

*Università di Pisa*  
*Facoltà di Medicina e Chirurgia*



*Dipartimento di Morfologia Umana e Biologia Applicata*  
*Dottorato di Ricerca*  
*in Morfologia e Funzione Normale e Patologica di Cellule e Tessuti*

***Il Sistema Noradrenergico nell'epilessia***

*Relatore*

*Chiar.mo Prof. Francesco Fornai*

*Candidata*

*Dr. Chiara Pizzanelli*

*Anni 2004-2006*

# Indice

## Introduzione

Considerazioni generali	1
Scopi del presente lavoro	2
Anatomia funzionale del sistema noradrenergico in relazione all'epilessia	6

## Metodi

### Prima Sezione: NA e Stato Epilettico

Animali	10
Chirurgia, disegno sperimentale e somministrazione di sostanze	10
Dialisi cerebrale	12
Dosaggio delle monoamine	12
Istochimica ed immunohistochimica	13
Analisi statistica	15

### Seconda Sezione: MDMA ed epilessia

Animali	15
Regime di somministrazione di MDMA	15
Valutazione EEG	16
Valutazione delle crisi	17
Studi di attività funzionale mediante misurazione dell'utilizzo cerebrale locale di glucosio	18
Dosaggio delle monoamine	19
Analisi statistica	20

### Terza Sezione: NA, MDMA, $\alpha 1b$ -AR

Animali	20
Valutazione del ruolo dell' $\alpha 1b$ -AR in epilessia	21
Valutazione del ruolo dell' $\alpha 1b$ -AR nella sensitizzazione comportamentale da MDMA e conseguente suscettibilità alle crisi	22
Valutazione delle modificazioni comportamentali durante esposizione a MDMA	23
Valutazione della suscettibilità alle crisi dopo esposizione a MDMA negli animali wild-type e knockout	24
Studi morfologici	24
Analisi statistica	24

## Risultati

### Prima Sezione: NA e Stato Epilettico

Effetti del DSP-4 sui neuroni NA del LC	25
Effetti del DSP-4 sul rilascio di NA in corteccia piriforme in condizioni basali e dopo crisi	26
Effetti del DSP-4 sulle crisi limbiche indotte da bicucullina	

in APC	27
Effetti di AP-7 e NBQX sulle crisi limbiche indotte da bicucullina in APC	27
Neuropatologia dello SE localmente indotto in animali con lesione NA	27
<b>Seconda Sezione: MDMA ed epilessia</b>	
EEG	28
Attività epilettica	29
Topografia del metabolismo cerebrale	30
Dosaggio delle monoamine	31
<b>Terza Sezione: NA, MDMA, <math>\alpha 1b</math>-AR</b>	
Attività epilettica	31
Modificazioni comportamentali durante esposizione a MDMA	33
Valutazione della suscettibilità alle crisi dopo esposizione a MDMA	34
Studi morfologici	35
<b>Discussione</b>	
Considerazioni generali	36
Perché una crisi non finisce?	38
Rilascio di NA e degenerazione neuronale in corso di crisi e SE	39
Ecstasy ed EEG	40
Ecstasy e crisi	42
Il recettore adrenergico $\alpha 1b$ media gli effetti dell'Ecstasy	43
Possibili implicazioni cliniche	45
<b>Bibliografia</b>	48
<b>Figure e Tabelle</b>	60

## **Introduzione**

### *Considerazioni generali*

Il coinvolgimento delle catecolamine nella modulazione delle crisi epilettiche rappresenta uno degli aspetti più studiati nel campo dell'epilessia sperimentale. Tra i vari sistemi monoaminergici, un ruolo preponderante nell'attenuare le crisi è svolto dalla noradrenalina (NA), come testimoniato dalla recente dimostrazione della necessità di una innervazione NA intatta per sostenere l'efficacia antiepilettica della stimolazione del nervo vago (VNS, Krahl et al., 1998). Quest'ultima costituisce una metodica recentemente approvata per la cura delle epilessie farmaco-resistenti nell'uomo (George et al., 2000; Schachter et al., 2002) e tale dimostrazione rappresenta un modello di interazione clinico-sperimentale in cui il dato sperimentale contribuisce a definire un meccanismo fisiopatologico con conseguenti potenziali ricadute cliniche.

Inizialmente, l'influenza della NA endogena sulle crisi sperimentali è stata suggerita da studi pre-clinici condotti su un'ampia varietà di crisi incluse quelle ottenute con la somministrazione sistemica di pentilentetrazolo, l'applicazione di elettroshock massimale, l'esposizione a fluorotile (Chen et al., 1954; Oishi et al., 1979). L'evidenza più solida dell'effetto antiepilettico della NA è stata ottenuta più tardi, dimostrando che la NA endogena ritardava lo sviluppo del kindling dell'amigdala del ratto (Corcoran et al., 1980; McIntyre, 1981; McIntyre e Wong, 1986) e che, al contrario, l'assenza di NA, ottenuta danneggiando il locus coeruleus (LC), la maggior fonte di NA nel sistema nervoso centrale (SNC), accelerava la progressione dello stesso kindling (Corcoran, 1988).

Mentre inizialmente il ruolo antiepilettico della NA endogena è stato sostenuto sulla base di studi che mostravano gli effetti deleteri di un danno del sistema NA sulle crisi indotte dalla stimolazione elettrica o dalla somministrazione sistemica di chemoconvulsivanti, approcci successivi si sono basati sull'analisi delle alterazioni del contenuto cerebrale di NA e del pattern di innervazione NA di animali spontaneamente epilettici (Dailey e Jobe, 1986; Browning et al., 1989). Nelle ultime decadi infine l'affinamento delle tecniche sperimentali ha condotto ad approcci ancora più sofisticati volti a chiarire lo specifico ruolo della NA nell'epilessia. Tali tecniche spaziano dall'elettrofisiologia *in vitro* agli studi di legame recettoriale fino alle ultime tecniche di ingegneria genetica che valutano selettivamente le varie componenti del sistema NA, sia *in vitro* che *in vivo*, mediante l'impiego di modelli animali knock-out e transgenici (Weinshenker e Szot, 2002). Questi ultimi approcci hanno condotto ad una più profonda conoscenza dei meccanismi attraverso cui la NA modula le crisi epilettiche.

### *Scopi del presente lavoro*

Nel presente lavoro si raccolgono alcuni contributi inerenti il ruolo della NA in epilessia ottenuti dal gruppo di ricerca in epilessia sperimentale che opera presso il Dipartimento di Morfologia Umana e Biologia Applicata dell'Università di Pisa.

Una specifica linea di ricerca è stata condotta al fine di valutare le conseguenze della deprivazione NA, ottenuta mediante lesione selettiva dei terminali del LC, su un modello di epilessia limbica basato sulla microinfusione di chemoconvulsivanti in una specifica area trigger ricchissima di terminali NA, la

corteccia piriforme anteriore (APC) o Area Tempesta (Piredda e Gale, 1985). Tale ricerca è stata orientata non solo a valutare gli effetti sulle crisi, già osservati in altri modelli sperimentali, ma soprattutto a considerare un fenomeno diverso, quello dello stato epilettico (SE). Lo SE infatti non è semplicemente una crisi prolungata, ma una crisi che ha trovato dentro di sé i meccanismi attraverso cui autosostenersi, senza cessare; l'ipotesi di lavoro è che il deficit di NA favorisca il consolidamento di un circuito epilettico che si automantiene, dando origine allo SE, mentre la presenza di NA contrasta lo sviluppo dello stesso circuito, favorendo il limitarsi della scarica in una singola crisi epilettica.

Un'altra linea di ricerca, che nasce dall'interesse che i laboratori di questo Dipartimento hanno recentemente sviluppato verso i farmaci e le sostanze d'abuso, si è proposta di valutare gli effetti dell'assunzione cronica di metilendiossimetanfetamina (MDMA, Ecstasy), una sostanza d'abuso comunemente utilizzata tra i giovani (EMCDDA, Luxembourg, 2001), sulla suscettibilità alle crisi epilettiche, complicanza neurologica estremamente comune nell'uomo che abusa di Ecstasy (Zagnoni e Albano, 2002; Ben-Abraham et al., 2003). In particolare si sono valutati gli effetti prodotti dalla somministrazione cronica di MDMA sull'attività EEG, sul metabolismo cerebrale e sulla soglia alle crisi nel modello murino. Si è dimostrato che la somministrazione cronica di MDMA produceva un'ipereccitabilità limbica associata a ridotta soglia epilettica e rallentamento dell'attività EEG. Questi dati sottolineano il potenziale epilettogeno della sostanza, di cui si individua una tossicità selettiva sul sistema limbico, che potrebbe essere alla base delle crisi epilettiche ed anche dei deficit cognitivi che si osservano spesso nell'uomo che abusa cronicamente di Ecstasy (Bolla et al.,

1998; Bhattachary e Powell, 2001; Zagnoni e Albano, 2002). Rimanevano tuttavia non chiariti i meccanismi attraverso cui si verificano tali fenomeni e l'ultima parte di questa ricerca si è orientata pertanto a cercare di definirli. In tale ottica, si è voluto valutare un possibile coinvolgimento del sistema NA ed in particolare di uno specifico sottotipo recettoriale adrenergico, l' $\alpha 1b$  ( $\alpha 1b$ -AR). I presupposti che ci hanno spinto ad indagare il possibile coinvolgimento di tale sottotipo recettoriale nel mediare l'aumentata suscettibilità alle crisi epilettiche conseguente all'esposizione a MDMA sono stati i seguenti: 1) gruppi di ricerca autorevoli hanno dimostrato che l' $\alpha 1b$ -AR esercita un ruolo potente nel controllo degli effetti prodotti dalle sostanze d'abuso, determinando con la sua assenza la soppressione della risposta ipermotoria indotta da psicostimolanti come la metanfetamina (Drouin et al., 2002); 2) lo stesso sottotipo recettoriale, quando iperespresso, costituisce un modello sperimentale di epilessia, visto che gli animali che esprimono livelli più elevati di  $\alpha 1b$ -AR hanno crisi epilettiche spontanee (Kunieda et al., 2002); 3) l' $\alpha 1b$ -AR è coinvolto nei meccanismi di degenerazione neuronale e recentemente il nostro stesso gruppo, per altri progetti, ha dimostrato che l'assenza di tale recettore protegge dal danno indotto da metanfetamina (Battaglia et al., 2003). In altre parole, essendo ben dimostrato che l'effetto di sostanze d'abuso come la metanfetamina necessita, per esplicarsi, della stimolazione dell' $\alpha 1b$ -AR (Drouin et al., 2002), si può ipotizzare che anche l'MDMA necessiti della stimolazione dell' $\alpha 1b$ -AR per esercitare il suo effetto, cioè che la presenza di  $\alpha 1b$ -AR sia necessaria a che l'esposizione a MDMA produca ipereccitabilità cerebrale. Tale ipotesi di coinvolgimento appare ulteriormente supportata dal fatto che l' $\alpha 1b$ -AR ha un ruolo potente nel modulare l'eccitabilità cerebrale, visto che

la sua iperespressione è causa di epilessia (Kunieda et al., 2002). Se i meccanismi che conducono alla sensitizzazione comportamentale ed alla suscettibilità alle crisi indotte da MDMA derivano entrambi da un'ipereccitabilità dipendente dalla stimolazione dell'  $\alpha 1b$ -AR, noi ci aspettiamo che la suscettibilità alle crisi e la sensitizzazione comportamentale da MDMA siano soppresse dal blocco dell'  $\alpha 1b$ -AR. In assenza di antagonisti selettivi  $\alpha 1b$ , è stato possibile valutare le ipotesi suddette grazie alla disponibilità di animali non esprimenti l' $\alpha 1b$ -AR. Disponendo pertanto di topi knockout per il recettore  $\alpha 1b$ , si è voluto valutare la loro risposta a stimoli convulsivanti, la risposta comportamentale a somministrazioni ripetute di MDMA e se una precedente esposizione a MDMA produceva una aumentata suscettibilità alle crisi epilettiche. Negli stessi animali infine sono stati effettuati studi morfologici al fine di valutare il ruolo di  $\alpha 1b$ -AR nella degenerazione neuronale. Dato che l'assenza di tale recettore protegge dal danno indotto da metanfetamina (Battaglia et al., 2003), si può ipotizzare che vi sia protezione anche dal danno indotto da MDMA e dal danno indotto dalle crisi.

Una parte dei dati presentati in questa tesi sono già stati pubblicati su riviste scientifiche nel corso degli anni del dottorato di ricerca o immediatamente precedenti. Segue un breve elenco delle principali pubblicazioni:

Giorgi FS, Ferrucci M, Lazzeri G, Pizzanelli C, Lenzi P, Alessandri MG, Murri L, Fornai F. A damage to locus coeruleus converts sporadic seizures into self-sustaining limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 2003; 17 (12): 2593-601;

Giorgi FS, Pizzanelli C, Biagioni F, Murri L, Fornai F. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28: 507-24;

Fornai F, Gesi M, Lenzi P, Ferrucci M, Lazzeri G, Pizzanelli C, Pellegrini A, Battaglia G, Ruggieri S, Paparelli A. Effects of repeated low doses of MDMA on EEG activity and fluoro-jade B histochemistry. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1025: 1-8;

Giorgi FS, Pizzanelli C, Ferrucci M, Lazzeri G, Faetti M, Giusiani M, Pontarelli F, Busceti CL, Murri L, Fornai F. Previous exposure to (+/-) 3,4 methylenedioxymethamphetamine produces long-lasting alteration in limbic brain excitability measured by electroencephalogram spectrum analysis, brain metabolism and seizure susceptibility. *Neuroscience* 2005;136: 43-53.

### *Anatomia funzionale del sistema noradrenergico in relazione all'epilessia*

L'epilessia è per definizione un fenomeno corticale, benché l'influenza di strutture sottocorticali nel modulare le crisi epilettiche sia ampiamente dimostrata (Gale, 1992). Oltre ai "classici" sistemi gabaergico e glutamatergico, a rappresentazione prevalentemente corticale, ha ricevuto particolare attenzione, soprattutto negli ultimi anni, il sistema NA.

I neuroni contenenti NA non si estendono oltre il metencefalo ed appartengono ad un gruppo consistente di neuroni catecolaminergici, che per la prima volta sono stati classificati da Dahlstroem e Fuxe negli anni '60 mediante il metodo di Falk (Dahlstroem e Fuxe, 1964 e 1965). Nel lavoro originario, gli autori descrivevano 12 gruppi cellulari nel SNC del ratto (A1-A12); i nuclei più rostrali, localizzati soprattutto nel mesencefalo, sono dopaminergici, mentre più caudalmente si estendono i nuclei NA. Il nucleo NA più rostrale corrisponde al nucleo pontino denominato LC (A6), situato nella porzione superiore del

pavimento del quarto ventricolo; esso è presente in tutte le specie di mammiferi e rappresenta la maggior fonte di NA per il SNC (Brodal, 1981; Aston-Jones e Shipley, 1995). Il LC costituisce un complesso nucleare essendo composto da vari nuclei localizzati vicini tra loro: il LC *sensu stricto*, il nucleo *sub-coeruleus* e i neuroni catecolaminergici diffusi localizzati vicino al *brachium conjunctivum* (nucleo parabrachiale). I neuroni catecolaminergici che appartengono a questo complesso nucleare presentano terminali estesamente ramificati cosicché un singolo assone NA va ad innervare l'intera corteccia cerebrale decorrendo nei due principali sistemi di fibre ascendenti: la banda dorsale e, molto più esiguo, il braccio rostrale della via periventricolare dorsale. Altre terminazioni efferenti del LC si distribuiscono caudalmente al cervelletto, al bulbo, al midollo spinale (Brodal, 1981). Il complesso nucleare del LC appare distinto da altri nuclei NA diffusi situati nella formazione reticolare bulbare ventro-laterale, nel complesso vagale dorsale e nel nucleo del tratto solitario. Questi nuclei NA diffusi formano la cosiddetta formazione NA "caudale" che è rappresentata da una rete interconnessa di neuroni i quali inviano i loro assoni ad aree target piuttosto ristrette, seguendo uno specifico pattern in cui nuclei distinti innervano regioni cerebrali discrete. Tale sistema NA caudale è soprattutto coinvolto nel regolare le funzioni autonome, partecipare al controllo delle funzioni neuroendocrine e, a differenza del LC, non gioca un ruolo significativo nell'epilessia.

E' ben intuibile invece come i terminali NA che originano dal LC, data la ricchezza delle proiezioni corticali, siano in grado di modulare svariate funzioni centrali, tra cui l'eccitabilità corticale, attraverso il rilascio di NA in numerose aree cerebrali. Pertanto tali neuroni sono coinvolti nel modulare dell'attività

elettrica cerebrale registrata mediante elettroencefalogramma (EEG, Foote et al., 1983), nel regolare il ciclo sonno-veglia (Jouvet, 1969), nel promuovere lo stato di veglia (Aston-Jones et al., 1991), nel monitorare gli stimoli ambientali con particolare enfasi agli stimoli di allerta ed all'orientamento di fronte alla novità (Aston-Jones et al., 1994). Studi dettagliati condotti da Cirelli et al. (1996 e 2000) non hanno rilevato significativi cambiamenti nell'EEG basale anche misurando l'analisi spettrale dopo lesione del LC. Gli effetti corticali prodotti dall'attività dei neuroni del LC appaiono essere più critici nel modulare l'espressione genica correlata allo stato di veglia. La stimolazione dei recettori adrenergici centrali conduce a modificazioni dello stato di vigilanza ed alla trascrizione di geni immediati precoci come *c-fos*, *nerve growth factor-induced A*, *nur 77*, *tis-7*, *zif-268* e *tis-21* in condizioni basali (Bing et al., 1991), durante stimoli stressanti (Stone et al., 1993) e specificamente durante crisi epilettiche (Simler et al., 1999).

Dato che tali geni controllano le funzioni cellulari, la loro induzione rappresenta un meccanismo attraverso cui segnali che agiscono sulle membrane cellulari mediano modificazioni biochimiche e strutturali a breve e a lungo termine nel neurone. Questo spiega la capacità della NA di modulare la plasticità sinaptica come già dimostrato *in vitro* nella "long-term potentiation" (una modificazione duratura dell'efficacia sinaptica prodotta dalla stimolazione ripetitiva del compartimento presinaptico) (Hopkins e Johnston, 1988; Neuman e Harley, 1983) e *in vivo* nei meccanismi dell'apprendimento e della memoria in cui l'innervazione NA della corteccia limbica gioca un ruolo fondamentale (Kobayashi e Yasoshima, 2001; Kobayashi e Kobayashi, 2001).

La natura diffusa di questi effetti è correlata alla vastità delle aree cerebrali che ricevono un'innervazione da parte del LC ed al pattern di rilascio della NA (Room et al., 1981). Infatti la NE, a parte il ruolo classico di neurotrasmettitore, dovrebbe essere considerata come un agente paracrino che esercita una diffusa influenza sulle aree bersaglio grazie alla sua lunga emivita nello spazio extracellulare ed alle abbondanti varicosità estese lungo il decorso assonico (“bouttons en passage” piuttosto che bottoni sinaptici terminali “bouttons terminaux”, questi ultimi tipici dei terminali assonici non monoaminergici). Gli assoni NA possono così influenzare neuroni, astrociti, microglia e vasi sanguigni e possiedono una profusa arborizzazione che consente ad un singolo neurone di innervare l'intera corteccia cerebrale (Nagai et al., 1981).

## **Metodi**

### ***Prima Sezione: NA e Stato Epilettico (SE)***

#### *Animali*

Sono stati utilizzati ratti maschi Sprague-Dawley (Harlan, Correzzana, Italia) del peso di 200-250 g. Essi ricevevano acqua e cibo *ad libitum* ed erano mantenuti in condizioni sperimentali controllate (ciclo luce/buio di 12 h; temperatura ambiente 21°C). Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le Linee Guida Nazionali per la Cura e l'Utilizzo degli Animali ed in conformità alle Linee Guida Locali.

#### *Chirurgia, disegno sperimentale e somministrazione di sostanze*

Un gruppo di animali è stato sottoposto a chirurgia stereotassica per il posizionamento di una cannula guida in corteccia piriforme anteriore, APC (coordinate stereotassiche: AP=+4 dal bregma, ML=+3.3 dalla linea mediana, DV=-6.5 dalla dura madre, in accordo con l'Atlante di Pellegrino et al., 1979). Tale area corticale è stata selezionata per la sua ricca innervazione NA e per la sua elevata sensibilità alla microinfusione focale di chemoconvulsivanti (Piredda e Gale, 1985). Durante la stessa procedura chirurgica alcuni sottogruppi di animali sono stati impiantati con elettrodi epidurali per le registrazioni EEG e/o con una fibra dialitica verticale per monitorare il rilascio di NA in condizioni basali e durante le crisi o lo SE. Tre giorni prima di eseguire le microinfusioni in APC, inoltre, un gruppo di ratti è stato sottoposto a somministrazione della neurotossina N-(-2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP-4, alla dose di 60 mg/kg, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) disciolto in 0.5 mL di salina, trattamento

che consente di ottenere una lesione selettiva delle fibre che originano dal LC, mentre le microinfusioni in APC sono iniziate 24 h dopo le procedure chirurgiche.

In un primo set di esperimenti ratti lesi con DSP-4 e non lesi sono stati sottoposti a microinfusione in APC con 118 pmol di bicucullina (RBI, Research Biomedical Incorporated, Natick, MA, USA) disciolta in 200 nL di salina ad una velocità di infusione di 100 nL/min. Tale trattamento in animali integri produce crisi limbiche sporadiche. Lo scopo dell'esperimento pertanto è stato quello di valutare se la denervazione NA producesse una modificazione del pattern di crisi noto. In un altro set di esperimenti i ratti sono stati pretrattati con microinfusioni di antagonisti glutamatergici 5 minuti prima della microinfusione di bicucullina. Le sostanze impiegate sono state: l'acido 2-amino-7-fosfonoeptanoico (AP-7; RBI, Research Biomedical Incorporated, Natick, MA, USA), antagonista selettivo NMDA, e la 1,2,3,4-tetraidro-6-nitro-2,3-diosso-benzo[f]quinoxalina-7-sulfonamide (NBQX; RBI, Research Biomedical Incorporated, Natick, MA, USA), antagonista selettivo non-NMDA. AP-7 è stato disciolto in acqua ad una concentrazione di 0.1 mg/mL e 250 nL di soluzione, corrispondenti alla dose di 100 pmol, sono stati infusi in APC ad una velocità di 100 nL/min. NBQX è stato disciolto in acqua deionizzata alla concentrazione di 0.5 mg/mL ed infuso per 4 min ad una velocità di 100 nL/min per una dose totale di 520 pmol. Tali antagonisti sono in grado di prevenire, in maniera simile, crisi epilettiche focali.

La severità delle crisi è stata valutata in accordo con i seguenti punteggi ottenuti dalla scala di Racine (1972), modificata come segue: punteggio 0.5=clono mandibolare; punteggio 1=clono della zampa anteriore controlaterale; punteggio 2=clono delle zampe anteriori della durata di 5-15 sec; punteggio 3=clono delle

zampe anteriori di durata >15 sec; punteggio 4=rearing e contemporaneo clono delle zampe anteriori; punteggio 5=rearing con perdita dell'equilibrio e contemporaneo clono delle zampe anteriori e posteriori. Infine, la definizione accettata di SE è stata quella di un'attività critica persistente senza interruzioni della durata di almeno 30 minuti.

### *Dialisi cerebrale*

Durante anestesia un sottogruppo di animali è stato sottoposto ad impianto di una fibra dialitica (diametro esterno 0.5 mm; lunghezza della membrana 3 mm; cut-off 20 000 D; CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden) verticalmente nella corteccia piriforme controlaterale a quella impiegata per le microinfusioni, come descritto dettagliatamente in precedenti lavori (Fornai et al., 2000; Fornai e Orzi, 2001). Brevemente, è stato eseguito un foro attraverso la scatola cranica per il posizionamento di una cannula guida fino a 3 mm sopra la lunghezza della fibra dialitica. Le cannule guida per la microdialisi e per le microinfusioni sono state bloccate insieme con cemento dentale. Prima di essere inserita, la fibra dialitica è stata lavata per 30 min con la soluzione usata per il dialisato: 147.2 mmol NaCl, 5 mmol KCl, 1.59 mmol CaCl<sub>2</sub> in acqua distillata. La velocità del flusso era di 3µL/min mentre gli intervalli di tempo di raccolta erano di 15 min. I campioni sono stati direttamente iniettati nel sistema HPLC per la valutazione dei livelli extracellulari di monoamine.

### *Dosaggio delle monoamine*

Il cervello degli animali destinati al dosaggio delle monoamine è stato rapidamente rimosso dopo il sacrificio; sono state prelevate le seguenti aree

cerebrali: cervelletto, corteccia frontale, ippocampo, ipotalamo, sostanza nera, corteccia olfattiva, quest'ultima comprendente sia la corteccia piriforme anteriore, APC, che la posteriore. Ciascuna area è stata omogenata tramite un sonicatore in 0.6 mL (0.2 per la sostanza nera) di acido perclorico 0.1 M contenente 10 ng/mL di 3,4-di-idrossibenzilamina (Sigma). Una aliquota di omogenato (50 µL) è stata impiegata per la determinazione del contenuto proteico secondo il metodo colorimetrico di Lowry (1951). Dopo centrifugazione dell'omogenato, 20 µL del sovrinatante sono stati iniettati in un sistema HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) per la misurazione di NA, dopamina (DA), serotonina (5HT) e loro metaboliti. Il sistema HPLC consta di una colonna a fase inversa (250 x 4.5 mm, ODS C18, SGE) e di un sistema di rilevazione coulometrico elettrochimico (modello 5012, ESA Inc.) dotato di due elettrodi di registrazione, uno ossidante, l'altro riducente. La fase mobile che è stata usata per i dosaggi consisteva in una soluzione di tampone fosfato-citrato (0.04 M di acido citrico e 0.06 M di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) contenente 0.1 mM di EDTA e 0.6 mM di sale sodico dell'acido eptansulfonico e metanolo 10%. La curva standard per ogni composto è stata calcolata impiegando una curva di regressione dei rapporti delle aree dei picchi per varie concentrazioni note di ogni composto. Tale curva di regressione è stata eseguita sia per i valori dell'elettrodo ossidante che per quelli dell'elettrodo riducente. In base ad essa sono stati stimati i livelli di neurotrasmettitore nel campione.

### *Istochimica ed immunoistochimica*

Gli animali destinati all'immunoistochimica per l'enzima dopamina- $\beta$ -idrossilasi (DBH) sono stati anestetizzati con cloralio idrato, sacrificati ed i

cervelli congelati a -80°C prima di essere sottoposti a taglio al criostato. Le fettine sono state incubate con l'anticorpo primario, anti-DBH IgG (1:1000; Sigma) per 24 h; dopo lavaggio accurato sono state incubate con l'anticorpo secondario biotinilato (Vector) e, dopo lavaggio, colorate mediante l'impiego di ABC kit (Vector) seguito da diaminobenzidina come cromogeno (Vector).

Per le valutazioni neuropatologiche i ratti sono stati perfusi per via transcardiaca con 500 mL di paraformaldeide al 4% disciolta in 0.1 M tampone fosfato preceduto da 300 mL di salina (0.9%). I cervelli sono stati estratti, mantenuti in fissativo durante la notte successiva e poi immersi in una soluzione crioprotettiva al 20% di saccarosio finché sono stati sottoposti a taglio al criostato. Fettine seriali di spessore di 20 µm sono state ottenute sul piano coronale, poste su vetrini polilisinati e processate per le varie colorazioni.

I campioni sono stati colorati con cresil violetto o Fluoro-Jade B (F-J B, gentilmente donato da Larry Schmued, NCTR, FDA Jefferson, Arkansas, USA) e DAPI (Sigma). La colorazione con F-J B è stata eseguita in accordo con il metodo originale descritto da Schmued e Hopkins (2000). Le fettine sono state passate in varie soluzioni secondo l'ordine seguente: 1% idrossido di sodio in 80% alcol (5 min), 70% alcol (2 min), acqua distillata (2 min), 0.06% permanganato di potassio (10 min). Successivamente sono state mantenute per 20 min nella soluzione F-J B + DAPI. Tale soluzione consiste di 98 mL di soluzione fresca di polvere F-J B 0.0004% in acido acetico 0.1% con aggiunta di 2 mL di soluzione stoccata di DAPI (10 mg/100 mL acqua distillata). Tale doppia colorazione consente di evidenziare sia i neuroni degenerati che si colorano con F-J che quelli ancora vitali, che si colorano con DAPI. Tali colorazioni sono state esaminate mediante

l'impiego di fluorescenza alla lunghezza d'onda di 450 e 350 nm rispettivamente; le cellule marcate con F-J emettono una tipica colorazione gialla, mentre la colorazione DAPI è blu-chiaro.

### *Analisi statistica dei dati*

Per quanto riguarda i dati biochimici sui livelli di monoamine sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA) con l'analisi di Sheffé ( $p < 0.05$ ). Nello stesso modo è stata condotta l'analisi sui campioni ottenuti dalla dialisi cerebrale.

Per quanto riguarda l'attività epilettica, sono state calcolate la durata media ( $\pm$  SEM) delle crisi, intesa come intervallo di tempo tra il primo e l'ultimo evento ictale e la percentuale media ( $\pm$  SEM) dei ratti in SE, mentre le comparazioni sono state condotte mediante ANOVA. L'incidenza delle crisi (numero delle crisi episodiche con punteggio  $>3$ ) e la severità delle crisi (punteggio massimo di crisi) sono state confrontate usando il test U di Mann-Whitney per dati appaiati non parametrici ( $p < 0.05$ ).

## ***Seconda Sezione: MDMA ed epilessia***

### *Animali*

Sono stati utilizzati topi maschi C57Black (Harlan, Correzzana, Italia) del peso di 22-24 g. Le condizioni ambientali erano le stesse descritte per gli animali nella prima sezione.

### *Regime di somministrazione di MDMA*

MDMA -HCl (gentilmente donato dal Prof. M. Giuliani, Dipartimento di Salute Pubblica, Università di Pisa) è stato disciolto in soluzione salina.

Gli animali sono stati suddivisi nei seguenti gruppi di trattamento i.p.: 1) MDMA 5 mg/kg x 2, con intervallo di 2 h tra le due somministrazioni (gruppo “MDMA 5 mg/kg x 2”); 2) MDMA 5 mg/kg x 2, con intervallo di 2 h tra le due somministrazioni per due giorni consecutivi (gruppo “MDMA 5 mg/kg x 4”); 3) MDMA 5 mg/kg x 2, con intervallo di 2 h tra le due somministrazioni per tre giorni consecutivi (gruppo “MDMA 5 mg/kg x 6”). Gli animali impiegati come controlli ricevevano salina, due iniezioni i.p. per uno, due o tre giorni consecutivi.

Come già dimostrato, la prima singola iniezione di MDMA non produceva effetti comportamentali rilevanti (Itzhak et al., 2003).

### *Valutazione EEG*

L'impianto chirurgico di due elettrodi epidurali è stato eseguito al fine di ottenere registrazioni EEG unipolari. Dopo anestesia con cloralio-idrato, i topi sono stati posizionati in un apparecchio stereotassico che ha consentito l'inserimento di elettrodi attraverso un foro della teca cranica in corrispondenza dell'osso frontale (elettrodo registrante) e occipitale (elettrodo di riferimento); si è proceduto a fissare tali elettrodi epidurali con cemento dentale e viti. Le registrazioni EEG sono state ottenute dai controlli e dagli animali sottoposti a MDMA (5 mg/kg) x2, x4, x6 utilizzando un apparecchio EEG dedicato (Vega Polygraph, E.S.A. O.T.E. Biomedica, Italia). Tali registrazioni erano eseguite su ciascun animale ad intervalli regolari (ogni 48 h) per un periodo di tempo fino a 8 settimane. Durante ogni sessione, che aveva una durata di circa 2 ore, si registrava il tracciato sia in condizioni basali che dopo prove di attivazione con stimolo olfattivo e nocicettivo. Il primo consisteva nella presentazione di un batuffolo di cotone imbevuto di timolo, il secondo consisteva nella blanda pinzatura della

coda. E' noto che entrambi gli stimoli producono nell'animale naïve una pronta desincronizzazione dell'attività EEG accompagnata da un aumentato consumo di glucosio nelle aree reclutate (Fornai et al., 2000). Il segnale EEG così raccolto è stato filtrato mediante filtro notch e filtro di frequenze passa-basso (64 Hz) e successivamente sottoposto a conversione analogico-digitale (tasso di campionamento 128 Hz) ed analisi spettrale. L'analisi spettrale dell'EEG, ottenuta mediante il calcolo della trasformata di Fourier (Cooley and Turkey, 1965) consente di separare i vari ritmi cerebrali, di stimare le loro frequenze, di quantificare l'attività EEG in una data banda di frequenze. Tale analisi spettrale è stata condotta su segmenti digitalizzati della traccia EEG della durata di 10 secondi ed i risultati ottenuti dai topi trattati con MDMA sono stati confrontati con quelli dei controlli in appropriati intervalli di frequenze.

### *Valutazione delle crisi*

Al fine di valutare i potenziali effetti del trattamento con MDMA sulla soglia epilettica e sulla severità delle crisi, i topi precedentemente trattati con MDMA sono stati trattati con acido kainico (KA, Sigma) somministrato i.p. in una singola iniezione alla dose di 5 mg/kg o 10 mg/kg, mentre un gruppo di controllo riceveva salina. Entrambe le dosi di KA sono significativamente inferiori a quelle necessarie per indurre crisi nel ceppo di topi impiegato (McKhann et al., 2003). Le crisi ottenute sono state valutate e classificate in accordo alla scala di Racine (1972), modificata come segue: punteggio 1=clono mandibolare ripetuto ed intenso; punteggio 2=clono delle zampe anteriori; punteggio 3=clono delle zampe anteriori associato a breve rearing (<5 sec); punteggio 4=clono prolungato (>10 sec) delle zampe anteriori; punteggio

5=rearing con perdita dell'equilibrio e contemporaneo clono delle zampe anteriori e posteriori.

### *Studi di attività funzionale mediante misurazione dell'utilizzo cerebrale locale di glucosio*

Visto che le modificazioni dell'attività elettrica cerebrale indotte dalla somministrazione di MDMA si sono dimostrate persistenti e durature, ci si è chiesti se si sarebbero ottenuti effetti simili anche studiando il metabolismo cerebrale nelle stesse condizioni sperimentali, cioè se somministrazioni ripetute di MDMA producessero modificazioni persistenti del metabolismo cerebrale. Inoltre, dato che l'effetto proconvulsivante dell'MDMA, slatentizzato da basse dosi di KA, è persistente, si è voluto valutare anche sul piano metabolico l'effetto di una bassa dose di KA, 5 mg/kg i.p., su una precedente esposizione a MDMA.

Sono stati dunque condotti esperimenti al fine di smascherare un correlato funzionale dell'attività cerebrale conseguente l'esposizione a ripetute dosi di MDMA, un fenomeno che potrebbe essere definito come "ipereccitabilità metabolica latente", espressione della convergenza di un approccio "elettrico" ed uno "metabolico". Per valutare dunque le modificazioni metaboliche prodotte dalla somministrazione di MDMA, è stato usato il metodo autoradiografico del [<sup>14</sup>C]2-desossi-glucosio (2-DG). Sono state indagate le modificazioni metaboliche prodotte dall'MDMA in acuto e in cronico e quelle prodotte da uno stimolo glutamatergico fasico (KA 5 mg/kg) in animali naïve o precedentemente trattati con MDMA. La captazione cerebrale di [<sup>14</sup>C]2-DG è stata dunque misurata 1) 1h dopo MDMA/salina ("modificazioni metaboliche acute"), 2) 2 settimane dopo

MDMA/salina (“modificazioni metaboliche croniche”), 3) 1 h dopo KA 5 mg/kg in topi precedentemente trattati con MDMA/salina.

Gli studi sono stati condotti in accordo con la procedura autoradiografica originariamente descritta da Sokoloff et al. (1977) con alcune modificazioni. In sintesi, un'ora dopo la somministrazione di [<sup>14</sup>C]2-DG (4.62 MBq/kg, attività specifica: 2219 MBq/mmol; Amersham, UK) i topi erano sacrificati per decapitazione, i cervelli rapidamente rimossi, congelati in isopentano a -40°C e conservati a -80°C fino al taglio. Al criostato erano ottenute fettine coronali (20 µm), mantenute a -21°C, montate su vetrini, essiccate ed infine autoradiografate su pellicole Kodak Min-R X-ray (Kodak, Rochester, NY, USA). Le pellicole erano esposte per 14 giorni e automaticamente sviluppate. Gli autoradiogrammi erano analizzati con densitometria che impiegava un sistema computerizzato di processazione delle immagini (NIH Imaging, Bethesda, MD, USA). In particolare, le misurazioni di densità ottica erano condotte a livello delle aree cerebrali più sensibili agli effetti indotti da MDMA/KA. Tali misurazioni sono state condotte nell'ippocampo dorsale e nella corteccia entorinale.

### *Dosaggio delle monoamine*

Gli animali sottoposti a trattamento con MDMA (5 mg/kg) x 2, x 4, x 6 e con salina sono stati sacrificati 2 settimane dopo la fine dei trattamenti. La successiva procedura di trattamento dei cervelli, il prelievo delle aree, le modalità tecniche del dosaggio delle monoamine sono gli stessi descritti nel paragrafo dedicato della sezione precedente.

### *Analisi statistica dei dati*

Per quanto riguarda l'EEG, la quantificazione delle differenze tra i gruppi di trattamento è stata ottenuta mediante l'analisi spettrale; in particolare, lo spettro di frequenze di ogni epoca EEG selezionata è stato suddiviso in gruppi di frequenze di intervallo di 1.5 Hz ciascuno, iniziando da 1.5 Hz (1° gruppo=1.5-3 Hz; 2° gruppo=3-4.5 Hz; 3° gruppo=4.5-6 Hz; fino a 19.5 Hz). Per ogni intervallo di frequenze è stata calcolata l'area sotto la curva, espressa come percentuale dell'area totale sotto la curva. Il confronto tra i vari gruppi di trattamento è dato dal confronto della percentuale media dell'area totale  $\pm$  SEM per ogni intervallo di frequenze, ottenuto mediante l'analisi della varianza (ANOVA) con analisi di Sheffé ( $p < 0.05$ ). Nello stesso modo è stata condotta l'analisi sull'EEG dopo stimolo olfattivo e nocicettivo.

Per quanto riguarda l'attività epilettica, sono state analizzate l'incidenza e la severità delle crisi.

Per l'analisi della captazione del [ $^{14}\text{C}$ ]2-DG, i valori sono stati espressi come media  $\pm$  SEM per ogni area ed ogni gruppo di trattamento, mentre i confronti tra differenti gruppi di trattamento sono stati ottenuti mediante l'analisi della varianza (ANOVA) con analisi di Sheffé ( $p < 0.05$ ).

I dati biochimici sui livelli di monoamine sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA) con analisi di Sheffé ( $p < 0.05$ ).

### ***Terza Sezione: NA, MDMA, $\alpha 1\text{b-AR}$***

#### *Animali*

Sono stati impiegati topi knockout per  $\alpha 1\text{b-AR}$  del peso di 22-24 g, gentilmente donati al Dipartimento da S. Cotecchia, Università di Losanna,

Svizzera. Della generazione di tali animali, descritta in dettaglio da Cavalli et al. (1997), viene di seguito riportata una sintesi della procedura. Il tipo 129/C57 BL rappresenta la comune base genetica per i topi knockout ed i loro controlli wild-type che derivano dalla stessa linea germinale di cloni microiniettati. Per ogni ceppo, topi provenienti da differenti genitori sono stati incrociati casualmente al fine di ottenere progenie wild-type o knockout e mai accoppiati con altri ceppi o con topi della stessa figliata. Dal 1997 sono stati effettuati almeno 40 incroci. Topi wild-type sono derivati dagli incroci iniziali tra eterozigoti ed allevati parallelamente con la progenie knockout.

Le condizioni ambientali e di trattamento erano le stesse descritte per gli animali nelle sezioni precedenti.

### *Valutazione del ruolo dell' $\alpha 1b$ -AR in epilessia*

Animali wild-type e knockout sono stati trattati con dosi convulsivanti di KA (Sigma) e pilocarpina (PIL, Sigma) in dose singola o doppia i.p. La dose di KA era di 35 mg/kg; nei soli knockout raddoppiata a 70 mg/kg. La dose iniziale di PIL era 200 mg/kg raddoppiata a 400 mg/kg sia nei knockout che nei wild-type. Trenta minuti prima del trattamento con PIL gli animali ricevevano metilscopolamina allo scopo di contrastare l'azione colinergica periferica della PIL. Un gruppo di animali sono stati sottoposti a impianto di elettrodi come descritto nel paragrafo dedicato nella seconda sezione al fine di registrare l'attività elettrica cerebrale in condizioni basali e dopo gli stimoli convulsivanti.

Le crisi limbiche ottenute dalla somministrazione di KA e PIL sono state valutate e classificate in accordo alla scala di Racine (1972), modificata come nella sezione precedente e di seguito nuovamente riportata: punteggio 1=clono

mandibolare ripetuto ed intenso; punteggio 2=clono delle zampe anteriori; punteggio 3=clono delle zampe anteriori associato a breve rearing (<5 sec); punteggio 4=clono prolungato (>10 sec) delle zampe anteriori; punteggio 5=rearing con perdita dell'equilibrio e contemporaneo clono delle zampe anteriori e posteriori.

### *Valutazione del ruolo dell' $\alpha 1b$ -AR nella sensitizzazione comportamentale da MDMA e conseguente suscettibilità alle crisi*

Questa sessione parallela ha lo scopo di indagare il possibile ruolo dell' $\alpha 1b$ -AR nell'ipereccitabilità latente e nell'aumentata suscettibilità alle crisi epilettiche osservate in seguito ad esposizione cronica a MDMA. L'interesse per tale sottotipo recettoriale nasce da recenti studi che hanno dimostrato un ruolo critico dell' $\alpha 1b$ -AR nell'epilessia (Kunieda et., 2002) e nella sensitizzazione comportamentale indotta dalle sostanze d'abuso (Drouin et al., 2002). A ciò si aggiunge la dimostrazione che l'esposizione a MDMA determina lo sviluppo di crisi come parte di un'ipereccitabilità cerebrale latente e persistente (Giorgi et al., 2005).

Animali wild-type e knockout sono stati trattati con ripetute somministrazioni di MDMA. In studi pilota è stato identificato un regime di sensitizzazione dell'MDMA in wild-type selezionando la dose di MDMA non in grado di determinare evidenti effetti comportamentali dopo una singola somministrazione (Itzhak et al., 2003). Al fine di evitare l'accumulo di metaboliti attivi a lunga emivita, è stato scelto un regime di sensitizzazione che prevedeva la presenza di periodi di wash-out. In particolare, gli animali ricevevano giornalmente iniezioni i.p. di MDMA 2.5 mg/kg per 5 giorni consecutivi seguiti

da 5 giorni liberi da trattamento; lo schema è stato ripetuto per 5 volte per un totale di 25 iniezioni.

### *Valutazione delle modificazioni comportamentali durante esposizione a MDMA*

Dopo ogni singola iniezione gli animali erano monitorati per due ore al fine di valutare le eventuali modificazioni comportamentali prodotte in seguito alle ripetute iniezioni. Inoltre, nel tentativo di evidenziare gli effetti della progressiva sensitizzazione rispetto al comportamento basale, l'osservazione aveva inizio un'ora prima di ogni singola iniezione di MDMA/soluzione salina. Di ogni animale si sono valutati l'attività motoria sia in *open field* che misurando la frequenza del *rearing*. Quest'ultimo consiste nel sollevamento dell'animale sulle zampe posteriori ed è un comportamento virtualmente presente anche in condizioni basali, ma che risulta accentuato dagli stimoli ambientali nuovi e dalla somministrazione di sostanze psicostimolanti.

Per consentire all'animale di adattarsi all'ambiente nuovo prima della valutazione comportamentale i topi erano posizionati per 15 minuti in un box di *open field*, costituito da una scatola trasparente di 80 x 80 cm ed un'altezza di 15 cm, la cui base era suddivisa in quadrati di 10 x 10 cm. L'attività motoria in *open field* era misurata come il numero di quadrati attraversati nell'unità di tempo (2 minuti) ed il numero di *rearing* veniva contato nello stesso intervallo di tempo. Alla fine delle misurazioni i topi erano collocati in gabbie separate.

## *Valutazione della suscettibilità alle crisi dopo esposizione a MDMA negli animali wild-type e knockout*

Si è valutato poi se la precedente esposizione a MDMA fosse in grado di produrre modificazioni nella suscettibilità alle crisi negli animali knockout; è noto infatti che gli animali wild-type sviluppano un'aumentata e persistente ipereccitabilità limbica dopo esposizione a MDMA (vedi sezione precedente). Un mese dopo l'ultima somministrazione di MDMA gli animali wild-type e knockout sono stati trattati con KA i.p. alla dose di 10 mg/kg, significativamente inferiore a quella necessaria per indurre crisi. La valutazione della severità delle crisi è stata condotta in accordo alla scala di Racine (1972) modificata, come già riportato.

## *Studi morfologici*

Al fine di valutare le conseguenze neuropatologiche della somministrazione dei chemoconvulsivanti KA e PIL sono stati compiuti studi morfologici sui cervelli degli animali sottoposti ai vari trattamenti mediante colorazioni con cresil violetto e F-J B, realizzate secondo modalità già descritte nelle sezioni precedenti.

## *Analisi statistica*

Il conteggio della attività locomotoria e del *rearing*, espresso come media  $\pm$  SEM, è stato confrontato tra i gruppi di trattamento mediante ANOVA con analisi di Sheffè ( $p < 0.05$ ). La valutazione dell'incidenza e della severità delle crisi e i dati biochimici sono stati analizzati come descritto nelle sezioni precedenti.

## **Risultati**

### ***Prima Sezione: NA e Stato Epilettico (SE)***

#### *Effetti del DSP-4 sui neuroni NA del LC*

Negli animali di controllo il nucleo del LC appare ben visualizzato nella porzione dorsale del ponte dall'immunostaining per DBH (Fig 1a). Benché la neurotossina DSP-4 agisca selettivamente sui terminali assonici, si osserva una marcata riduzione della positività per DBH a livello del nucleo del LC (Fig. 1b); tale fenomeno dipende probabilmente dalla perdita dei collaterali ricorrenti degli assoni che decorrono nel nucleo stesso e non dalla degenerazione dei corpi cellulari, che non si osserva nei tre giorni successivi alla somministrazione di DSP-4. Invece ad intervalli di tempo più tardivi (6 settimane) è possibile evidenziare degenerazione anche a livello dei corpi cellulari, come mostrato dalla colorazione con F-J B in Fig. 1c. Quanto osservato è in accordo con l'ipotesi di un effetto ritardato del DSP-4 sui corpi cellulari di neuroni NA formulata da Fritschy e Grzanna (1991).

Come atteso, non si sono rilevati fenomeni degenerativi a carico dei nuclei NA/5HT della porzione inferiore del tronco dell'encefalo, confermando pertanto la selettività della neurotossina DSP-4 verso i neuroni del LC.

Una densa positività per DBH si è osservata a livello della corteccia piriforme dei controlli (Fig. 1d), mentre tale marcatura diviene molto scarsa tre giorni dopo trattamento con DSP-4 (Fig. 1e). A tale effetto dovuto alla perdita dei terminali assonici NA, corrisponde una marcata riduzione dei livelli di NA nella corteccia olfattiva degli animali trattati con DSP-4 ( $2.59 \pm 0.69$  ng/mg proteine) rispetto ai controlli ( $9.76 \pm 0.22$  ng/mg proteine). Il trattamento con la

neurotossina determina infatti una riduzione dei livelli di NA in svariate aree cerebrali secondo un pattern strettamente correlato con l'innervazione NA che origina dal LC (Fig.1f). In particolare una significativa deplezione NA si verifica a livello della corteccia frontale ( $0.46 \pm 0.03$  ng/mg di proteine rispetto a  $1.71 \pm 0.2$  ng/mg di proteine nei controlli), dell'ippocampo ( $1.12 \pm 0.06$  ng/mg di proteine rispetto a  $3.67 \pm 0.23$  ng/mg di proteine nei controlli) e del cervelletto ( $1.01 \pm 0.2$  ng/mg di proteine rispetto a  $3.27 \pm 0.14$  ng/mg di proteine nei controlli). Una riduzione intermedia si verifica a livello della sostanza nera ( $1.98 \pm 0.1$  ng/mg di proteine rispetto a  $4.37 \pm 0.25$  ng/mg di proteine nei controlli) (Fig. 1f). I livelli di DA e 5HT invece non risultano modificati dal trattamento, confermando ulteriormente la selettività NA della lesione ottenuta.

#### *Effetti del DSP-4 sul rilascio di NA in corteccia piriforme in condizioni basali e dopo crisi*

Immediatamente dopo la microinfusione di bicucullina (118 pmol) nei ratti di controllo si osserva un significativo incremento nel rilascio di NA (circa 5 volte rispetto al basale) nella corteccia piriforme controlaterale alla microinfusione (Fig. 2a). A fronte di una breve durata delle crisi indotte focalmente dalla bicucullina (Fig.2b), il rilascio di NA continua ad essere significativamente più elevato fino a 90 min dopo la microinfusione (Fig. 2a). Negli animali pretrattati con DSP-4 si osserva, oltre ad una significativa riduzione dei livelli basali di NA, anche una marcata differenza rispetto ai controlli durante l'attività epilettica. Infatti, mentre gli animali trattati con DSP-4 vanno incontro ad uno SE duraturo (Fig.2b), la quantità e la durata dell'incremento del rilascio di NA rimane marcatamente soppresso (Fig. 2a).

### *Effetti del DSP-4 sulle crisi limbiche indotte da bicucullina in APC*

L'infusione di bicucullina (118 pmol) in ratti di controllo ha indotto crisi limbiche sporadiche che hanno inizio poco dopo la fine dell'infusione. Tali crisi sono state di breve durata (nessuna superiore a 5 minuti) e la loro durata media è stata di  $36 \pm 4.61$  minuti dopo l'inizio della microinfusione. Nei ratti con lesione del LC la durata di crisi è stata molto più lunga ( $123.5 \pm 26.4$  min,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2b); una elevata percentuale di questi animali inoltre ha presentato uno SE, cioè un'attività epilettica continua di durata maggiore di 30 minuti (v. paragrafo successivo).

### *Effetti di AP-7 e NBQX sulle crisi limbiche indotte da bicucullina in APC*

Nei ratti di controllo la microinfusione degli antagonisti glutamatergici AP-7 e NBQX in APC, effettuata 5 minuti prima della bicucullina, ha prodotto una uguale soppressione della severità delle crisi da parte di entrambi i composti (Fig. 3a). Diversi sono gli effetti dopo lesione del LC: infatti mentre NBQX è ancora in grado di sopprimere le crisi, AP-7 non è più in grado di attenuarle. Lo stesso effetto si osserva per quanto concerne la severità delle crisi.

La stessa modificazione di sensibilità agli antagonisti glutamatergici si estende allo SE: mentre AP-7 non è efficace nel prevenire lo SE, NBQX ne previene pienamente l'insorgenza (Fig. 3b).

### *Neuropatologia dello SE focalmente indotto in animali con lesione NA*

Non si è osservata alcuna perdita cellulare dopo crisi sporadiche in animali con sistema NA integro (bicucullina in animali integri). Come atteso, non si sono

rilevate alterazioni patologiche in nessuna area cerebrale (a parte il LC) nei ratti trattati con solo DSP-4 o con DSP-4 e microinfusione di salina in APC. Al contrario, gli animali pretrattati con DSP-4 hanno mostrato marcate alterazioni nelle regioni limbiche dopo SE (Fig. 4 e 5). Un danno marcato è evidente a livello del Corno di Ammone a carico del CA3 e dell'ilo con risparmio relativo del giro dentato (Fig.5).

## ***Seconda Sezione: MDMA ed epilessia***

### ***EEG***

Negli animali esposti a MDMA si osserva la comparsa di anomalie EEG presenti sia in condizioni basali che dopo le prove di attivazione con stimolo olfattivo e nocicettivo e persistenti per l'intera durata del periodo di osservazione sperimentale (8 settimane). Tali anomalie sono costituite da un marcato rallentamento delle frequenze EEG e le caratteristiche del tracciato degli animali esposti a MDMA sono diverse rispetto a quelle dei controlli anche alla semplice analisi ispettiva (Fig 6a). Quantificando poi le frequenze EEG con l'analisi spettrale, si osserva un'attività mista con un profilo smusso nell'intervallo tra 1.5 e 10 Hz nei controlli; al contrario negli animali trattati con MDMA si è rilevata una distribuzione molto ristretta delle frequenze con un picco nell'intervallo 3-4.5 Hz (Fig. 6b). In particolare, questo è evidente negli animali trattati con MDMA 5 mg/kg x 6 e MDMA 5 mg/kg x 4, in cui il  $53 \pm 1.7\%$  e  $51 \pm 1.4\%$  della densità di potenza rispettivamente è distribuita nell'intervallo di frequenze tra 3 e 4.5 Hz. Tali valori differiscono significativamente da quelli ottenuti nei controlli ( $32 \pm 1.1\%$ ,  $p < 0.05$ ). Al contrario, i topi pretrattati con MDMA 5 mg/kg x 2 non si differenziano significativamente dai controlli.

Per quanto riguarda le prove di attivazione, la stimolazione olfattiva ha prodotto, come atteso, una desincronizzazione del tracciato EEG tipo reazione di Berger nei controlli, mentre la reazione risulta molto attenuata negli animali trattati con MDMA 5 mg/kg x 4 e MDMA 5 mg/kg x 6 (Fig.7a). L'analisi spettrale conferma nei controlli l'induzione di un picco di alte frequenze in seguito a stimolazione olfattiva, fenomeno che risulta assai attenuato negli animali pre-trattati con MDMA (Fig. 7b). In effetti, quantificando la densità spettrale delle varie frequenze dopo stimolo olfattivo, si osserva una differenza significativa nella densità di potenza nell'intervallo di frequenze tra 9 e 10.5 Hz negli animali trattati con MDMA 5 mg/kg x 4 e MDMA 5 mg/kg x 6 ( $13.1 \pm 0.6\%$  e  $13.7 \pm 0.6\%$ , rispettivamente) rispetto ai controlli ( $6.0 \pm 0.8\%$ ;  $p < 0.05$ ).

Al contrario, la stimolazione nocicettiva produce una desincronizzazione sovrapponibile negli animali trattati con MDMA e nei controlli (Fig. 8).

### *Attività epilettica*

Nessun animale esposto a sola MDMA ha presentato crisi spontanee durante le 8 settimane di osservazione. Tutti gli animali hanno invece presentato crisi dopo somministrazione di basse dosi di KA (5 e 10 mg/kg i.p.).

In particolare, per KA 5 mg/kg i.p. sono stati ottenuti i seguenti risultati: per quanto riguarda l'incidenza di crisi, tutti gli animali pre-trattati con MDMA 5 mg/kg x 4 e MDMA 5 mg/kg x 6 hanno avuto crisi, mentre nessuno degli animali pre-trattati con MDMA 5 mg/kg x 2 ne ha avute (Fig. 9a); per quanto riguarda la severità, tutti gli animali trattati con MDMA 5 mg/kg x 4 hanno presentato crisi limbiche limitate al clono mandibolare (punteggio 1), mentre degli animali trattati

con MDMA 5 mg/kg x 6 il 75% ha presentato clono mandibolare ed il 25% clono delle zampe anteriori (Fig. 9b).

Per KA 10 mg/kg i.p. sono stati ottenuti i seguenti risultati: per quanto riguarda l'incidenza di crisi, tutti gli animali pre-trattati con MDMA 5 mg/kg x 4 e MDMA 5 mg/kg x 6 ed il 33% dei topi pre-trattati con MDMA 5 mg/kg x 2 hanno avuto crisi (Fig. 9a); per quanto riguarda la severità, tutti gli animali trattati con MDMA 5 mg/kg x 4 hanno presentato crisi limbiche con clono delle zampe anteriori, mentre gli animali trattati con MDMA 5 mg/kg x 6 hanno mostrato clono delle zampe anteriori associato a breve *rearing* (punteggio 3) e topi pre-trattati con MDMA 5 mg/kg x 2 hanno presentato clono mandibolare ed occasionalmente breve clono delle zampe anteriori (Fig. 9b).

### *Topografia del metabolismo cerebrale*

La captazione cerebrale di [<sup>14</sup>C]2-DG misurata 1h dopo MDMA 5 mg/kg x 2 i.p. (corrispondente alle “modificazioni metaboliche acute”) è risultata aumentata rispetto al trattamento con salina nei gangli della base ed in misura più consistente in specifiche regioni limbiche, comprese la corteccia entorinale e l'ippocampo. Le misurazioni effettuate 2 settimane dopo MDMA 5 mg/kg x 2 i.p. (“modificazioni metaboliche croniche”) hanno mostrato un ritorno dei valori di captazione del [<sup>14</sup>C]2-DG su livelli sovrapponibili a quelli dei controlli iniettati con salina. Il challenge con KA 5 mg/kg 2 settimane dopo il trattamento con MDMA ha mostrato una importante attivazione della corteccia entorinale e dell'ippocampo rispetto ai controlli iniettati con salina; tale attivazione metabolica acuta nell'ippocampo e nella corteccia entorinale dopo KA era significativamente

maggiore nei topi che avevano ricevuto MDMA 2 settimane prima piuttosto che nei topi di controllo che avevano ricevuto salina (Fig.10).

### *Dosaggio delle monoamine*

La dose più alta di MDMA (5 mg/kg x 6) ha indotto una significativa deplezione di DA in tutte le aree esaminate eccetto l'ipotalamo. A livello di ippocampo, corteccia olfattiva e striato è stata osservata una riduzione significativa anche per la dose intermedia di MDMA (5 mg/kg x 4); al contrario tale dose intermedia non ha indotto una significativa riduzione di 5HT in nessuna delle aree esaminate. Una significativa riduzione della 5HT è stata osservata solo per la dose più alta di MDMA e limitatamente all'ippocampo ed allo striato (Tab. 1).

### ***Terza Sezione: NA, MDMA, $\alpha 1b$ -AR***

#### *Attività epilettica*

KA induce classicamente crisi limbiche caratterizzate nel topo da movimenti faciali e clono delle zampe anteriori che progrediscono rapidamente a *rearing* ripetuto e caduta fino, occasionalmente, alla comparsa di un'alternarsi di *rearing* e cadute.

Come atteso, nei 15 minuti successivi alla somministrazione di KA 35 mg/kg, tutti i topi wild-type hanno presentato crisi limbiche limitate al punteggio 1. Nei successivi 30 minuti il 35% degli animali ha presentato una progressione delle crisi: nel 10% è stato raggiunto il punteggio 2, mentre nel restante 25% si è avuta progressione ai punteggi 4-5 seguiti da morte dell'animale (Tab.2a).

Al contrario, nessuno dei knockout esposti alla dose di KA 35 mg/kg ha presentato crisi. Per i soli knockout si è proceduto quindi a raddoppiare la dose di KA a 70 mg/kg, che rappresenta una dose letale per il ceppo murino impiegato (Mekhann et al., 2003). Si è osservata la comparsa di crisi nel 70% degli animali; tali crisi si sono limitate ad un punteggio 1 nel 40%, sono progredite ad un punteggio 2 nel 25%, mentre solo una percentuale del 5% dei knockout ha avuto una progressione ulteriore a crisi di alto grado con *rearing*, perdita dell'equilibrio e clono delle zampe anteriori e posteriori fino ad un punteggio di 5 (Tab. 2a). Una dose di KA che risulta letale nell'animale wild-type determina pertanto crisi di basso grado nell'animale knockout e solo occasionalmente crisi di grado elevato. Al fine di documentare l'attività epilettica, sono state eseguite registrazioni EEG che hanno consentito di registrare crisi sia nel wild-type che nel knockout (Fig. 11).

Anche PIL determina classicamente crisi limbiche nel topo caratterizzate all'esordio da arresto motorio, movimenti faciali tipo automatismi masticatori con salivazione, clono delle zampe anteriori, *rearing* e caduta con clono delle 4 zampe; per le dosi più elevate la progressione attraverso le varie fasi della crisi limbica è rapida. La dose di 200 mg/kg ha prodotto crisi nel 30% degli animali wild-type di basso grado, limitate cioè all'arresto motorio ed agli automatismi masticatori, punteggio 1. Nessuna crisi è stata osservata negli animali knockout. La dose di 400 mg/kg ha prodotto crisi nella totalità degli animali wild-type, risultando letale per il 70% di essi che hanno presentato crisi tonico-cloniche prolungate; la stessa dose di PIL ha prodotto crisi nel 60% dei knockout, che si sono per lo più limitate

ai basso gradi di severità e solo occasionalmente, nel 5% dei casi, sono progredite fino ad un punteggio di 5 (Tab 2b).

### *Modificazioni comportamentali durante esposizione a MDMA*

Come atteso, la somministrazione della dose test di 2.5 mg/kg MDMA non ha prodotto modificazioni comportamentali rilevanti. Invece le iniezioni ripetute hanno condotto ad un progressivo incremento dell'attività locomotoria e del *rearing* negli animali wild-type. Al contrario, per tutta la durata del trattamento non si osservavano modificazioni comportamentali significative nei knockout che risultavano non distinguibili dai controlli trattati con salina (Fig.12).

Nel tentativo di distinguere nei topi wild-type le modificazioni comportamentali croniche da quelle acutamente indotte dal trattamento con le singole dosi di MDMA ripetute nel tempo, le misurazioni comportamentali sono state condotte prima e dopo ogni singola iniezione ed analizzate distintamente. Il comportamento osservato prima dell'iniezione rappresenta la modificazione comportamentale cronica, mentre quello osservato subito dopo rappresenta una modificazione indotta acutamente dalla singola dose che avviene su un substrato comportamentale cronicamente modificato. Tale procedura ha consentito di valutare la comparsa di alterazioni di specifici parametri comportamentali che possono essere considerati come aspetti comportamentali permanenti ed indipendenti dalla presenza di MDMA. Come mostrato in Fig. 12 dopo ripetute iniezioni di MDMA 2.5 mg/kg l'attività locomotoria progressivamente aumenta, divenendo significativa alla 10° iniezione e raggiungendo il massimo alla 15° iniezione per rimanere stazionaria successivamente. L'incremento dell'attività locomotoria che si ottiene acutamente dopo MDMA appare significativo già a

partire dalla 5° iniezione e continua ad aumentare durante l'intero periodo di trattamento. Dopo poche iniezioni di MDMA il *rearing*, virtualmente assente nei controlli, diviene un segno comportamentale distintivo dei topi trattati con MDMA sia in condizioni basali che dopo MDMA. Il *rearing* continua a crescere dopo ogni iniezione di MDMA fino alla fine del trattamento quando risulta significativamente più elevato che nei controlli ( $p < 0.05$ ). Per tutta la durata del trattamento il comportamento dei knockout non differisce da quello dei controlli trattati con salina (Fig. 12).

#### *Valutazione della suscettibilità alle crisi dopo esposizione a MDMA negli animali wild-type e knockout*

Un mese dopo l'ultima somministrazione di MDMA gli animali wild-type e knockout sono stati trattati con KA i.p. alla dose di 10 mg/kg, significativamente inferiore a quella necessaria per indurre crisi. E' noto che una precedente esposizione a MDMA aumenta la suscettibilità alle crisi epilettiche (Giorgi et al., 2005). Come atteso, la totalità degli animali wild-type sottoposti a MDMA hanno avuto crisi limbiche dopo KA; in particolare il 40% di essi hanno avuto clono delle zampe anteriori associato a breve *rearing* (punteggio 3), il 25% ha raggiunto un punteggio di 5 con crisi caratterizzate da *rearing* e perdita dell'equilibrio e contemporaneo clono delle zampe anteriori e posteriori; il restante 35% ha presentato crisi di basso grado con punteggio 1-2 (Tab. 2c). Degli animali knockout precedente esposti a MDMA nessuno ha presentato crisi (Tab. 2c).

### *Studi morfologici*

In nessun animale, wild-type o knockout, che ha presentato crisi sporadiche e di basso grado si sono osservate significative alterazioni neuropatologiche.

Allo scopo di valutare la diversa suscettibilità al danno neuronale dipendente dalla espressione del recettore adrenergico  $\alpha 1b$ , sono stati paragonati i cervelli di topi wild-type e knockout che hanno avuto la stessa severità e durata di crisi. Si sono paragonati pertanto gli effetti neuropatologici conseguenti a crisi prolungate con punteggi di 4-5 nei wild-type e knockout. Come suddetto, solo le dosi più alte di KA e PIL hanno determinato una severità elevata di crisi ed un'attività epilettica protratta per oltre due ore. Tale attività epilettica si è associata ad un danno neuronale nell'ippocampo e nelle aree paraippocampali dei wild-type. In netto contrasto, nei knockout non si osservava mai un danno in queste aree, neppure per dosi doppie di chemoconvulsivante e negli animali che raggiungevano una severità di crisi pari a 5 e che avevano crisi che si protraevano oltre le tre ore.

Questi studi morfologici dimostrano quindi che gli animali knockout, già resistenti alle crisi ed alla sensitizzazione da MDMA, sono anche resistenti al danno neuronale che ci si aspetta per dosi di tossine chemoconvulsivanti molto elevate (letali nei wild-type e che producono crisi molto gravi e prolungate nei knockout). (Fig.13 e 14).

## **Discussione**

### *Considerazioni generali*

Il presente lavoro esamina il ruolo della NA nell'epilessia, ripercorrendo inizialmente la letteratura dai primi studi che utilizzavano il modello del kindling in ratti lesi nel sistema NA fino alle acquisizioni più recenti ottenute mediante la manipolazione genica e la creazione di modelli animali iperesprimenti o, in alternativa, non esprimenti specifici geni per il sistema NA. Questi ultimi rappresentano modelli preziosi per definire il ruolo di specifiche molecole del sistema NA nel modulare le crisi, superando le incertezze e le discordanze che derivavano dall'approccio farmacologico. Il limite di quest'ultimo dipende in buona parte dal fatto che i composti agonisti o antagonisti di uno specifico recettore adrenergico sono impiegati a varie concentrazioni e dall'impiego di elevate concentrazioni può derivare la perdita della selettività del composto stesso. Nel caso specifico dell' $\alpha 1b$ -AR l'approccio farmacologico non è neppure possibile, dato che non esistono agonisti/antagonisti selettivi per tale sottotipo recettoriale; pertanto la manipolazione genica con silenziamento o iperespressione del recettore  $\alpha 1b$  rappresenta l'unico approccio sperimentale per comprenderne il ruolo nell'epilessia.

I dati presentati nella prima sezione confermano e reinterpretano il ruolo della NA nell'attenuare le crisi epilettiche. Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando un modello di epilessia basato sulla microinfusione di chemoconvulsivanti in una specifica area del sistema limbico, la corteccia piriforme anteriore (APC), definita da chi ne ha scoperto l'elevata sensibilità ai chemoconvulsivanti, Area Tempestas, proprio per il fatto che la microinfusione di

chemoconvulsivanti a dosi picomolari in tale area determina crisi o stato epilettico (Piredda e Gale, 1985). Si è dimostrato che la lesione del LC converte le crisi limbiche sporadiche evocate dall'APC in uno SE autosostenentesi. Il significato del fenomeno va ben oltre il semplice effetto antiepilettico della NA, dimostrando una influenza potente esercitata dalla perdita di NA nel sostenere uno SE limbico. Infatti, mentre gli animali che ricevevano microinfusioni con bicucullina 118 pmol presentavano solo crisi sporadiche, il danno del LC produceva uno SE limbico anche della durata di molte ore. Benché moltissimi altri studi basati su diversi modelli sperimentali di epilessia abbiano ben dimostrato l'effetto antiepilettico della NA (Corcoran et al., 1980; McIntyre, 1981; McIntyre e Wong, 1986; Browning et al., 1989), nessuno ha mai indagato il suo ruolo nello SE.

La seconda sezione di questo lavoro trova le sue basi nell'interesse che il nostro gruppo ha sviluppato per le sostanze d'abuso in rapporto all'epilessia. Tale sezione, definendo l'elevato potenziale epilettogeno dell'Ecstasy ed i suoi effetti sull'EEG, si discosta solo apparentemente dal tema della NA nell'epilessia. Infatti l'ultima sezione del lavoro, che richiama storicamente la prima, ma si pone in stretto rapporto con la seconda, indaga i meccanismi dei fenomeni osservati nella seconda sezione, cioè attraverso quali meccanismi l'MDMA esercita il suo potenziale epilettogeno. Un ruolo fondamentale nel sostenere gli effetti dell'Ecstasy è svolto dalla NA ed in particolare dal sottotipo recettoriale adrenergico  $\alpha 1b$ , la cui assenza produce protezione dalle crisi e dagli effetti comportamentali e neuropatologici dell'Ecstasy.

### *Perché una crisi non finisce?*

Per quanto riguarda lo SE, un aspetto interessante sollevato da questi esperimenti riguarda il fenomeno della conversione di una crisi epilettica singola in uno SE persistente; vale a dire, perché e dove una crisi trova i meccanismi per non cessare, trasformandosi in uno SE. Tale questione presenta indubbiamente anche una rilevanza clinica perché una maggiore comprensione del fenomeno potrebbe comportare la disponibilità di strategie per controllare, per esempio, SE refrattari. Nel nostro esperimento, le crisi venivano soppresse in ratti con LC non leso sia da antagonisti NMDA che non-NMDA con efficacia comparabile, mentre nei ratti con LC leso si osservava una perdita della sensibilità al blocco NMDA. Infatti la pre-infusione dell'antagonista NMDA, AP-7, in ratti lesi non attenuava le crisi limbiche né preveniva lo SE. Al contrario, l'antagonista non-NMDA, NBQX, manteneva la sua efficacia farmacologica sia nel prevenire le crisi sporadiche che lo SE. E' probabile che l'area cerebrale responsabile della conversione di una singola crisi in uno SE nel modello animale con lesione del LC sia rappresentata dalla corteccia olfattiva, dato che lo switch di sensibilità agli antagonisti NMDA ha luogo proprio nella sua porzione anteriore, l'APC. Nello stesso senso sono da interpretare i dati relativi alla somministrazione di bloccanti selettivi la desensitizzazione AMPA (ciclotiazide e aniracetam) (Fornai et al., 2000) che, infusi focalmente in APC, producono effetti comparabili alla denervazione NA descritta nel presente lavoro. Questo può sottendere la perdita di sensibilità al blocco NMDA che si osserva nei ratti con LC leso. E' probabile che ciò sia dovuto ad un'aumentata efficacia dei recettori AMPA visto che una simile resistenza al blocco NMDA è stata ottenuta prevenendo la desensitizzazione

AMPA con l'iniezione focale di ciclotiazide o aniracetam (Fornai et al, 2000). Numerosi studi precedenti hanno dimostrato che la NA attenua le crisi epilettiche in vari modelli sperimentali. Per esempio crisi indotte da pentilentetrazolo ed elettroshock massimale risultano facilitate dalla deplezione di NE endogena ottenuta mediante 6-idrossidopamina (Mason e Corcoran, 1978 e 1979) o DSP-4 (Mishra et al., 1994). Allo stesso modo, i ratti GEPR-3 e 9 che mostrano un'aumentata suscettibilità all'epilessia presentano una riduzione dell'innervazione NA documentata da bassi livelli di NA, ridotti siti di captazione e ridotti livelli di DBH in varie regioni cerebrali (Dayley e Jobe, 1986; Browning et al., 1989).

Mentre quegli studi hanno mostrato che la NA possiede un effetto anticonvulsivante, nessuno ha indagato il ruolo della NA specificamente nello SE. I presenti dati indicano per la prima volta che l'attività epilettica evocata dall'APC in ratti lesi nel LC è trasformata da sporadica in continua. Questa potente influenza della perdita di NA nella corteccia olfattiva potrebbe essere correlata alla specificità di quest'area che contiene una ricca innervazione NA che potrebbe sostituire l'innervazione talamica (Fallon e Moore, 1978; Foote et al., 1983); il contenuto NA nella corteccia piriforme è infatti quattro volte più elevato di quello misurato nella corteccia frontale.

### *Rilascio di NA e degenerazione neuronale in corso di crisi e SE*

E' noto che un significativo decremento nel rilascio di NA nei siti target con innervazione NA può essere ottenuto solo dopo massiva lesione dei terminali probabilmente a causa di un aumento compensatorio della sintesi di NA e del firing neuronale dei terminali assonici risparmiati. Questo è in linea con i nostri

esperimenti condotti utilizzando la dialisi cerebrale nella corteccia piriforme di ratti lesi con DSP-4. In particolare si è osservato che anche durante una stimolazione massiva come si verifica in corso di SE, i ratti lesi con DSP-4 non erano più capaci di produrre un rilascio sostenuto di NA rispetto ai controlli.

Il pattern di degenerazione neuronale osservato nel sistema limbico di animali pretrattati con DSP-4 tendenzialmente corrisponde a quello che osserviamo in altri modelli di crisi limbiche prolungate, come quelle indotte da somministrazione sistemica di KA (Ben-Ari et al., 1981) o PIL (Turski et al., 1983). Comunque i presenti risultati offrono un modello di crisi prolungate in cui la morte cellulare è improbabile che dipenda dalla diffusione di chemoconvulsivante. Comparato con altri modelli, lo SE indotto localmente dall'APC diffonde lungo le naturali vie anatomiche che connettono questa area cerebrale con aree distanti. Pertanto il danno cerebrale indotto in questo modello deriva molto probabilmente dalla persistente attivazione sinaptica dei neuroni coinvolti nella circuiteria epilettica.

### *Ecstasy ed EEG*

Nella seconda sezione del lavoro si è dimostrato che l'esposizione a MDMA produce nel topo modificazioni EEG persistenti ed una ipereccitabilità cerebrale latente, come mostrato dalle modificazioni persistenti nel tracciato EEG basale e dopo le prove di attivazione, dalla facilitazione delle crisi e dall'iperattività metabolica latente. Questi effetti sono concomitanti con la deplezione monoaminergica osservata a livello delle aree limbiche e dei nuclei della base. Tuttavia, mentre non si verifica deplezione monoaminergica dopo trattamento con le dosi più basse di MDMA (5 mg/kg x 2), l'ipereccitabilità

latente persiste imm modificata nel tempo per le stesse dosi. Tale effetto cronico, visualizzato mediante autoradiografia con 2DG, riproduce l'anatomia e amplifica l'intensità delle alterazioni metaboliche fasiche misurate subito dopo somministrazione di MDMA. I dati del presente studio trovano significato nelle conseguenze a lungo termine dell'abuso di MDMA e rivelano la presenza di un'ipereccitabilità latente indotta da MDMA in specifiche aree cerebrali fornendo un approccio allo studio di crisi limbiche e SE nei topi C57Black. In uno studio pilota il nostro gruppo aveva dimostrato nel topo la comparsa di un rallentamento delle frequenze EEG dopo un regime di ripetute dosi molto basse di MDMA (Fornai et al., 2004). Nel presente studio si conferma che l'MDMA produce un rallentamento dell'attività EEG e che tale effetto richiede solo poche esposizioni (1-3 giorni di somministrazioni di MDMA)escludendo pertanto il bias dovuto all'accumulo di metaboliti attivi dell'MDMA, come accade dopo basse dosi cumulative (de la Torre e Farre, 2004). Inoltre, nel presente studio, l'analisi spettrale rafforza l'osservazione del rallentamento, mostrando una distribuzione di frequenze ristretta in un intervallo tra 3 e 4.5 Hz con un picco intorno a 4-4.5 Hz. Tali anomalie non sono mai scomparse nel corso dell'intero periodo di osservazione (fino a 8 settimane) e, globalmente, tale anomalie osservate nell'animale trovano un corrispettivo nel rallentamento EEG che è stato descritto nell'uomo che abusa cronicamente di MDMA e che è stato posto in relazione con i deficit cognitivi osservati negli stessi soggetti (Bolla et al., 1998; Bhattachary e Powell, 2001).

Un altro dato emerso dal presente studio è costituito dall'osservazione che la sincronizzazione EEG persistente osservata nei topi trattati con MDMA può

venir meno transitoriamente in rapporto all'esposizione a stimoli attivanti (pinzatura della coda) a meno che non si tratti di stimoli reclutanti regioni di pertinenza del rinencefalo (stimolo olfattivo). Questo suggerisce ancora una volta che le strutture limbiche sono profondamente coinvolte dal precedente trattamento con MDMA. Gli altri esperimenti rafforzano l'ipotesi di un effetto permanente delle ripetute somministrazioni di MDMA sulle strutture limbiche.

### *Ecstasy e crisi*

Negli animali pretrattati con MDMA l'alterata eccitabilità cerebrale ha portato al verificarsi di crisi limbiche nel 100% degli animali dopo basse dosi di KA (5 e 10 mg/kg) e, sorprendentemente, il 10% dei topi ha crisi continue autosostenentisi fino a configurare uno SE. Dato che le dosi di KA sono subconvulsivanti in C57Black naïve (McKhann et al., 2003), queste osservazioni indicano un effetto proconvulsivante diretto della precedente esposizione a MDMA che è indipendente dagli effetti sistemici concomitanti che si verificano immediatamente dopo la somministrazione di MDMA. Infatti nel presente studio la facilitazione alle crisi e le alterazioni EEG persistono immutate per l'intera durata del periodo di osservazione ed oltre la sospensione dell'MDMA.

Le crisi indotte in animali pretrattati con MDMA si sono espresse come un'attività ictale confinata in strutture limbiche; tale dato contrasta marcatamente con lo SE che può essere indotto da dosi molto basse di KA in topi naïve che costantemente divengono generalizzate (McKhann et al., 2003). Inoltre le crisi limbiche indotte nel presente modello di topi protrattati con MDMA non sono associate agli elevati tassi di mortalità osservati in studi dove lo SE è ottenuto mediante alte dosi di KA (McKhann et al., 2003).

La persistenza della suscettibilità alle crisi suggerisce che la circuiteria neuronale responsabile delle crisi limbiche sia alterata in maniera permanente dall'MDMA. In linea con ciò, la persistente suscettibilità alle crisi epilettiche può essere dovuta all'ipereccitabilità latente del network neuronale responsabile dell'inizio e della propagazione di crisi limbiche. Il metodo autoradiografico del 2DG mostra che la somministrazione acuta di MDMA produce un'attivazione metabolica acuta significativa nelle aree limbiche (ippocampo e corteccia entorinale) che risultano primariamente coinvolte nelle crisi limbiche. Nonostante che tali alterazioni metaboliche non siano più rilevabili 2 settimane dopo l'MDMA, la presenza di una ipereccitabilità latente che riguarda le stesse aree limbiche viene smascherata una volta che gli animali vengono trattati con uno stimolo glutamatergico fasico (KA) somministrato da 2 a 8 settimane dopo l'MDMA. Oltre a fornire una mappa metabolica indotta da MDMA, questo lavoro fornisce un substrato metabolico per spiegare la comparsa di un'ipereccitabilità cerebrale che si correla ad effetti proconvulsivanti duraturi conseguenti ad una precedente esposizione a MDMA.

### *Il recettore adrenergico $\alpha 1b$ media gli effetti dell'Ecstasy*

L'ultima sezione di questo lavoro spiega alcuni meccanismi che sono alla base degli effetti proconvulsivanti dell'MDMA osservati nella sezione precedente. Si richiama di nuovo l'attenzione sul sistema NA e su uno specifico sottotipo recettoriale adrenergico,  $\alpha 1b$ -AR. Si dimostra un ruolo potente di tale recettore nel mediare gli effetti prodotti dall'MDMA. In particolare, la stimolazione  $\alpha 1b$  appare necessaria affinché una precedente esposizione a MDMA 1) induca un'aumentata

suscettibilità alle crisi epilettiche 2) produca effetti comportamentali, caratterizzati nell'animale da iperattività locomotoria. In effetti, per quanto riguarda il ruolo dell'  $\alpha 1b$ -AR nei meccanismi dell'abuso è stato dimostrato da gruppi autorevoli che la stimolazione  $\alpha 1b$  è necessaria affinché sostanze psicostimolanti come la metanfetamina producano sensitizzazione comportamentale (Drouin et al., 2002). E' l'assenza del recettore a proteggere dagli effetti delle sostanze d'abuso e, nel nostro caso, dalle crisi epilettiche e dagli effetti comportamentali dovuti alla somministrazione cronica di Ecstasy.

L'interesse nel campo dell'epilessia riguardo all' $\alpha 1b$ -AR nasce anche dal fatto che è stato recentemente dimostrato che esso esercita un ruolo importante nella suscettibilità alle crisi (Kunieda et al., 2002). Nel topo infatti l'espressione costitutiva di tale recettore si associa alla presenza di crisi spontanee fornendo un modello sperimentale di epilessia; tuttavia la presenza di un esteso e precoce danno corticale in tale modello sperimentale non consentiva di escludere con certezza che alla base delle crisi vi fosse il danno corticale piuttosto che l'alterazione recettoriale. Negli esperimenti che hanno previsto l'impiego di topi non esprimenti il gene per  $\alpha 1b$ -AR si è dimostrato che in effetti è il recettore ad avere un ruolo proconvulsivante e non il danno. Infatti i topi knockout risultano resistenti a più stimoli convulsivanti (KA e PIL) e presentano in genere crisi limbiche di basso grado per dosi che nell'animale wild-type risultano spesso letali.

Il nostro stesso gruppo ha recentemente dimostrato che l'assenza di  $\alpha 1b$ -AR protegge contro la tossicità nigrostriatale indotta da metanfetamina (Battaglia et al., 2003). A tale proposito, un ulteriore aspetto interessante emerso in questa ultima sessione di esperimenti è costituito dal fatto che gli animali knockout non

sono resistenti solo alla sensitizzazione da MDMA ed alle crisi epilettiche, ma anche al danno prodotto dalle crisi. Infatti per crisi limbiche di alto grado, ottenute nel topo knockout con dosi molto elevate di chemoconvulsivanti, si osserva l'assenza di danno cerebrale limbico. Tale danno invece risulta consistente negli animali wild-type che hanno avuto una dose minore di chemoconvulsivante ed alto grado di crisi.

Il meccanismo attraverso cui l'attivazione endogena di  $\alpha 1b$ -AR è responsabile di tossicità non è noto. Si può pensare che l'assenza dell'  $\alpha 1b$ -AR impedisca all'MDMA di indurre le modificazioni persistenti di eccitabilità e metabolismo a livello limbico e che per tale motivo non si instauri un circuito epilettico.

I dati esposti nella presente trattazione suggeriscono dunque un ruolo assai rilevante della NA nell'epilessia, sottolineando come la denervazione NA in particolare nelle aree limbiche sia cruciale nel generare ipereccitabilità neuronale; emerge inoltre un ruolo preponderante dello stesso sistema NA nel modulare le conseguenze dell'abuso di MDMA e dello specifico sottotipo recettoriale  $\alpha 1b$  nei meccanismi epilettogenici dell'Ecstasy.

### *Possibili implicazioni cliniche*

I dati sperimentali discussi in questo lavoro suggeriscono svariate possibili implicazioni cliniche che spaziano da considerazioni speculative sui meccanismi neuropatologici di malattia ad ipotetiche future ricadute sul piano terapeutico. Un primo aspetto, già sottolineato a più riprese nel corso di questa discussione e sicuramente interessante per il clinico epilettologo, è il meccanismo con cui si produce uno stato epilettico (SE). In ipotesi, la comprensione piena dei

meccanismi attraverso i quali una crisi non finisce ma si prolunga in uno SE condurrebbe a risolvere i vari casi di pazienti con SE refrattario. I dati ottenuti dimostrano che il sistema NA ha un ruolo fondamentale nel limitare l'estensione della crisi nello spazio e nel tempo. A tale effetto antiepilettico, si aggiunge inoltre un ruolo neuroprotettivo del sistema NA, la cui integrità è fondamentale nel limitare il danno indotto da crisi gravi e prolungate o SE. I dati presentati in questa tesi sono in linea con altre evidenze sperimentali che già hanno indicato come il LC sia in grado di svolgere un ruolo protettivo nei meccanismi del danno cerebrale (Blomqvist et al., 1985; Nevander et al., 1986). A parità di crisi/SE, gli animali con maggior estensione del danno cerebrale sono infatti quelli con lesione NA. Sulla base di una ricca letteratura che dimostra che i neuroni NA vanno incontro ad una fisiologica perdita nel corso della vita (Amaral e Sinnamon, 1977, Mann, 1983; Manaye et al., 1995), si può ipotizzare che nel bambino, l'elevato tono NA conseguente alla piena integrità del LC contribuisca a determinare una minore suscettibilità al danno cerebrale (Haut et al., 2004; Holmes, 2005). Per contro, l'elevata incidenza di SE che si osserva nell'anziano (Hesdorffer et al., 1998) potrebbe derivare dalla riduzione del tono NA che si accompagna alla fisiologica involuzione dei neuroni del LC nell'invecchiamento (Mann, 1983; Manaye et al., 1995). Una riduzione patologica del tono NA, come si verifica nella malattia di Alzheimer (Mann, 1983), potrebbe rappresentare un contributo alle crisi che sono frequenti in questa popolazione di pazienti (Amatniek et al., 2006).

A fronte dell'efficacia antiepilettica della NA che appare ormai come una evidenza solida in epilettologia sperimentale, sono sempre risultati poco chiari i

meccanismi attraverso cui tale neurotrasmettitore esercita i propri effetti, anche per l'assenza di ligandi specifici per i vari sottotipi recettoriali adrenergici. Le nuove tecniche di ingegneria genetica stanno contribuendo in maniera rilevante alla definizione del ruolo dei singoli sottotipi recettoriali mediante la creazione di modelli sperimentali basati sulla manipolazione genica con cui si produce il silenziamento o, in alternativa, l'iperespressione di un dato gene codificante per proteine selettivamente espresse nei neuroni NA o per recettori attivati dalla NA endogena. A tale proposito, disponendo di animali non esprimenti il sottotipo recettoriale adrenergico  $\alpha 1b$ , i dati presentati in questa tesi indicano un ruolo potente di tale recettore nel modulare le crisi epilettiche. Mentre altri gruppi avevano dimostrato che la sua iperstimolazione si accompagnava a crisi spontanee (Kunieda et al., 2002), i dati presentati indicano che la sua assenza determina una protezione elevata dalle crisi. Questo potrebbe essere molto importante sul piano clinico e la costruzione di bloccanti selettivi  $\alpha 1b$  potrebbe in futuro costituire una nuova strategia terapeutica per le persone con epilessia.

## **Bibliografia**

Amaral DG, Sinnamon HM. The locus coeruleus: neurobiology of a central noradrenergic nucleus. *Prog. Neurobiol* 1977;9(3):147-96.

Amatniek JC, Hauser WA, DelCastillo-Castaneda C, Jacobs DM, Marder K, Bell K, Albert M, Brandt J, Stern Y. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia*. 2006;47(5):867-72.

Aston-Jones G, Chiang C, Alexinski T. Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. In: Barnes CD, Pompeiano O, editors. *Prog Brain Res* vol. 88, Amsterdam: Elsevier;1991, p. 501-20.

Aston-Jones G, Shipley MT, Grzanna. The locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1995, p. 183-213.

Battaglia G, Fornai F, Busceti CL, Lembo G, Nicoletti F, De Blasi A. Alpha-1B adrenergic receptor knockout mice are protected against methamphetamine toxicity. *J Neurochem* 2003; 86: 413-421.

Ben-Abraham R, Szold O, Rudick V, Weinbroum AA. Ecstasy intoxication: life-threatening manifestations and resuscitative measures in the intensive care setting. *Eur J Emerg Med* 2003; 10: 309-13.

Bhattachary S and Powell JH. Recreational use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) or “ecstasy”: evidence for cognitive impairment. *Psychol Med* 2001; 3: 647-58.

Blomqvist P, Lindvall O, Wieloch T. Lesions of the locus coeruleus system aggravate ischemic damage in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 1985;58(3):353-8.

Bolla KL, McCann UD, Ricaurte GA. Memory impairment in abstinent MDMA (“ecstasy”) users. *Neurology* 1998; 51: 1532-7.

Brodal A. The reticular formation and some related nuclei. The nucleus locus coeruleus. In: Brodal A. editor. *Neurological anatomy in relation to clinical medicine*. 3<sup>rd</sup> edition New York: Oxford University Press, 1981, p. 416-19.

Browning RA, Wade DR, Marcinczyk M, Long GL, Jobe PC. Regional brain abnormalities in norepinephrine uptake and dopamine beta-hydroxylase activity in the genetically epilepsy-prone rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 249:229-35.

Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel MC, Yang M, Lembo G, Vecchione C, Mostardini M, Schmidt A, Beermann F and Cotecchia S. Decreased blood pressure response in mice

deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 11589-11594.

Chen G, Ensor GF, Bohner B. A facilitation of reserpine on the central nervous system. Proc Soc Exp Biol Med 1954; 86:507-10.

Cirelli C, Pompeiano M, Tononi G. Neuronal gene expression in the waking state: a role for the locus coeruleus. Science 1996; 274:1212-5.

Cirelli C, Tononi G. Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. J Neurosci 2000; 20: 9187-94.

Corcoran ME and Mason ST. Role of forebrain catecholamines in amygdaloid kindling. Brain Res 1980; 190:473-84.

Cooley JW and Turkey JW. An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. Math. Comput., 1965; 19: 297-301.

Corcoran ME. Characteristics of accelerated kindling after depletion of noradrenaline in adult rats. Neuropharmacology 1988; 27:1081-4.

Dahlstroem A and Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. Acta Physiol Scand 1965; 64:1-36.

Dahlstroem A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* 1964; 62:1-55.

Dailey JW, Jobe PC. Indices of noradrenergic function in the central nervous system of seizure-naïve genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia* 1986; 27: 665-70.

Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S and Tassin JP. Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J Neurosci* 2002; 22: 2873-2884.

Escobedo I, O'Shea E, Orío L, Sanchez V, Segura M, de la Torre R, Farre M, Green AR, Colado MI. A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 231-41.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA, Luxembourg, 2001). Annual Report on the State-of-the-Drug Problem in the European Union 1-52.

Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G. Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 1983; 63:844-914.

Fornai F, Bassi L, Gesi M, Giorgi FS, Guerrini R, Bonaccorsi I, Alessandri MG. Similar increases in extracellular lactic acid in the limbic system during epileptic and/or olfactory stimulations. *Neuroscience* 2000; 97: 447-58.

Fornai F e Orzi F. Sexual pheromone or conventional odors increase extracellular lactate without changing glucose utilization in specific brain areas of the rat. *Neuroreport* 2001; 12: 63-9.

Fornai F, Gesi M, Lenzi P, Ferrucci M, Lazzeri G, Pizzanelli C, Pellegrini A, Battaglia G, Ruggieri S, Paparelli A. Effects of repeated low doses of MDMA on EEG activity and fluoro-jade B histochemistry. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1025: 1-8.

Fritschy JM and Grzanna R. Experimentally-induced neuron loss in the locus coeruleus of adult rats. *Exp Neurol* 1991; 111: 123-7.

George MS, Sackeim HA, Rush AJ, Marangell LB, Nahas Z, Husain MM, Lisanby S, Burt T, Goldman J, Ballenger JC. Vagus nerve stimulation: a new tool for brain research and therapy. *Biol Psychiatry* 2000;47:287-95.

Giorgi FS, Ferrucci M, Lazzeri G, Pizzanelli C, Lenzi P, Alessandrì MG, Murri L, Fornai F. A damage to locus coeruleus converts sporadic seizures into self-sustaining limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 2003; 17 (12): 2593-601

Giorgi FS, Pizzanelli C, Biagioni F, Murri L, Fornai F. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004; 28: 507-24.

Giorgi FS, Pizzanelli C, Ferrucci M, Lazzeri G, Faetti M, Giusiani M, Pontarelli F, Busceti CL, Murri L, Fornai F. Previous exposure to (+/-) 3,4 methylenedioxymethamphetamine produces long-lasting alteration in limbic brain excitability measured by electroencephalogram spectrum analysis, brain metabolism and seizure susceptibility. *Neuroscience* 2005;136: 43-53.

Haut SR, Velísková J, Moshé SL. Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. *Lancet Neurol* 2004; 3: 608-17.

Hesdorffer DC, Logroscino G, Cascino G, Annegers JF, Hauser WA. Incidence of status epilepticus in Rochester, Minnesota, 1965-1984. *Neurology.* 1998;50(3):735-41.

Holmes GL. Effects of seizures on brain development: lessons from the laboratory. *Pediatr. Neurol* 2005;33:1-11.

Hopkins WF, Johnston D. Noradrenergic enhancement of long-term potentiation at mossy fiber synapses in the hippocampus. *J Neurophysiol* 1988; 59: 667-87.

Itzhak Y, Ali SF, Achat CN, Anderson KL. Relevance of MDMA (“ecstasy”)-induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology* 2003; 166:241-248.

Jouvet M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science*. 1969;163:32-41.

Kobayashi K, Yasoshima Y. The central noradrenaline system and memory consolidation. *Neuroscientist* 2001; 7: 371-6

Kobayashi K, Kobayashi T. Genetic evidence for noradrenergic control of long-term memory consolidation. *Brain Dev* 2001; 23 (Suppl 1): S16-23

Krahl SE, Clark KB, Smith DC, Browning RA. Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 1998; 39:709-14.

Kunieda T, Zuscick MJ, Boongird A, Perez DM, Luders HO, Najm IM. Systemic overexpression of the  $\alpha 1B$  adrenergic receptor in mice: an animal model of epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43, 11:1324-9.

McCann UD, Szabo Z, Scheffel U, Dannals RF, Ricaurte GA. Positron emission tomographic evidence of MDMA («Ecstasy») on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet* 1998; 352:1433-1437.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.

Manaye KF, McIntire DD, Mann DM, German DC. Locus coeruleus cell loss in the aging human brain: a non-random process. *J. Comp. Neurol.* 1995; 358(1):79-87.

Mann DM. The locus coeruleus and its possible role in ageing and degenerative disease of the human central nervous system. *Mech. Ageing Dev.* 1983;23(1):73-94.

McIntyre DC, Wong RK. Cellular and synaptic properties of amygdala-kindled pyriform cortex in vitro. *J Neurophysiol* 1986; 55:1295-307.

McIntyre DC. Catecholamines involvement in amygdala kindling of the rat. In: Wada JA, editor. *Kindling*. New York: Raven Press; 1981, p. 67-80.

Mckhann GM, Wenzel HJ, Robbins CA, Sosunov AA, Schwartzkroin PA. Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality and hippocampal pathology. *Neuroscience* 2003; 122: 551-61.

Nagai T, Satoh K, Imamoto K, Maeda T. Divergent projections of catecholamine neurons of the locus coeruleus as revealed by fluorescent retrograde double labeling technique. *Neurosci Lett* 1981; 23: 117-23.

Neuman RS, Harley CW. Long-lasting potentiation of the dentate gyrus population spike by norepinephrine. *Brain Res* 1983; 273: 162-5.

Nevander G, Ingvar M, Lindvall O. Mechanisms of epileptic brain damage: evidence for a protective role of the noradrenergic locus coeruleus system in the rat. *Exp Brain Res*. 1986;63(2):439-42.

Oishi R, Suenaga N, Fukuda T. Possible involvement of brainstem norepinephrine in pentylenetetrazol convulsion in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 10:57-61.

Piredda S, Gale K. A crucial epileptogenic site in the deep prepiriform cortex. *Nature* 1985; 317: 623-625.

Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*. Plenum Press, New York 1979.

Racine R. Modification of seizure activity by electrical stimulation. Motor seizures. *Electroencephalog Clin Neurophysiol* 1972; 32:281-94.

Room P, Postema F, Korf J. Divergent axon collaterals of the rat locus coeruleus neurons: demonstration by a fluorescent double-labeling technique. *Brain Res* 1981; 221: 219-30.

Russell GV. The nucleus locus coeruleus (dorsolateralis tegmenti). *Tex Rep Biol Med* 1955; 13:939-88.

Schachter SC. Vagus nerve stimulation therapy summary: five years after FDA approval. *Neurology* 2002; 59(6 Suppl 4):S15-20.

Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 2000; 874:123-30.

Seppi K, Puschban Z, Stefanova N, Scherfler C, Mueller J, Poewe W, Wenning GK. Overstimulation of the alpha1B-adrenergic receptor causes a "seizure plus" syndrome. *Nat Med* 2001; 7: 132.

Simler S, Vergnes M, Marescaux C. Spatial and temporal relationships between c-fos expression and kindling of audiogenic seizures in Wistar rats. *Exp Neurol* 1999; 157:106-19.

Stone EA, Zhang Y, John S, Filer D, Bing G. Effect of locus coeruleus lesion on c-fos expression in the cerebral cortex caused by yohimbine injection or stress. *Brain Res* 1993; 603: 181-5.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 1977; 28: 897-916.

Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LM, Schwarz M, Turski L. Seizures produced by by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res* 1984; 321: 237-53.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z and Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983; 9: 315-36.

Weinshenker D and Szot P. The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. *Pharmacol Ther*. 2002;94: 213-33.

Zagnoni PG and Albano C. Psychostimulants and epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43 (Suppl 2): 28-31.

Zuscick MJ, Sands S, Ross SA, Waugh DJ, Gaivin RJ, Morilak D, Perez DM. Overexpression of the  $\alpha$ 1B adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: multiple system atrophy. Nat Med 2000; 6:1388-94.