta della substantia nigra ed una perdita di dopamina maggiore del 99 % nello striato (242). Comunque, esiste una sostanziale variabilità tra animali in termini di dosi effettive e di reversibilità dei sintomi clinici.

Esiste qualche limitazione nel modello dell'MPTP: alcuni protocolli di somministrazione utilizzano un trattamento acuto della tossina, ed in questo modo non riescono a riprodurre gli effetti di tipo progressivo del Parkinson; il trattamento cronico con MPTP può superare questa limitazione. Si è visto anche che una somministrazione a lungo termine con MPTP a dosi più basse risulta in un recupero dell'attività locomotoria una volta che si interrompa il trattamento. Inoltre, il modello dell'MPTP non è indirizzato direttamente alla valutazione del coinvolgimento nel PD del danno a livello del sistema mitocondriale: infatti l'MPP<sup>+</sup> inibisce l'attività del complesso I solo in cellule che esprimono il trasportatore della dopamina e quindi, questo modello valuta soltanto l'ipotesi che la disfunzione del complesso I sia tossica per i neuroni dopaminergici.

## 1.5.2 Nocicettina e Parkinson

La nocicettina ed il suo recettore NOP sono espressi nell'area ventrale tegmentale (VTA) e nella substantia nigra (SN) (243, 244, 245), da cui originano le vie dopaminergiche ascendenti coinvolte nel controllo motorio (Fig. 22). L'azione inibitoria sulla locomozione esercitata dalla N/OFQ esogena è stata spiegata sulla base sia dell'inibizione dei neuroni dopaminergici della VTA (246) e della SN compacta (SNc) (247), sia della trasmissione lungo le vie mesoaccumbali e nigrostriatali. Più recentemente, è stato anche evidenziato, mediante studi farmacologici e genetici, che la nocicettina endogena inibisce la locomozione nella substantia nigra reticolata (SNr) (247): infatti, le somministrazioni in quest'area di antagonisti peptidici e non peptidici del recettore NOP, [Nphe1,Arg14,Lys15] N/OFQ-NH2 (UFP-101) (71) e J-113397 rispettivamente, come anche la delezione del gene del recettore NOP in topi, incrementano il rilascio di dopamina striatale e aumentano le prestazioni al rotarod. Inoltre UFP-101 facilita la locomozione spontanea, inducendo rotazione controlaterale.

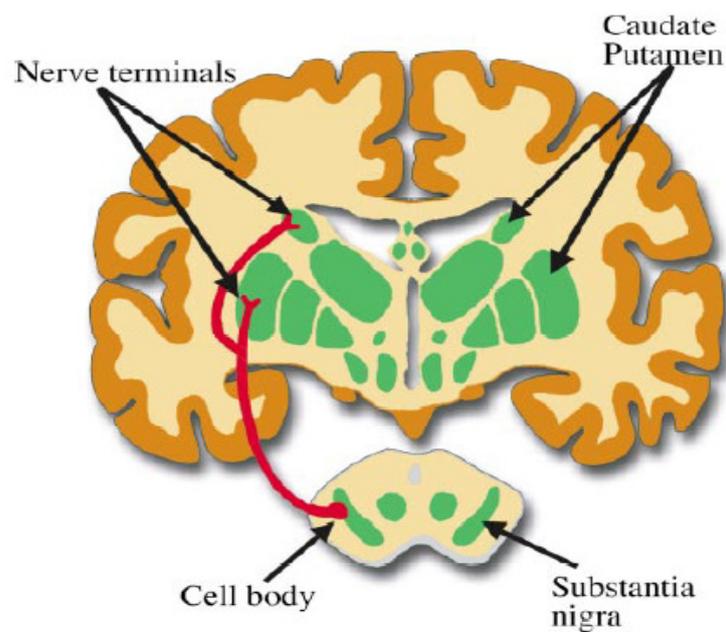
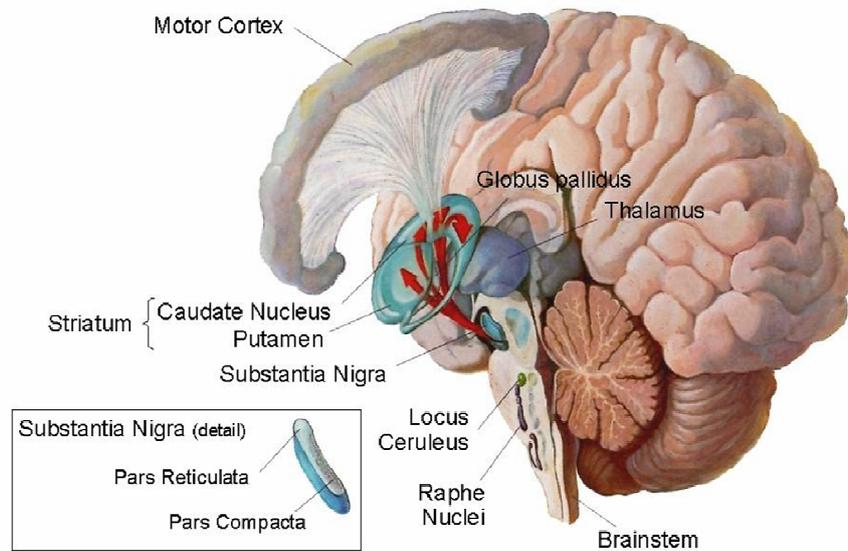
È stato precedentemente dimostrato che, sia la nocicettina endogena che quella esogena, facilitano il rilascio di glutammato nella SNr. Ciò suggerisce che UFP-101 antagonizzi l'acinesia contrapponendosi al rilascio nigrale di glutammato indotto da nocicettina. Inoltre, sembra che il neuropeptide faciliti il rilascio di glutammato indirettamente mediante meccanismi mediati dalle vie dei recettori D<sub>2</sub> e GABA<sub>A</sub>. Quindi, si può ipotizzare che la riduzione del rilascio di glutammato indotta da UFP-101 in condizioni di trasmissione dopaminergica danneggiata, sia principalmente dovuta ad un aumentato rilascio di GABA in seguito a disinibizione di interneuroni GABAergici nigrali. Questa ipotesi è supportata dall'evidenza che la nocicettina inibisce i neuroni GABAergici nella VTA e che nel talamo antagonisti del recettore NOP disinibiscono una sottopopolazione di neuroni GABAergici in vivo. Inoltre, è interessante notare come UFP-101 diminuisca il rilascio di glutammato principalmente in condizioni di catalessia, indicando che la facilitazione del rilascio di glutammato e quindi l'inibizione della locomozione indotta da nocicettina endogena, risulta aumentata quando la trasmissione dopaminergica è danneggiata. Inoltre, evidenze farmacologiche indicano che la nocicettina

endogena promuove l'acinesia indotta da aloperidolo mediante un aumento del tono glutammaergico, nonostante l'acinesia da aloperidolo rappresenti un modello di Parkinson funzionale.

SNr invia le informazioni motorie generate a livello della corteccia cerebrale, queste vengono processate nello striato e nel talamo e poi inviate nuovamente alla corteccia motoria a formare un circuito neuronale che regola i movimenti (detto circuito corticobasale-ganglio-talamocorticale). Su queste basi i trattamenti farmacologici o le condizioni patologiche che alterano la trasmissione nocicettiva in SNr sono in grado di interferire con questo circuito e quindi con la processazione delle informazioni motorie a livello corticale.

In studi recentissimi, il nostro laboratorio ha messo in luce un'aumentata espressione dell'mRNA della nocicettina nella SN, in seguito a trattamento con MPP<sup>+</sup> in accordo con i dati presenti in letteratura che mostravano un aumento di questi livelli in seguito a trattamento con la neurotossina 6-OHDA (246). Al contrario l'espressione genica della nocicettina risulta diminuita nel CP in seguito a trattamento con entrambe le neurotossine. In contrasto con questi dati, la neurotossina MPP<sup>+</sup> determina una diminuzione dell'espressione genica di NOP sia nella SN sia nel CP. Questi dati, considerati in relazione con altri recenti studi in questo ambito, suggeriscono un'associazione tra i neuroni dopaminergici e il sistema neuropeptidergico nocicettina\ NOP nella SN e nel CP a conferma del coinvolgimento di questo sistema neuropeptidergico nei meccanismi del morbo di Parkinson. E' comunque importante sottolineare che non è possibile escludere con certezza il fatto che le alterazioni osservate per il recettore NOP siano causate da un'alterata funzione di altre componenti dei neuroni dopaminergici o da altri effetti delle neurotossine usate (247).

## Brain Regions Affected by Parkinson's Disease



**Figura 22** *Rappresentazione tridimensionale (a) e rappresentazione schematica (b) della via dopaminergica nigrostriatale, la cui degenerazione progressiva è responsabile della maggior parte dei sintomi del morbo di Parkinson. I neuroni dopaminergici, i cui corpi cellulari sono situati nella SN, mandano proiezioni che rilasciano dopamina nello striato. Con la degenerazione della via nigrostriatale, si determina una progressiva diminuzione di dopamina nello striato che risulta in complesse modificazioni dei circuiti motori del cervello e causa il deficit motorio caratteristico del morbo di Parkinson.*

## 2 SCOPO DELLA RICERCA

---

Le evidenze sperimentali esposte nell'introduzione sottolineano le caratteristiche del sistema nocicettina/NOP e ne delineano il profilo farmacodinamico.

La ricerca scientifica studia da molti anni i possibili effetti di differenti farmaci d'abuso sul sistema oppioidi. Tra questi, risultano interessanti gli effetti evocati da due sostanze d'abuso di largo consumo: la cocaina e la MDMA (ecstasy).

Dati sperimentali hanno evidenziato che la somministrazione cronica di cocaina provoca, nel ratto, un aumento della densità dei recettori oppioidi  $\mu$  e  $\kappa$  nel nucleus accumbens e nel caudato putamen (127), un aumento dell'espressione genica della prodinorfina nel caudato putamen ed una diminuzione nell'ipotalamo(129). Inoltre emergono dati in letteratura che dimostrano che la somministrazione acuta di N/OFQ è in grado di attenuare l'attività stimolatoria indotta da cocaina (143).

A supporto dell'ipotesi che la nocicettina sia coinvolta negli effetti indotti da cocaina, recentemente il nostro laboratorio ha evidenziato che la somministrazione cronica di cocaina è in grado di indurre una diminuzione del peptide nocicettina (129).

Vista l'analogia della Nocicettina con i peptidi oppioidi endogeni, vista la capacità della cocaina di indurre alterazioni sull'espressione genica di questi ultimi (143), e vista l'azione della nocicettina sugli effetti indotti da cocaina, scopo della mia ricerca è stato indagare le possibili alterazioni dell'espressione genica del sistema nocicettina/NOP e dinorfina/KOP nel SNC di ratto in seguito a trattamento cronico con cocaina.

Lo studio ha riguardato le aree del circuito dopaminergico mesolimbico particolarmente interessate dalle modificazioni neuronali che sottendono l'uso dei farmaci d'abuso e quindi si è concentrato sullo Striato, la Substantia Nigra, l'Area Ventrale Tegmentale e il Nucleus Accumbens.

La seconda parte della mia ricerca ha riguardato un altro farmaco d'abuso di largo impiego: la MDMA più comunemente conosciuta come ecstasy.

Studi condotti dal nostro laboratorio hanno dimostrato come anche la MDMA sia in grado di alterare l'espressione genica della prodinorfina in aree cerebrali di ratto quali: l'ipotalamo, l'ippocampo, lo striato, l'area ventrale tegmentale, il nucleus accumbens e la corteccia prefrontale, evidenziando il coinvolgimento del sistema oppioide endogeno negli effetti di tale sostanza d'abuso (220).

Data la relazione tra il sistema oppioide ed il sistema nocicettina/NOP, si è quindi indagato il possibile coinvolgimento di quest'ultimo negli effetti indotti da MDMA.

I potenti effetti della MDMA sul sistema serotoninergico sembrano essere i maggiori responsabili delle sue azioni, tuttavia essa interferisce anche con la trasmissione dopaminergica incrementando il rilascio di dopamina. Oltre ad un'azione diretta della MDMA sul trasportatore della dopamina (DAT), sembra che il rilascio della DA sia determinato principalmente dall'azione sul recettore 5-HT<sub>2A/2C</sub> da parte della serotonina i cui livelli sinaptici sono significativamente aumentati in risposta al trattamento con la sostanza d'abuso in esame. Un altro fattore che interviene nella facilitazione del rilascio della DA nello striato e nella substantia nigra è la riduzione del rilascio del GABA mediato dai recettori 5-HT<sub>2</sub> e ciò determina l'attenuazione del controllo a feedback esercitato dal neurotrasmettitore GABA sul rilascio della DA.

Nell'ultimo decennio in letteratura sono comparsi articoli contrastanti sul coinvolgimento della MDMA nella malattia di Parkinson. In particolare, secondo alcuni autori, l'aumentata diffusione per uso ricreazionale dell'ecstasy potrebbe essere una delle cause di comparsa di sintomi Parkinsoniani in età giovanile. In realtà però tutti gli studi condotti sul possibile coinvolgimento dell'ecstasy nella degenerazione neuronale associata al Parkinson hanno portato a risultati contraddittori.

Recentemente è stato ipotizzato il coinvolgimento della nocicettina nella patologia neurodegenerativa del Parkinson visto che svolge un ruolo biologico anche in fenomeni di ipereccitabilità neuronale (221, 222).

Infatti, è stato osservato che il peptide, può provocare acinesia mediante una facilitazione del rilascio di glutammato (223), e che le somministrazioni di antagonisti peptidici e non peptidici del recettore NOP, possono antagonizzare l'acinesia contrapponendosi al rilascio nigrale di glutammato indotto da nocicettina. Inoltre, sembra che lo stesso neuropeptide faciliti il rilascio di

glutammato indirettamente attraverso meccanismi mediati dalle vie dei recettori D<sub>2</sub> e GABA<sub>A</sub> (223).

Risulta da quanto esposto una possibile relazione tra la neurodegenerazione Parkinsoniana sia con il sistema neuropeptidergico nocicettina/NOP che con i meccanismi molecolari attivati da MDMA. Scopo della mia ricerca è stato valutare il possibile coinvolgimento del sistema neuropeptidergico Nocicettina/NOP nei meccanismi attivati da MDMA in animali naive e in un modello animale di Parkinson.

Lo studio ha riguardato sia alcune aree del circuito dopaminergico mesolimbico quali il Nucleus Accumbens (NA) e l'Area Ventrale Tegmentale (VTA), sia il Midollo Allungato (BS) in quanto in quest'area si trovano i corpi neuronali dei neuroni serotoninergici, ed infine la Substantia Nigra (SN) e il Caudato Putamen (CP) in quanto componenti della via motoria nigro-striatale.

## 3 MATERIALI E METODI

---

### 3.1 ESPERIMENTI IN VIVO

#### 3.1.1 Animali

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley, del peso di  $210\pm 20$ g (Harlan, Italia).

Gli animali sono stati alloggiati in gabbie di makrolon e sono stati alimentati con una dieta standard in pellets ed acqua liberamente accessibili. L'illuminazione, regolata in modo automatico, ha previsto cicli di 12 ore di luce (h 7-h 19) e 12 ore di buio (h 19-h 7) e la temperatura è stata costantemente mantenuta a  $21\pm 2^\circ\text{C}$ .

Per facilitare l'acclimatazione degli animali, si è lasciato trascorrere un periodo di 3-4 giorni nelle condizioni sopra citate, prima del loro utilizzo sperimentale. Trascorso tale periodo, gli animali sono stati sottoposti ai trattamenti di seguito descritti.

#### 3.1.2 Trattamenti

##### 3.1.2.1 Trattamenti con cocaina

I ratti sono stati suddivisi in 2 gruppi ( $n=12$ ), in ognuno sono state impiantate minipompe osmotiche che rilasciavano  $1\mu\text{l/h}$  (Alzet, Model 2001) (Fig.23) per 7 giorni. Le minipompe, sterili e monouso vengono riempite con la soluzione da somministrare e avviate mediante immersione *overnight* in soluzione fisiologica.

I ratti vengono brevemente anestetizzati, una incisione preticata all'altezza delle scapole tra le quali scollando la cute si ricava una tasca all'interno della quale viene deposta la minipompa. L'incisione viene suturata.

Le dosi da somministrare sono state determinate dalla media dei pesi di ciascun gruppo di animali e dal volume medio di rilascio delle minipompe osmotiche.

Al gruppo controllo è stata somministrata soluzione fisiologica per 7 giorni, al secondo gruppo è stata somministrata una soluzione di cocaina alla dose di 50 mg/kg/die per 7 giorni.



**Fig. 23:** *Rappresentazione grafica di minipompe osmotiche (Alzet, Model 2001).*

### **3.1.2.2 Trattamenti con MDMA**

I ratti sono stati suddivisi in due gruppi principali. Il primo gruppo è stato ulteriormente suddiviso in quattro sottogruppi ognuno dei quali costituito da 5-8 animali. Il primo sottogruppo ha ricevuto una somministrazione singola di MDMA alla dose di 8 mg/kg (0,2 ml/100g i.p), il secondo due somministrazioni giornaliere per sette giorni alla stessa dose del precedente. Gli altri due sottogruppi sono stati trattati secondo lo schema dei due precedenti, ma con soluzione fisiologica (0,9% NaCl, i.p.).

Il secondo gruppo è stato suddiviso in 4 sottogruppi di 5-8 ratti ciascuno. Le soluzioni deputate alla deplezione dopaminergica sono state somministrate per mezzo di un catetere inserito direttamente nel ventricolo laterale cerebrale (ICV) mediante la tecnica descritta nei successivi paragrafi. Ad ogni animale sono stati iniettati 5µl di soluzione: al primo sottogruppo soluzione fisiologica, al secondo, terzo e quarto sottogruppo 40 µg/5µl di MPP<sup>+</sup>. L'avvenuto danno dopaminergico è stato confermato mediante PET (positron emission tomography). Dopo 10 giorni dalla somministrazione, i ratti sono stati trattati

per via intraperitoneale (IP): il primo e secondo sottogruppo con salina, il terzo con una singola somministrazione di MDMA alla dose di 8 mg/kg (0,2 ml/100g i.p) e il quarto con due somministrazioni giornaliere di MDMA per sette giorni alla stessa dose del precedente.

La MDMA è stata ottenuta dal National Institute of Drug Abuse/ National Institutes of Health (NC, USA).

### ***3.1.2.2.1 Incannulazione cronica intracerebroventricolare (i.c.v.)***

Il ratto viene sottoposto ad anestesia con sodio pentobarbitale e clorallidato (30/130 mg/kg i.p.). Viene poi inciso longitudinalmente nella porzione mediana dell'area frontale fino all'area intraparietale, dove si pongono 1-2 gocce di anestetico locale (ossibuprocaina cloridrato 4.0 mg/ml) per desensibilizzare ulteriormente l'area interessata dall'operazione chirurgica. Localizzato il bregma, si procede forando l'osso parietale destro 2 mm lateralmente e posteriormente al bregma medesimo. Il foro viene eseguito con una punta di trapano dentistico posizionata perpendicolarmente alla parete della volta cranica. In posizione diametralmente opposta, viene praticata una piccola sede nell'osso frontale sinistro, utilizzando una fresa dentistica ed inserendovi una piccola vite in acciaio. Si colloca quindi la porzione interna del catetere nel primo foro praticato, scendendo fino a una profondità calcolata di 4.5 mm. Su quanto predisposto si pone una preparazione a base di cemento dentistico a presa rapida (polimetilmetacrilato), costituito da una polvere (il catalizzatore perossido di benzoile) e una fase liquida (il monomero metilmetacrilato), in modo da bloccare la base del catetere e le altre componenti del sistema di ancoraggio. In questa fase, è necessario forgiare opportunamente il cemento quando questo è ancora plastico durante la ricopertura, in modo che non siano presenti imperfezioni grossolane nel profilo dello stesso che potrebbero creare danno all'animale, compromettendo la tenuta della sutura e la corretta cicatrizzazione della ferita. Si procede poi al lavaggio interno della cannula con soluzione fisiologica sterile per mezzo di

una microsiringa, alla chiusura dell'estremità superiore per compressione a caldo, ed infine alla suturazione della cute con filo Polifil E.P.2.

### ***3.1.2.2.1.1 Preparazione del catetere***

Il catetere è costituito da tre distinte componenti, che vengono preparate singolarmente e successivamente assemblate: il catetere principale, la porzione protettiva e la doppia serpentina di filo di rame. Il catetere principale è costituito da un tubicino di polietilene (PE 10, Beckton-Dickinson, diametro esterno 0.61 mm, interno 0.28 mm) appositamente forgiato nel modo seguente:

- a) una porzione esterna della lunghezza di 5-6 cm;
- b) una porzione interna della lunghezza di 4.5 mm con estremità a “becco di flauto”;
- c) le due porzioni sono comunicanti attraverso una espansione del tubicino appositamente creata a caldo per bloccare la parte interna della cannula alla profondità prestabilita di 4.5 mm;

La porzione protettiva è costituita da un tubicino di Silastic<sup>®</sup> (Dow Corning, diametro esterno 1.65 mm , diametro interno 0.76 mm) della lunghezza di 8 mm inserito esternamente al catetere principale, posizionato con l'estremità inferiore in corrispondenza dell'espansione che funge da blocco a livello del cranio. Questa protezione preserva il catetere principale dal contatto diretto con il cemento dentistico che, per la sua natura vetrosa, entro breve tempo usurerebbe inesorabilmente fino a rottura la sottile struttura del PE 10. Applicando questa procedura, si è apprezzato un significativo aumento della durata e della qualità dei cateteri rispetto al protocollo che non prevedeva l'inserimento della porzione protettiva.

L'elemento di stabilità per il sistema di ancoraggio alla vite di acciaio e specialmente per la porzione protettiva è costituito da un filo di rame lungo 2 cm che, grazie alle sue caratteristiche di plasticità, viene prima piegato formando un nodo semplice lasso, poi forgiato a serpentina ad entrambi i capi. Nel “nodo” viene inserito il catetere con la porzione protettiva, quindi “strozzato” dal filo di rame in corrispondenza del margine superiore dell'espansione senza occludere il catetere stesso. L'introduzione del filo di rame garantisce l'immobilità della porzione protettiva (Silastic<sup>®</sup>), impedendo

un eventuale suo scorrimento lungo la porzione centrale costituita dal catetere principale, e costituisce inoltre l'elemento di ancoraggio alla vite d'acciaio solidale alla volta cranica. Questo tipo di ancoraggio, unitamente all'introduzione della porzione protettiva, contribuisce a garantire una maggiore stabilità e una miglior resa dell'intera operazione di incannulazione intracerebroventricolare nel ratto rispetto al passato.

### **3.1.3 Prelievo dei tessuti**

#### **3.1.3.1 Trattati con cocaina**

Al termine del trattamento cronico (ottavo giorno), i ratti sono stati sacrificati per decapitazione con le minipompe ancora inserite, i cervelli sono stati rapidamente prelevati e le aree cerebrali sono state dissezionate secondo la metodica di Glowinski ed Iversen. Le aree cerebrali sono poi state congelate immediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  utilizzando anidride carbonica solida.

#### **3.1.3.2 Trattati con MDMA**

Per tutti i sottogruppi 2 ore dopo l'ultima somministrazione di MDMA, i ratti sono stati sacrificati per decapitazione, i cervelli sono stati rapidamente prelevati e le aree cerebrali sono state dissezionate. Le aree cerebrali sono poi state congelate immediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  utilizzando anidride carbonica solida.

## **3.2 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

### **3.2.1 Estrazione di RNA totale dai tessuti**

L'RNA totale è stato estratto dalle aree cerebrali secondo la metodica di Chomczynski e Sacchi: i campioni sono stati inizialmente trattati con una soluzione contenente fenolo e guanidinio isotiocianato, denominata TRIzol. All'omogenato è stato aggiunto cloroformio alla concentrazione finale del 10%, si è agitato vigorosamente dopodichè, per favorire la separazione delle fasi organica e acquosa, si è lasciato in ghiaccio per 5 minuti. È stata effettuata una prima centrifugazione di 25 minuti alla velocità di 11000 giri/min. a 4 °C, al termine della quale il campione risulta diviso in due fasi: una inferiore rosa, organica contenente fenolo-cloroformio, ed una superiore incolore, acquosa contenente l'RNA. Successivamente, è stata prelevata la fase acquosa e trasferita in un tubo sterile, ad essa è stato aggiunto un uguale volume di isopropanolo per facilitare la precipitazione dell'RNA; il tutto è stato lasciato per 15 minuti a 4 °C. Dopo aver nuovamente agitato vigorosamente, è stata effettuata una seconda centrifugazione di 25 minuti alla velocità di 11000 giri/min. a 4 °C, al termine della quale si ritrova l'RNA totale stratificato in fondo al tubo sotto forma di un piccolo pellet. A questo punto si è stato allontanato il surnatante e il pellet è stato lavato con 1 ml di etanolo al 75%. E' stata poi effettuata una terza centrifuga di 10 minuti alla velocità di 11000 giri/min. a 4 °C, al termine della quale si è eliminato l'etanolo.

Successivamente il pellet è stato disciolto in 25µl di acqua RNAsi e DNAsi free, così da garantire la stabilità della soluzione, si è agitato sino a completa dissoluzione del pellet e si è trasferita la soluzione così ottenuta in Eppendorf sterili che sono state poi conservate a -20°C.

La concentrazione di RNA della soluzione è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica in densità ottica, misurando l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm (1 O.D./ml = 40 µg RNA totale/ml). Il rapporto O.D. 260/280 desiderato > 2.0; l'integrità dell'RNA è stata verificata su gel di agarosio 1%.

### 3.2.2 Reazione di trascrizione inversa

Dopo isolamento dell'RNA totale dai tessuti in esame, 2 µg di ciascun campione sono stati digeriti con DNase RNase-free enzyme (Invitrogen, WI, USA) per eliminare il DNA genomico, e quindi convertiti in DNA complementare (cDNA) usando 50 U di Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) in 20 µl di buffer contenente 0.5 mM deossinucleotidi trifosfati, 2 U/ml RNase inhibitor, e 0.5 µg/µl oligo(dT) primer.

### 3.2.3 Disegno dei primer per la PCR

I primer del recettore NOP, del precursore del neuropeptide nocicettina, del recettore KOP, della prodinorfina e della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), utilizzato come standard interno per le reazioni semiquantitative, sono stati disegnati con il software Primer 3.0 (copyright 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research) in accordo con le sequenze della GenBank. Determinata la sequenza, sono stati sintetizzati dalla ditta Invitrogen Life Technologies. Le sequenze dei primer sono riportate nella tabella sottostante:

<i>Gene</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (3'-5')</i>	<i>Product size</i>
GAPDH	AgACAgCCgCATCTTCTTgT	CTTgCCgTgggTAgAgTCAT	207
ppN/OFQ	TgCAgCACCTgAAgAgAATg	CAACTTCCgggCTgACTTC	170
NOP	AgCTTCTgAAgAggCTgTgT	gACCTCCCgTATggAgCAG	101
pDYN	CCTgTCCTTgTgTTCCCTgT	AgAggCAgTCAgggTgAgAA	157
KOP	TTggCTACTggCATCATCTg	ACACTCTTCAAgCgCaggAT	177

**Tabella:** sequenze dei primer forward e reverse relativi alla gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), al precursore della nocicettina, al recettore NOP, alla prodinorfina e al recettore KOP.

### **3.2.4 Real Time PCR**

Il cDNA ottenuto mediante reazione di trascrizione inversa, è stato diluito e utilizzato come template nella reazione di Real-Time PCR (circa 5 ng totali di cDNA per reazione) condotta in 20 uL con SYBR GREEN Master Mix. L'abbondanza di mRNA dei vari trascritti è stata quantificata come differenze di Ct tra il gene target e il gene controllo. L'espressione genica relativa è stata calcolata mediante il metodo del delta-delta Ct e convertita mediante la formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  per l'analisi statistica. Tutti i dati sono stati normalizzati prima con l'espressione del gene di controllo interno gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e poi con il gruppo naive (non trattati).

### **3.3 Analisi statistica**

I risultati sperimentali da trattamento con cocaina sono stati analizzati mediante analisi della varianza (One Way ANOVA) seguita dal test di Dunnett. I dati derivanti da trattamento con MDMA e MPP<sup>+</sup> sono stati analizzati mediante analisi della varianza (Two Way ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

Tutti i dati sono riportati come medie  $\pm$  errore standard come variazioni rispetto alla media dei controlli posta uguale ad uno.

Il livello di significatività statistica è stato posto a  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ .

## 4 RISULTATI

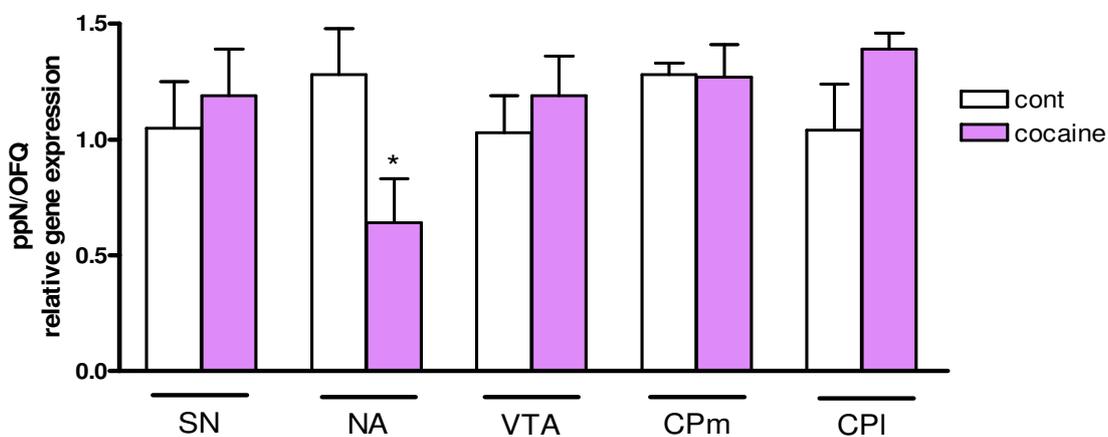
---

### 4.1 Effetti della somministrazione di cocaina

#### 4.1.1 sull'espressione genica della N/OFQ

Gli studi di espressione genica, condotti mediante Real Time PCR, mostrano che in seguito a trattamento cronico con cocaina non si verificano variazioni statisticamente significative in SN (naive  $1.05 \pm 0.2$ , cocaina  $1.19 \pm 0.2$ ), VTA (naive  $1.03 \pm 0.16$ , cocaina  $1.19 \pm 0.17$ ), CPm (naive  $1.28 \pm 0.05$ , cocaina  $1.27 \pm 0.14$ ) e CPI (naive  $1.04 \pm 0.2$ , cocaina  $1.39 \pm 0.07$ ).

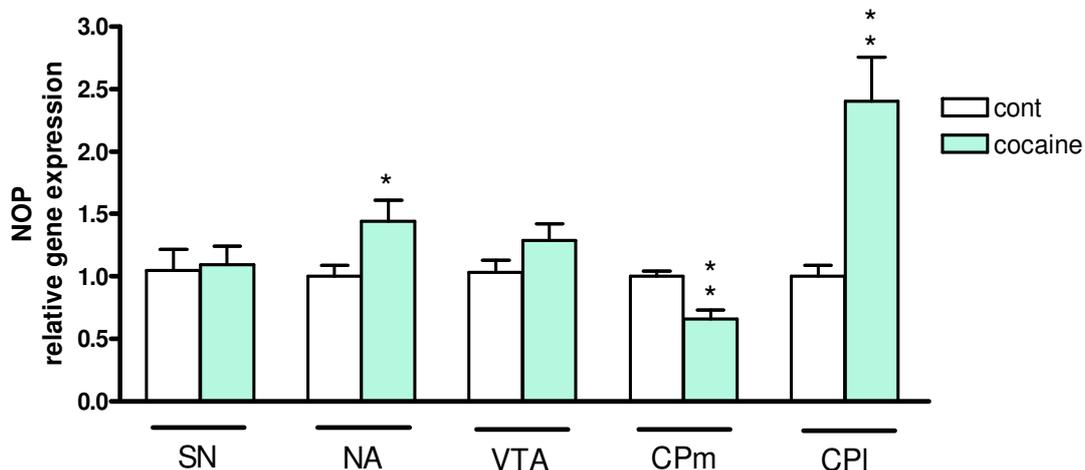
Nel NA, invece, questa sostanza d'abuso è in grado di provocare una diminuzione statisticamente significativa dell'mRNA della nocicettina (naive  $1.28 \pm 0.02$ , cocaina  $0.64 \pm 0.19$ ; \* $p < 0.05$  – One-way ANOVA Dunnet post test).



**Fig.24** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per la ppN/OFQ nelle aree cerebrali SN, NA, VTA, CPm e CPI in ratti naive ed in ratti trattati con cocaina alla dose di 50 mg/Kg/die per 7 giorni. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

## 4.1.2 sull'espressione genica del recettore NOP

Gli studi di espressione genica, condotti mediante Real Time PCR, mostrano che in seguito a trattamento cronico con cocaina nel CPm si ha una significativa diminuzione della biosintesi del recettore NOP (naive  $1.00 \pm 0.04$ , cocaina  $0.66 \pm 0.072$ ;  $**p < 0.01$ – One-way ANOVA Dunnet post test). Al contrario, nel NA e nel CPI si ha un aumento statisticamente significativo dello stesso mRNA (rispettivamente: naive  $1.00 \pm 0.089$ , cocaina  $1.44 \pm 0.17$ ,  $*p < 0.05$ ; naive  $1.00 \pm 0.087$ , cocaina  $2.40 \pm 0.355$ ,  $**p < 0.01$ – One-way ANOVA Dunnet post test). Nelle aree cerebrali SN e VTA il trattamento con cocaina non sembra modificare l'espressione del recettore NOP (rispettivamente: naive  $1.045 \pm 0.17$ , cocaina  $1.092 \pm 0.149$ ; naive  $1.034 \pm 0.098$ , cocaina  $1.289 \pm 0.13$ ).

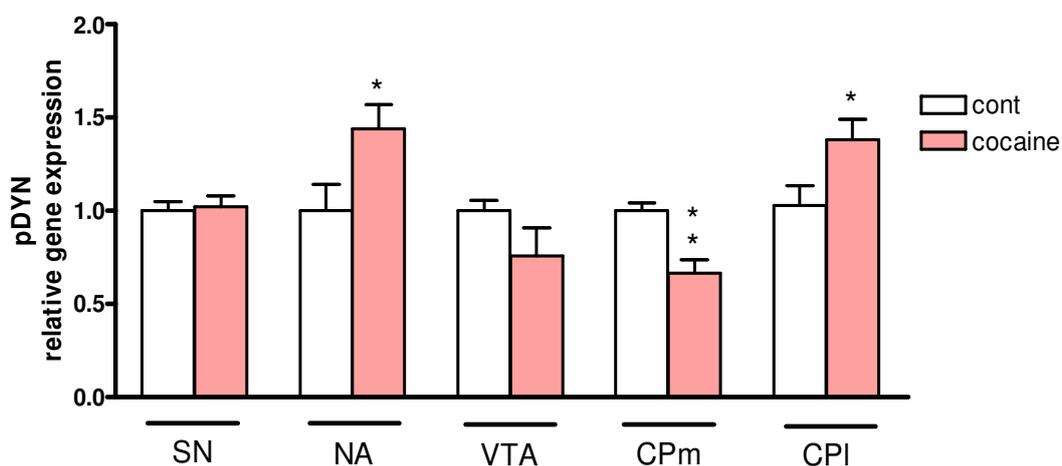


**Fig.25** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nelle aree cerebrali SN, NA, VTA, CPm e CPI in ratti naive ed in ratti trattati con cocaina alla dose di 50 mg/Kg/die per 7 giorni. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

### 4.1.3 sull'espressione genica della dinorfina

Gli studi di espressione genica, condotti mediante Real Time PCR, mostrano che in seguito a trattamento cronico con cocaina, la prodinorfina risulta sensibilmente aumentata sia nel NA che nel CPI (rispettivamente: naive  $1.00 \pm 0.14$ , cocaina  $1.44 \pm 0.13$ ,  $*p < 0.05$ ; naive  $1.027 \pm 0.107$ , cocaina  $1.39 \pm 0.109$ ,  $*p < 0.05$ - One-way ANOVA Dunnet post test). Al contrario, nel CPm, la sostanza d'abuso sembra in grado di far diminuire in modo statisticamente significativo l'espressione genica della prodinorfina (naive  $1.00 \pm 0.04$ , cocaina  $0.664 \pm 0.07$ ,  $**p < 0.01$ - One-way ANOVA Dunnet post test).

Nelle aree cerebrali SN e VTA, il trattamento cronico con cocaina non altera i normali livelli di mRNA della dinorfina (rispettivamente: naive  $1.00 \pm 0.05$ , cocaina  $1.021 \pm 0.06$ ; naive  $1.00 \pm 0.056$ , cocaina  $0.758 \pm 0.150$ ).

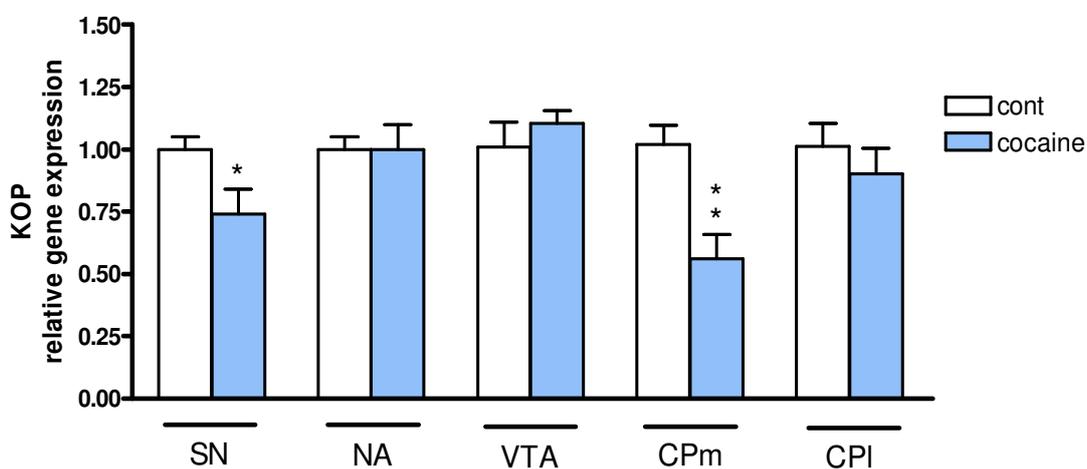


**Fig.26** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per la prodinorfina nelle aree cerebrali SN, NA, VTA, CPm e CPI in ratti naive ed in ratti trattati con cocaina alla dose di 50 mg/Kg/die per 7 giorni. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

#### 4.1.4 sull'espressione genica del recettore KOP

Gli studi di espressione genica, condotti mediante Real Time PCR, mostrano che in seguito a trattamento cronico con cocaina, nella SN e nel CPm si ha una diminuzione statisticamente significativa dell'mRNA del recettore (rispettivamente: naive  $1.00 \pm 0.05$ , cocaina  $0.74 \pm 0.1$ ,  $*p < 0.05$ ; naive  $1.02 \pm 0.077$ , cocaina  $0.563 \pm 0.095$ ,  $**p < 0.01$ - One-way ANOVA Dunnet post test).

Nelle aree cerebrali NA, VTA e CPI, invece, la cocaina non altera i livelli basali di messaggero (rispettivamente: naive  $1.00 \pm 0.05$ , cocaina  $1.00 \pm 0.1$ ; naive  $1.01 \pm 0.01$ , cocaina  $1.103 \pm 0.052$ ; naive  $1.013 \pm 0.09$ , cocaina  $0.903 \pm 0.103$ ).



**Fig.27** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore KOP nelle aree cerebrali SN, NA, VTA, CPm e CPI in ratti naive ed in ratti trattati con cocaina alla dose di 50 mg/Kg/die per 7 giorni. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

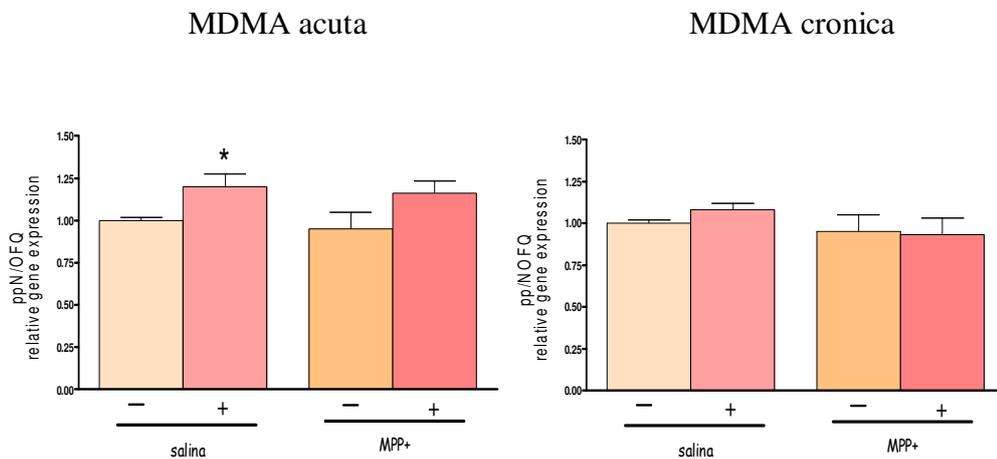
## 4.2 Effetti della somministrazione di MDMA

### 4.2.1 nel MIDOLLO ALLUNGATO

#### 4.2.1.1 sull'espressione genica della ppN/OFQ

Lo studio dell'espressione genica in seguito ad esposizione acuta e cronica a MDMA anche in modelli di Parkinsonismo, mostra un aumento statisticamente significativo dei livelli di mRNA di Nocicettina solo negli animali trattati con la somministrazione acuta di MDMA (naive  $1.0 \pm 0.0196$ , MDMA acuta  $1.2 \pm 0.0747$ , \* $p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test).

Né la deplezione dopaminergica indotta con MPP<sup>+</sup> né i rimanenti trattamenti con MDMA sembrano in grado di alterare l'espressione del precursore della nocicettina.

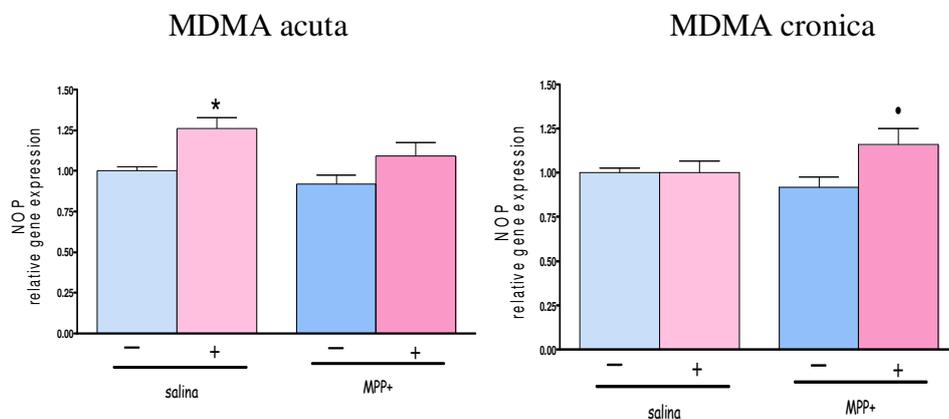


**Fig.28** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per la N/OFQ nel midollo allungato in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

### 4.2.1.2 sull'espressione genica del recettore NOP

Lo studio dell'espressione genica del recettore NOP evidenzia un aumento statisticamente significativo sia dopo somministrazione acuta di MDMA (naive  $1.0 \pm 0.027$ , MDMA acuta  $1.26 \pm 0.066$ , \* $p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test), che dopo trattamento cronico con la stessa sostanza ma in condizioni di deplezione dopaminergica (MPP<sup>+</sup>  $0.92 \pm 0.055$ , MPP<sup>+</sup>/MDMA cronica  $1.16 \pm 0.091$ , \* $p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test).

Non provocano alterazioni nei livelli di mRNA del recettore né il trattamento cronico di MDMA, né la sola deplezione, né il trattamento acuto di MDMA a seguito della neurotossina.



**Fig.29** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nel midollo allungato in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

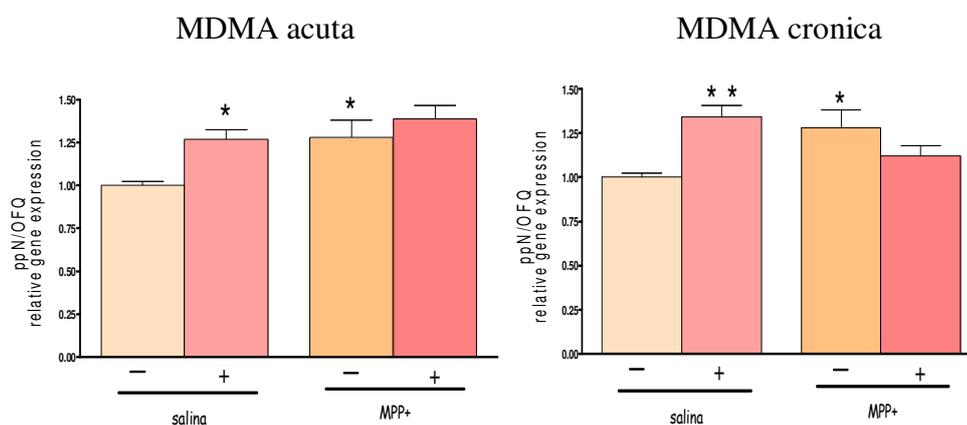
## 4.2.2 nell' AREA VENTRALE TEGMENTALE

### 4.2.2.1 sull'espressione genica della ppN/OFQ

Lo studio dell'espressione genica della nocicettina mostra un aumento statisticamente significativo sia in seguito a trattamento acuto di MDMA (naive  $1.0 \pm 0.025$ , MDMA acuto  $1.27 \pm 0.055$ ,  $*p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test), che cronico (naive  $1.0 \pm 0.025$ , MDMA cronico  $1.34 \pm 0.068$ ,  $**p < 0.005$  – One-way ANOVA Bonferroni post test).

La deplezione indotta con la neurotossina MPP<sup>+</sup> induce un aumento significativo dei livelli di mRNA della ppN/OFQ (naive  $1.0 \pm 0.025$ , MPP<sup>+</sup>  $1.28 \pm 0.1$ ,  $*p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test).

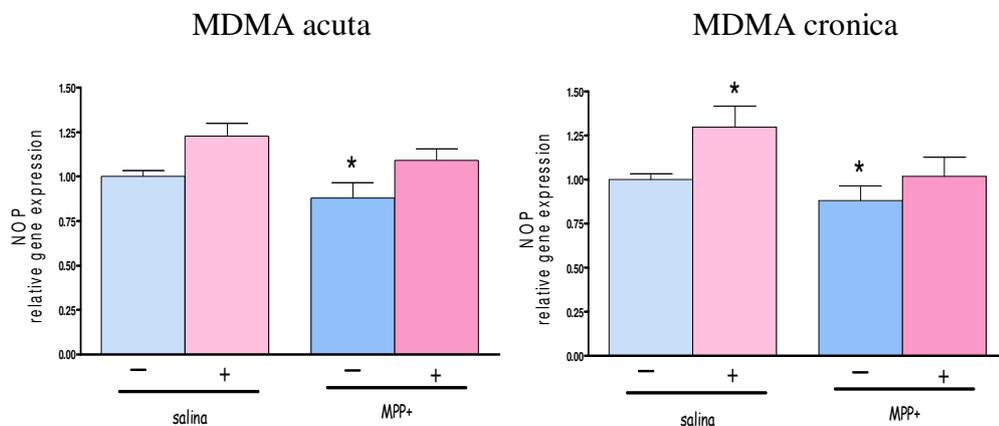
Il trattamento con MDMA sia acuto che cronico, in seguito ad MPP<sup>+</sup>, non provoca alcuna variazione rispetto alla sola deplezione dopaminergica.



**Fig.30** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per la N/OFQ nell'area ventrale tegmentale in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

#### 4.2.2.2 sull'espressione genica del recettore NOP

Per quanto riguarda l'espressione genica del recettore NOP si osserva un aumento statisticamente significativo in seguito a somministrazione cronica di MDMA (naive  $1.00 \pm 0.34$ , MDMA cronica  $1.30 \pm 0.12$ ,  $*p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test). Al contrario, la somministrazione di MPP<sup>+</sup> ne determina una riduzione statisticamente significativa (naive  $1.00 \pm 0.34$ , MPP<sup>+</sup>  $0.88 \pm 0.087$ ,  $*p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test) che non subisce variazioni in seguito a successiva somministrazione di MDMA.

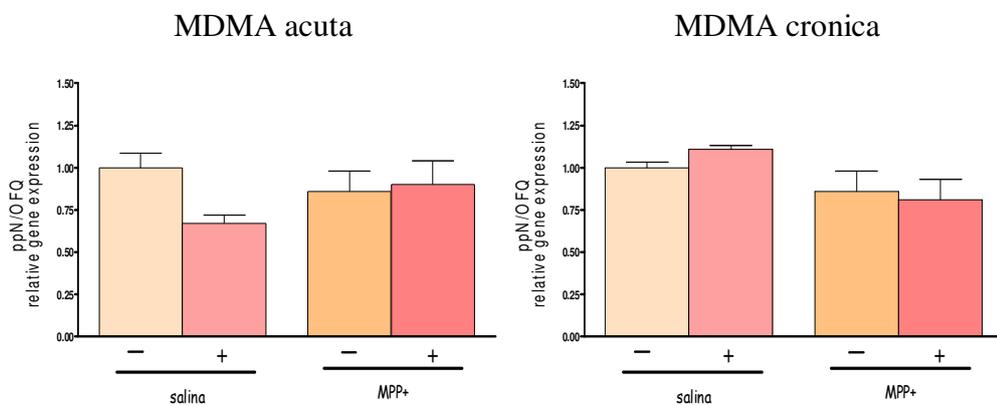


**Fig.31** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nell'area ventrale tegmentale in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

## 4.2.3 Nel NUCLEUS ACCUMBENS

### 4.2.3.1 sull'espressione genica della ppN/OFQ

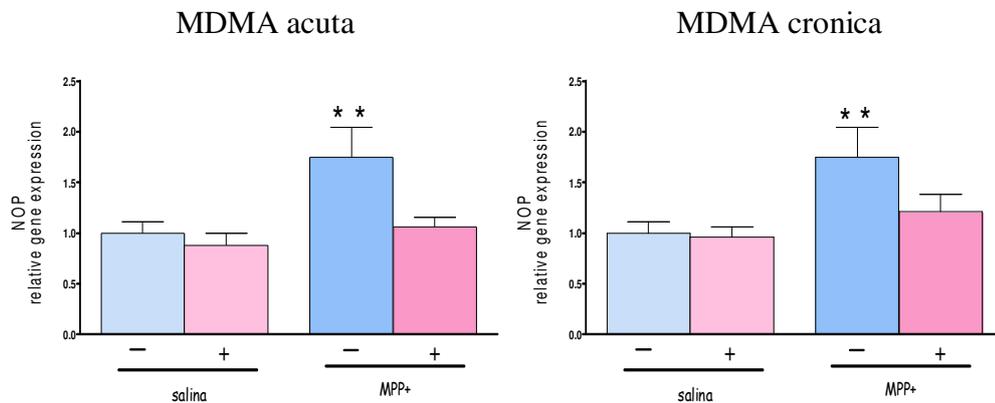
In quest'area cerebrale, né la somministrazione di MDMA, sia acuta che cronica, né della neurotossina MPP<sup>+</sup> sembrano in grado di influenzare l'espressione genica della Nocicettina .



**Fig.32** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per la N/OFQ nel nucleus accumbens in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive*

### 4.2.3.2 sull'espressione genica del recettore NOP

Per quanto riguarda l'espressione genica del recettore NOP, la sola somministrazione di MDMA non provoca variazioni. Tuttavia se somministrata in seguito all'MPP<sup>+</sup>, il quale provoca un aumento significativo dell'mRNA del recettore (naive  $1.00 \pm 0.11$ , MPP<sup>+</sup>  $1.75 \pm 0.29$ , \*\* $p < 0.01$  – One-way ANOVA Bonferroni post test), questa sembra in grado di riportarlo a valori paragonabili ai fisiologici.

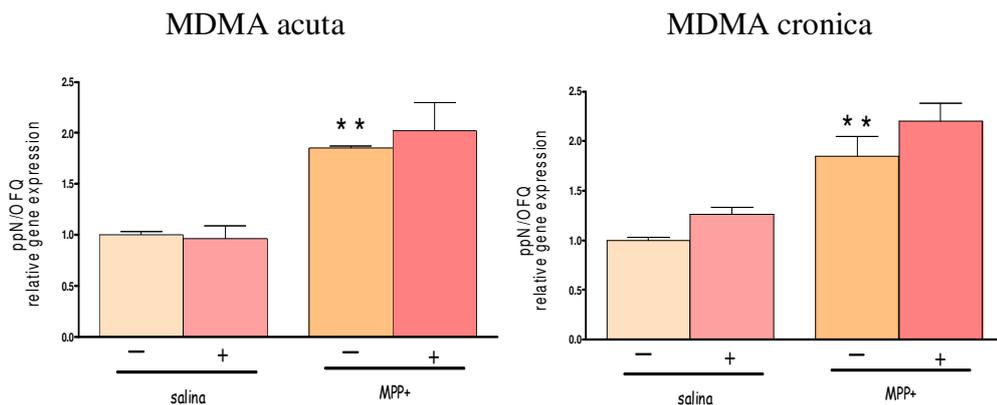


**Fig.33** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nel nucleus accumbens in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

## 4.2.4 Nella SUBSTANTIA NIGRA

### 4.2.4.1 sull'espressione genica della ppN/OFQ

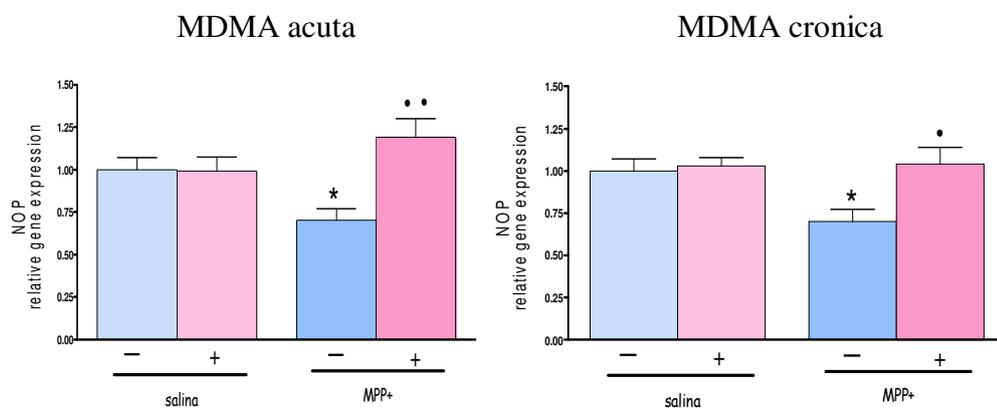
In quest'area cerebrale si osserva un aumento statisticamente significativo dell'espressione genica della nocicettina solo in seguito a somministrazione di MPP<sup>+</sup> (naive  $1.00 \pm 0.034$ , MPP<sup>+</sup>  $1.85 \pm 0.02$ ,  $**p < 0.01$  – One-way ANOVA Bonferroni post test). La MDMA non sembra agire a questo livello né in condizioni fisiologiche né di deplezione dopaminergica.



**Fig.34** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per la N/OFQ nella substantia nigra in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive*

#### 4.2.4.2 sull'espressione genica del recettore NOP

Per quanto riguarda l'espressione del recettore NOP, il solo trattamento con MDMA non provoca variazioni. In seguito a somministrazione della neurotossina si evidenzia una diminuzione statisticamente significativa dell'mRNA del recettore NOP (naive  $1.00 \pm 0.07$ , MPP<sup>+</sup>  $0.70 \pm 0.071$ , \* $p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test), che tuttavia viene riportata a valori simili ai fisiologici sia dopo somministrazione acuta che cronica di MDMA (rispettivamente: MPP<sup>+</sup>  $0.70 \pm 0.071$ , MPP<sup>+</sup>/MDMA acuta  $1.19 \pm 0.11$ , \*\* $p < 0.01$ ; MPP<sup>+</sup>  $0.70 \pm 0.071$ , MPP<sup>+</sup>/MDMA cronica  $1.04 \pm 0.099$ , \* $p < 0.05$ – One-way ANOVA Bonferroni post test).



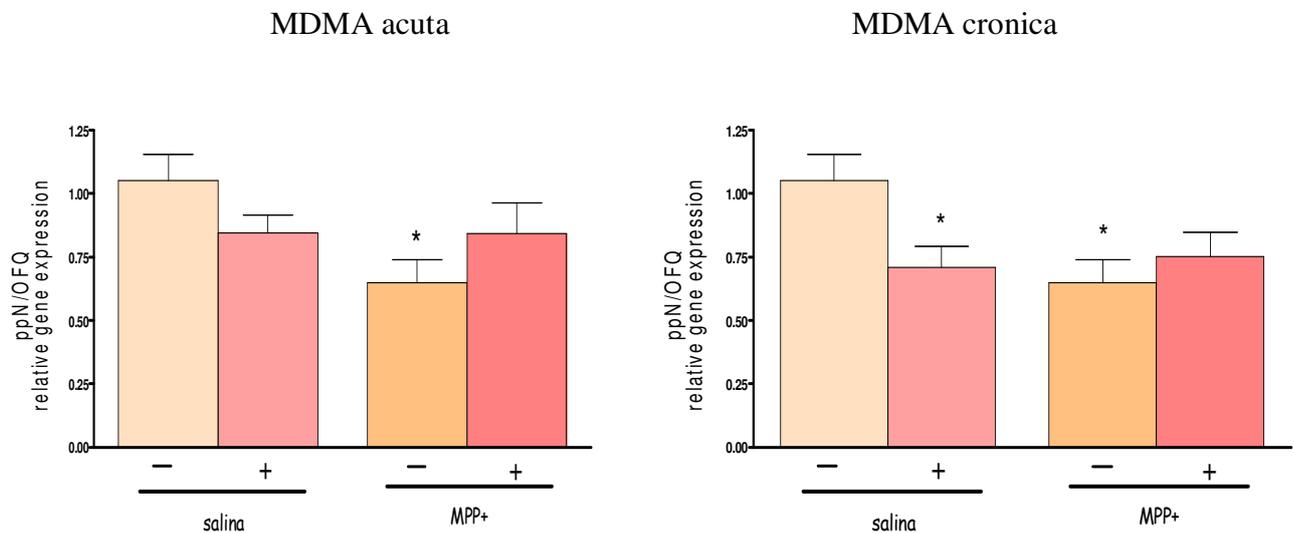
**Fig.35** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nella substantia nigra in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

## 4.2.5 Nel CAUDATO PUTAMEN

### 4.2.5.1 sull'espressione genica della ppN/OFQ

Lo studio di espressione genica in quest'area cerebrale mostra una diminuzione statisticamente significativa in seguito a deplezione dopaminergica mediante MPP<sup>+</sup> (naive 1.052±0.1030, MPP<sup>+</sup> 0.65±0.09, \*p<0.05 – One-way ANOVA Bonferroni post test).

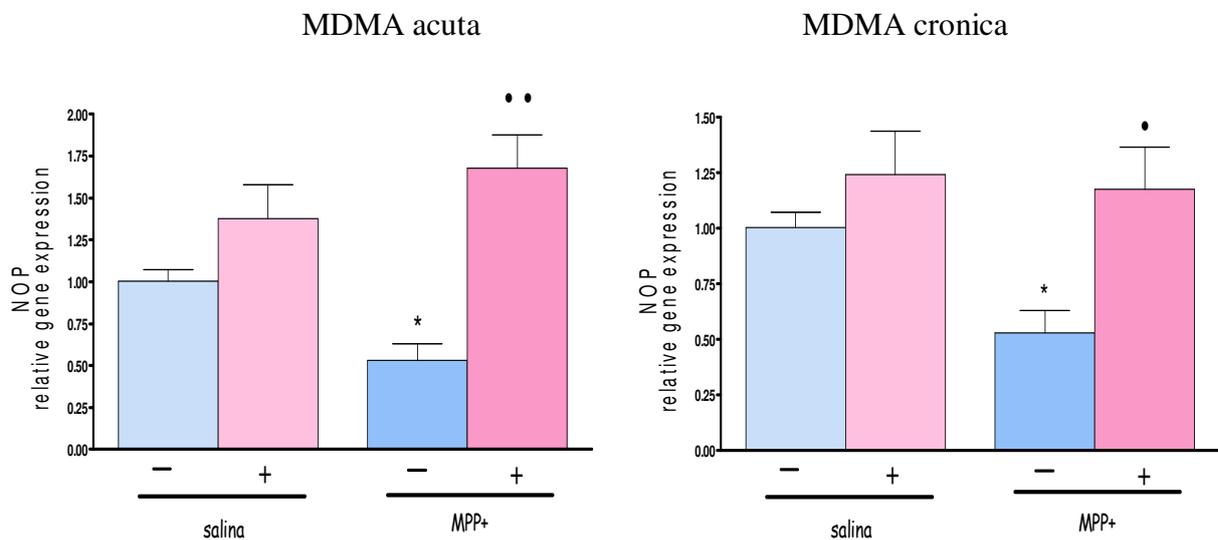
Il trattamento cronico con MDMA provoca una significativa diminuzione dei livelli del messaggero della nocicettina (naive 1.052±0.1030, MDMA cronico 0.71±0.081, \* p<0.05 – One-way ANOVA Bonferroni post test) mentre sia il trattamento acuto che i trattamenti con MDMA successivi alla deplezione non alterano l'espressione genica della stessa.



**Fig.36** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per la N/OFQ nel caudato putamen in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive*

#### 4.2.5.2 sull'espressione genica del recettore NOP

Lo studio dell'espressione genica del recettore NOP evidenzia una diminuzione statisticamente significativa in seguito a trattamento con MPP<sup>+</sup> (naive  $1.003 \pm 0.069$ , MPP<sup>+</sup>  $0.53 \pm 0.10$ , \* $p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test). Il trattamento sia acuto che cronico con MDMA non altera i livelli di mRNA del recettore NOP; tuttavia sia la somministrazione acuta che cronica di MDMA a seguito della deplezione sembra in grado di contrapporsi agli effetti esercitati dalla neurotossina (rispettivamente: MPP<sup>+</sup>  $0.53 \pm 0.10$ , MPP<sup>+</sup>/MDMA acuta  $1.676 \pm 0.20$ , \* $p < 0.01$ ; MPP<sup>+</sup>  $0.53 \pm 0.10$ , MPP<sup>+</sup>/MDMA cronica  $1.175 \pm 0.19$ , \* $p < 0.05$  – One-way ANOVA Bonferroni post test).



**Fig.37** *Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nel caudato putamen in ratti naive, in ratti trattati con MDMA ed in ratti depletati con MPP<sup>+</sup>. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.*

## 5 DISCUSSIONE

---

Questa tesi sperimentale risulta inserita in un ampio contesto di ricerca che riguarda lo studio degli effetti di diverse sostanze d'abuso sul sistema neuropeptidergico nocicettina-NOP. I risultati suggeriscono il coinvolgimento del sistema N/OFQ-NOP sia negli effetti indotti da esposizione cronica a cocaina sia da esposizione acuta e cronica a MDMA.

### **Coinvolgimento del sistema N/OFQ-NOP negli effetti indotti da esposizione cronica a cocaina**

La ricerca scientifica studia da molti anni i possibili effetti di differenti farmaci d'abuso sul sistema oppioide endogeno. Sono state osservate interessanti relazioni tra gli effetti evocati dalla cocaina e il sistema oppioide, in particolare a livello di interazione recettoriale e di liberazione di neurotrasmettitori. E' stato infatti evidenziato che la somministrazione cronica di cocaina causa una up-regulation dei recettori oppioidi  $\mu$  e  $\kappa$  (126). La somministrazione cronica intracerebroventricolare di cocaina induce differenti effetti nella regolazione dell'espressione genica della prodinorfina in alcune aree cerebrali di ratto (129): un'inibizione dei livelli di mRNA della prodinorfina nell'ipotalamo e nella corteccia prefrontale di ratto, mentre ne provoca un aumento nello striato e nell'area ventrale tegmentale. Il meccanismo con il quale la cocaina produce alterazioni a livello del sistema oppioide endogeno è ancora sconosciuto, ma evidenze sperimentali suggeriscono che tale effetto della cocaina è mediato almeno in parte dalla dopamina. Infatti la somministrazione cronica di cocaina sembra produrre una up-regulation dei recettori  $\mu$  attraverso l'inibizione del re-uptake di dopamina e l'attivazione dei recettori dopaminergici D2 (131).

E' stato inoltre evidenziato che una singola somministrazione di cocaina (20 mg/Kg i.p.) porta ad una diminuzione dei livelli del peptide N/OFQ in aree cerebrali di ratto quali il midollo allungato, il caudato putamen e nelle regioni

coricali; effetto che viene attribuito ad un aumento della degradazione o del rilascio del peptide stesso (224).

In accordo con questi dati, recentemente il nostro laboratorio ha suggerito che la somministrazione cronica di cocaina sia in grado di indurre una diminuzione del peptide nocicettina nel caudato putamen, nel nucleus accumbens shell e in substantia nigra (225).

Dati in letteratura evidenziano anche l'azione di nocicettina esogena sugli effetti indotti da cocaina: la somministrazione acuta di N/OFQ attenua l'attività stimolatoria indotta da cocaina (143), iniezioni intra-VTA di N/OFQ in combinazione con cocaina diminuiscono solo il primo giorno gli effetti comportamentali della cocaina (144). Al contrario se la nocicettina è somministrata da sola per 3 giorni, la sensibilizzazione alla cocaina è evidente in 5-7 giorni (144).

Una singola iniezione di N / OFQ nella VTA o caudato putamen porta ad una migliore risposta alla cocaina per quanto riguarda l'attività locomotoria 23 h più tardi. Se, tuttavia, i ratti ricevono una seconda iniezione intra VTA di N/OFQ, gli effetti di una successiva somministrazione di cocaina sono bloccati (147).

Sulla base dell'analogia della nocicettina con i peptidi oppioidi endogeni, vista la capacità della cocaina di indurre alterazioni sull'espressione genica di questi ultimi (143), e vista l'azione della nocicettina sugli effetti indotti da cocaina, è stata indagata l'esistenza di una relazione tra questa sostanza d'abuso e l'espressione genica del sistema nocicettina/NOP.

In particolare sono stati indagati gli effetti dell'esposizione cronica a cocaina (50 mg/Kg/die per sette giorni) sull'espressione genica del sistema N/OFQ-NOP mediante RT-PCR nelle aree cerebrali di ratto maggiormente interessate dai fenomeni di gratificazione, tolleranza e dipendenza.

I risultati ottenuti mediante la tecnica della Real Time PCR evidenziano una riduzione statisticamente significativa dei livelli di mRNA del neuropeptide nocicettina nel NA.

Per quanto riguarda l'espressione genica del recettore NOP, in seguito al trattamento con cocaina, essa risulta sensibilmente aumentata nel NA e nel CPL.

Nel CPM, invece, l'effetto è opposto: i livelli di mRNA del recettore sono diminuiti in modo statisticamente significativo.

Poiché il sistema N/OFQ-NOP mostra un'elevata omologia di sequenza con i sistemi oppioidi classici, specialmente con il sistema DYN-KOP e data la presenza in letteratura di evidenze riguardo al coinvolgimento del sistema DYN-KOP negli effetti indotti dalla cocaina, allo studio dell'espressione genica del sistema N/OFQ-NOP è stata affiancata l'indagine di una possibile variazione dell'espressione genica del sistema DYN-KOP.

Mediante Real Time PCR si è potuto evidenziare che la somministrazione cronica di cocaina ha indotto un aumento significativo dell'espressione della prodinorfina nelle aree cerebrali NA e CPI mentre ne causa una diminuzione, altrettanto significativa, nel CPM. A seguito dello stesso trattamento, i livelli di mRNA del recettore KOP risultano sensibilmente diminuiti rispetto ai valori basali nella SN e nel CPM.

Nel loro insieme questi dati mostrano che la cocaina è in grado di alterare i sistemi nocicettina/NOP e dinorfina/KOP.

In particolare, nella SN tale sostanza d'abuso down-regola l'espressione genica del recettore KOP; nel NA è possibile ipotizzare che l'up-regulation del recettore NOP rappresenti un meccanismo compensatorio alla diminuzione del precursore della N/OFQ. Inoltre è molto interessante osservare che nelle medesime condizioni l'espressione della pro-dinorfina sia aumentata.

Infine, lo studio del caudato putamen laterale distinto dal mediale è stato utile per evidenziare effetti opposti esercitati dalla cocaina sulla espressione genica del recettore NOP e della pro-dinorfina.

In conclusione i dati ottenuti da questo studio sperimentale evidenziano che i sistemi neuropeptidergici N/OFQ-NOP e DYN-KOP intervengono nei meccanismi alla base degli effetti indotti dalla cocaina.

### **Coinvolgimento del sistema N/OFQ-NOP negli effetti indotti da esposizione a MDMA in un modello animale di Parkinson**

Per quanto riguarda la seconda sostanza d'abuso studiata, poichè il nostro laboratorio ha recentemente dimostrato come la MDMA sia in grado di modulare la regolazione dell'espressione genica del sistema dinorfnergico (248) e in virtù dell'analogia tra il sistema neuropeptidergico N/OFQ-NOP ed

il sistema oppioide, si è valutato il possibile coinvolgimento del sistema neuropeptidergico N/OFQ-NOP nei meccanismi attivati da MDMA.

La MDMA o 3,4-metilendioSSimetamfetamina è una sostanza d'abuso più comunemente conosciuta come ecstasy, appartenente alla classe degli entactogeni termine di derivazione greco-latina che indica il "miglioramento dei contatti" successivi alla sua assunzione (153). Le sue proprietà di ricompensa, così come quelle di altre sostanze psicostimolanti, sono correlate alla sua abilità di aumentare il rilascio di dopamina (DA) nel nucleus accumbens (152). La MDMA è inoltre in grado di indurre un aumento di serotonina (5-HT) nella stessa area. I potenti effetti della MDMA sul sistema serotoninergico sembrerebbero essere i maggiori responsabili delle azioni di questa sostanza e per questo sono stati oggetto di numerosi studi. Il meccanismo della liberazione massiccia di serotonina è dovuto essenzialmente all'azione della MDMA sul trasportatore della serotonina (SERT). La MDMA, avendo una forte affinità per il SERT, si comporta come un substrato, bloccando la ricaptazione della serotonina e facilitando lo scambio 5-HT/MDMA attraverso il trasportatore (164). Una volta nella terminazione nervosa, la MDMA potrebbe anche causare la liberazione della serotonina contenuta nella vescicole permettendo in questo modo di aumentare il pool di 5-HT disponibile per lo scambio via SERT. La MDMA interferisce anche con la trasmissione dopaminergica incrementando il rilascio di dopamina nello striato, nel nucleus accumbens e nella corteccia prefrontale. Oltre ad un'azione diretta della MDMA sul trasportatore della dopamina, sembra che il rilascio della DA sia determinato principalmente dall'azione sul recettore 5-HT<sub>2A/2C</sub> da parte della serotonina i cui livelli sinaptici sono significativamente aumentati in risposta al trattamento con la sostanza d'abuso in esame. Un altro fattore che interviene nella facilitazione del rilascio della DA nello striato e nella substantia nigra è la riduzione del rilascio del GABA mediato dai recettori 5-HT<sub>2</sub> e ciò determina l'attenuazione del controllo a feedback esercitato dal neurotrasmettitore GABA sul rilascio della DA.

Nell'ultimo decennio in letteratura sono comparsi articoli contrastanti sul coinvolgimento della MDMA nella malattia di Parkinson. In particolare, secondo alcuni autori, in seguito alla pubblicazione di alcuni casi di consumatori di ecstasy con sintomi Parkinson- simili, la MDMA è una

possibile causa di Parkinson in giovane età. Questa ipotesi, inizialmente supportata dai risultati ottenuti in studi su primati non umani (194) da Ricaurte e collaboratori, è poi stata in parte smentita dalla successiva ritrattazione di questi dati dello stesso gruppo di ricerca (195).

In realtà la maggior parte dei dati apparsi ultimamente in letteratura propendono più per un possibile effetto anti-Parkinson della MDMA.

A supporto di tale ipotesi, studi su primati non umani (in particolare scimmie common marmosets), preventivamente trattati con MPP<sup>+</sup>, hanno mostrato che la MDMA è in grado di ridurre la discinesia indotta dalla L-DOPA senza influenzare l'abilità della stessa L-DOPA di ridurre la disabilità motoria (204). Questo aspetto è molto interessante perché l'iperattività motoria è correlata con gli effetti collaterali di un trattamento a lungo termine del Parkinson, mentre il miglioramento della disabilità motoria rappresenta l'effetto terapeutico della L-DOPA. Alcuni studi hanno dimostrato che l'azione anti discinetica della MDMA si possa attuare grazie ad un'attivazione indiretta dei recettori per la serotonina indotta dall'aumento dei livelli extracellulari della serotonina (204,205).

E' stata indagata, innanzi tutto nel ratto, la possibile implicazione del sistema Nocicettina/NOP in modelli di Parkinsonismo indotti con neurotossine. I risultati ottenuti, recentemente pubblicati, hanno evidenziato che la Dopamina modula il sistema N/OFQ-NOP nella SN e nel CP, sostenendo l'ipotesi che questo sistema neuropeptidergico sia coinvolto nei meccanismi che sono alla base di questa patologia neurodegenerativa (6).

Sulla base di queste considerazioni, sono state studiate le variazioni dell'espressione genica del sistema neuropeptidergico N/OFQ-NOP in seguito a somministrazione di MDMA acuta e cronica sia in condizioni fisiologiche che in condizioni di deplezione dopaminergica ottenuta mediante somministrazione intracerebroventricolare (ICV) della neurotossina MPP<sup>+</sup>. Le aree scelte per questo studio sono: il midollo allungato (BS), l'area ventrale tegmentale (VTA), il nucleus accumbens (NA), la substantia nigra (SN) ed il caudato putamen (CP).

Nel Midollo Allungato, area scelta in quanto in essa si trovano i corpi neuronali dei neuroni serotoninergici, la somministrazione acuta di MDMA provoca un

aumento dell'espressione genica sia della nocicettina che del suo recettore. Inoltre l'espressione genica di NOP aumenta in maniera statisticamente significativa anche in seguito al trattamento cronico con MDMA in condizioni di deplezione dopaminergica.

Nell'Area Ventrale Tegmentale, uno dei costituenti principali del circuito mesocorticolimbico di natura dopaminergica, i valori relativi all'espressione genica della nocicettina mostrano un aumento statisticamente significativo in seguito a trattamento acuto e cronico con MDMA e anche in seguito a trattamento con MPP<sup>+</sup>. Questi dati dimostrano un'analogia di effetti sull'espressione genica della nocicettina da parte di MDMA e MPP<sup>+</sup>. A conferma di ciò, la MDMA somministrata in seguito ad MPP<sup>+</sup>, sia in acuto che in cronico, non dà alcuna variazione significativa rispetto alla sola deplezione dopaminergica.

Per quanto riguarda l'espressione genica del recettore NOP si osserva un aumento statisticamente significativo in seguito a somministrazione cronica di MDMA. Al contrario, la somministrazione di MPP<sup>+</sup> ne determina una riduzione statisticamente significativa che non subisce variazioni in seguito a somministrazione di MDMA. Questi dati suggeriscono che la MDMA in quest'area cerebrale non è in grado di agire sui livelli del recettore in condizioni di deplezione dopaminergica a differenza di quanto accade in condizioni fisiologiche.

Nel Nucleus Accumbens, altra area cerebrale facente parte del circuito mesocorticolimbico, né la MDMA né l'MPP<sup>+</sup> sembrano in grado di influenzare l'espressione genica della nocicettina. Per quanto riguarda l'espressione genica del recettore NOP, la sola somministrazione di MDMA non provoca variazioni. Tuttavia se somministrata in seguito all'MPP<sup>+</sup>, il quale provoca un aumento significativo dell'mRNA del recettore, questa sembra in grado di riportarlo a valori simili ai fisiologici.

In Substantia Nigra, area maggiormente colpita dalla progressiva denegrazione dei neuroni dopaminergici che caratterizza il morbo di Parkinson, si osserva un aumento statisticamente significativo dell'espressione genica della nocicettina solo in seguito a somministrazione di MPP<sup>+</sup>. La MDMA non sembra agire a questo livello né in condizioni fisiologiche né di deplezione dopaminergica.

Per quanto riguarda l'espressione del recettore NOP, il solo trattamento con MDMA non provoca variazioni. In seguito a somministrazione della neurotossina si evidenzia una diminuzione statisticamente significativa dell'mRNA del NOP che tuttavia viene riportata a valori simili ai fisiologici sia dopo somministrazione acuta che cronica di MDMA. Questi ultimi dati fanno quindi supporre che la MDMA sia in grado di contrastare gli effetti esercitati da MPP<sup>+</sup> sull'espressione genica di NOP.

Infine, nel CP, altra area costituente il circuito nigrostriatale, quindi di fondamentale importanza nel morbo di Parkinson, l'espressione genica della nocicettina risulta diminuita in maniera significativa sia in seguito a trattamento cronico con MDMA sia in seguito a deplezione dopaminergica.

Interessante è l'effetto della MDMA sull'espressione del recettore NOP: infatti mentre il trattamento con MPP<sup>+</sup> ne provoca una diminuzione statisticamente significativa, la successiva somministrazione di MDMA sia acuta che cronica la contrasta.

In conclusione, dall'analisi di questi risultati, emerge che la MDMA ha effetti diversi sull'espressione genica del sistema N/OFQ-NOP a seconda dell'area cerebrale considerata. Si conferma inoltre il coinvolgimento dello stesso sistema neuropeptidergico nel modello sperimentale di Parkinson indotto con la neurotossina MPP<sup>+</sup>.

Per la prima volta si evidenzia un'azione dell'ecstasy sul sistema N/OFQ-NOP in condizioni di deplezione indotta con MPP<sup>+</sup>, azione che risulta diversa a seconda dell'area cerebrale considerata. In particolare il dato più interessante che emerge dai risultati ottenuti è l'evidenza che la dopamina esercita un tono inibitorio sui livelli di espressione genica della nocicettina nella SN e nella VTA, mentre esercita un tono eccitatorio nel CP.

Inoltre, in queste tre aree cerebrali la dopamina sembra esercitare un tono eccitatorio sui livelli del recettore NOP; al contrario nel NA la dopamina esercita un tono inibitorio sui livelli dello stesso recettore.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo studio permettono di chiarire i meccanismi molecolari tramite cui la MDMA agisce, valutando se alcuni tra questi possano essere sfruttati per scopi terapeutici, per esempio in patologie neurodegenerative.

## 6 BIBLIOGRAFIA

---

- 1) **Chuang T.T., Lacovelli L., Sallese M., De Blasi A.** : *G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitisation and its implication; TIPS, 17, 416-421, 1996.*
- 2) **Meunier J.C., Moudeledous L., Topham C.M.** : *the nociceptin (ORL-1) receptor: molecular cloning and functional architecture; Pept., 21, 893-900, 2000.*
- 3) **Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J.L., Moisand C., Chalon P., Caput D., Vassart G., Meunier J.C.** : *ORL-1, a novel member of the opioid receptor family Cloning, functional expression and localization; FEBS Lett., 341, 33-38, 1994.*
- 4) **Chen Y., Fan Y., Liu J., Mestek A., Tian M., Kozak C.A., Yu L.** : *molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family; FEBS Lett., 347, 279-283, 1994.*
- 5) **Wang J.B., Johnson P.S., Imai Y., Persico A.M., Ozenberg B.A., Eppler C.M., Uhl G.R.** : *cDNA cloning of an opiate receptor gene family member and its splice variant; FEBS Lett., 348, 75-79, 1994.*
- 6) **Lapalu S., Moisand C., Mazarguil H., Cambois G., Mollerau C., Meunier J.C.** : *comparison of the structure- activity relationships of nociceptin and dynorphin A using chimeric peptides; FEBS Lett., 417: 333-336, 1997*
- 7) **Topham C.M., Mouldous L., Poda G., Maigret B., Meunier J.C.** : *molecular modelling of the ORL-1 receptor and its complex with nociceptin; Protein Eng. 11(12): 1163-79, 1998.*

- 8) **Fukuda K., Kato S., Mori K., Nishi M., Takeshima H., Iwabe N., Miyata T., Houtani T., Sugimoto T.** : *cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family*, *FEBS Letters*; 343, 42-46, 1994.
- 9) **Bunzow J.R., Saez C., Mortrud M., Bouvier C., Williams J.T., Low M., Grandy D.K.** : *molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a  $\mu$ ,  $\delta$  or  $\kappa$  opioid receptor type*, *FEBS Letters*; 347, 284-288, 1994.
- 10) **Wick M.J., Minnerath S.R., Lin X., Elde R., Law P.J., Loh H.H.** : *isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptors*; *Mol. Brain Res.*, 27, 37-44, 1994.
- 11) **Lachowicz J.E., Shen Y., Monsma Jr., Sibley D.R.**, *Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family*, *J. of Neurochem.*, 64, 34-40, 1995.
- 12) **Wang J.B., Johnson P.S., Imai Y., Persico A.M., Ozenberg B.A., Eppler C.M., Uhl G.R.**, *cDNA cloning of an opiate receptor gene family member and its splice variant*, *FEBS Letters.*, 348, 75-79, 1994.
- 13) **Meunier J-C, Mollereau C., Toll L., Suaudeau C., Moisand C., Alvineria P., Butour J-L, Guillemot J-C, Ferrara P., Monsarrat B., Mazargull H., Vassart G., Parmentier M., Costantin J.** : *isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL-1 receptor*, *Nature*, 377, 532-535, 1995.
- 14) **Reinscheid R.K., Nothacker H.P., Bourson A., Ardati A., Henningsen R.A., Bunzow J.R., Gandy .K., Langen H., Monsma F.J.Jr., Civelli O.** : *Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor*, *Science*, 270, 792-794, 1995.

- 15) **Connor M., Yeo A., Henderson G.** : *the effect of nociceptin on  $Ca^{2+}$  - channel current and intracellular  $Ca^{2+}$  in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line ; Br J Pharmacol, 118 (2: 205-7,) 1996*
- 16) **Vaughan C.W., Christie M.J.** : *increase by the ORL-1 receptor ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal rafe nucleus neurones; Br J Pharmacol, 117(8):1609-11, 1996.*
- 17) **Mogil J.S., Grisel J.E., Reinscheid R.K., Civelli O., Belknap J.K., Grandy D.K.** : *Orphanin FG is a functional anti- opioid peptide; Neuroscience, 75(2): 333-7, 1996.*
- 18) **Chavkin C., Goldstein A.**: *specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure–activity relationships; Proc Natl Acad Sci USA, 78: 6543–7, 1981.*
- 19) **Riedl M., Shuster S., Vulchanova L., Wang J., Loh H.H., Elde R.** : *Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord, Neuroreport, 7, 1369-1372, 1996.*
- 20) **Dolley C.T, Houghten R.A** : *Orphanin FQ: receptor binding and analog structure activity relationships in rat brain; Life Science, 59 PL23- PL29, 1996.*
- 21) **Calò G., Rizzi A., Bodin M., Neugebauer W., Salvadori S., Guerrini R., Bianchi C., Regoli D.** : *pharmacological characterization of nociceptin receptor: an in vitro study; Can. J. Physiol. Pharmacol., 75: 713-718, 1997.*
- 22) **Dunnill R.J., Kakizawa K., Mcknight A.T., Henderson G.** : *Characterisation of the actions of naloxone benzoylhydrazone at m-opioid, k-opioid and ORL-1 receptors in isolated tissues from rat and guinea-pig; Br. J. Pharmacol., 119, 275 P, 1996.*

- 23) **Calo G., Rizzi A., Bogoni G., Neugebauer V., Salvadori S., Guerrini R., Bianchi C., Regoli D.** : *the mouse vas deferens: a pharmacological preparation sensitive to nociceptin*; *Eur. J. Pharmacol.*, 311, R3-R5, 1996.
- 24) **Butour J.L., Moisand C., Mazarguil H., Meunier J.C.** : *recognition and activation of the opioid receptor-like ORL-1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids*; *Eur. J. Pharmacol.*, 321, 97-103, 1997.
- 25) **Watson S.J., Mansour A., Meng F., Devine D., Civelli O., Akil H.**: *Orphanin FQ peptide and receptor: structure-function, anatomical and behavioral analysis*; *27th Meeting of the INRC, S3-S4, 1996*
- 26) **Varani K. et Al.**: *pharmacology of [Tyr1] nociceptin analogs: receptor binding and bioassay studies*; *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 360: 270- 277, 1999.
- 27) **Mollerau C., Mouledous L., Lapalu S., Cambois G., Moisand C., Butour J.L., Meunier J.C.** : *distinct mechanisms for the activation of the opioid receptor-like 1 and k opioid receptor by nociceptin and dynorphin A*; *Mol. Pharmacol.*, 55: 324- 331, 1999.
- 28) **Reinscheid R.K., Higelin J., Henningsen R.A, Monsma F.J.Jr., Civelli O.**: *structures that delineate orphanin FQ and dynorphin A pharmacological selectivities*; *J. Biol. Chem.*, 273:1490- 1495, 1998.
- 29) **Schulz S., Schreff M., Nuss D., Gramsch C., Holtt V.** : *Nociceptin/orphanin FQ and pioid peptides show overlapping distribution but not co-localization in pain-modulatory brain regions*; *Neuroreport*, 7, 3021-3025, 1996.
- 30) **Riedl M., Shuster S., Vulchanova L., Wang J., Loh H.H., Elde R.** : *Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord*; *Neuroreport*, 7, 1369-1372, 1996.

- 31) **Matthes H., Seward E.P., Kieffer B., North R.A.** : *functional selectivity of orphanin FQ for its receptor coexpressed with potassium channel subunits in Xenopus laevis oocytes; Mol. Pharmacol.; 50, 447-450, 1996.*
- 32) **Vaughan C.W., Ingram S.L., Christie M.J.** : *actions of the ORL-1 receptor ligand nociceptin on membrane properties of rat periaqueductal gray neurons in vitro; J. Neurosci; 17, 996-1003, 1997*
- 33) **Wu Y.L., Pu L., Ling K., Zhao J., Cheng Z.J., Ma L., Pei G.** : *molecular characterisation and functional expression of opioid receptor-like 1 receptor; Cell. Res., 7, 69-77, 1997.*
- 34) **Knoflach F., Reinscheid R.K., Civelli O., Kemp J.A.** : *modulation of voltage-gated calcium channels by orphanin FQ in freshly dissociated hippocampal neurons; J. Neurosci., 16, 6657-6664, 1996.*
- 35) **Nicol B., Lambert D.G., Rowbotham D.J., Smart D., Mcknight A.T.** : *Nociceptin induced inhibition of K<sup>+</sup>-evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices; Br. J. Pharmacol., 119, 1081-1083, 1996.*
- 36) **Neal M.J., Cunningham J.R., Paterson S.J., Mcknight A.T.**: *inhibition by nociceptin of the light-evoked, release of Ach from retinal cholinergic neurones; Br. J. Pharmacol.; 120, 1399-1400, 1997.*
- 37) **Nicholson J. R., Paterson S.J., Mcknight A.T.** : *characterization of the response in the rat vas deferens to the ORL-1 agonist nociceptin; Br. J. Pharmacol.; 119, 36 P, 1996.*
- 38) **Berzetei-Gurske I.P., Schwartz. T.L.** : *determination of activity for nociceptin in the mouse vas deferens; Eur. J. Pharmacol.; 302, R1-R2, 1996.*
- 39) **Patel H. J., Giembycz M. A., Spicuzza L., Barnes P. J., Belvisi M. G.** : *Naloxone-insensitive inhibition of acetylcholine realase from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by the novel opioid, nocicepti; Br. J. Pharmacol.; 120, 765-736, 1997.*

- 40) **Chu X., Xu N., Li P., Mao L., Wang J. Q.** : *inhibition of cardiovascular activity following microinjection of novel opioid-like neuropeptide nociceptin (orphanin FQ) into the rat rostral ventrolateral medulla; Brain Res.*, 829: 134- 142, 1999.
- 41) **Zeilhofer H.U., Calo G.** : *Nociceptin/orphanin FQ and its receptor – potential target for pain therapy?; J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306: 423-429, 2003.
- 42) **Pan Z., Hirakawa N., Fields H.L.** : *a cellular mechanism for the bidirectional pain- modulating actions of orphanin FQ/ nociceptin; Neuron.*, 26:515-522, 2000.
- 43) **Heinricher M.M., Mcgaraughty S., Grandy D.K.** : *circuitry underlying antiopioid actions of orphanin FQ in the rostral ventromedial medulla; J. Neurophysiol.*, 78:3351-3358, 1997.
- 44) **Mogil J.S, Grisel J.E., Reinscheid R.K., Civelli O., Belknap J.K., Grandy D.K.** : *Orphanin FQ is a functional anti- opioid peptide; Neuroscience*, 75: 333- 337, 1996.
- 45) **King M. A., Rossi G. C., Chang A. H., Williams L. & Pasternak G. W.:** *spinal analgesic activity of orphanin FQ/ nociceptin and its fragments; Neurosci. Lett.*, 223:113-116, 1997.
- 46) **Ko M.C., Wei H., Woods J.H. & Kennedy R.T.:** *effects of intrathecally administered nociceptin/ orphanin FQ in monkeys: behavioral and mass spectrometric studies; J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 318.1257- 1264, 1996.
- 47) **Giuliani S., Maggi C.A.** : *inhibition of tachykinin release from peripheral endings of sensory nerves by nociceptin, a novel opioid peptide; Br. J. Pharmacol.*, 118, 1567-1569, 1996.
- 48) **Florin S., Suaudeau C., Meunier J.Cl., Costentin J.** : *Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice; Eur. J. Pharmacol.*, 317, 9-13, 1996.

- 49) **Devine D.P., Reinscheid R.K., Monsma F.J.Jr., Civelli, O., Akil, H. :** *the novel neuropeptide orphanin FQ fails to produce conditioned place preference or aversion; Brain Res., 727, 225-229, 1996.*
- 50) **Murphy N.P., Ly H.Y., Maidment N.T.:** *intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats; Neuroscience, 75, 1-4, 1996.*
- 51) **Koob G.F. :** *drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of rewards pathways; Tips, 13, 177-184, 1992.*
- 52) **Devine D.P., Taylor L., Reinscheid R.K., Monsma F.J., Civelli O., Akil H. :** *rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ; Neurochem. Res., 21, 1387-1396, 1996.*
- 53) **Murphy N.P., Lee Y., Maidment N.T.:** *Orphanin FQ/nociceptin blocks acquisition of morphine place preference; Brain Res., 832, 168-170, 1999.*
- 54) **Yuan L., Han Z., Chang J.K., Hans J.S. :** *accelerated release and production of orphanine FQ in brain of chronic morphine tolerant rats; Brain Res., 826, 330-334, 1999.*
- 55) **King M., Chang A., Pasternak G.W.:** *functional blockade of opioid analgesia by orphanin FQ/nociceptin; Biochem. Pharmacol., 55, 1537-1540, 1998.*
- 56) **Narayanan S., Maidment N.T.:** *Orphanin FQ and behavioral sensitization to cocaine; Pharmacol. Biochem. Behav., 63, 271-277, 1999.*
- 57) **Cabeza De Vaca S., Carr K.D. :** *food restriction enhances the central rewarding effect of abused drugs; J Neurosci., 18, 7502-7510, 1998.*
- 58) **Stratford T.R., Holahan M.R., Kelly A.E. :** *injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake; Neuroreport, 8, 423-426, 1997.*

- 59) **Leventhal L., Mathis J.P., Rossi G.C., Pasternak G.W., Bodnar R.J. :** *Orphanin opioid receptor antisense probes block orphanin FQ-induced hyperphagia; Eur. J. Pharmacol., 349, R1-R3, 1998.*
- 60) **Guerrini R., Calo' G., Rizzi A., Bigoni R., Rizzi D., Regoli D., Salvadori S.:** *structure-activity relationships of nociceptin and related peptides: comparison with dynorphin A; Peptides, 21, 923-933, 2000.*
- 61) **Rizzi A., Rizzi D., Marzola G., Regoli D., Larsen Bd., Petersen Js., Calo' G.:** *pharmacological characterization of the novel nociceptin/orphanin FQ receptor ligand, ZP120: in vitro and in vivo studies in mice; Br. J. Pharmacol., 137, 369-74, 2002.*
- 62) **Nicholson J.R., Paterson S.J., Menzies J.R.W., Corbett A.D., Mcknight A.T.:** *pharmacological studies on the "orphan" receptor in central and peripheral sites; Can. J. Physiol. Pharmacol., 76, 304-313, 1998.*
- 63) **Schlicker E., Werthwein S., Kahmann M., Bauer U.:** *Nociceptin inhibits noradrenaline release in mouse brain cortex via presynaptic ORL-1 receptor; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 358, 418-422, 1998.*
- 64) **Paul D., Levison J.A., Howard D.H., Pick C.G., Hahn E.F., Pasternack G.W.:** *Naloxone benzoylidrazone (NalBzoH) analgesia; J. Pharm. Exp. Ther., 255, 769-774, 1990.*
- 65) **Guerrini R., Calo' G., Rizzi A., et al.:** *a new selective antagonist of the nociceptin receptor; Br. J. Pharmacol., 123, 163-165, 1998.*
- 66) **Varani K., Rizzi A., Calo' G., et al.:** *pharmacology of [Tyr1]nociceptin analogs: receptor binding and bioassay studies; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 360, 270-277, 1999.*

- 67) **Sbrenna S., Marti M., Calo' G., Guerrini R., Beani L., Bianchi C.:** *modulation of 5-hydroxytryptamine efflux from rat cortical synaptosomes by opioids and nociceptin; Br. J. Pharmacol., 130(2), 425-433, 2000.*
- 68) **Siniscalchi A., Rodi D., Beani L., Bianchi C. :** *inhibitory effect of nociceptin on [ 3H ]- 5 HT release from rat cerebral cortex slices; Br. J. Pharmacol, 128, 119-123, 1999.*
- 69) **Calo' G., Guerrini R., Rizzi A., Salvadori S., Regoli D. :** *pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target; Br. J. Pharmacol, 129, 1261-1283, 2000.*
- 70) **Kawamoto H., Ozaki S., Itoh Y. et al.:** *discovery of the first potent and selective small molecule opioid receptor-like (ORL-1) antagonist:1-[(3R,4R)-1-cyclooctymethyl-3-hydroxymethyl-4piperidyl]-3-ethyl-1,3-diidro-2H-benzimidazolo-2-one (J113397); J. Med. Chem., 42, 5061-3, 1999.*
- 71) **Calò G., Rizzi A., Rizzi D., Bigoni R., Guerrini R., Marzola G., Marti M., Mc Donald J., Morari M., Lambert D. G., Salvadori S., Regoli D. :** *[Nphe1, Arg14, Lys15]nociceptin-NH2, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor; Br. J. Pharmacol., 136 (2), 303-311, 2002.*
- 72) **Siniscalchi A., Rodi D., Sbrenna S., Marti M., Bianchi C. :** *species difference in nociceptin inhibition of cortical noradrenaline release in vitro; Regul. Pept., 80, 127, 1999.*
- 73) **Schlicker E., Werthwein S., Kahmann M. :** *Orphan opioid receptor-mediated inhibition of noradrenaline, dopamine and serotonin release in the mouse, rat, guinea-pig brain; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 357(Suppl.), R90, 1998.*

- 74) **Werthwein S., Bauer U., Nakazi M. Kahmann M., Schlicker E.** : *further characterization of the ORL-1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain in vitro*; *Br. J. Pharmacol.*, 127(1), 300-308, 1999.
- 75) **Mollereau C., Mouledous L.** : *tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL-1) receptor*; *Peptides*, 21, 907-917, 2000.
- 76) **Murphy N.P., Maidment N.T.** : *Orphanin FQ/nociceptin modulation of mesolimbic dopamine transmission determined by microdialysis*; *J. Neurochem.*, 73, 179-186, 1999.
- 77) **Di Giannuario A., Pieretti S., Catalani A., Loizzo A.** : *Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis study in rats*; *Neurosci. Lett.*, 272, 183-186, 1999.
- 78) **Di Giannuario A., Pieretti S.**: *Nociceptin differentially affects morphine-induced dopamine release from the nucleus accumbens and nucleus caudate in rats*; *Peptides*, 21, 1125-1130, 2000.
- 79) **Konya H., Masuda H., Itoh K., Nagai K., Kakishita E., Matsuoka A.**: *modification of dopamine release by nociceptin in conscious rat striatum*; *Brain Res.*, 788, 341-344, 1998.
- 80) **Maneuf Y.P., Hughes J., Mcknight A.T.** : *different actions of ORL1 agonists on K<sup>+</sup> evoked [3H]-5-HT release from rat cortical slices*; *Soc. Neurosci. Abstr.*, 25, 433, 1999.
- 81) **Sbrenna S., Marti M., Morari M. et al.** : *L-Glutamate and  $\gamma$  aminobutyric acid efflux from rat cerebrocortical synaptosomes: modulation by  $\kappa$ - and  $\mu$ -, but not  $\delta$  and opioid receptor like receptors*; *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, 291, 1365-1371, 1999.
- 82) **Gavioli E.C., Calo' G.** : *antidepressant- and ansiolytic- like effects of nociceptin/ orphanin FQ receptor ligands*; *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 372(5):319-30, 2006

- 83) **Le Maitre E., Vilpoux C., Costentin J. & Leroux- Nicollet I.** : *opioid receptor- like 1 (NOP) receptors in the rat dorsal raphe nucleus : evidenze for localization on serotonergic neurons and functional adaption after 5,7- dihydroxytryptamine lesion ; J. Neurosci. Res. 81, 488-496, 2005.*
- 84) **Jenk F. et al.** : *Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral response to stress; Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 94 14854- 14858, 1997.*
- 85) **Gavioli E.C., Duarte F.S., Guerrini R., Calò G., Rae G.A., M. De Lima T.C.** : *GABA<sub>A</sub> signalling is involved in NOFQ anxiolytic- like effects but not in nocistatin anxiogenic- like action as evaluated in the mouse elevated plus maze; Peptides, 29(8):1404-12, 2008.*
- 86) **Sandrini M., Vitale G., Pini L.A., Lopetuso G., Romualdi P., Candeletti S.** : *Nociceptin/orphanin FQ prevents the antinociceptive action of paracetamol on the rat hot plate test; Eur J. Pharmacol., 507: 43-48, 2005.*
- 87) **Ciccocioppo R., Angeletti S., Panocka I., Massi M.**: *Nociceptin/orphanin FQ and drug abuse; Peptides, 21: 1071-1080, 2000.*
- 88) **Meunier Jc.** : *Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL-1 receptor; Eur. J. Pharmacol., 340: 1-15, 1997.*
- 89) **Wallington C.-L., Peters D. M., Gelb C. R., Peterfreund R. A.** : *Orphanin FQ/nociceptin and  $\mu$ -opioid receptor mRNA levels in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: effects of activating the cAMP-PKA signal transduction pathway; Brain Res., 944: 73-81, 2002.*
- 90) **Nishi M., Houtani T., Noda Y. et al.**: *unretrained nociceptive reponse and disregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor; Embo. J., 16: 1858-1864, 1997*

- 91) **Morgan J. I., Curran T.:** *immediate-early genes: ten years on; Trends Neurosci.*, 18:66-67, 1995.
- 92) **Nestler E.J.:** *molecular mechanisms of drug addiction; Neuropharmacology*, 47:24-32, 2004.
- 93) **Kuhar M.J., Joyce A., Dominguez G.:** *genes in drug abuse; Drug Alcohol Depend.*, 62:157-162, 2001.
- 94) **Samaha A.N., Mallet N., Ferguson S.M., Gonon F., Robinson T.E.** *the rate of cocaine administration alters gene regulation and behavioral plasticity: implications for addiction; J. Neurosci.*, 24:6362-6370, 2004.
- 95) **Gonzalez-Nicolini V., McGinty J.F.:** *gene expression profile from the striatum of amphetamine-treated rats: a cDNA array and in situ hybridization histochemical study; Brain Res Gene Expr. Patterns*, 1:193-198, 2002.
- 96) **Koob G.F.:** *drug of abuse: anatomy, pharmacology and function of rewards pathways; TIPS*, 13:77-184, 1992.
- 97) **Maldonado R.:** *the neurobiology of addiction; J. Neural Transm. Suppl.*, 66:1-14, 2003.
- 98) **Di Chiara G.:** *in-vivo brain dialysis of neurotransmitters; Trends Pharmacol. Sci.*, 11:116-121, 1990.
- 99) **Di Chiara G.:** *nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction; Behav. Brain Res.*, 137:75-114, 2002.
- 100) **Cunningham S.T., Kelley A.E.:** *evidence for opiate-dopamine cross-sensitization in nucleus accumbens: studies of conditioned reward; Brain Res. Bull.*, 29:675-680, 1999.
- 101) **Di Chiara G.:** *drug addiction as a dopamine-dependent associative learning disorder; Eur. J. Pharmacol.*, 375:13-30, 1999.

- 102) **Wightman R.M., Robinson D.I.:** *transient changes in mesolimbic dopamine and their association with “reward”*; *J. Neurochem.*,82:721-735, 2002.
- 103) **Nestler E.J., Hope B.T., Widnell K.L.:** *drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity*, *Neuron.*, 11: 995-1006, 1993.
- 104) **Volkow N.D., Fowler J.S., Wang G.J. et al.:** *reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increase in brain dopamine and occupancy of D2 receptors*; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291:409-415, 1999.
- 105) **Phillips A.G., Ahn S., Howland J.G.:** *amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior*; *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 27:543-554, 2003.
- 106) **Everitt B.J., Robbins T.W.:** *neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habit to compulsion*; *Nat. Neurosci.*, 8:1481-1489, 2005.
- 107) **Wise R.A.:** *brain reward circuitry: insights from unsensed incentives*; *Neuron.*,36:229-240, 2002.
- 108) **Koob G.F., Le Moal M.:** *drug addiction, dysregulation of reward and allostasis*, *Neuropsychopharmacology*, 24:97-129, 2001.
- 109) **Bechara A.:** *decision making , impulse control and loss of willpower to resist drugs: a neurocognitive perspectiva*; *Nat. Neurosci.*, 11:1458-1462, 2005.
- 110) **Bechara A.:** *neurobiology of decision making: risk and reward*, *Neuropsychiatry*, 6:205-216, 2001.

- 111) **Rahman S., Sahakia B., Rudolph N.C., Rogers R.D., Robbins T.W.:** *decision making and neuropsychiatry; Trends Cogn Sci., 6:271-277, 2001.*
- 112) **Fishbein D., Hyde C., Eldreth D.:** *cognitive performance and autonomic reactivity in abstinent drug abusers and nonusers; Exp. Clin. Psychopharmacology, 13:25-40, 2005.*
- 113) **Goldstein R.Z., Volkow N.D.:** *drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidences for the involvement of the frontal cortex; Am. J. Psychiatry, 159:1642-1652, 2002.*
- 114) **Pani L., Fratta W.** *Farmacocinetica della cocaina: i segreti chimici della foglia delle Ande, Medicina delle Farmacotossicodipendenze, 2, 34, 1994.*
- 115) **Katzung B.G.** *Farmacologia generale e clinica, IV edizione italiana sulla VII di lingua inglese a cura del Prof. Paolo Preziosi, Piccin Nuova Libreria, SpA-Padova, 32, 555-556, 2000.*
- 116) **Clementi F., Fumagalli G., Paoletti R., Nicosia S.** *Farmacologia generale e molecolare, trattato di farmacologia e terapia, seconda edizione, UTET, 31, 445, 2003.*
- 117) **Giros B., Caron M.G.** *Molecular characterization of the dopamine transporter, TIPS, 14, 43-49, 1993.*
- 118) **Koob G.F.** *Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of rewards pathways, TIPS, 13, 177, 1992.*
- 119) **Uhl G.R., Hall F.S., Sora I.** *Cocaine, reward, movement and monoamine transporters, Molecular Psychiatry, 7, 21-26, 2002.*
- 120) **Dalman F.C., O'Malley K.L.** *Kappa-opioid tolerance and dependence in culture of dopaminergic midbrain neurons, J. Neuroscience, 14, 5750-5757, 1999.*
- 121) **Shippenberg S., Lefevour A., Heidbreder C.** *k-oppioid agonist prevent sensitizzazione to the conditioned rewarding effect of cocaine, J. Pharmacol. Exp. Ther 276: 545-554, 1996.*
- 122) **Heidbreder C., Goldberg S., Shippenberg T.** *The k-oppioid receptor agonist U-69593 attenuate cocaine induced behavioural sensitizzazione in the rat, Brain Res., 616: 335-338, 1993.*
- 123) **Collins S.L., D'Addario C., Izenwasser S.** *Effect of k.oppioid receptor agonist on long-term cocaine use and dopamine neurotransmission, Europ. J. of Pharmac, 426:25-34, 2001.*

- 124) **Izenwasser S., Heller B., Cox B.M.** *Continuous cocaine administration enhances  $\mu$  but not  $\delta$ -opioid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in nucleus accumbens, Eur. J. Pharmacol., 297:187-191, 1996.*
- 125) **Unterwald E.M., Horne-King J., Kreek M.J.** *Chronic cocaine alters brain  $\mu$  opioid receptors, Brain res., 584:314-318, 1992.*
- 126) **Unterwald E.M., Rubinfeld J.M., Kreek M.J.** *Repeated cocaine administration upregulates  $\kappa$  and  $\mu$  but not  $\delta$  opioid receptor, Neuroreport 5: 1613-1616, 1994.*
- 127) **Collins S.L., Kunko P.M., Ladenheim B., Cadet J-L., Carrol F. I., Izenwasser S.** *Chronic cocaine increase  $\kappa$ -opioid receptor density: lack of effect by selective dopamine uptake inhibitors. Synapse, 45:153-158, 2002.*
- 128) **Trazferis J.A., McGinty J.F.** *Kappa-opioid receptor stimulation decrease amphetamine-induced behavior and neuropeptide mRNA expression in the striatum, Brain Res. Mol. Brain Res., 93, 27-35, 2001.*
- 129) **Romualdi P., Donatini A., Izenwasser S., Cox B.M., Ferri S.** *Chronic intracerebroventricular cocaine differentially affects prodynorphin gene expression in rat hypothalamus and caudate putamen, Mol. Brain Res., 40: 153-156, 1996.*
- 130) **Turchan J., Przewlicka B., Lason W., Przewlicki R.** *Effect of repeated psychostimulant administration on the prodynorphin system activity and  $\kappa$  opioid receptor density in the rat brain, Neuros., 85: 1051-1059, 1998.*
- 131) **Unterwald E.M.** *Regulation of opioid receptors by cocaine, Ann n y Accad. Sci.,973, 74-92, 2001.*
- 132) **Romualdi P., D'Addario C., Ferri S., Cox B.M., Izenwasser S.** *Chronic GBr 12909 administration differentially alters prodynorphin gene expression compared to cocaine, Eur. J. Pharmacol, 413: 207-212, 2001.*
- 133) **Gerdes R., Garg R., Gorokhovskaya D., Hurley M.J., Carrol F.I., Mash D.C., Izenwasser S.** *Decreased tyrosine hydroxylase after continuous cocaine, GBR 12909 and RTI-117, Soc. Neurosci. Abstr,25: 810 1999.*
- 134) **D'Addario C., Di Benedetto M., Candeletti S., Romualdi P.** *The  $\kappa$ -opioid receptor agonist U-69593 prevents cocaine-induced phosphorylation of DARPP-32 at Thr 34 in the rat brain, Brain Res. Bull., 73:34-39; 2007.*

- 135) **Dichiara G., North R.A.** *Neurobiology of opiate abuse. Trends Pharmacol. Sci., 13, 185-193, 1992.*
- 136) **Grudt T.J., Williams J.T.** *Kappa-opioid receptor also increase potassium conductance, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 23, 11429-11432, 1993.*
- 137) **Koob G.F.** *Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of rewards pathways, TIPS, 13, 177, 1992.*
- 138) **Van De Kar L.D., Bonadonna A.M., Rittenhouse P.A., Kerr J.E., Levy A.D., Iyer L., Herbert G.B., Alvarez Sanz M.C., Lent S.J., Carnes M.** *Prior chronic exposure to cocaine inhibits the serotonergic stimulation of ACTH and secretion of corticosterone, Neuropharmacology, 31, 169-175, 1992.*
- 139) **Katzung B.G.** *Farmacologia generale e clinica, IV edizione italiana sulla VII di lingua inglese a cura del Prof. Paolo Preziosi, Piccin Nuova Libreria, SpA-Padova, 32, 555-556, 2000.*
- 140) **Levy A.D., Rittenhouse P.A., Li Q., Bonadonna A.M., Alvarez Sanz M.C., Bethea C.L., Van De Kar L.D.** *Repeated injections of cocaine inhibit the serotonergic regulation of prolactin and rennin secretion in rats, Brain Res., 580, 6-11, 1992.*
- 141) **Kozel L.B., Meshul C.K.** *Nerve terminal glutamate immunoreactivity in the rat nucleus accumbens and ventral tegmental area after a short withdrawal from cocaine, Synapse, 51, 224-232, 2004.*
- 142) **Pani P.P.** *Gli aspetti clinici della dipendenza da cocaina, le difficoltà nella terapia, in: Medicina delle farmacotossicodipendenze, 2, 40, 1994.*
- 143) **Lutfly K., Do T., Maidment N.T.** *Orphanin FQ/Nociceptin attenuate motor stimulation and changes in nucleus accumbens extracellular dopamine induced by cocaine in rats, Psychopharmacology, in press, 2001 .*
- 144) **Narayanan S., Maidment N.T.** *Orphanin FQ and behavioral sensitization to cocaine, Pharmacol Biochem Behav, 63, 271-277, 1999.*

- 145) **Lutfly K., Khaliq I., Carrol F.I., Maidment N.T.** *Orphanin FQ/nociceptin blocks cocaine-induced behavioral sensitization in rats, Psychopharmac., 164:168-176, 2002.*
- 146) **Kawamoto H., Ozaki S., Itoh Y.** Discovery of the first potent and selective small molecule opioid receptor-like (ORL-1) antagonist: 1-[(3R,4R)-1-cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidyl]-3-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazole-2-one (J113397), *J. Med. Chem.*, 42, 5061-5063, 1999.
- 147) **Narayanan S., Lutfly K., Maidment N.** *Sensitization to cocaine after a single intra-cerebral injection of orphanin FQ/NOCICEPTIN, Behav. Brain Res., 131:97-103, 2002.*
- 148) **Narayanan S., Lam H., Carrol I., Lutfly K.** *Orphanin FQ/nociceptin suppresses motor activity through an action along the mesoaccumbens axis in rats, J. Psychiatry Neurosci., 29(2):116-123, 2004*
- 149) **Kotlinska J., Wichmann J., Legowska A., Rolka K., Silberring J.** *Orphanin FQ/nociceptin but not Ro 65-6570 inhibits the expression of cocaine-induced conditioned place preference, Behav. Pharmacol., 13: 229-235, 2002.*
- 150) **Sakoori K., Murphy N.P.** *Central administration of nociceptin/orphanin FQ blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine and cocaine, but not conditioned place aversion to naloxone in mice, Psychopharmacol. (berl.) 172 (2): 129-136, 2004.*
- 151) **Romualdi P., Di Benedetto M., D'Addario C., Collins S.L., Wade D., Candeletti S., Izenwasser S.** *Chronic cocaine produces decreases in N/FQ peptide levels in select rat brain regions, J. of Molec. Neurosci., 31:163-168, 2007.*
- 152) **Karlsen S.N., Spigset O., Slordal L.** *The dark side of ecstasy: neuropsychiatric symptoms after exposure to MDMA; Journal compilat., 102, 15-24, 2007.*

- 153) **Nichols D.E.** *Differences between the mechanism of action of MDMA, MBMB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogenes; J. Psychoactive Drugs, 18:305-313, 1986.*
- 154) **Whitaker-Azmitia P.M., Aronson T.A.** *“Ecstasy” (MDMA)-induced panic; Am. J. Psychiatry, 146:119, 1989.*
- 155) **Peroutka S.J., Newman H., Harris H.** *Subjective effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine in recreational users; Neuropsychopharmacology, 1:273-277, 1988.*
- 156) **Mas M., Farre M., De la Torre R.** *Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3,4-methyleneioxymethamphetamine in humans; J. Pharmacol. Exp. Ther., 290:136-145, 1999.*
- 157) **Pacifici R., Pichini S., Zuccaro P.** *Paroxetine inhibits acute effects of MDMA on the immune system in humans; J. Pharmacol. Exp. Ther., 309:285-292, 2004.*
- 158) **Liechti M.E., Vollenweider F.X.** *Acute physiological effects of effects of MDMA (“Ecstasy”) after haloperidol pretreatment in healthy humans; Eur. Neuropsychopharmacol., 14:269-274, 2000.*
- 159) **Steele T.D., Nichols D.E., Yim G.K.** *Stereochemical effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) and related amphetamine derivatives on inhibition of uptake of (3H)monoamines into synaptosomes from different regions of rat brain; Biochem. Pharmacol., 36:2297-2303, 1987.*
- 160) **Rothman R.B., Baumann M.H.** *Therapeutic and adverse actions of serotonin transporter substrates; Pharmacol. Ther., 95:73-88, 2002.*

- 161) **Gudelsky G.A., Yamamoto B.K.** *Action of MDMA on cerebral dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons; Pharmacol. Biochem. Behav., 90:198-207, 2008.*
- 162) **Yamamoto B.K., Nash J.F., Gudelsky G.A.** *Modulation of methylenedioxy-methamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and g-aminobutyric acid in the substantia nigra; J. Pharmacol. Exp. Ther., 273:1063-1070, 1995.*
- 163) **Gough B., Ali S.F., Slikker W., Holson R.R.** *Acute effect of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate; Pharmacol. Biochem. Behav., 39:619-623, 1991.*
- 164) **Schmidt C.J., Taylor B.L.** *Depression of rat brain tryptophan hydroxylase following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine; Biochem. Pharmacol., 40:95-102, 1987.*
- 165) **Stone D.M., Johnson M., Hanson G.R. and Gibb J.W.** *Role of endogenous dopamine in the central serotonergic deficits induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine; J. Pharmacol. Exp. Ther., 247:79-87, 1988.*
- 166) **Gough B., Ali S.F., Slikker W., Holson R.R.** *Acute effect of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate; Pharmacol. Biochem. Behav., 39:619-623, 1991.*
- 167) **Nash J.F., Brodtkin J.** *Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxy-methamphetamine-induced dopamine release: effect of dopamine uptake inhibitors; J. Pharmacol. Exp. Ther., 259:820-825, 1991.*
- 168) **Koch S., Galloway M.P.** *MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin; J. Neural. Transm., 104:135-146, 1997.*

- 169) **Davison D., Parrot A.C.** *Ecstasy (MDMA) in recreational users: self-reported psychological and physiological effects; Human Psychopharmacology, 12:221-226, 1997.*
- 170) **Gudelsky C.A., Yamamoto B.K., Nash J.F.** *Potential of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine-induced dopamine release and serotonin neurotoxicity by 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists; Eur. J. Pharmacol., 264:325-330, 1994.*
- 171) **Slikker W.Jr, Holson R.R., Ali S.F.** *Behavioral and neurochemical effects of orally administered MDMA in the rodent ant in non-human primates; Neurotoxicology, 10:529-542, 1989.*
- 172) **Callaway C.W., Wing L.L., Geyer M.A.** *Serotonin release contributes to the locomotor stimulant effect of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine in rats; J. Pharmacol. Exp. Ther., 254:456-464, 1990.*
- 173) **Thompson M. R., Callaghan P. D. Hunt G.E.** *A role for oxytocin and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the prosocial effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy); Neuroscience, 146:509-514, 2007.*
- 174) **Gerra G., Bassignana S., Zaimovic A., Moi G.** *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in subjects with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) use history: correlation with dopamine receptor sensitivity; Psychiatry research, 120:115-124, 2003.*
- 175) **Kobeissy F.H., Jeung J.A., Warren W.** *Changes in leptin, ghrelin and neuropeptide Y after an acute model of MDMA and methamphetamine exposure in rats; Journal compilation, 13:15-25, 2007.*
- 176) **Pacifici R., Zuccaro P., Farrè M., Pichini S.** *Proprietà immunomodulanti dell'ecstasy (MDMA); Ann. Ist. Super. Sanità, vol.36 n.1 pp 69-75, 2000.*

- 177) **Morley K.C., McGregor I.S.** *3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, "ecstasy") increases social interaction in rats; Eur. J. Pharmacol., 408:41-49, 2000.*
- 178) **Byrne T., Baker L.E., Poling A.** *MDMA and learning: effects of acute and neurotoxic exposure in the rat; Pharmacol. Biochem. Behav., 66:501-508, 2000.*
- 179) **O'Shea E., Granados R., Esteban E.** *The relationship between the degree of neurodegeneration of rat brain 5-HT nerve terminals and the dose and frequency of administration of MDMA ("ecstasy"); Neuropsychopharmacology, 37:919-926, 1998.*
- 180) **O'Hearn E., Battaglia G., De Souza E.B.** *Methylenedioxymphetamine (MDA) and Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity; J. Neurosci., 8:2788-2803, 1988.*
- 181) **Scanzanello C.R., Hatzidimitriou G., Martello A.L.** *Serotonergic recovery after ( $\pm$ ) 3,4-(methylenedioxy) methamphetamine injury: observations in rats; J. Pharmacol. Exp. Ther., 264:1484-1491, 1993.*
- 182) **Malberg Y.E., Sabol K.E., Seiden L.S.** *Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat; J. Pharmacol. Exp. Ther., 278:258-267, 1996.*
- 183) **Andreu V., Mas A., Bruguera M.** *Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity; J. Hepatol., 29:394-397, 1998.*
- 184) **Ellis A.J., Wendon J.A., Portmann B., Williams R.** *Acute liver damage and ecstasy ingestion; Gut., 25:497-500, 2002.*
- 185) **Carvalho M., Carvalho F., Bastos M. L.** *Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxy-methamphetamine*

(“ecstasy”)? *An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes; Arch Toxicol.*, 74:789-793, 2001.

186) **Morgan M.J., Mcfie L., Fleetwood H., Robinson J.A.** *Ecstasy (MDMA): are the psychological problems associated with its use reversed by prolonged abstinence?; Psychopharmacology*, 159:294-303, 2002.

187) **Green A.R., Mechan A.O., Elliott J.M.** *The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, “ecstasy”;* *Pharmacol. Rev.*,55:463-508, 2003.

188) **Reneman L., Majoie C.B., Flick H., Den Heeten G.J.** *Reduced N-acetylaspartate levels in the frontal cortex of 3,4-mththylendioxy-methamphatmine (“Ecstasy”) user: preliminary results; AJNR Am. Neuroradiol.*, 23:231-237, 2002.

189) **Obrocki J., Buchert R., Vaterlein O., Thomasius R.** *Long terme effects on the human nervous system revealed by positron emission tomography; Br. J. Psychiatry*, 175:186-188, 1999.

190) **Morgan M.J.** *Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects; Psychopharmacology*, 142:230-248, 2000.

191) **O’suilleabhain P., Giller C.** : *rapidly progressive parkinsonism in a self-reported user of Ecstasy and other drugs; Mov. Disord.*, 18:1378- 1381, 2003.

192) **Mintzer S., Hickenbottom S., Gilman S.:** *Parkinsonism after taking Ecstasy; N. Engl. J. Med.*, 340:1443, 1999.

193) **Kuniyoshi SM, Jankovich J.** : *MDMA and Parkinsonism; N. Engl. J. Med.*, 349:96- 97, 2003.

194) **Ricaurte G.A., Yuan J., Hatzidimitriou G., Cord B.J., Mccann U.D.** : *severe dopaminergic neurotoxicity in primates after a common*

- recreational dose regimen of MDMA (“ecstasy”); Science, 297:2260-2263, 2002.*
- 195) **Ricaurte G.A., Yuan J., Hatzidimitriou G., Cord B.J., Mccann U.D. :** *retraction: severe dopaminergic neurotoxicity in primates after a common recreational dose regimen of methylenedioxymethamphetamine (MDMA); Science, 301:1479, 2003.*
- 196) **Verbaten M.N. :** *specific memory deficits in Ecstasy users? The results of a meta- analysis; Hum. Psychopharmacol., 18: 281- 290, 2003.*
- 197) **Bankson M.G., Cunningham K.A.:** *3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) as a unique model of serotonin receptor function and serotonin- dopamine interactions; J. Pharmacol. Exp. Ther., 297:846- 852, 2001.*
- 198) **Barnes N.M., Sharp T.:** *a review of central 5-HT receptors and their functions; Neuropharmacology, 38: 1083- 1152, 1999.*
- 199) **Frechilla D., Cobreros A., Saldise L., Moratalla R., Insausti R., Luquin M., Del Rio J.:** *serotonin 5-HT(1A) receptor expression is selectively enhanced in the striosomal compartment of chronic parkinsonian monkeys; Synapse, 39: 288- 296, 2001.*
- 200) **Bibbiani F., Oh J.D., Chase T.N.:** *serotonin 5-HT1A agonist improves motor complications in rodent and primate parkinsonian models; Neurology, 57:1829- 184, 2001.*
- 201) **Kannari K., Kurahashi K., Tomiyama M., Maeda T., Arai A., Baba M., Suda T., Matsunaga M.:** *Tandospirone citrate, a selective 5-HT1a agonist, alleviates L-DOPA-induced dyskinesia in patients with Parkinson’s disease; No To Shinkei, 54:133-137, 2002.*
- 202) **Oh J.D., Bibbiani F., Chase T.N.:** *Quetiapine attenuates levodopa-induced motor complications in rodent and primate parkinsonian models; Exp. Neurol., 177:557- 564, 2002.*

- 203) **Iravani M.M., Asari D., Patel J., Wiczorek W.J., Kruk Z.L.:** *direct effects of 3,4- methylenedioxyamphetamine (MDMA) on serotonin or dopamine release and uptake in the caudate putamen, nucleus accumbens, substantia nigra pars reticulata and the dorsal raphe nucleus slices; Synapse, 36: 275- 285, 2000.*
- 204) **Iravani M., Jackson M., Kuoppamaki M., Smith L.A., Jenner P.:** *3,4- methylenedioxyamphetamine (Ecstasy) inhibits dyskinesia expression and normalizes motor activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine- treated primates; Journal of Neuroscience, 23: 9107- 9115, 2003.*
- 205) **Scraggs P.R., Ridley R.M.:** *behavioural effects of amphetamine in a small primate: relative potencies of the D- an L- isomers; Psychopharmacology (Berl), 59:243- 245, 1978.*
- 206) **Green A.R., Cross A.J., Goodwin G.M.:** *review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4- methylenedioxyamphetamine (MDMA or “ecstasy”); Psychopharmacology, 119:247- 260, 1995.*
- 207) **Paulus M.P., Geyer M.A.:** *the effects of MDMA and other methylenedioxy- substituted phenylalkylamines on the structure of rat locomotor- activity; Neuropsychopharmacology, 7:15- 31, 1992.*
- 208) **Rempel N.L., Callaway C.W., Geyer M.A.:** *serotonin 1B receptor activation mimics behavioral effects of presynaptic serotonin release; Neuropsychopharmacology, 8:201- 211, 1993.*
- 209) **Callaway C.W., Wing L.L., Geyer M.A.:** *Serotonin release contributes to the locomotor stimulant effect of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine in rats; J. Pharmacol. Exp. Ther., 254:456-464, 1990.*
- 210) **Maratos E.C., Jackson M.J., Pearce R.K., Jenner P.:** *antiparkinsonian activity and dyskinesia risk of ropinirole and L-DOPA combination*

*therapy in drug naive MPTP- lesioned common marmosets; Mov. Disord., 16:631-641, 2001.*

- 211) **Forsling M.L., Fallon J.K., Kicman A.T., Hutt A.J., Cowan D.A., Henry J.A.:** *arginine vasopressin release in response to the administration of 3,4- methylenedioxymethamphetamine: is metabolism a contributory factor?; J Pharm Pharmacol., 53: 1357-1363, 2001.*
- 212) **Forsling M.L., Fallon J.K., Shah D., Tilbrook G.S., Cowan D.A., Kicman A.T., Hutt A.J. :** *the effect of 3,4- methylenedioxymethamphetamine and its metabolites on neurohypophysial hormone release from the isolated rat hypothalamus; Br J Pharmacol., 135:649-656, 2002.*
- 213) **Jorgensen H., Riis M., Knigge U., Kjaer A., Warberg J.:** *serotonin receptors involved in vasopressin and oxytocin secretion; J Neuroendocrinol, 15:242-249, 2003.*
- 214) **Schmidt W.J., Mayerhofer A., Meyer A., Kovar K.:** *ecstasy counteracts catalepsy in rats, an anti- parkinsonian effect?; Neuroscience, 330: 251- 254, 2002*
- 215) **Rothman R.B., Baumann M.H., Dersch C.M., Romero D.V., Rice K.C., Carroll F.I., Partilla J.S.:** *amphetamine – type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin; Synapse, 39:32-41, 2001.*
- 216) **Wadenberg M.L.:** *serotonergic mechanism in neuroleptic- induced catalepsy in the rat; Neurosci. Biobehav. Rev., 20: 325-339, 1996.*
- 217) **Stadtland C., Erfurth A., Arolt V.:** *de novo onset of Parkinson's disease after antidepressant treatment with citalopram; Pharmacopsychiatry, 33: 194-195, 2000.*
- 218) **Battaglia G., Brooks B.P., Kulsakdinun C., De Souza E.B.:** *pharmacologic profile of MDMA (3,4- methylenedioxymethamphetamine)*

- at various brain recognition sites; Eur. J. Pharmacol, 149: 159-163, 1988.*
- 219) **Kish S.J., Shannak K., Hornykiewicz O.** *Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease: Pathophysiologic and clinical implications; N. Engl. J. Med., 318: 876–880, 1988.*
- 220) **Mc Naught KS., Olanow CW.** *Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease; Neurobiol. Aging., 27:530-545, 2006.*
- 221) **Olanow Cw., Mc Naught Ks.** *Ubiquitin- proteasome system and Parkinson's disease; Mov. Disord., 21:1806- 1823, 2006.*
- 222) **Jenner P., Olanow Cw.** *The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease; Neurology, 66:S24- S36, 2006.*
- 223) **Mc Naught KS., Jackson T., Jno Baptiste R., Kaupustine A., Olanow CW.** *Proteasomal dysfunction in sporadic Parkinson's disease; Neurology, 66: S37- S49, 2006.*
- 224) **Simuni T.** *Diagnosis and management of Parkinson's disease; Medscape Neurology, 2007.*
- 225) **Rezak M.** *Current pharmacotherapeutic treatment options in Parkinson's disease; Dis. Mon., 53: 214-222, 2007.*
- 226) **Kolb b. and Whishaw I.Q.** *Brain plasticity and behavior; Annu. Rev. Psychol., 49, 43-64, 1998.*
- 227) **Cummings J. L.** *Depression and Parkinson's disease: a review; Am. J. Psychiat., 149, 443–454,1992.*
- 228) **Kirik D., Rosenblad C., Bjorklund A.** *Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the*

*nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat; Exp. Neurol., 152, 259–277, 1998.*

- 229) **Hornykiewicz O.** *Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: possible neurochemical mechanisms; Adv. Neurol., 60: 140–147, 1986.*
- 230) **Anglade P., Tsuji S., Javoy-Agid F., Agid Y., Hirsch E. C.** *Plasticity of nerve afferents to nigrostriatal neurons in Parkinson's disease; Ann. Neurol., 37: 265–272, 1995.*
- 231) **Seeman P., Niznik H.B.** *Dopamine receptors and transporters in Parkinson's disease and schizophrenia; FASEB J., 4: 2737–2744, 1990.*
- 232) **Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F.** *Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington: Clinical, morphological and neurochemical correlations; J. Neurol. Sci., 20: 415–455, 1973.*
- 233) **Jellinger K., The pathology of parkinsonism. In: C. D. Marsden and S. Fahn Editors, Movement Disorders, Butterworths, London (1987), pp. 124–165, K Jellinger, New developments in the pathology of Parkinson's disease, Adv. Neurol., 53, 1–16, 1990.**
- 234) **Marin C., Aguilar E., Obeso J.A.** *Coadministration of entacapone with levodopa attenuates the severity of dyskinesias in hemiparkinsonian rats; Mov. Disord. 21: 646- 653, 2006.*
- 235) **Lang A.E., Lozano A.M.** *Parkinson's disease. First of two parts; N. Engl. J. Med. 339: 1044- 1053, 1998.*
- 236) **Kahle P.J., Haass C., Kretschmar H.A., Neumann M.** *Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases; J. Neurochem., 82: 449-457, 2002.*

- 237) **Betarbet R., Sherer Todd B., Greenamyre J.T.** *Animal models of Parkinson's disease; Bioessays, 24: 308-318, 2002.*
- 238) **Javitch J.A., D'Amato R.J., Strittmatter S.M., Snyder S.H.** *Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity; Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 2173-2177, 1985.*
- 239) **Tipton K.F., Singer T.P.** *Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds; J. Neurochem., 61: 1191-1206, 1993.*
- 240) **Shoffner J.M., Watts R.L., Juncos J.L., Torroni A., Wallace D.C.** *Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease; Ann. Neurol., 30: 332-339, 1991.*
- 241) **Zigmond M.J., Berger T.W., Grace A.A., Stricker E.M.** *Compensatory responses to nigrostriatal bundle injury, Studies with 6-hydroxydopamine in an animal model of parkinsonism; Mol. Chem. Neuropathol., 10: 185-200, 1989.*
- 242) **Hantraye P., Varastet M., Peschanski M., Riche D., Cesaro P., Willer J.C., Maziere M.** *Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons; Neuroscience, 53: 169-178, 1993.*
- 243) **Darland T., Heinricher M.M., Grandy D.K.** *Orphanin FQ/nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more; Trends Neurosci., 21: 215-221, 1998.*
- 244) **Maidment N.T., Chen Y., Tan A.M., Murphy N.P., Leslie F.M.** *Rat ventral midbrain dopamine neurons express the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL-1; Neuroreport, 13: 1137-1140, 2002.*

- 245) **Norton C.S., Neal C.R., Kumar S., Akil H., Watson S.J.** *Nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor-like receptor mRNA expression in dopamine systems; J. Comp. Neurol., 444: 358-368, 2002.*
- 246) **Zheng F., Grandy D.K., Johnson S.W.** *Actions of orphanin FQ/nociceptin on rat ventral tegmental area neurons in vitro; Br. J. Pharmacol., 136: 1065-1071, 2002.*
- 247) **Marti M., Mela F., Veronesi C., Guerrini R., Salvadori S., Federici M., Mercuri N.B., Rizzi A., Franchi G., Beani L., Bianchi C., Morari M.** *Blockade of nociceptin/orphanin FQ receptor signaling in rat substantia nigra pars reticulata stimulates nigrostriatal dopaminergic transmission and motor behavior; J. Neurosci., 24: 6659-6666, 2004.*
- 248) **Di Benedetto 2006**
- 249) **Bregola G., Zucchini S., Rodi D., Binaschi A., D'Addario C., Landuzzi D., Reinscheid R., Candeletti S., Romualdi P., Simonato M.:** *involvement of the neuropeptide nociceptin/orphanin FQ in kainate seizures; J. Neurosci., 22: 10030-10038, 2002.*
- 250) **Aparicio L.C., Candeletti S., Binaschi A., Mazzuferi M., Mantovani S., Di Benedetto M., Landuzzi D., Lopetuso G., Romualdi P., Simonato M.:** *Kainate seizures increase nociceptin/orphanin FQ release in the rat hippocampus and thalamus: a microdialysis study; J. Neurochem., 91(1): 30-37, 2004*
- 251) **Marti M., Guerrini R., Beani L., Bianchi C., Morari M.:** *Nociceptin/orphanin FQ receptors modulate glutamate extracellular levels in the substantia nigra pars reticulata: a microdialysis study in the awake freely moving rat; Neuroscience, 112: 153-160, 2002.*