



**Università degli studi di Pisa**

**Dottorato di Ricerca in**

**Morfologia e Funzione Normale e Patologica di Cellule e**

**Tessuti**

**Direttore: Chiar.mo Prof. Antonio Paparelli**

**Tesi di Dottorato**

**Morfologia e funzione patologica nell'ippocampo associata al  
trattamento con 3,4-metilendiossimetanfetamina (ecstasy)**

**Relatore:** Chiar.mo Prof. Francesco Fornai

**Candidata:** Dott.ssa Francesca Biagioni

*A Ginevra ed Ettore*

## INDICE

<b>I. Riassunto</b>	16
<b>1. Introduzione</b>	
1.1 MDMA o Ecstasy	17
1.1.1 <i>Caratteristiche chimiche e farmacologiche;</i>	18
1.1.2 <i>Effetti comportamentali acuti da assunzione di MDMA;</i>	19
1.1.3 <i>Effetti biochimici acuti ed a lungo termine indotti dall'MDMA;</i>	20
1.1.4 <i>Evidenze di neurotossicità indotta dall'MDMA;</i>	21
1.1.5 <i>Meccanismi di neurotossicità;</i>	23
1 <i>Stress ossidativo;</i>	
2 <i>Serotonina e dopamina;</i>	
3 <i>Glutammato e ossido nitrico;</i>	
1.1.6 <i>Coinvolgimento preferenziale del sistema limbico nella neurotossicità da MDMA;</i>	27
1 <i>Breve descrizione del sistema limbico;</i>	
2 <i>Sistema limbico ed MDMA;</i>	
1.2 Alterazioni cognitive e iperfosforilazione della proteina tau	34
1.3 Coinvolgimento della glicoproteina Dickkopf-1 nell'iperfosforilazione della proteina tau	38
<b>2. Scopo dello studio</b>	41
<b>3. Materiali e metodi</b>	41
3.1 Animali	41
3.2 Strategie sperimentali: protocolli di somministrazione di MDMA	42
3.3 Quantificazione della produzione di radicali liberi mediante microdialisi in striato, ippocampo e corteccia di animali trattati con MDMA	44
3.4 Analisi istologica	46
3.5 Analisi immunoistochimica	47
3.6 Analisi Western blot	48
3.6 Valutazione dell'attività enzimatica di GSK-3 $\beta$	50
3.7 Valutazione dell'attività enzimatica di Cdk5	50
3.8 Test water maze di Morris	51

<b>4. Risultati</b>	52
4.1 Quantificazione mediante microdialisi della formazione di radicali liberi	52
4.2 Il trattamento con MDMA non causa morte neuronale nell'ippocampo	52
4.3 Il trattamento con MDMA determina gliosi reattiva nell'ippocampo	53
4.4 Il trattamento con MDMA causa iperfosforilazione della proteina tau ippocampale	53
4.5 Caratterizzazione delle vie molecolari coinvolte nella fosforilazione della proteina tau dopo trattamento con MDMA	54
4.6 Alterazione della capacità di apprendimento spaziale nei topi trattati con MDMA	57
<b>5. Discussione</b>	58
<b>6. Bibliografia</b>	64
<b>7. Legenda delle figure</b>	93

## I. RIASSUNTO

Ecstasy è il nome comune della 3,4-metilendiossimetanfetamina (MDMA). Si tratta di un derivato dell'anfetamina strutturalmente correlato alla mescalina. Gli effetti inducono psicostimolazione, allucinazioni, e, a lungo termine, effetti neuropsichiatrici come psicosi e depressioni. La sostanza fu brevettata in Germania da Merk nel 1914 (Shulgin, 1990) come soppressore dell'appetito, ma non fu mai immessa sul mercato. Successivamente rimase sconosciuto ed inutilizzato per molti anni finché non divenne la droga più popolare dei rave party, feste in cui si ballava fino all'alba, molto popolari negli anni ottanta e novanta. I piacevoli effetti comportamentali, che comprendono aumento dell'empatia, riduzione del senso di ansia e perdita delle inibizioni, associati con l'apparente scarsità di effetti collaterali, hanno portato all'affermazione dell'ecstasy come droga ricreazionale (Morton, 2005).

L'MDMA interferisce con le funzioni del sistema nervoso centrale e periferico, agendo principalmente sul sistema serotonergico (Lyles e Cadet, 2003). La sostanza possiede proprietà simpatico-mimetiche (Seiden e Sabol, 1996) e può modulare la funzione psicomotoria e neuroendocrina. L'azione dell'MDMA sul sistema nervoso centrale è complessa, poiché colpisce principalmente le vie serotonergiche ma può colpire anche le vie di trasmissione dopaminergiche e noradrenergiche (Morton, 2005). La sua tossicità si attua mediante il legame con i tre trasportatori presinaptici delle monoamine, con affinità più elevata per i trasportatori della serotonina. Agisce, inoltre, come un agonista monoaminergico indiretto legandosi a diversi recettori classici, con affinità più elevata per i recettori  $\alpha_2$ -adrenergici, 5-HT<sub>2</sub>

serotonergici, M-1 muscarinici e H-1 per l'istamina, e affinità più bassa, per i recettori muscarinici M-2,  $\alpha_1$  e  $\beta$ -adrenergici, 5-HT<sub>1</sub> serotonergici ed i recettori D1 e D2 dopaminergici (Green et al., 2003). Ci sono importanti differenze tra le varie specie animali in merito alla sensibilità ad MDMA. Nei topi, a differenza di quanto avviene in ratti e primati, in cui gli effetti sono per lo più limitati ai neuroni serotonergici, MDMA sembra colpire principalmente il sistema dopaminergico nigrostriatale determinando un rapido rilascio di dopamina (DA) dal tessuto cerebrale (Colado et al., 2004).

È stato proposto che gli agenti causali della degenerazione a lungo termine indotta da MDMA siano i suoi metaboliti che generano radicali liberi, associati con stress ossidativo e danneggiamento delle membrane (Colado et al., 1993; Paris e Cunningham, 1992). I metaboliti dell' MDMA generano specie reattive attraverso cicli redox. Queste specie reattive potrebbero causare danno ossidativo alle proteine ed ai lipidi che compongono le terminazioni nervose. Inoltre i catecoli, gli idrochinoni ed i chinoni vanno incontro a spontanea ossidazione utilizzando idrogeno e generando superossido e perossido di idrogeno che portano a perossidazione lipidica e danneggiamento delle terminazioni serotonergiche. Queste osservazioni sono sostenute dal fatto che il trattamento con scavenger dei radicali liberi previene la neurotossicità indotta da MDMA (Colado et al., 1995).

Gli studi di neurotossicità da MDMA si sono focalizzati quasi esclusivamente sui gangli della base (sul sistema nigro-striatale), ad ogni modo l'evidenza che l'MDMA induce anomalie elettroencefalografiche (Dafters et al., 1999; Gamma et al., 2000) e danneggiamento cognitivo richiede l'analisi del potenziale coinvolgimento di aree cerebrali diverse dai gangli della base. I

nostri studi hanno dimostrato un maggior coinvolgimento del sistema limbico rispetto ai gangli della base. Il ruolo del sistema limbico appare importante in quanto si tratta di un'area coinvolta nella memoria e nelle attività cognitive. Infatti i consumatori di MDMA hanno difficoltà nel codificare informazioni di memoria a lungo termine, difficoltà nell'apprendimento verbale, sono più facilmente distratti e sono meno efficienti nel concentrarsi durante prove complesse. Il livello di danno è in relazione alla severità dell'uso (Lundqvist, 2005).

Le immagini di risonanza magnetica funzionale in soggetti umani facenti uso di MDMA evidenziano delle differenze rispetto a soggetti di controllo in un test di associazioni viso-professione per la memoria episodica, ed in particolare i consumatori di MDMA, presentano l'attivazione di un'area più ristretta nell'ippocampo sinistro rispetto ai controlli (Daumann et al., 2005). Inoltre i consumatori di MDMA, con tempi di reazione più prolungati nei test di attenzione, non riescono ad attivare in maniera normale l'ippocampo nei test di memoria verbale (Jacobsen et al., 2004).

Inizialmente i disturbi mnemonici e cognitivi sono stati attribuiti al fatto che l'MDMA danneggia i neuroni serotonergici (McCann et al., 1998; Semple et al., 1999; Reneman et al., 2001) tuttavia la possibilità di un danno diretto per i neuroni dell'ippocampo non è stata mai indagata in maniera specifica. Solo recentemente è stato visto nel topo che dosi ripetute di MDMA producono stress ossidativo, rottura del DNA a singolo e doppio filamento, e cambiamenti metabolici di lunga durata nell'ippocampo, associati con suscettibilità ad attacchi convulsivi limbici (Frenzilli et al., 2007). I cambiamenti elettroencefalografici indotti nel topo da MDMA sono coerenti con l'aumento

dell'eccitabilità limbica (Giorgi et al., 2005). Nel complesso questi dati suggeriscono che il sistema limbico, e con esso l'ippocampo, potrebbe essere un'area cerebrale preferenziale per l'azione neurotossica dell'MDMA. In altri termini, i neuroni appartenenti al sistema limbico potrebbero rappresentare bersagli primariamente colpiti da questa droga.

Nell'uomo le malattie neurodegenerative caratterizzate da deficit cognitivo portano ad alterazioni strutturali delle proteine del citoscheletro ed in particolare dei microtubuli. I microtubuli sono coinvolti nel mantenimento della corretta polarità cellulare e nel trasporto assonale (Buée et al., 2000). Probabilmente le proteine associate ai microtubuli (MAPs) sono le principali responsabili del mantenimento di tali funzioni. Tra queste proteine la proteina tau appartenente al gruppo delle MAPs è localizzata principalmente nell'assone (Leger et al., 1994); essa gioca un ruolo fondamentale nell'assemblaggio dei monomeri di tubulina in microtubuli, nel mantenimento della struttura dei microtubuli (Alonso et al., 2001), e nella costruzione di legami tra microtubuli ed altri componenti citoscheletrici o proteine (Buée et al., 2000). In vivo, tau induce la costruzione e la stabilizzazione dei microtubuli cellulari, promuove la crescita assonale e stabilisce e mantiene la corretta polarità cellulare (Leger et al., 1994)

Nella malattia di Alzheimer ed in altre patologie neurodegenerative le proteine tau si aggregano in filamenti dritti ed accoppiati ad elica (Sergeant et al., 2005), col progredire della patologia le fibrille si associano tra di loro a formare delle dense reti di filamenti interconnessi tra di loro che prendono il nome di grovigli neurofibrillari; è stato visto che la quantità di grovigli



neurofibrillari è correlata con la severità della demenza (Arriagada et al., 1992; Flament et al., 1990).

Una serie di studi hanno evidenziato la presenza di elevati livelli di fosforilazione nei filamenti accoppiati ad elica, la principale forma di tau filamentosa presente nella malattia di Alzheimer, indicando così un importante ruolo della fosforilazione nello sviluppo dei grovigli neurofibrillari (Sergeant et al., 2005; Buée et al., 2005; Lee et al., 2001). In effetti l'isoforma iperfosforilata di tau non si lega alla tubulina ma inibisce in vitro l'assemblaggio dei microtubuli e distrugge i microtubuli preformati, sequestrando la tau normale e le proteine ad elevato peso molecolare associate ai microtubuli (MAPs) (Alonso et al., 1994) portando alla destabilizzazione dei microtubuli stessi (Bramblett et al., 1993; Biernat et al., 1993) e alterando il trasporto assonale (Stamer et al., 2002; Mandelkow et al., 2004). L'anormale iperfosforilazione di tau, tramite tali meccanismi, conduce a degenerazione, formazione di grovigli neurofibrillari e demenza (Iqbal et al., 2005).

L'iperfosforilazione di tau sembra essere controllata sia a livello dell'enzima che a livello del substrato (Iqbal et al., 2005). La regolazione a livello dell'enzima avviene per attivazione di una o più chinasi e si riduce per attivazione di una o più fosfatasi. Sono stati identificati più di 25 siti differenti nei quali tau può essere fosforilata da diverse protein chinasi (Iqbal et al., 2005). Si crede che i due principali enzimi coinvolti nell'iperfosforilazione di tau siano la chinasi ciclina-dipendente 5 (Cdk5) e la glicogeno sintetasi chinasi  $3\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), due chinasi serina/treonina dipendenti (Hanger et al., 1992; Ishiguro et al., 1992; Mandelkow et al., 1992; Paudel et al., 1993). La regolazione a livello del substrato avviene ad opera della struttura di tau, in

particolare si è visto che isoforme di tau con due inserti amino-terminali sono maggiormente suscettibili alla fosforilazione da parte di Cdk5 seguita da fosforilazione da parte di GSK-3 $\beta$  (Sengupta et al., 1997). Infatti delle proteine tau si conoscono diverse isoforme ottenute dallo splicing alternativo di 11 esoni nel cromosoma 17 (17q21). Le isoforme del sistema nervoso centrale sono prodotte dallo splicing dell'esone 2, 3 e 10; questo produce sei isoforme di tau in un range che va da 352 a 441 aminoacidi. La variabilità è in relazione sia con la porzione carbossi-terminale sia con quella amino-terminale della molecola.

Dickkopf-1 è una glicoproteina secreta che agisce come antagonista selettivo della via canonica di Wnt interagendo con le lipoproteine a bassa densità legate ai recettori LRP 5/6, che sono anche i recettori delle glicoproteine Wnt. Nella “via canonica” di Wnt queste glicoproteine si legano ad un gruppo di recettori noti come “Frizzled receptors” ed “LRP5/6” promuovendo una cascata di eventi intracellulari che inibiscono l'attività della glicogeno sintetasi chinasi 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) e che quindi prevengono la fosforilazione, ubiquitinazione e anche la degradazione di una serie di proteine tra le quali la  $\beta$ -catenina e le proteine tau. Un effetto indotto dalla fosforilazione della  $\beta$ -catenina è che questa migra nel nucleo della cellula dove promuove la trascrizione di geni importanti per l'omeostasi e la sopravvivenza neuronale. Dkk-1 agisce legandosi ad LRP quindi impedendo l'interazione di queste con le proteine Wnt (Zorn, 2001; Mao et al., 2002; Grotewold e Ruther, 2002 a e b, Huelsken e Behrens, 2002) determinando l'internalizzazione del recettore. Una delle conseguenze del blocco della via di Wnt è un'aumentata degradazione della  $\beta$ -catenina risultante dalla disinibizione di GSK-3 $\beta$  (Kim et

al., 2003; Levina et al., 2004). Ciò priva i neuroni del supporto trofico fornito dal programma genico portato avanti dalla  $\beta$ -catenina (Willert e Nusse, 1998), portando alla sua fosforilazione e degradazione da parte del complesso ubiquitina/proteosoma quindi non rendendola più disponibile per la traslocazione nucleare (Aberle et al., 1997). Alternativamente la  $\beta$ -catenina può essere fosforilata da GSK-3 $\beta$  nel nucleo (Bijur e Hope, 2003). Oltre che promuovere la degradazione della  $\beta$ -catenina, l'inibizione della via di Wnt da parte di Dkk-1 potrebbe anche promuovere la fosforilazione della proteina tau mediata da GSK-3 $\beta$  con conseguente danneggiamento delle dinamiche citoscheletriche (Caricasole et al., 2004). La proteina tau è un costituente essenziale dei microtubuli e l'anomala struttura ne impedisce la polimerizzazione causando, da un lato, il suo addensamento in grovigli insolubili e, dall'altro, la mancata sintesi dei microtubuli e la perdita delle funzioni ad essi legate, in particolare il trasporto di sostanze da una parte all'altra della cellula.

Nel presente studio abbiamo valutato l'alterazione della glicoproteina Dickkopf-1 (Dkk-1) nel cervello di topi trattati con MDMA. Studi recenti dimostrano, infatti, che l'induzione di tale proteina può costituire un evento chiave nello sviluppo della morte neuronale ischemica ed eccitotossica (Cappuccio et al., 2005). In virtù di questo ruolo ne abbiamo valutato l'espressione come marker di vulnerabilità neuronale.

**Scopo dello studio:** Lo scopo di questo studio consiste nel valutare il coinvolgimento delle aree limbiche nel danno indotto dall'MDMA e la presenza di alterazioni cognitive, biochimiche e comportamentali in topi trattati con MDMA, in acuto ed in cronico.

Questa caratterizzazione si è basata sulla valutazione dello stress ossidativo dal momento che è stato proposto nella parte introduttiva che gli agenti causali della degenerazione a lungo termine indotta da MDMA siano i suoi metaboliti che generano radicali liberi, associati con stress ossidativo e danneggiamento delle membrane (Colado et al., 1993; Paris e Cunnigham, 1992); sulla valutazione, in particolar modo nell'ippocampo rispetto ad altre aree, dello stato di fosforilazione della proteina tau e delle vie coinvolte in questo fenomeno tra cui la glicoproteina Dkk-1 valutazioni effettuate in relazione al loro coinvolgimento nello sviluppo di patologie neurodegenerative e nello sviluppo delle demenze.

**Metodi:** Gli esperimenti sono stati condotti su topi C57/BL6 maschi di 10 settimane (Charles River, Calco, CO, Italia) o topi omozigoti per un allele ipomorfo di Dkk-1 (topi *doubleridge*) (gentilmente forniti da M.H. Meisler, Università di Michigan, USA) usando topi C3H come controlli wild-type (Charles River, Calco, CO, Italia). I topi *doubleridge* sono mutanti inserzionali privi di un enhancer trascrizionale nel gene per Dkk-1 (MacDonald et al., 2004). Gli animali sono stati trattati, sia acutamente che ripetutamente, con MDMA. Il trattamento acuto consisteva di due somministrazioni consecutive intraperitoneali (i.p.) di 25 mg/kg di MDMA cloridrato racemico (iniettati a due ore di intervallo). La dose cumulativa di 50 mg/kg corrisponde a 42 mg/kg di MDMA base libera. In alternativa i topi sono stati trattati per 6 giorni con due somministrazioni consecutive intraperitoneali (i.p.) di 15 mg/kg di MDMA cloridrato racemico (iniettati a due ore di intervallo). La dose cumulativa di 30 mg/kg corrisponde a 23.5 mg/kg di MDMA base libera al giorno per sei giorni. In un ulteriore ciclo di esperimenti l'MDMA (25 mg/Kg x 2 i.p. = 50 mg/Kg) è

stato somministrato a topi ipomorfici per Dkk-1 (topi *doubleridge*; n = 6) usando topi C3H come linea wild-type. Gli animali di controllo sono stati sottoposti a due iniezioni consecutive di salina (a distanza di 2 h). I topi *doubleridge* e C3H sono stati sacrificati mediante decapitazione 1 giorno dopo il trattamento con MDMA o salina.

Infine, l'MDMA (25 mg/Kg x 2 i.p. = 50 mg/Kg) è stato iniettato in topi pre-trattati con cloruro di litio (1 mEq/kg, i.p. ogni dodici ore iniziando 7 giorni prima di un trattamento con MDMA) e/o pre-trattati con l'inibitore dell'enzima Cdk5, roscovitina (30 nmol/2µl di DMSO 50%, i.c.v. due volte, 30 minuti prima di ognuna delle due iniezioni consecutive di MDMA). I topi di controllo sono stati trattati con salina (i.p.) (due iniezioni consecutive a distanza di 2 h) in topi pre-trattati i.p. con salina (ogni 12 ore a partire da 7 giorni prima del trattamento con salina) e/o pre-trattati *i.c.v.* con DMSO 50% (2µl, i.c.v., 30 minuti prima di ognuna delle due consecutive iniezioni di salina). Tutte le iniezioni *i.c.v.* sono state effettuate tramite una cannula guida impiantata in animali anestetizzati con ketamina (100 mg/Kg) + xilazina (10 mg/Kg), i.p., (coordinate: AP -0.8 mm; ML 1.4 mm; DV -2.4 mm dal cranio dell'animale, secondo l'atlante Paxinos e Franklin, 1997). Tutti gli animali sono stati uccisi per decapitazione 1 giorno dopo il trattamento con MDMA o salina.

I cervelli prelevati sono stati usati per l'analisi istologica/immunoistochimica e biochimica. Da ciascun cervello, un emiencefalo è stato fissato in Carnoi, incluso in paraffina, sezionato a 10 µm e processato per analisi istologica/immunoistochimica. Dall'altro emiencefalo

sono state microdissezionate le aree cerebrali di interesse (ippocampo e striato) e le proteine sono state processate per l'analisi Western blot.

**Risultati:** Il trattamento acuto con MDMA determinato negli animali un immediato aumento di ROS nell'ippocampo, ma non ha avuto lo stesso effetto nello striato o nella corteccia cerebrale. Mediante colorazione di Nissl e Fluoro Jade B non è stato evidenziato nessun segno di morte neuronale nella finestra temporale esaminata. Non è stata osservata, mediante TUNEL, frammentazione del DNA nell'ippocampo degli animali trattati. Nonostante la mancanza di morte neuronale, è stata messa in evidenza una consistente gliosi reattiva nell'ippocampo di topi trattati con MDMA che molti autori associano a danno cellulare. La gliosi reattiva nell'ippocampo era transitoria in risposta ad un trattamento acuto con MDMA e permaneva fino a 90 giorni dopo un trattamento cronico. L'analisi semi-quantitativa della tau fosforilata attraverso immunoblotting ha mostrato un aumento transitorio, sia dei livelli di PHF-tau che di P-tau nell'ippocampo degli animali trattati in acuto con MDMA, visualizzabile dopo un giorno per tornare a livelli normali dopo tre giorni. Un trattamento prolungato con MDMA ha indotto l'incremento sia dei livelli di PHF-tau che di P-tau ippocampale, visualizzabile fino a sette giorni dopo l'ultimo trattamento ma non più visualizzabile a 45 e 90 giorni dopo. L'analisi immunohistochimica di espressione ippocampale di P-tau e di PHF-tau ha confermato il profilo temporale di induzione della fosforilazione della proteina tau.

La glicogeno sintetasi chinasi  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ) e Cdk5 sono due dei maggiori enzimi coinvolti nella fosforilazione della proteina tau. L'attività della GSK- $3\beta$  è negativamente regolata dalla via canonica di Wnt, che a sua

volta è inibita dalla glicoproteina secreta Dkk-1. Il trattamento acuto con MDMA ha condotto ad un incremento dell'espressione di Dkk-1 nell'ippocampo ad 1 e 3 giorni dopo una somministrazione acuta, in maniera simile si è potuta mettere in evidenza la fosforilazione della tau. Un maggior incremento è stato riscontrato dopo un trattamento cronico con MDMA, da un giorno fino a sette giorni dopo l'MDMA.

È stata anche esaminata l'espressione, mediante immunoblotting, di Cdk5 e dei suoi partner proteici p35, e il prodotto della degradazione di p35, p25. L'espressione di queste proteine nell'ippocampo aumenta progressivamente a partire da un giorno dopo un trattamento acuto con MDMA. Questo incremento si riduce a sette giorni ma comunque è sempre presente. Negli animali trattati cronicamente l'incremento è visibile da sette giorni dopo l'ultima iniezione di MDMA.

Per esaminare la relazione causale tra l'inibizione della via di Wnt da parte di Dkk-1, la attivazione della Cdk5 e la fosforilazione della tau sono state utilizzate diverse strategie sperimentali. Per primo sono stati utilizzati i topi *doubleridge*. Questi animali mostrano una espressione costitutiva di Dkk-1 normale, ma l'espressione è ridotta in seguito al trattamento con MDMA se messi a confronto con i relativi topi di controllo (C3H). L'induzione di P-tau e PHF-tau è ancora presente nell'ippocampo dei topi *doubleridge* anche se di entità minore. È stato effettuato anche il trattamento con l'inibitore di Cdk5, roscovitina, con o senza trattamento concomitante con litio cloruro (che ripristina la via di Wnt agendo a valle del blocco di Dkk-1). Il trattamento con roscovitina ha ridotto l'incremento di P-tau e PHF-tau indotto dall'MDMA in maniera più efficiente del litio. Il trattamento combinato ha abolito

completamente l'incremento di tau fosforilata nell'ippocampo dei topi trattati con MDMA.

È stata valutata la capacità di apprendimento spaziale in topi trattati con MDMA cronicamente per sei giorni. Il risultato di tale analisi ha evidenziato che i topi trattati con MDMA presentano una significativa alterazione nell'apprendimento, già dal secondo e terzo giorno di sessione di allenamento nel test del Morris water maze.

**Conclusioni:** In questo studio è stato dimostrato che il trattamento con MDMA incrementa la fosforilazione della proteina tau, un marker biochimico della patologia di Alzheimer, della demenza fronto-temporale, e di altre malattie neurodegenerative caratterizzate da un progressivo declino cognitivo (Grundke-Iqbal et al., 1986; Iqbal et al., 1989; Lee et al., 1991). Questo dato porta a ipotizzare che la neurotossicità indotta dall'abuso di MDMA possa riprodurre le alterazioni neuropatologiche tipiche delle demenze degenerative. Rimangono alcuni quesiti importanti da chiarire: 1) Se l'iperfosforilazione della tau sia anche in relazione con un'azione primaria dell'MDMA sui terminali assonici dei neuroni dopaminergici e serotonergici; 2) Quanto sia permanente, ed eventualmente irreversibile, l'iperfosforilazione della tau in relazione alla dose, alla frequenza ed al tempo di somministrazione dell'MDMA.



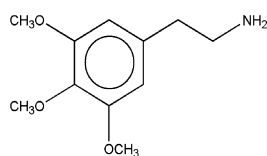
## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 MDMA o ECSTASY

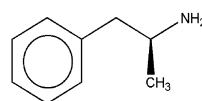
La sostanza fu brevettata in Germania da Merk nel 1914 (Shulgin, 1990) come soppressore dell'appetito, ma non fu mai immessa sul mercato. Successivamente rimase sconosciuta ed inutilizzata per molti anni finché non divenne la droga più popolare dei rave party, feste in cui si ballava fino all'alba, molto popolari negli anni ottanta e novanta. I piacevoli effetti comportamentali, che comprendono aumento dell'empatia, riduzione del senso di ansia e perdita delle inibizioni, associati con l'apparente scarsità di effetti collaterali, hanno portato all'affermazione dell'ecstasy come droga ricreazionale (Morton, 2005).

#### 1.1.1 Caratteristiche chimiche e farmacologiche

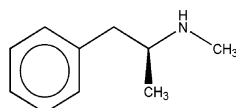
La molecola è un derivato sintetico dell'anfetamina, caratterizzato dal possedere un nucleo benzenico e un gruppo metilendioossilico in posizione 3,4.



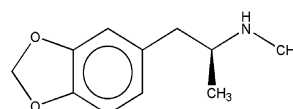
Mescalina



Anfetamina



Metanfetamina



3,4 Metilenediossimetanfetamina

Analogie strutturali tra la mescalina, l'anfetamina ed i suoi derivati.

L'assorbimento dell'MDMA somministrato per os è rapido e nell'uomo il picco plasmatico si raggiunge in circa 2 ore. L'emivita plasmatica è intorno alle 6-7 ore ed in 72 ore il 72% della dose somministrata è eliminata con le urine. Nel ratto l'emivita è stimata in circa 70 minuti per l'isomero destrogiro S-(+) ed in circa 100 minuti per quello levogiro R(-). L'MDMA viene metabolizzato attraverso una serie di reazioni enzimatiche: N-demetilazione, O-dealchilazione, deaminazione e coniugazione. Tali vie portano alla formazione di 14 metaboliti. Il metabolita principale dell'MDMA è la 3,4-metilendioossianfetamina (MDA), prodotto di N-demetilazione. La più importante via di metabolizzazione di MDMA ed MDA è la N-demetilazione in catelcolderivati successivamente ossidati in chinoni. L'N-demetilazione è una reazione ossidativa catalizzata dal citocromo P-450.

### **1.1.2 Effetti comportamentali acuti da assunzione di MDMA**

Gli effetti comportamentali acuti da assunzione di MDMA includono ipertermia (Dafters, 1994 e 1995; Gordon et al, 1991; Nash et al., 1988; Schmidt, 1990a), iperattività (Dafters, 1994; Gordon, 1993) e sindrome serotoninergica (Callaway et al., 1992; Colado et al., 1993; Slikker, 1989; Spanos e Yamamoto, 1989) caratterizzata da incremento dell'attività motoria, piloerezione, abduzione degli arti posteriori, atassia, e in dipendenza dalla dose, convulsioni e morte (Green et al., 1995). Si ritiene che l'iperattività indotta da MDMA sia causata dal rilascio di dopamina (Marston et al. 1999; McCreary 1999) che induce iperlocomozione; mentre, essendo la serotonina

coinvolta nella regolazione della temperatura corporea (Grahame e Smith, 1971a e 1971b, Yamawaki et al, 1983; Colado et al. 1993) si riteneva che l'ipertermia potesse essere causata dall'aumentato rilascio di tale neurotrasmettitore (Shankaran e Gudelsky, 1999). Tuttavia, il trattamento con diversi antagonisti dei recettori serotoninergici non ha condotto ad alcun risultato nel trattamento dell'ipertermia (Mechan et al. 2002), mentre l'utilizzo di un antagonista dei recettori dopaminergici D<sub>1</sub> riduce l'ipertermia in maniera dose dipendente, indicando che l'ipertermia potrebbe essere causata dall'aumentato rilascio di dopamina, la quale agisce, poi, sui recettori D<sub>1</sub> (Mechan et al. 2002). Quindi, il meccanismo tramite il quale si produce alterazione della temperatura corporea non è del tutto noto anche se potrebbe avere un ruolo la proteina disaccoppiante 3, una proteina mitocondriale notoriamente coinvolta nel processo della termogenesi (Mills et al., 2003).

I consumatori di MDMA sperimentano una sensazione di pace, esperienze emozionali con miglioramento dell'intuizione, sensazione di aumentata vicinanza con gli altri, euforia e sintomi simil-simpatetici inclusi tremori e tachicardia (Cohen, 1995, 1996; Cohen e Cocores 1997; Downing, 1986; Greer e Tolbert, 1986). L'MDMA produce uno stato di buonumore e benessere associati con moderata spersonalizzazione e disordini del pensiero. Solo occasionalmente induce un aumento dell'aggressività e della rabbia. Gli effetti collaterali acuti includono bruxismo, serrata della mascella, soppressione dell'appetito, difficoltà di concentrazione, atassia, irrequietezza, dolori muscolari e sudorazione (Liester, 1992). In casi di grave ipertermia la morte può sopravvenire a causa di aritmie cardiache, danno renale acuto, rhabdomiolisi

e coagulazione intravascolare disseminata (Callahan et al., 2001; Fahal, 1992; Malpass, 1999; Screatton et al., 1992).

### **1.1.3 Effetti biochimici acuti e a lungo termine indotti dall' MDMA**

L'azione dell'MDMA sul sistema nervoso centrale è complessa, poiché colpisce principalmente le vie serotonergiche ma può colpire anche le vie di trasmissione dopaminergiche e noradrenergiche (Morton, 2005). Si lega ai tre trasportatori presinaptici delle monoamine, con affinità più elevata per i trasportatori della serotonina.

Ci sono importanti differenze tra le varie specie animali in merito alla sensibilità all'MDMA. Nei topi, a differenza di quanto avviene nei ratti e nei primati, in cui gli effetti sono per lo più limitati ai neuroni serotonergici, l'MDMA sembra colpire principalmente il sistema dopaminergico nigrostriatale determinando un rapido rilascio di dopamina (DA) (Colado et al., 2004).

Gli effetti dell'ecstasy sono attribuibili a modificazioni della funzione e dell'integrità del sistema serotonergico. Esso aumenta il rilascio di serotonina (5-HT), neurotrasmettitore deputato al controllo del sonno, del tono dell'umore, del comportamento sessuale e della fame. Studi sull'animale hanno infatti dimostrato che l'MDMA agisce sul sistema serotonergico incrementando il livello extracellulare della 5-HT. Il meccanismo di azione molecolare responsabile dell'effetto dell'MDMA a livello del terminale serotonergico comprende: (a) blocco del carrier vescicolare deputato al trasporto di serotonina all'interno delle vescicole; (b) inversione del trasporto della serotonina da parte del carrier di membrana con accumulo del

neurotrasmettitore nel citoplasma e quindi blocco del "re-uptake"; (c) blocco delle monoaminossidasi (MAO). Questa prima fase è definita fase acuta o reversibile, in quanto tra il trattamento e le 24 ore successive al trattamento si ha un veloce ripristino dei livelli di serotonina. Nella seconda fase, ovvero nella settimana successiva, si verifica una nuova diminuzione dei livelli di questo neurotrasmettitore. Tale inibizione è dovuta ai seguenti fattori: 1) meccanismo di feed-back negativo prodotto da un accumulo di serotonina; 2) formazione di radicali liberi durante il metabolismo dell'MDMA che inattivano l'enzima responsabile della sintesi del neurotrasmettitore (triptofano-idrossilasi, TPH). Questa seconda fase è definita fase a lungo termine o neurotossica.

#### **1.1.4 Evidenze di neurotossicità indotta dall'MDMA**

Studi istologici condotti nel ratto hanno documentato l'insorgenza di degenerazione delle terminazioni nervose nello striato e nella corteccia somatosensoriale a seguito di assunzione cronica di MDMA (Commins et al., 1987). Utilizzando anticorpi specifici contro la 5-HT è stata vista la perdita di assoni serotonergici in neocorteccia, striato e talamo di ratti trattati con MDMA (O'Hearn et al., 1988). Tutto ciò era associato con aumento del calibro degli assoni e sviluppo di larghe varicosità assonali (Molliver et al., 1990; O'Hearn et al., 1988). L'MDMA può anche causare diminuzione del trasporto anterogrado di [<sup>3</sup>H]prolina nei neuroni ascendenti che si originano nei nuclei dorsali del Raphe (Ricaurte et al., 2000b; Callahan et al., 2001). Gli effetti a lungo termine nei primati non umani sono simili a quelli osservati nei ratti (Insel et al., 1989; McCann et al., 2000; Ricaurte et al., 1988a e 1988b,

Scheffel et al., 1998; Slikker et al., 1989), sebbene i primati si siano mostrati più sensibili all'azione tossica della sostanza (De Souza et al., 1990; Ricaurte, 1989) e più inclini a rispondere con una riduzione dei livelli di 5-HT nella corteccia, nel nucleo caudato, nel putamen, nell'ippocampo, nell'ipotalamo e nel talamo, 7 giorni dopo l'assunzione (Hatzidimitriou, 1999).

Il maggiore problema riscontrato negli studi di neurotossicità sugli umani riguarda l'estrema difficoltà nella determinazione delle precise quantità autosomministrate di MDMA e la presenza di impurità ed altre sostanze nelle pasticche di ecstasy in commercio, non solo ma anche la possibilità che i soggetti che abusano di MDMA possano anche consumare in maniera concomitante altre sostanze ed essere quindi di fatto poliabusatori. Studi recenti effettuati in abusatori hanno mostrato una significativa diminuzione della concentrazione di acido 5-idrossindolacetico, metabolita della serotonina, nel fluido cerebrospinale (Bolla et al., 1998; McCann et al. 1994 e 1999; Ricaurte et al., 1988a e 1989). Non sono stati osservati invece cambiamenti nei livelli del metabolita della dopamina, l'acido omovanilico, né dei livelli del metabolita della noradrenalina, 3-metossi 4-idrossifenilglicole (McCann et al., 1994).

Esiste inoltre una forte differenza tra consumatori per quanto riguarda i livelli di trasportatori per la 5-HT, in misura dipendente dalla severità dell'uso (McCann et al., 1998; Ricaurte et al., 2000a). La disponibilità di recettori postsinaptici 5-HT<sub>2A</sub> è più bassa in consumatori recenti della sostanza, mentre è più alta in ex-assuntori. Pertanto, mentre gli effetti acuti dell'MDMA comprendono riduzione della densità di recettori 5-HT<sub>2A</sub>, a lungo termine si realizza un aumento nella densità di tali recettori probabilmente a causa di una

sintesi compensatoria di recettori per contrastare la deplezione di serotonina indotta dall'MDMA. Si è inoltre rilevata, in soggetti che avevano assunto almeno 50 pasticche di ecstasy per almeno un anno e che assumevano ancora regolarmente la sostanza, una diminuzione di trasportatori serotoninergici nella corteccia, prevalentemente nella corteccia motoria primaria (Semple et al., 1999). In uno studio simile sono stati valutati gli effetti dell'abuso di MDMA, sia sulla densità di trasportatori serotoninergici, sia sulla funzione motoria a lungo termine riscontrando una diminuzione nella densità dei trasportatori in utilizzatori recenti ma non in soggetti astinenti da lungo tempo, mentre il deficit nella memoria verbale era osservato in utilizzatori sia recenti che vecchi (Reneman et al., 2001).

### **1.1.5 Meccanismi di neurotossicità indotta dall'MDMA**

*1- Stress ossidativo.* Si pensa che gli agenti causali della degenerazione a lungo termine indotta dall'MDMA siano i suoi metaboliti che generano radicali liberi associati con stress ossidativo e danneggiamento delle membrane (Colado et al., 1993; Paris e Cunningham, 1992). Il metabolismo dell'MDMA porta alla formazione di metilenediossianfetamina (MDA) tramite N-demetilazione, e 3,4-diidrossimetanfetamina (HHMA), il principale metabolita, tramite O-demetilazione. I metaboliti dell'MDMA generano specie reattive attraverso cicli redox. Queste specie reattive potrebbero inattivare la TPH oltre che causare danno ossidativo alle proteine ed ai lipidi che compongono le terminazioni nervose. Inoltre i catecoli, gli idrochinoni ed i chinoni possono andare incontro a spontanea ossidazione utilizzando idrogeno e generando superossido e perossido di idrogeno che possono condurre a perossidazione

lipidica e danneggiamento delle terminazioni serotonergiche. Queste osservazioni sono sostenute dal fatto che il trattamento con scavenger dei radicali liberi previene la neurotossicità indotta da MDMA (Colado et al., 1995).

2- *Serotonina e dopamina.* È stato suggerito che la serotonina o un suo metabolita possano essere responsabili della neurotossicità indotta da MDMA perché il blocco della ricaptazione del neurotrasmettitore antagonizza la deplezione serotonergica indotta da MDMA (Schmidt, 1987) e facilita il recupero dell'attività della TPH (Schmidt e Taylor 1987). Queste osservazioni suggeriscono che la neurotossicità indotta da MDMA potrebbe coinvolgere la serotonina o la formazione di un suo metabolita tossico. Inoltre l'osservazione che antagonisti dei recettori 5-HT<sub>2A</sub> attenuano la neurotossicità (Nash et al., 1990) suggerisce un coinvolgimento di questi probabilmente tramite alterazione nell'omeostasi del calcio o tramite traslocazione ed attivazione della protein chinasi C (Kramer et al., 1995).

L'MDMA esplica la sua azione principalmente sul rilascio di serotonina, ma determina anche il rilascio di una certa quantità di dopamina. Il ruolo della dopamina è stato specificamente confermato utilizzando  $\alpha$ -metil-p-tirosina, un inibitore della biosintesi delle catecolamine, in grado di ridurre i livelli di dopamina. La somministrazione di  $\alpha$ -metil-p-tirosina tre ore prima del trattamento con MDMA o contemporaneamente ad essa, antagonizza la tossicità da MDMA. Se, al contrario, vengono innalzati i livelli di dopamina somministrando L-dopa, gli effetti neurotossici dell'MDMA risultano potenziati. Quindi la somministrazione di MDMA negli animali induce,



sebbene in minor misura rispetto al rilascio di serotonina, un aumento della concentrazione sinaptica di dopamina (Colado et al., 2004). Nell'uomo, studi post-mortem condotti su tessuti derivati da consumatori di ecstasy, hanno mostrato una sostanziale riduzione nella concentrazione striatale di dopamina (Kish et al., 2000). L'utilizzo di agonisti dei recettori 5-HT<sub>2</sub> potenzia il rilascio di dopamina mediato da MDMA e incrementa l'effetto tossico di MDMA sui livelli di serotonina.

Il danno assonale e l'inattivazione del TPH non possono essere attribuiti né ai prodotti metabolici dell'MDMA né a quelli della 5-HT. La DA è chiaramente implicata nel meccanismo neurotossico dell'MDMA. Esiste una correlazione lineare tra rilascio acuto di DA e danno a lungo termine delle terminazioni serotonergiche. Mentre il danno neuronale è potenziato dalla DA, la preventiva somministrazione di triptofano (TP) o 5-idrossitriptofano (5-OHTP) aumenta il rilascio extraneuronale di 5-HT dopo MDMA ma previene, invece che incrementare, la neurotossicità. Il 5-metossi-6-metil-2-aminoindano, molecola sprovvista di azione intrinseca sulla DA, provoca selettivamente liberazione e successiva deplezione di 5-HT, senza tossicità per il sistema serotonergico se non somministrato in combinazione con (+)-anfetamina. È noto da tempo che la fluoxetina, somministrata fino a sei ore dopo l'MDMA, ne attenua significativamente la neurotossicità e più recentemente si è accertato che il "carrier" di membrana per l'"uptake" della 5-HT, in mancanza di quest'ultima, riconosce come substrato anche la DA. E' suggestivo che la deplezione di 5-HT dai neuroni serotonergici renda i terminali vulnerabili e che la DA trasportata dal "carrier" per l'"uptake" della 5-HT dal pool extracellulare incrementato all'interno del terminale serotonergico depleto di 5-HT sia

deaminata dalle MAO-B di cui quest'ultimo è primariamente provvisto. Il metabolismo della DA nelle terminazioni serotonergiche genera perossido di idrogeno in misura superiore alle capacità riduttive della cellula provocando perossidazione lipidica, stress ossidativo generalizzato e degenerazione selettiva degli assoni. In effetti il pretrattamento con l-deprenil o con MDL-72974 inibitori delle MAO-B protegge dagli effetti neurotossici prodotti da 40 mg/kg di MDMA in singola dose. Nel terminale serotonergico la MAO-B sembra giocare un ruolo protettivo degradando neurotrasmettitori estranei: in normali condizioni la deaminazione da parte della MAO-B di DA estranea, che può occasionalmente entrare nel terminale serotonergico, ha minime conseguenze essendo la capacità riduttiva del neurone sufficiente a neutralizzare bassi livelli di ossidanti. Il trattamento con MDMA supera la capacità del neurone di distruggere le specie ossidative, determinando tossicità. Analogamente l'inattivazione di TPH potrebbe essere causata dall'ossidazione dei gruppi tiolici della sua molecola e si suppone che la fase di reversibilità a breve termine dell'attività idrossilasica sia effetto di un meccanismo di inibizione enzimatica mentre la riduzione a lungo termine più propriamente rifletta la degenerazione assonale. Considerando che il sistema gabaergico modula l'attività dopaminergica questo modello non contrasta con l'osservazione che l'agonista GABA clorometiazolo attenua la neurotossicità da MDMA.

*3- Glutammato e ossido nitrico.* Al momento attuale invece non vi sono dati sufficientemente convincenti intorno al ruolo di glutammato e nitrossido nel meccanismo neurotossico dell'MDMA. Un importante argomento di

indagine riguarda l'implicazione della temperatura ambientale nei processi neurotossici da MDMA. Molti laboratori hanno dimostrato che quando l'MDMA viene somministrata all'animale alla temperatura ambientale di 24°C (o più alta) vi è ipertermia mentre a 10°C c'è risposta ipotermica. Gli effetti dell'MDMA sulla temperatura corporea sembrano direttamente correlati alla temperatura ambientale. L'ipertermia è nell'uomo uno dei più gravi effetti collaterali associati all'uso di ecstasy mentre l'ipotermia protegge contro i danni cerebrali indotti da una grande varietà di insulti neurotossici. Gli animali stabulati in ambiente freddo diminuiscono sia il rilascio di DA che la neurotossicità da anfetamina. Allo stesso modo si potrebbe ipotizzare che la riduzione della temperatura corporea diminuisca gli effetti dell'MDMA fornendo indirettamente protezione nei confronti dei suoi effetti tossici.

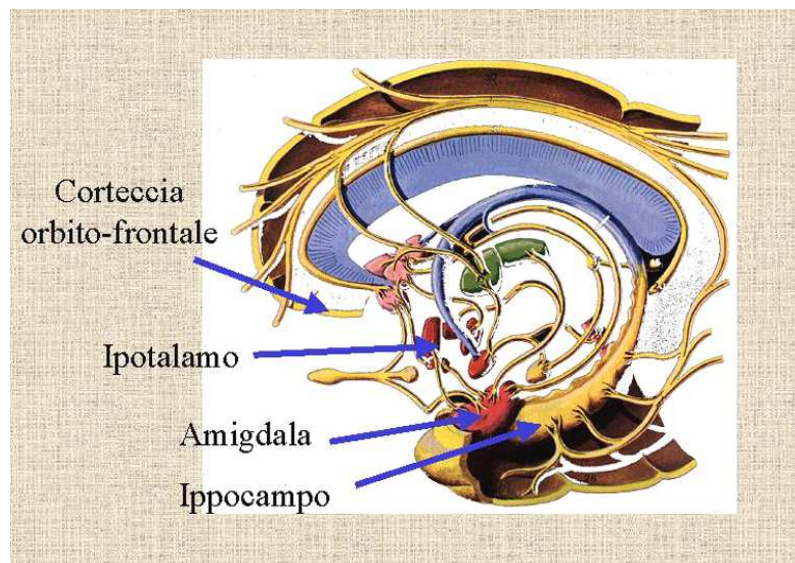
### **1.1.6 Coinvolgimento preferenziale del sistema limbico negli abusatori di MDMA**

#### *Breve descrizione del sistema limbico*

Col termine di lobo limbico si era soliti indicare in passato quelle formazioni senza soluzione di continuità che circondano il tronco encefalico ed il corpo calloso. Questa definizione si è mantenuta fino ad oggi sebbene negli ultimi anni il termine lobo limbico sia stato sostituito da quello di sistema limbico che racchiude il lobo omonimo e tutte quelle strutture e formazioni ad esso funzionalmente correlate. Tale sistema è costituito da strutture filogeneticamente antiche e collegate (elencate nello schema riportato di seguito), che funzionano in maniera coordinata e deputate alla modulazione

delle emozioni, alla formazione della memoria recente ed alla regolazione delle risposte viscerali.

- Sistema limbico**
- **Lobo limbico**
  - **Formazione ippocampale**
  - **Corpi mammillari ipotalamici**
  - **Nuclei medio-dorsale ed anteriore del talamo**
  - **Amigdala**



Schema della struttura anatomica e delle connessioni del sistema limbico.

La formazione ippocampale è coinvolta nel consolidamento della working memory (memoria di lavoro) a breve termine e nella memoria dichiarativa a lungo termine. Lesioni della sola amigdala causano alterazione di elementi mnemonici legati alle emozioni, mentre un danno selettivo dell'ippocampo o delle aree associative con cui è in connessione (corteccia peririnale e paraippocampica) determina evidenti effetti sulla memoria esplicita.

Nell'uomo le nozioni conservate come memorie esplicite vengono inizialmente elaborate in una o più delle corteccie associative (corteccie prefrontale, limbica e parieto-temporo-occipitale). Da qui le informazioni vengono trasferite alle corteccie paraippocampica e peririnale, e quindi alla corteccia entorinale, al giro del cingolo, all'ippocampo, al subiculum ed infine di nuovo alla corteccia entorinale. Dalla corteccia entorinale le informazioni sono re-inviate alla corteccia paraippocampica e peririnale ed infine ancora alle corteccie associative della neocortex. Dunque, la corteccia entorinale rappresenta la principale porta d'ingresso verso l'ippocampo attraverso la *via perforante* che proietta al *nucleo dentato*. Essa rappresenta, inoltre, il più importante canale di output dell'ippocampo stesso. L'ippocampo è una struttura del sistema limbico relativamente grande accolta nella compagine della circonvoluzione interna di ogni lobo temporale.

L'informazione entra nell'ippocampo mediante il *tratto perforante* (perforant path) i cui assoni originano da neuroni della corteccia entorinale e fanno sinapsi a livello del giro dentato. I neuroni del giro dentato inviano i loro assoni, che prendono il nome di fibre muscoidi (mossy fibers), all'area CA3 dell'ippocampo. Quest'ultima, attraverso il fascio collaterale di Schaeffer, invia assoni all'area CA1 dalla quale altre fibre si distaccano per raggiungere il subiculum. Il subiculum è responsabile di tutta l'efferenza dall'ippocampo, inviando assoni alla corteccia entorinale ed ai corpi mammillari attraverso il fornice.

Esiste una sorta di lateralizzazione delle funzioni e delle risposte a livello degli ippocampi. L'ippocampo destro si attiva nei processi di apprendimento ambientale. Le memorie legate allo spazio comportano una

maggior attività dell'ippocampo di destra. L'ippocampo sinistro è connesso con la memoria verbale. Il ricordo di parole, oggetti, persone e degli elementi che appartengono a queste categorie, richiede un'attività più intensa dell'ippocampo dell'emisfero sinistro (dominante). Il ruolo dominante nell'acquisizione delle relazioni spaziali fra oggetti in un ambiente e nella formazione di una mappa spaziale, quale quella che dobbiamo formarci per decidere il percorso da compiere per recarsi da un punto ad un altro di una città, è svolto dall'ippocampo destro; in particolare, l'ippocampo destro si attiva mentre i soggetti sono impegnati in compiti di orientamento spaziale (Maguire et al., 1996).

L'ippocampo sinistro si attiva invece fortemente in compiti che impegnano la memoria verbale a lungo termine (Maguire et al., 1996). Ci sono evidenze sperimentali circa il ruolo dell'ippocampo come sede *transitoria* delle tracce di memoria a lungo termine; sono invece le aree associative a rappresentare il deposito ultimo delle tracce di memoria esplicita.

#### *Sistema limbico ed MDMA*

Dati recenti dimostrano che l'MDMA agisce principalmente sul sistema limbico piuttosto che sul sistema nigro-striatale, indicando un maggiore coinvolgimento delle aree cognitive piuttosto che delle aree motorie nella neurotossicità mediata da tale sostanza da abuso.

I consumatori di MDMA mostrano difficoltà nel codificare informazioni nella memoria a lungo termine, difficoltà nell'apprendimento verbale, sono più facilmente distratti e sono meno efficienti nel concentrarsi

durante prove complesse. Il livello di compromissione dipende dalla severità dell'uso (Lundqvist, 2005).

Studi di diagnostica per immagini del cervello hanno suggerito che l'uso di MDMA potrebbe danneggiare i neuroni serotonergici (McCann et al., 1998; Semple et al. 1999; Reneman et al. 2001); tali studi si sono soffermati sull'analisi dei livelli cerebrali di trasportatori serotonergici, come indicatori di integrità neuronale. L'analisi di reperti autoptici derivanti da consumatori abituali di più tipi di droghe mostrava un ridotto livello di serotonina, ma un normale livello di dopamina.

Studi comportamentali hanno fornito uno strumento per valutare la presenza e l'entità di effetti cognitivi e comportamentali in seguito ad assunzione di MDMA. Diversi studi hanno dimostrato l'insorgenza di deficit cognitivo acuto.

Prima che l'MDMA divenisse illegale negli Stati Uniti, Downing (1986) ha somministrato MDMA puro ad alcuni soggetti, riportando che la sostanza non aveva effetti su test di ripetizione di cifre ma poteva danneggiare le prestazioni in test di moltiplicazione.

Curran e Travill (1997) confrontarono i consumatori di ecstasy con i consumatori di bevande alcoliche in un compito di memoria di prose e in prove di sottrazioni seriali, trovando che gli assuntori di MDMA ottenevano un punteggio più basso nelle prove di sottrazione.

Parrott e Lasky (1998) valutarono poi gli effetti sull'umore e sulle funzioni cognitive prima, durante e dopo un sabato notte in discoteca. Sono stati confrontati tre gruppi di giovani. Ogni soggetto fu chiamato a svolgere test cognitivi e di umore in quattro differenti momenti: un momento iniziale senza

assunzione della sostanza, durante un sabato notte in discoteca (sotto effetto della droga), due giorni dopo l'assunzione e sette giorni dopo l'assunzione. Due giorni dopo si osservava un danneggiamento delle funzioni cognitive in due diversi test (memoria verbale e esame visivo). La memoria visiva era profondamente alterata anche a livello basale (senza assunzione della sostanza) in quei soggetti che mostravano una storia di assunzione regolare di MDMA.

Gouzoulis-Mayfrank ed altri autori (2000) confrontarono un gruppo di consumatori di MDMA, astinente da 2-8 settimane con un gruppo di non consumatori, controllati per l'uso della cannabis. I gruppi non mostravano differenze su semplici test di attenzione, ma i consumatori di MDMA mostravano punteggi più bassi nei test di memoria verbale di base e nei test di apprendimento. Essi conclusero quindi che la tipica dose ricreazionale di MDMA era sufficiente per causare neurotossicità.

Morgan (1999) confrontò consumatori di MDMA in astinenza da 65 giorni con policonsumatori di droghe che non avevano avuto una storia di assunzione di MDMA e riscontrarono danneggiamento cognitivo nei consumatori di MDMA rispetto agli utilizzatori di altre droghe.

McCann et al. (1999) cercarono di dimostrare che il deficit cognitivo mostrato dai consumatori di MDMA era correlato con i bassi livelli di serotonina; essi misurarono nel liquor i livelli cerebrospinali di acido 5-idrossindoliacetico che costituisce una misura indiretta dei livelli di serotonina. Essi riscontrarono che una significativa diminuzione del neurotrasmettitore era correlata con bassi punteggi in diversi test cognitivi, suggerendo che l'uso di MDMA potrebbe portare ad una compromissione del sistema serotonergico e condurre quindi ad un danno della memoria a breve termine, dell'attenzione



complessa, dell'apprendimento, del ragionamento verbale e del riconoscimento semantico. L'MDMA può anche colpire l'umore provocando euforia ma anche sensazione di depressione.

Parrott e Lasky dimostrarono anche che soggetti che avevano consumato ecstasy di recente si sentivano molto più depressi dei soggetti di controllo. Sebbene sia stato dimostrato che l'ecstasy possa avere effetti depressivi tra due e sette giorni dopo l'assunzione, sembra chiaro che la sostanza non ha alcun effetto a lungo termine sull'umore.

Gli studi precedenti indicavano che l'uso di MDMA potesse danneggiare il sistema serotonergico e che questo potesse condurre a danneggiamento cognitivo e sbalzi d'umore.

Uno studio di McCardle et al. (2004) riportò i risultati ottenuti da utilizzatori di MDMA in una serie di test cognitivi e test sull'umore utilizzando come controlli individui che non differivano significativamente in termini di uso corrente o precedente di cocaina, eroina, inalanti e che non mostravano differenze in merito al quoziente intellettivo. I risultati di questo studio suggerivano che gli abusatori di MDMA mostrano un più alto livello di depressione ed un impoverimento delle funzioni cognitive rispetto ai soggetti di controllo. Dato che i soggetti utilizzati per lo studio riportavano di non avere assunto l'MDMA in media da 130 giorni, gli effetti depressivi non potevano risultare dalla temporanea delezione di serotonina, ma necessariamente da effetti a lungo termine sul sistema serotonergico.

Il danneggiamento cognitivo mostrato dagli utilizzatori di MDMA è coerente con il tipo di danneggiamento che risulta dalla degenerazione serotonergica. Infatti una serie di studi precedenti hanno mostrato come la

diminuzione della trasmissione serotonergica negli umani possa danneggiare una serie di aspetti dell'apprendimento e della memoria (Altman et al., 1984; McEntee e Crook, 1991) che si crede siano correlati con le regioni ippocampale–limbica (Wood et al., 2002), regioni ampiamente coinvolte nei processi di memorizzazione.

Nel complesso i dati presenti in letteratura ed ampiamente descritti suggeriscono che il sistema limbico, e con esso l'ippocampo, potrebbero essere aree cerebrali preferenziali per l'azione neurotossica dell'MDMA. In altri termini, i neuroni appartenenti al sistema limbico mostrano una maggiore vulnerabilità alla tossicità indotta dall'MDMA.

## **1.2 ALTERAZIONI COGNITIVE E IPERFOSFORILAZIONE DELLA PROTEINA TAU**

Nell'uomo le malattie neurodegenerative che sono caratterizzate da deficit cognitivo mostrano alterazioni strutturali delle proteine del citoscheletro ed in particolare dei microtubuli.

I microtubuli sono i maggiori componenti dei processi neuronali e sono coinvolti nel mantenimento della corretta polarità cellulare e del trasporto assonale (Buee et al., 2000). Probabilmente le proteine associate ai microtubuli (MAPs) sono le principali responsabili del mantenimento di tali funzioni.

La proteina tau, appartenente al gruppo delle MAPs, è localizzata principalmente nell'assone (Leger et al., 1994), gioca un ruolo fondamentale nell'assemblaggio dei monomeri di tubulina in microtubuli, nel mantenimento della struttura dei microtubuli (Alonso et al., 2001), e nella costruzione di legami tra microtubuli ed altri componenti citoscheletrici o proteine (Buee et

al., 2000). *In vivo*, la proteina tau induce la costruzione e la stabilizzazione dei microtubuli cellulari, promuove la crescita assonale e stabilisce e mantiene la corretta polarità cellulare (Leger et al., 1994).

Nella malattia di Alzheimer ed in altre patologie neurodegenerative le proteine tau si aggregano in filamenti dritti ed accoppiati ad elica (Sergeant et al., 2005), col progredire della patologia le fibrille si associano tra di loro a formare delle dense reti di filamenti interconnessi tra di loro che prendono il nome di grovigli neurofibrillari; è stato visto che i grovigli neurofibrillari sono correlati con la severità della demenza (Arriagada et al., 1992; Flament et al., 1990).

Una serie di studi hanno evidenziato la presenza di elevati livelli di fosforilazione nei filamenti accoppiati ad elica, la principale forma di tau filamentosa presente nella malattia di Alzheimer, indicando un importante ruolo per la fosforilazione nello sviluppo dei grovigli neurofibrillari (Sergeant et al., 2005; Lee et al., 2001).

In effetti l'isoforma iperfosforilata di tau non si lega alla tubulina ma inibisce *in vitro* l'assemblaggio dei microtubuli e distrugge i microtubuli preformati, sequestrando la tau normale e le proteine ad elevato peso molecolare associate ai microtubuli (MAPs) (Alonso et al., 1994) portando alla destabilizzazione degli stessi microtubuli (Bramblett et al., 1993; Biernat et al., 1993) e alterando il trasporto assonale (Stamer et al., 2002; Mandelkow et al., 2004). L'anormale iperfosforilazione di tau, tramite tali meccanismi, conduce a neurodegenerazione, formazione di grovigli neurofibrillari e demenza (Iqbal et al., 2005). Quindi è essenziale comprendere in che modo sia regolata la fosforilazione di tau .

L'iperfosforilazione di tau sembra essere controllata sia a livello dell'enzima che a livello del substrato (Iqbal et al., 2005). La regolazione a livello dell'enzima avviene per attivazione di una o più chinasi e declina per attivazione di una o più fosfatasi. Sono stati identificati più di 25 siti differenti nei quali tau può essere fosforilata da diverse protein chinasi (Iqbal et al., 2005).

Si crede che i due principali enzimi coinvolti nell'iperfosforilazione di tau siano la chinasi ciclina-dipendente 5 (Cdk5) e la glicogeno sintetasi chinasi 3 beta (GSK-3 $\beta$ ), due chinasi serina/treonina dipendenti (Hanger et al., 1992; Ishiguro et al., 1992; Mandelkowitz et al., 1992; Paudel et al., 1993).

Cdk5 appartiene alla famiglia delle chinasi ciclina dipendenti in virtù dell'elevato grado di omologia strutturale, ma non è attivata dalle cicline (Liu e Kipreos, 2000). Piuttosto è attivata dal legame con gli attivatori p35, p39, p25 e p29 che portano all'assemblaggio di oleoenzima funzionale (Dhavan e Tsai 2001). Gli attivatori p25 e p29 derivano dal clivaggio calpaina-dipendente rispettivamente di p35 e p39, che si assemblano a formare un oleoenzima funzionale. La deregolazione dell'attività di Cdk5 tramite degradazione proteolitica di p35 a p25, con conseguente iperattivazione di Cdk5 è coinvolta in disordini neurodegenerativi (Patrick et al., 1999; Lee et al., 2000; Patzke e Tsai, 2002; Tseng et al., 2002).

La Cdk5 nella malattia di Alzheimer è attivata dallo stress ossidativo e la sua attivazione determina iperfosforilazione di tau (de la Monte et al., 2000; Lee et al., 2000; Hashiguchi et al., 2002). In particolare, agisce determinando iperfosforilazione dei neurofilamenti ad elevato peso molecolare. È stato inoltre dimostrato che p25 si accumula nel cervello di pazienti affetti dalla

malattia di Alzheimer e induce iperfosforilazione della proteina tau e apoptosi in colture neuronali (Patrick et al., 1999).

Si ritiene che Cdk5 possa indurre direttamente l'iperfosforilazione di tau in determinati siti e che possa mediarne la fosforilazione in altri tramite regolazione di GSK-3 $\beta$ . Il derivato purinico roscovitina (2-(1-etil-2-idrossi-etilamino)-6-benzilamino-9-isopropilpurina) è un importante inibitore delle chinasi ciclina dipendenti, che agisce impedendo in maniera competitiva il legame dell'ATP alla sua tasca di legame sull'enzima (De Azevedo et al. 1997).

GSK-3 $\beta$  genera fosfo-epitopi su tau associati con patologie e co-localizza con la tau iperfosforilata (Ishizawa et al., 2003). Esperimenti condotti in modelli animali hanno dimostrato che l'iperespressione della chinasi GSK-3 $\beta$  porta a neurodegenerazione, iperfosforilazione di tau (Brownlee et al., 1997; Spittaels et al., 1999) e deficit comportamentale (Hernandez et al., 2002). A ciò va aggiunto che la somministrazione dell'inibitore di GSK-3 $\beta$ , cloruro di litio, determina una riduzione della neurodegenerazione e della fosforilazione di tau se utilizzato nelle fasi precoci della patologia (Engel et al., 2006; Noble et al., 2005). Gli ioni litio inibiscono l'attività della GSK-3 $\beta$ , tramite competizione con gli ioni magnesio, ma non con l'ATP o con il substrato (Ryves e Harwood, 2001).

La regolazione a livello del substrato avviene ad opera della struttura di tau. In particolare, si è visto che isoforme di tau con due inserti amino-terminali sono maggiormente suscettibili alla fosforilazione da parte di Cdk5 seguita da fosforilazione da parte di GSK-3 $\beta$  (Sengupta et al., 1997). Infatti delle proteine tau si conoscono diverse isoforme ottenute dallo splicing

alternativo di 11 esoni nel cromosoma 17 (17q21). Le isoforme del sistema nervoso centrale sono prodotte dallo splicing dell'esone 2, 3 e 10; questo produce sei isoforme di tau in un range che va da 352 a 441 aminoacidi. La variabilità è in relazione sia con la porzione carbossi-terminale sia con quella amino-terminale della molecola.

### **1.3 COINVOLGIMENTO DELLA GLICOPROTEINA DICKKOPF-1 NELL'IPERFOSFORILAZIONE DELLA PROTEINA TAU**

Nell'uomo l'esposizione cronica ad ecstasy produce lo sviluppo di sintomi neurologici, quali anomalie elettroencefalografiche ed alterazioni cognitive, la cui base neuroanatomica non risiede nella circuitistica dei gangli della base. Tali effetti potrebbero ricondursi al concomitante uso di altre sostanze o all'ipertermia indotta dall'MDMA ma anche ad un'azione neurotossica diretta a regioni extrastriatali. Uno studio recente ha dimostrato che gli effetti di sensitizzazione comportamentale e le progressive modificazioni elettroencefalografiche indotti nel topo dal trattamento cronico con MDMA sono associati a degenerazione neuronale ippocampale. Nello studio presente questo tipo di osservazione è stata estesa alla valutazione nel cervello di topi trattati con MDMA della glicoproteina Dickkopf-1 (Dkk-1). Studi recenti dimostrano, infatti, che l'induzione di tale proteina può costituire un evento chiave causale nello sviluppo della morte neuronale ischemica ed eccitotossica (Cappuccio et al., 2005). In virtù di questo ruolo ne abbiamo valutato l'espressione come marker di vulnerabilità neuronale.

Dkk-1 è una glicoproteina secreta che agisce come antagonista selettivo della via canonica di Wnt interagendo con le lipoproteine a bassa densità legate ai recettori (LRP) 5 e 6, che sono anche i recettori delle glicoproteine Wnt .

Nella via “canonica” di Wnt, le glicoproteine Wnt si legano al recettore a 7 domini transmembrana Frizzled, ed a LRP5/6, promuovendo una cascata di eventi intracellulari che inibiscono l’attività della glicogeno sintetasi chinasi  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ) e prevengono la fosforilazione e ubiquitinazione, e quindi la degradazione, della  $\beta$ -catenina (Willert e Nusse, 1998). Di conseguenza la  $\beta$ -catenina migra nel nucleo cellulare dove può svolgere il suo ruolo fisiologico che consiste nel promuovere la trascrizione di geni importanti per l’omeostasi e la sopravvivenza neuronale.

Dkk-1 agisce legandosi ad LRP e quindi impedisce l’interazione di questo con le proteine Wnt (Zorn, 2001; Mao et al., 2002; Grotewold e Ruther, 2002a e b, Huelsken e Behrens, 2002).

Dkk-1 ha un ruolo prevalente nel corso dello sviluppo ed è espressa a livelli molto bassi in cervelli adulti (Diep et al., 2004). La sua espressione aumenta in risposta ad eventi che causano danni al DNA poiché è regolata trascrizionalmente da p53 (Wang et al., 2000), la cui espressione è associata con riparazione del DNA o esecuzione di un piano di morte cellulare apoptotica. Dunque l’induzione di Dkk-1 potrebbe rappresentare una componente della sequenza di eventi che conducono alla morte neuronale (Caricasole et al., 2003).

Dkk-1 e Dkk-4 inibiscono la via canonica Wnt/Frizzled/GSK- $3\beta$ / $\beta$ -catenina formando un complesso ternario con LRP6 e i recettori di membrana Kremen1/2 e quindi promuovendo l’endocitosi dei corecettori di Wnt LRP6

(Mao et al., 2002). L'inibizione della via di Wnt da parte di Dkk-1 contribuisce all'esecuzione del programma di morte cellulare e alla fosforilazione della proteina tau in neuroni trattati con  $\beta$ -amiloide (Caricasole et al., 2004). L'idea che Dkk-1 possa promuovere la morte cellulare è supportata dalla scoperta che la sua overespressione sensibilizza cellule cerebrali tumorali all'apoptosi a seguito di danni alchilativi al DNA (Shou et al., 2002).

Una delle conseguenze del danneggiamento della via di Wnt è un'aumentata degradazione della  $\beta$ -catenina risultante dalla disinibizione di GSK-3 $\beta$  (Kim et al., 2003; Levina et al., 2004). Ciò priva i neuroni del supporto trofico fornito dal programma genico portato avanti dalla  $\beta$ -catenina (Willert e Nusse, 1998). Dkk-1 potrebbe alleviare l'inibizione esercitata dalla via di Wnt sull'attività di GSK-3 $\beta$ , portando alla fosforilazione della  $\beta$ -catenina che è degradata dal complesso ubiquitina/proteosoma e non è quindi più disponibile per la traslocazione nucleare (Aberle et al., 1997). Alternativamente la  $\beta$ -catenina può essere fosforilata da GSK-3 $\beta$  nel nucleo (Bijur e Hope, 2003). Oltre che promuovere la degradazione della  $\beta$ -catenina, l'inibizione della via di Wnt da parte di Dkk-1 potrebbe anche promuovere la fosforilazione della proteina tau mediata da GSK-3 $\beta$  con conseguente danneggiamento delle dinamiche citoscheletriche (Caricasole et al., 2004).

Infatti la proteina tau è un costituente essenziale dei microtubuli e l'anomala struttura ne impedisce la polimerizzazione causando, da un lato, il suo addensamento in grovigli insolubili e, dall'altro, la mancata sintesi dei microtubuli e la perdita delle funzioni ad essi legate, in particolare il trasporto di sostanze da una parte all'altra della cellula.



Nel nostro studio abbiamo dimostrato una possibile correlazione tra la fosforilazione della proteina tau ed il danno citoscheletrico neuronale che potrebbe essere alla base dei disturbi cognitivi presenti negli abusatori cronici di MDMA.

## **2. SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo di questo studio consiste nel valutare il coinvolgimento delle aree limbiche nel danno indotto dall'MDMA e la presenza di alterazioni cognitive, biochimiche e comportamentali in topi trattati con MDMA, in acuto ed in cronico.

Questa caratterizzazione si è basata sulla valutazione dello stress ossidativo dal momento che è stato proposto nella parte introduttiva che gli agenti causali della degenerazione a lungo termine indotta da MDMA siano i suoi metaboliti che generano radicali liberi, associati con stress ossidativo e danneggiamento delle membrane (Colado et al., 1993; Paris e Cunnigham, 1992); sulla valutazione, in particolar modo nell'ippocampo rispetto ad altre aree, dello stato di fosforilazione della proteina tau e delle vie coinvolte in questo fenomeno tra cui la glicoproteina Dkk-1 valutazioni effettuate in relazione al loro coinvolgimento nello sviluppo di patologie neurodegenerative e nello sviluppo delle demenze.

## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 Animali**

Gli esperimenti sono stati condotti su topi C57/BL6 maschi di 10 settimane di vita (Charles River, Calco, CO, Italia) o topi omozigoti per un allele ipomorfico di Dkk-1 (topi *doubleridge*) (gentilmente forniti da M.H. Meisler, Università di Michigan, USA) usando topi C3H come controlli wild-type (Charles River, Calco, CO, Italia). I topi *doubleridge* sono mutanti inserzionali privi di un enhancer trascrizionale nel gene per Dkk-1 (MacDonald et al., 2004). Tutti i topi sono stati tenuti in condizioni ambientali controllate (temperatura ambiente = 22° C, umidità = 40%) in un ciclo luce/buio di 12 ore con cibo ed acqua ad libitum. Gli esperimenti sono stati condotti seguendo le Linee Guida per la Cura e l'Uso degli Animali dell'Istituto Nazionale di Sanità.

### **3.2 Strategie sperimentali: protocolli di somministrazione di MDMA**

In tutti gli esperimenti gli animali sono stati trattati, sia acutamente che ripetutamente, con MDMA. Il trattamento acuto consisteva di due somministrazioni consecutive intraperitoneali (i.p.) di 25 mg/kg di MDMA cloridrato racemico (iniettati a due ore di intervallo). La dose cumulativa di 50 mg/kg corrisponde a 42 mg/kg di MDMA base libera. In alternativa i topi sono stati trattati per 6 giorni con due somministrazioni consecutive intraperitoneali (i.p.) di 15 mg/kg di MDMA cloridrato racemico (iniettati a due ore di intervallo). La dose cumulativa di 30 mg/kg corrisponde a 23.5 mg/kg di MDMA base libera al giorno per sei giorni.

Queste dosi sono state selezionate sapendo che i consumatori assumono da 80 a 250 mg di MDMA al giorno, e che l'equivalente dose parenterale negli animali può essere calcolata secondo la relazione  $D_{\text{uomo}} = D_{\text{animale}} (W_{\text{uomo}}/W_{\text{animale}})^{0.7}$  dove D è la dose della droga in mg e W è il peso corporeo in

kg (Green et al., 2003). Secondo questa relazione le dosi selezionate nel topo sono approssimativamente equivalenti ad una dose acuta di 217 mg o 130 mg giornalieri per 6 giorni in un uomo di 70 kg. I topi di controllo sono stati trattati esclusivamente con salina. Tutti i topi sono stati sacrificati per decapitazione in tempi differenti (da 1 a 7 giorni dopo il trattamento acuto con MDMA e da 1 giorno a 3 mesi dopo iniezioni ripetute di MDMA).

In un ulteriore ciclo di esperimenti l'MDMA (25 mg/Kg x 2 i.p. = 50 mg/Kg) è stato somministrato a topi ipomorfici per Dkk-1 (topi *doubleridge*; n = 6) usando topi C3H come linea wild-type. Gli animali di controllo sono stati sottoposti a due iniezioni consecutive di salina (a distanza di 2 h). I topi *doubleridge* e C3H sono stati sacrificati mediante decapitazione 1 giorno dopo il trattamento con MDMA o salina.

Infine, l'MDMA (25 mg/Kg x 2 i.p. = 50 mg/Kg) è stato iniettato in topi pre-trattati con cloruro di litio (1 mEq/kg, i.p. ogni dodici ore iniziando 7 giorni prima del trattamento con MDMA) e/o pre-trattati con l'inibitore dell'enzima Cdk5, roscovitina (30 nmol/2µl di DMSO 50%, i.c.v. due volte, 30 minuti prima di ognuna delle due iniezioni consecutive di MDMA). I topi di controllo sono stati trattati con salina (i.p.) (due iniezioni consecutive a distanza di 2 h) in topi pre-trattati i.p. con salina (ogni 12 ore a partire da 7 giorni prima del trattamento con salina) e/o pre-trattati *i.c.v.* con DMSO 50% (2µl, i.c.v., 30 minuti prima di ognuna delle due consecutive iniezioni di salina). Tutte le iniezioni *i.c.v.* sono state effettuate mediante l'impianto di una cannula guida, con chirurgia stereotassica, in animali anestetizzati con ketamina (100 mg/Kg) + xilazina (10 mg/Kg), i.p., utilizzando le seguenti coordinate; AP -0.8 mm; ML 1.4 mm; DV -2.4 mm dal cranio dell'animale,

secondo l'atlante Paxinos e Franklin, 1997. Tutti gli animali sono stati sacrificati per decapitazione 1 giorno dopo il trattamento con MDMA o salina.

I cervelli prelevati sono stati utilizzati per l'analisi istologica-immunoistochimica e biochimica. Da ciascun cervello sono stati separati i due emiencefali, uno è stato fissato in Carnoi (miscela di Etanolo/Ac.acetico/Cloroformio in proporzione 6:1:3), incluso in paraffina, sezionato a 10  $\mu\text{m}$  e processato per analisi istologica-immunoistochimica; l'altro emiencefalo è stato micro dissezionato e sono state prelevate le aree cerebrali di interesse (ippocampo e striato) e le proteine sono state processate per l'analisi Western blot.

### **3.3 Quantificazione della produzione di radicali liberi mediante microdialisi in striato, ippocampo e corteccia di animali trattati con MDMA**

Topi C57/BL6 maschi di 10 settimane (Charles-River) sono stati utilizzati per misurare la produzione di radicali liberi in diverse aree cerebrali (striato, ippocampo e corteccia frontale) indotta dal trattamento sistemico con MDMA (25 mg/Kg x 2 i.p. = 50 mg/Kg). A tal fine è stata utilizzata la tecnica della microdialisi eseguita in animali consci e liberi di muoversi. Ai topi è stata impiantata una guida intracerebrale da microdialisi (CMA/7 Cannula Guida, CMA/Microdialisi, Stoccolma, Svezia) in anestesia con Ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg, i.p.), utilizzando un apparato stereotassico di Kopf. L'analisi è stata eseguita selezionando tre siti di impianto alternativi: lo striato sinistro (coordinate: 0.6 mm anteriormente al bregma, 1.7 mm lateralmente alla linea mediana, 2.5-4.5

mm ventralmente rispetto alla superficie del cranio); l'ippocampo sinistro (coordinate: 3.0 mm posteriore al bregma, 2.8 mm lateralmente alla linea mediana, 2.0-4.0 mm ventralmente rispetto alla superficie del cranio) o la corteccia frontale (coordinate: 1.8 mm anteriormente al bregma, 2.2 mm lateralmente alla linea mediana, 1.8-3.8 mm ventralmente rispetto alla superficie del cranio). Le coordinate riportate sono state ricavate in accordo all'atlante di Paxinos e Franklin (1997). Dopo l'operazione, i topi sono stati sistemati in gabbie differenti in un ambiente a temperatura controllata con un ciclo luce/buio di 12 ore, con libero accesso ad acqua e cibo, ed è stato permesso loro di riprendersi per quattro giorni. Il giorno prima dell'esperimento, un probe è stato inserito nella guida intracerebrale e i topi sono stati trasferiti in una gabbia di plastica con un braccio mobile (CMA/120 Sistema per animali liberi di muoversi, CMA/ Microdialisi, Stoccolma, Svezia) con libero accesso ad acqua e cibo. E' stato utilizzato un probe da microdialisi verticale concentrico lungo 2 mm, e del diametro di 0.24 mm avente una membrana di cuprophane con un cut-off molecolare di 6,000 Daltons (CMA/7 probe per Microdialisi, CMA/Microdialisi, Stoccolma, Svezia). Il probe è stato continuamente perfuso con liquido cerebro-spinale artificiale (ACSF), ad un flusso di 1.5  $\mu$ l/min, attraverso l'utilizzo di una pompa da microinfusione (Sistema Inc. Bioanalitico, Ovest Lafayette, Indiana, USA). La mattina seguente, sono state raccolte le frazioni ogni 20 minuti contenenti 30  $\mu$ l di perfusato mediante l'utilizzo di un collettore di frazioni (CMA/ 142 Microfraction Collector, CMA/Microdialisi, Stoccolma, Svezia). Dopo la raccolta di tre frazioni, usate per determinare i livelli basali di radicali liberi (ROS), i topi sono stati

sottoposti a due somministrazioni sistemiche MDMA (25 mg/kg, i.p. x 2 i.p. = 50 mg/Kg) e le frazioni sono state raccolte per le successive 2 ore seguenti ad ogni singola iniezione di MDMA. La formazione di specie reattive dell'ossigeno è stata esaminata monitorando i livelli dell'acido 2,3-diidrossibenzoico (2,3-DHBA), prodotto dalla reazione dell'acido salicilico (aggiunto a ACSF alla concentrazione di 5 mM) con i radicali liberi. L'analisi è stata effettuata mediante un sistema HPLC accoppiato ad un detettore elettrochimico. Venti  $\mu$ l del perfusato sono stati iniettati nell'HPLC equipaggiato con una colonna analitica a fase inversa a C-18 mantenuta a 30 gradi centigradi (Ultrasfera ODS 5  $\mu$ m sferica, 80 Å poro, 250 mm  $\times$  4.6 mm, Beckman Instruments) e di un detettore elettrochimico (ESA, Inc., Chelmsford, MA, USA). I potenziali di ossidoriduzione erano settati a + 350 and - 350 mV per la detezione dell'acido 2,3-DHBA. La fase mobile utilizzata era costituita da sodio fosfato (80 mM), acido citrico (40 mM), EDTA (0.4 mM), acido 1-eptansulfonico (3 mM) e metanolo (12.5%) a un pH 2.75 con acido fosforico (corsa in condizioni isocratiche, 1 ml/min).

### **3.4 Analisi istologica e quantitativa**

Per valutare la possibile degenerazione neuronale le sezioni sparaffinate (10  $\mu$ m) sono state processate per colorazione con la tionina (colorazione Nissl). Dopo lavaggi in acqua distillata, le sezioni sono state incubate per 8 minuti in tionina. Per valutare il danno ippocampale, il numero di neuroni sopravvissuti nello strato di cellule piramidali è stato contato con un metodo non stereologico per la valutazione della densità neuronale (neuroni per  $\text{mm}^3$  di tessuto,  $N_v$ ) utilizzando la formula seguente:  $N_v = NA / (t + D)$ , dove NA è il

numero di neuroni per  $\text{mm}^2$  di tessuto,  $t$  è lo spessore della sezione, e  $D$  è il diametro del neurone (Abercrombie, 1946). I neuroni di forma rotonda simile a quella comunemente osservata nelle sezioni di controllo sono stati considerati vitali. È stata anche valutata la presenza di morte neuronale, tramite colorazione Fluoro-Jade B che marca i neuroni in degenerazione come fluorescenza verde (Schmued et al., 1997; Schmued and Hopkins, 2000). A tal fine, le sezioni sparaffinate ( $10\ \mu\text{m}$ ) sono state incubate 30 minuti in una soluzione di acido acetico allo 0.1% (v/v) contenente lo 0.001% (w/v) di Fluoro-Jade B e successivamente analizzate mediante un microscopio a fluorescenza.

Per la valutazione della presenza di frammentazione del DNA, sono state usate sezioni sparaffinate di  $10\ \mu\text{m}$  e processate per il TUNEL labeling utilizzando il kit In situ cell Death detection, POD (Roche Applied Science, Mannheim, Germania).

### **3.5 Analisi immunoistochimica**

I cervelli prelevati sono stati fissati in Carnoi, inclusi in paraffina e sezionati a  $10\ \mu\text{m}$ . Le sezioni sono state sparaffinate mediante immersione in xilene per 40 minuti ed immerse in soluzioni di etanolo successive (dal 100% al 70%) fino all'immersione in acqua distillata per 6 min. Eliminata la paraffina, sono state immerse in perossido di idrogeno al 3% per bloccare l'attività delle perossidasi endogene. L'immunoistochimica è stata eseguita con tecnica immunoperossidasi basata sul metodo del complesso avidina-biotina (ABC elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). I campioni sono stati incubati per 12 ore con un anticorpo monoclonale di

topo anti-proteina fibrillare acida gliale (GFAP) (1:400, Signa Aldrich, Milano, Italia) e poi per 1 ora con l'anticorpo biotinilato anti-IgG di topo (1:200; Vector Laboratoires, Burlingame, CA, USA); con l'anticorpo di coniglio anti-fosfo-tau (pSer<sup>404</sup>) (P-tau, 1:100, Signa Aldrich, Milano, Italia) e poi per 1 ora con l'anticorpo secondario biotinilato anti-IgG di coniglio (1:200; Vector Laboratoires, Burlingame, CA, USA); con l'anticorpo monoclonale di topo anti-PHF tau (PHF-1, 1:100; pSer<sup>396</sup> e pSer<sup>404</sup> gentilmente fornito dal professor Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA) e poi per 1 ora con l'anticorpo biotinilato anti-IgG di topo (1:200; Vector Laboratoires, Burlingame, CA, USA); con l'anticorpo monoclonale di ratto anti-Dkk-1 (Dkk-1, 1:10; R&D System Inc. Minneapolis, MN, USA) e poi per 1 ora con l'anticorpo biotinilato anti-IgG di ratto (1:200; Vector Laboratoires, Burlingame, CA, USA). Per quanto riguarda l'immunisto chimica per Dkk-1 la procedura ha richiesto un passaggio di smascheramento antigenico eseguito mediante l'incubazione delle sezioni in tampone citrato (10 mM, pH 6) riscaldato in forno a microonde a 350 W per 10 minuti. Come sistema di rivelazione è stata utilizzata la 3,3'-diamminobenzidina (DAB) come substrato perossidasi. La colorazione di controllo è stata eseguita senza gli anticorpi primari. L'immunopositività per P-tau e PHF tau è stata quantificata misurando la densità ottica della regione CA2/CA3 ipocampale in sezioni colorate usando un sistema applicato ad un software di immagine (NIH Image Software, Bethesda, MD, USA).

### **3.6 Analisi Western blot**



I tessuti di topo sono stati omogeneizzati a 4° C in un tampone di lisi con un omogeneizzatore Teflon-glass (1700 rev/min). 5 µl di tessuto sono stati utilizzati per la determinazione delle proteine, 50 µg di proteine sono stati risospesi nel tampone riducente SDS-blu di bromofenolo e utilizzati per la determinazione delle proteine. Le analisi tramite Western blot sono state condotte utilizzando gel di poliacrilamide con SDS (10% per P-tau e PHF tau, 15% per la proteina Dkk-1, e 12% per le proteine p35/p25) e corso su un apparato minigel o maxigel (Biorad, Mini o Maxi Protean II Cell; Biorad, Milano, Italia), l'elettroblotting del gel è stato eseguito su una membrana Immunblot PVDF (Biorad, Italia) per un'ora utilizzando un sistema di elettroblotting semi-asciutto (Biorad, Trans-blot system SD) e i filtri sono stati bloccati overnight in un tampone TTBS (100 mM Tris-HCl; 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) contenente 5% di latte in polvere non grasso, per la proteina fosforilata la soluzione bloccante conteneva 3% di BSA e 2% di latte in polvere non grasso.

I blots per le proteine fosforilate sono stati incubati per 1 h a temperatura ambiente con l'anticorpo primario policlonale di coniglio anti-P-tau (0.5 µg/ml, Oncogene, DBA, Italia) e con l'anticorpo monoclonale di topo anti-PHF-tau (PHF-1 pSer<sup>396</sup> e pSer<sup>404</sup>, 1 µg/ml, fornito dal professor Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA).

I blots per Dkk-1, Cdk5 e p35/25 sono stati incubati O/N a 4°C con i rispettivi anticorpi: policlonale di capra anti-Dkk-1 (2 µg/ml, R&D System), monoclonale di topo anti-Cdk5 (1 µg/ml, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), policlonale di coniglio anti-p35/25 (2 µg/ml, Santa Cruz

Biotechnology, Tebu, France). I blots per la  $\beta$ -actina (anticorpo monoclonale di topo; Sigma) sono stati incubati per 1 h a temperatura ambiente (1:60,000).

I blots per GSK-3 $\beta$  e Phospho-GSK-3 $\beta$  (P-GSK-3 $\beta$ ) sono stati incubati O/N a 4°C con i rispettivi anticorpi: monoclonale di topo anti-GSK-3 $\beta$  (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, France), policlonale di coniglio anti-P-GSK-3 $\beta$  (1:1000, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA). I filtri sono stati lavati per tre volte in tampone TTBS e quindi incubati con il relativo anticorpo secondario legato alla perossidasi per 1 h in TBS (anti-coniglio 1:7,000; anti-topo, 1:7,000; o anti-capra 1:2,000; Calbiochem, DBA, Italia).

La marcatura immunologica è stata rilevata tramite chemiluminescenza indotta (Amersham Biosciences, Milano, Italia). L'analisi densitometrica è stata condotta misurando l'intensità della banda. I risultati sono espressi in unità arbitrarie di densità ottica.

### **3.7 Valutazione dell'attività enzimatica di GSK-3 $\beta$**

La valutazione dell'attività di GSK-3 $\beta$  è stata effettuata per trasferimento del fosforo radioattivo ( $^{32}\text{P}$ ) dal [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP ad un peptide substrato usando un kit specifico (Sigma). La chinasi è stata precipitata da un estratto di proteine ippocampali con un anticorpo anti-GSK-3 $\beta$ . La reazione è stata effettuata a temperatura ambiente e fermata 8 minuti dopo caricando 20  $\mu\text{l}$  della mistura su fogli di fosfocellulosa P81, dopo una serie di lavaggi la radioattività è stata valutata mediante il beta counter (model SL 3801; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

### **3.8 Valutazione dell'attività enzimatica di Cdk5**

Il lisato tissutale contenente 500 µg di proteine è stato diluito in tampone di lisi in un volume di 500 µl e prechiarificato con 50 µl di biglie di proteina A (beads) (50% di tampone di lisi; Santa Cruz Biotechnology) a 4°C per 2 ore. La Cdk5 è stata immunoprecipitata con 5 µg di anticorpo anti-Cdk5. L'immunoprecipitato è stato lavato con tampone di lisi e con tampone chinasi (20 mM Tris HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10 µM NaF, e 1 µM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>) e risospeso in 30 µl di acqua. Sono poi stati aggiunti dieci µl di mix chinasi [100 mM Tris HCl, pH 7.4, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 50 µM NaF, 5 µM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 5 mM DTT, e 50 µM NF-H peptide (VKSPAKEKAKSPVK; Sigma Genosys, Milano)] a 30 µl di immunoprecipitato. L'attività chinasi è stata valutata aggiungendo 5 µCi di [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP (attività specifica, 3 Ci/mmol, GE Healthcare). La specificità dell'attività è stata confermata in presenza di roscovitina (10 µM). La reazione è stata quindi bloccata aggiungendo 20 µl di acido tricloroacetico (10%) a 20 µl di miscela di reazione e il tutto è stato quindi caricato su fogli di fosfocellulosa P81. L'attività della chinasi è stata valutata al beta counter.

### **3.9 Test water maze di Morris**

Il test water maze è stato condotto come descritto da Morris (1984). L'apparato sperimentale consisteva in un recipiente circolare (diametro, 97 cm; altezza 60 cm) contenente acqua a 24 ± 1° C. La piattaforma bersaglio (diametro 10 cm) era sommersa 1 cm al di sotto della superficie dell'acqua ed era piazzata nel punto centrale di un quadrante. La piattaforma era localizzata in una posizione fissa, equidistante dal centro e dalle pareti della piscina. La piscina era situata in una stanza di test contenente vari riferimenti visivi fissi.

La sessione di acquisizione training è stata condotta 30 giorni dopo iniezioni ripetute di MDMA (30 giorni dopo l'ultima delle dosi di 30 mg/kg ripetute giornalmente per 6 giorni). Ogni topo è stato sottoposto ad una sessione giornaliera comprendente 5 prove per 4 giorni successivi (giorni 1-3) durante i quali gli animali sono stati lasciati nella vasca liberi di nuotare fino alla piattaforma di fuga. Se un animale non trovava la piattaforma in un periodo di 60 s vi era delicatamente guidato. Agli animali era consentito di rimanere sulla piattaforma per 20 s dopo averla raggiunta. I punti di inizio variavano in maniera pseudo-casuale. La sessione di probe è stata effettuata rimuovendo la piattaforma dalla vasca e lasciando il topo libero di nuotare per 60 s nella vasca. Il tempo impiegato dall'animale a raggiungere la piattaforma è stato registrato e preso come indice inversamente proporzionale alla capacità di apprendimento spaziale. Un tempo di latenza lungo tra l'immersione e il raggiungimento della piattaforma è stato interpretato come mancata memorizzazione del percorso eseguito nelle prove precedenti.

## **4. RISULTATI**

### **4.1 Quantificazione tramite microdialisi della formazione di radicali liberi**

La formazione di radicali liberi (ROS) è stata valutata, mediante microdialisi, in topi consci e liberi di muoversi trattati con MDMA (due dosi successive di 25 mg/kg, i.p.), attraverso la determinazione dei livelli di acido 2,3 diidrossibenzoico (2,3-DHBA), ottenuto dall'acido salicilico presente nel perfusato. Il trattamento con MDMA ha indotto un immediato aumento di ROS

nell'ippocampo, ma, non ha avuto lo stesso effetto nello striato o nella corteccia cerebrale (Figura 1).

#### **4.2 Il trattamento con MDMA non causa morte neuronale nell'ippocampo**

È stato valutato se il trattamento con MDMA potesse causare morte neuronale, attraverso un'analisi istologica eseguita mediante colorazione di Nissl e Fluoro Jade B (Figura 2). Non è stato, evidenziato nessun segno di morte neuronale, nella finestra temporale esaminata (fino a sette giorni dopo un trattamento acuto con MDMA, alla dose cumulativa di 50 mg/kg o fino a novanta giorni dopo un trattamento di sei giorni con MDMA, alla dose cumulativa di 30 mg/kg/giorno, i.p.). Inoltre, la colorazione con Fluoro Jade B non ha evidenziato la presenza di cellule in degenerazione in tutti i campi microscopici esaminati.

#### **4.3 Il trattamento con MDMA determina gliosi reattiva nell'ippocampo**

Nonostante la mancanza di morte neuronale, abbiamo trovato una consistente gliosi reattiva nell'ippocampo di topi trattati con MDMA che molti autori associano a danno cellulare. La gliosi reattiva nell'ippocampo era transitoria in risposta ad un trattamento acuto con MDMA (osservabile tre giorni dopo il trattamento) (Figura 3) e permaneva per più di 90 giorni in seguito ad un trattamento ripetuto per 6 giorni (Figura 4). Infine, la somministrazione di MDMA non provocava attivazione gliale nello striato (Figure 3, 4).

#### **4.4 Il trattamento con MDMA causa iperfosforilazione della proteina tau ippocampale.**

È stata effettuata l'analisi semi-quantitativa della tau fosforilata attraverso immunoblotting della tau fosforilata usando sia un anticorpo policlonale che riconosce la proteina tau fosforilata in Ser<sup>404</sup> (P-tau) che un anticorpo monoclonale PHF-1 che riconosce la proteina tau fosforilata in Ser<sup>396</sup> e Ser<sup>404</sup> (PHF tau). Il trattamento acuto con MDMA induce un aumento transitorio sia dei livelli di PHF tau che di P-tau nell'ippocampo, visualizzabile dopo un giorno per tornare a livelli normali dopo tre giorni (Figura 5). Un trattamento prolungato con MDMA ha indotto l'incremento sia dei livelli di PHF tau che di P-tau ippocampale, visualizzabile fino a sette giorni dopo l'ultimo trattamento ma non più visualizzabile a 45 e 90 giorni dopo (Figura 6). Un incremento nei livelli di tau è visualizzabile sette giorni dopo un trattamento cronico a bassa dose di MDMA (10 mg/kg/die, dati non mostrati). L'analisi immunoistochimica di espressione ippocampale di P-tau e di PHF tau (Figure 8 e 9) ha confermato il profilo temporale di induzione della fosforilazione della proteina tau. Lo studio condotto su base morfologica ha consentito, inoltre, di osservare che l'aumento nella fosforilazione di tau indotta dall'MDMA è regionalizzato in maniera specifica nello strato radiato della regione CA2 e nello strato lucido e radiato della regione CA3. Il profilo temporale di incremento di P-tau e PHF tau visualizzato in immunoistochimica è stato confermato dall'immunoblotting. Un aumento transitorio dei livelli di PHF tau e di P-tau, inoltre, è stato indotto dal trattamento con MDMA nello striato, ma è stato osservato, mediante immunoblotting, solo in seguito a un trattamento prolungato con MDMA (una dose cumulativa di 30 mg/kg/giorno

per sei giorni) e per un tempo molto ristretto (solo 1 giorno dopo l'ultimo trattamento) (Figura 7). Il trattamento acuto con MDMA non ha indotto alcun incremento striatale dei livelli di PHF tau o di P-tau (dato non mostrato).

#### **4.5 Caratterizzazione delle vie molecolari coinvolte nella fosforilazione di tau dopo trattamento con MDMA**

La glicogeno sintetasi chinasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) e Cdk5 sono i due principali enzimi coinvolti nella fosforilazione della proteina tau (Yamaguchi et al., 1996, Pei et al., 1997; 1998; 1999). L'attività dell'enzima GSK-3 $\beta$  è modulata negativamente dalla via canonica di Wnt, la cui funzione è inibita da Dkk-1, una glicoproteina secreta. L'espressione della proteina Dkk-1 è stata dimostrata nel tessuto cerebrale di pazienti con malattia di Alzheimer, ed è la sua induzione è correlata causalmente alla fosforilazione della tau in neuroni in coltura trattati con  $\beta$ -amiloide (Caricasole et al., 2004). In base a queste osservazioni, è stata quindi valutata l'espressione di questa proteina nei topi trattati con MDMA. Il trattamento acuto ha condotto ad un incremento dell'espressione di Dkk-1 nell'ippocampo ad 1 e 3 giorni, in maniera simile all'incremento osservato per la fosforilazione della tau. Un maggior incremento è stato riscontrato dopo un trattamento cronico con MDMA, da un giorno fino a sette giorni dopo l'MDMA (Figura 10). L'analisi immunostochimica ha inoltre dimostrato che l'induzione di Dkk-1 è localizzata preferenzialmente nelle regioni CA2/CA3, in maniera particolare nello strato delle cellule piramidali, sia intracellularmente che extracellularmente (Figura 10). Per quanto riguarda lo striato, un lieve aumento nella espressione della proteina

è stato osservato esclusivamente nei primi tre giorni che seguono un trattamento di 6 giorni con MDMA (dati non mostrati). Questi dati mostrano che l'MDMA causa una inibizione transiente della via canonica di Wnt attraverso l'induzione di Dkk-1. Questa ipotesi è stata supportata misurando l'attività enzimatica di GSK-3 $\beta$  nell'ippocampo degli animali trattati con una singola somministrazione di MDMA (25 mg/kg x2 i.p.). L'attività dell'enzima aumenta ad un giorno dopo una singola iniezione per tornare a livelli normali a tre giorni, quando l'espressione di Dkk-1 è ancora incrementata (Figura 11). È interessante notare come i livelli di GSK-3 $\beta$  fosforilata in Ser<sup>9</sup>, appaiono incrementati a 3 e 7 giorni dalla somministrazione di MDMA ma non ad 1 giorno, suggerendo una complessa regolazione tempo-dipendente dell'attività di GSK-3 $\beta$  in risposta all'MDMA.

È stata anche esaminata l'espressione, di Cdk5 e dei suoi partner proteici p35, e il prodotto della degradazione di p35, p25 (Hisanaga e Saito, 2003) che è responsabile di una sostanziale attivazione di Cdk5. L'analisi western blot dell'espressione di queste proteine nell'ippocampo mostra un aumento progressivo ad 1 e 3 giorni dopo un trattamento acuto. L'incremento era ridotto, ma ancora presente, dopo 7 giorni (Figura 12). In topi trattati per 6 giorni con MDMA, i livelli sia di p25 che di p35 erano aumentati nell'ippocampo 7 giorni dopo l'ultima iniezione. Nessun incremento venne riscontrato dopo 90 giorni. Al contrario i livelli di Cdk5 mostravano soltanto un debole incremento ad 1 e 3 giorni dopo il trattamento (Figura 13).



Per esaminare la possibile relazione tra l'inibizione indotta da Dkk-1 della via di Wnt, l'attivazione della Cdk5 e la fosforilazione della tau, sono stati utilizzati topi *doubleridge*, ovvero topi geneticamente modificati (mutanti inserzionali), che mostrano la perdita di un enhancer trascrizionale del gene Dkk1 (Adamska et al., 2003; MacDonald et al., 2004). Tali topi mostrano una normale espressione di Dkk-1 nell'ippocampo, ma la sua espressione non è indotta in seguito al trattamento con MDMA, quando essi sono comparati ai topi di controllo dello stesso ceppo (C3H) (Figure 14 e 15). Inoltre il trattamento acuto con MDMA determina fosforilazione della tau nell'ippocampo dei topi *doubleridge*, sebbene in misura minore se tali topi sono comparati ai topi di controllo (Figure 14 e 15).

È stata esaminata la relazione causale tra l'attivazione di Cdk5 e GSK-3 $\beta$  e la fosforilazione di tau mediante esperimenti di inibizione farmacologica di tali enzimi. Il trattamento con un inibitore selettivo di Cdk5, la roscovitina, 30 minuti prima di ognuna delle due consecutive dosi di MDMA, riduce l'aumento del livello sia di P-tau che di PHF tau indotti da MDMA (Figura 16). Anche il trattamento con litio, che inibisce l'enzima GSK-3 $\beta$ , riduce i livelli i livelli di P-tau e di PHF tau dopo la somministrazione di MDMA, sebbene in minor misura rispetto alla roscovitina (Figura 16). Infine, un trattamento combinato con roscovitina e litio ha abolito completamente l'incremento della fosforilazione di tau nell'ippocampo.

Nel complesso questi dati suggeriscono che l'aumento della fosforilazione di tau indotto da MDMA nell'ippocampo è mediato dall'attivazione di Cdk5 combinata con l'attivazione di GSK-3 $\beta$ .

#### **4.6 Alterazione della capacità di apprendimento spaziale nei topi trattati con MDMA**

È stata condotta una valutazione dell'apprendimento spaziale negli animali trattati per sei giorni con salina o MDMA (30 mg/kg). La valutazione è stata effettuata ad una settimana (Figura 17) ed a quattro settimane (Figura 18) dopo l'ultima somministrazione di MDMA. Il risultato di tale analisi ha evidenziato che i topi trattati con MDMA presentano una significativa alterazione nell'apprendimento, già dal secondo e terzo giorno di sessione di allenamento nel test water maze di Morris. Nel caso in cui la piattaforma era resa visibile non c'era differenza tra i topi trattati con MDMA ed i controlli (il tempo di latenza per entrambi è inferiore a 10 secondi), indicando l'assenza di deficit motorio sensoriale.

### **5. DISCUSSIONE**

Lo studio sperimentale eseguito documenta un'azione dell'MDMA nell'indurre la fosforilazione della proteina tau nell'ippocampo, associato ad una alterazione a lungo termine dell'apprendimento spaziale nel topo. Tale effetto è stato documentato a dosi che coincidono approssimativamente con i limiti massimi di dosaggio nei consumatori di MDMA (Green et al. 2003).

L'iperfosforilazione della proteina tau è alla base della formazione di filamenti accoppiati ad elica (PHF) e grovigli neurofibrillari, che fanno parte del quadro istopatologico caratterizzante la malattia di Alzheimer, la demenza fronto-temporale, e altre malattie neurodegenerative (Grundke-Iqbal et al., 1986; Iqbal et al. 1989; Lee et al., 1991). La conseguenza della iperfosforilazione della proteina tau è l'instabilità dei microtubuli con relative

alterazioni citoscheletriche responsabili di disfunzioni neuronali (Alonso et al., 1994; 2001).

L'induzione della fosforilazione di tau tramite iperattivazione di GSK-3 $\beta$  (Liu et al., 2006), iperattivazione di Cdk5 (Liao et al., 2004) o inibizione delle proteine fosfatasi (Sun et al., 2003) portano ad un danneggiamento della memoria spaziale. Inoltre, topi transgenici che esprimono una forma tronca di tau, soggetta alla fosforilazione, mostrano danneggiamento nel test Morris water maze, senza deficit nell'attività locomotoria spontanea o ansia (Hrnoka et al., 2007).

Quindi, la scoperta dell'incremento nella fosforilazione di tau nei neuroni ippocampali potrebbe contribuire a spiegare il danneggiamento dell'apprendimento indotto da MDMA. L'iperfosforilazione di tau nell'ippocampo è rapida e a breve termine dopo un trattamento acuto con MDMA, ma permane per almeno una settimana a seguito di dosi ripetute di MDMA. Ciò suggerisce che la durata dell'iperfosforilazione di tau sia correlata con la durata della somministrazione dell'MDMA.

È estremamente interessante notare che, nelle nostre condizioni sperimentali, la neurotossicità da MDMA è prevalente nell'ippocampo e, almeno, per quanto riguarda la fosforilazione di tau, ristretta alle aree ippocampali CA2 e CA3, anche se rimane ancora da chiarire la preferenzialità per queste aree. Alle dosi utilizzate in questo lavoro l'MDMA induce un consistente aumento della formazione di ROS nell'ippocampo ma non determina differenze invece in striato e corteccia cerebrale. Al contrario la somministrazione di metanfetamina determina un consistente aumento di ROS nello striato degli animali trattati (Battaglia et

al., 2002). Come altri derivati anfetaminici, l'MDMA stimola il rilascio non vescicolare di catecolamine e serotonina dopo essere stato captato dalle terminazioni nervose monoaminergiche. La neurotossicità dell'MDMA è mediata dalla formazione di ROS da diverse sorgenti, che includono la biotrasformazione di MDMA in metaboliti reattivi (Lin et al., 1997; Tucker et al., 1994; Jeng et al., 2006), e la ricaptazione della dopamina extracellulare nelle terminazioni serotoninergiche deplete, dove la dopamina è metabolizzata dalle MAO-B con formazione di perossido d'idrogeno (Montoya et al., 2002; Lyles e Cadet, 2003). C'è un'elevata densità di fibre serotoninergiche nella regione CA3 (Bjarkam et al., 2003; Szyndler et al., 2002), e un trattamento di 4 giorni con dosi neurotossiche di MDMA causa regolazione selettiva dei recettori serotoninergici 5-HT<sub>2C</sub> nella regione CA3, senza cambiamenti in altre aree ippocampali (Yau et al., 1994).

Quindi, la regione CA3 potrebbe essere un target preferenziale per MDMA a causa dell'organizzazione anatomica delle vie monoaminergiche afferenti. Una disfunzione dei neuroni CA3, causata dall'iperfosforilazione della proteina tau e dal danno citoscheletrico, potrebbe compromettere il trasferimento della memoria dal giro dentato alla regione CA1 (Gruart et al., 2006), causando il danno cognitivo indotto da MDMA.

GSK-3 $\beta$  e Cdk5 fosforilano la proteina tau in siti multipli, inclusi i due siti (Ser<sup>396</sup> e Ser<sup>404</sup>) rilevati dall'anticorpo PHF-1 (Gong et al., 2006; Liu et al., 2006; Sengupta et al., 2006). Tra le vie che regolano l'attività della GSK-3 $\beta$ , l'attenzione si è focalizzata sulla via "canonica" di Wnt poichè l'induzione dell'antagonista di Wnt, Dkk-1, è associata con la fosforilazione della proteina tau e con il danno neuronale in modelli *in vitro* ed *in vivo* di malattie

neurodegenerative (Caricasole et al., 2004; Cappuccio et al., 2005; Busceti et al., 2007).

L'interazione delle glicoproteine Wnt con i propri partner recettoriali frizzled ed LRP5/6 (low-density lipoprotein-receptor related proteins 5 e 6), innesca una cascata di eventi intracellulari che inattivano GSK-3 $\beta$  e proteggono la  $\beta$ -catenina libera dalla degradazione da parte del sistema ubiquitina proteasoma (Hinck et al., 1994; Aberle et al., 1997; Willert e Nusse, 1998). Dkk-1, che è indotto in risposta ad un danno al DNA, viene secreto extracellularmente e si lega ad LRP 5/6 impedendo il legame con Wnt (Zorn, 2001; Mao et al., 2002; Grotewold and Ruther, 2002a,b).

La somministrazione di MDMA determina un incremento dei livelli di Dkk-1 nell'ippocampo degli animali trattati con un profilo temporale simile all'incremento riscontrato per la fosforilazione di tau; l'espressione di Dkk-1 è ristretta alla regione CA3 dell'ippocampo e la marcatura immunologica prevalente nel corpo cellulare dei neuroni piramidali e nello spazio extracellulare (Cappuccio et al., 2005; Busceti et al., 2007). Questo suggerisce che Dkk-1 è prodotto dalle cellule dell'ipocampo e secreto nello spazio extracellulare. Dkk-1 è indotto dalla somministrazione di MDMA in seguito alla produzione di ROS ed al danno al DNA (Frenzilli et al., 2007) dal momento che Dkk-1 è target trascrizionale di p53 (Wang et al., 2000), che è il maggior sensore di danno al DNA nelle cellule eucariotiche (Smith e Seo, 2002; Seo e Jung, 2004).

L'altro enzima coinvolto nella fosforilazione di tau, Cdk5, è una chinasi ciclina-dipendente non mitotica coinvolta nei meccanismi di neurodegenerazione (Patrick et al., 1999, Lee et al., 2000; Patzke e Tsai,

2002, Tseng et al., 2002; Lee e Tsai, 2003). Due proteine specifiche, correlate ai neuroni, p35 e p39, sono necessarie e sufficienti per attivare Cdk5 per legame diretto (Dhavan e Tsai, 2001); p25, che è generato da clivaggio calpaina-dipendente di p35, iperattiva Cdk5 causando danno neuronale (Patrick et al., 1999, Nath et al., 2000). Topi transgenici che iperesprimono p25 mostrano neurodegenerazione e patologie associate a tau (Cruz et al., 2003).

La somministrazione di MDMA stimola l'espressione di Cdk5, p35 e p25 nell'ippocampo fornendo un'evidenza indiretta che Cdk5 sia attivato in risposta alla somministrazione sistemica di MDMA.

Utilizzando topi *doubleridge*, litio o roscovitina è possibile dimostrare una relazione causale tra attivazione di Cdk5/GSK-3 $\beta$  e fosforilazione di tau, dal momento che i topi *doubleridge* mostrano una ridotta induzione di Dkk-1 poichè sono mancanti di un enhancer trascrizionale del gene per Dkk-1 (MacDonald et al., 2004); gli ioni litio inibiscono l'attività di GSK-3 $\beta$  (Klein e Melton, 1996) ripristinando la via di Wnt a valle del blocco di Dkk-1; la roscovitina è un inibitore di Cdk con attività preferenziale su Cdk5 (Knockaert et al., 2002).

Negli animali pretrattati con litio o con roscovitina si assiste ad un ridotto incremento della fosforilazione della tau in seguito alla somministrazione di MDMA. Una combinazione di ioni litio e roscovitina ha abolito completamente la fosforilazione di tau in risposta all'MDMA. Quindi, l'attivazione sia di Cdk5 che di GSK-3 $\beta$  sono critiche per l'incremento della fosforilazione di tau indotta da MDMA (Figura 15). Se

esista una comunicazione tra queste due vie a qualche livello rimane ancora da chiarire.

È di estrema importanza la dimostrazione che la somministrazione sistemica di MDMA è in grado di indurre cambiamenti tipici dei disordini neurodegenerativi cronici associati a progressivo declino cognitivo, come la malattia di Alzheimer e la demenza fronto-temporale. Alcuni dubbi rimangono però ancora da chiarire e sono attualmente in fase di studio: (1) qual è il meccanismo primario tramite cui l'MDMA promuove la cascata di eventi intracellulari che conducono alla fosforilazione di tau; (2) se esista una relazione tra la frequenza della somministrazione di MDMA (o la dose di MDMA) ed entità, durata e diffusione della fosforilazione di tau e (3) quanto sia forte l'associazione tra la fosforilazione di tau e la compromissione dell'apprendimento spaziale nel topo.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abercrombie M (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94:239-247.

Aberle H, Baurer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997)  $\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16:3797-3804.

Adamska M, MacDonald BT, Meisler MH (2003) Doubleridge, a mouse mutant with defective compaction of the apical ectodermal ridge and normal dorsal-ventral patterning of the limb. *Dev Biol* 255:350-362.

Alonso A, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5562-5566.

Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:6923-8.

Altman HJ, Nordly DA, Ogren SO. (1984) Role of serotonin in memory: facilitation by alopreclate and zimeldine. *Psychopharmacol* 84:496-502.



Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurol* 42:631-9.

Battaglia G, Fornai F, Busceti CL, Aloisi G, Cerrito F, De Blasi A, Melchiorri D, Nicoletti F (2002) Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors is protective against methamphetamine neurotoxicity. *J Neurosci* 22:2135-2141.

Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153-63.

Bijur GN, Jope RS. (2003) Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *NeuroReport* 14:2415-2419.

Bjarkam CR, Sørensen JC, Geneser FA. (2003) Distribution and morphology of serotonin-immunoreactive axons in the hippocampal region of the New Zealand white rabbit. I. Area dentata and hippocampus. *Hippocampus* 13:21-37.

Bolla KI, McCann UD, Ricaurte GA. (1998) Memory impairment in abstinent MDMA ('Ecstasy') users. *Neurology* 5:1532-1537.

Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10:1089-99.

Brownlee J, Irving NG, Brion JP, Gibb BJ, Wagner U, Woodgett J, Miller CC. (1997) Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3beta transgenes. *Neuroreport* (15):3251-5.

Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.

Busceti CL, Biagioni F, Aronica E, Riozzi B, Storto M, Battaglia G, Giorgi FS, Gradini R, Fornai F, Caricasole, Nicoletti F, Bruno V. (2007) Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48:694-705.

Callahan BT, Cord BJ, Ricaurte GA. (2001) Long-term impairment of anterograde axonal transport along fiber projections originating in the rostral raphe nuclei after treatment with fenfluramine or methylenedioxy-methamphetamine. *Synapse* 40:113-121.

Callaway CW, Rempel N, Peng RY, Geyer MA. (1992) Serotonin 5-HT<sub>1</sub>-like receptors mediate hyperactivity in rats induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neuropsychopharmacol* 7:113-127.

Cappuccio I, Calderone A, Buceti CL, Biagioni F, Pontarelli F, Bruno V, Storto M, Terstappen GT, Gaviraghi G, Fornai F, Battaglia G, Melchiorri D, Zukin S, Nicoletti F, Caricasole A. (2005) Induction of Dickkopf-1, a Negative Modulator of the Wnt Pathway, Is Required for the Development of Ischemic Neuronal Death. *J Neurosci* 25:2647-2657.

Caricasole A, Copani A, Caruso A, Caraci F, Iacovelli L, Sortino MA, Terstappen GC, Nicoletti F. (2003) The Wnt pathway, cell-cycle activation and  $\beta$ -amyloid: novel therapeutic strategies in Alzheimer disease? *Trends Pharmacol Sci* 24:233-238.

Caricasole A, Copani A, Caraci F, Aronica E, Rozemuller AJ, Caruso A, Storto M, Gaviraghi G, Terstappen GC, Nicoletti F. (2004) Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci* 24:6021-6027.

Cohen RS. (1995) Subjective reports on the effects of the MDMA antagonist ('ecstasy') experience in humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19:1137-1145.

Cohen RS, Cocores J. (1997) Neuropsychiatric manifestations following the use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA: 'Ecstasy'). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21:727-734.

Colado MI, Murray TK, Green AR. (1993) 5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), p-chloroamphetamine, and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine. *Br J Pharmacol* 108:583-589.

Colado MI, Green AR. (1995) The spin trap reagent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *Eur J Pharmacol* 280:343-346.

Colado MI, O'Shea, Green AR. (2004) Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function. *Psychopharmacol (Berl)* 173:249-263.

Commins DL, Vosmer G, Virus RM, Woolverton WL, Schuster CR, Seiden LS (1987) Biochemical and histological evidence that (1/2)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 241:338-345.

Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, Shih H, Tsai LH. (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40:471-83.

Curran HV, Travill RA. (1997) Mood and cognitive effects of  $\pm$  3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): weekend “high” followed by mid-week low. *Addiction* 92:821-831.

Dafters RI. (1994) Effect of ambient temperature on hyperthermia and hyperkinesia induced by 3,4-methylene-dioxymethamphetamine (MDMA or ‘ecstasy’) in rats. *Psychopharmacol (Berl.)* 114:505–508.

Dafters RI. (1995) Hyperthermia following MDMA administration in rats: effects of ambient temperature, water consumption, and chronic dosing. *Physiol Behav* 58 877-882.

Daumann J, Fischermann T, Heekeren K, Henke K, Thron A, Gouzoulis-Mayfrank E (2005) Memory-related hippocampal dysfunction in poly-drug ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine) users. *Psychopharmacology* 180:607-611.

De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH. (1997) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 243:518-26.

de la Monte SM, Ganju N, Feroz N, Luong T, Banerjee K, Cannon J, Wands JR. (2000) Oxygen free radical injury is sufficient to cause some Alzheimer-type molecular abnormalities in human CNS neuronal cells. *J Alzheimers Dis* 2:261-81.

De Souza EB, Battaglia G, Insel TR. (1990) Neurotoxic effect of MDMA on brain serotonin neurons: evidence from neuro-chemical and radioligand binding studies. *Ann NY Acad Sci* 600:682-697.

Dhavan R, Tsai LH. (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:749-59.

Diep DB, Hoen N, Bachman M, Machon O, Krauss S. (2004) Characterisation of the Wnt antagonists and their response to conditionally Wnt signalling in the developing mouse forebrain. *Brain Res. Dev Brain Res* 153:261-270.

Downing J. (1986) The psychological physiological effects of MDMA on normal volunteers. *J Psy Drugs* 18:335-339.

Engel T, Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernández F. (2006) Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 99:1445-55.

Fahal IH, Sallomi DF, Yaqoob M, Bell GM. (1992) Acute renal failure after ecstasy. *Br Med J* 305:29.

Flament S, Delacourte A, Mann DM (1990) Phosphorylation of Tau proteins: a major event during the process of neurofibrillary degeneration. A comparative study between Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res* 516:15-9.

Frenzilli G, Ferrucci M, Giorgi FS, Blandini F, Nigro M, Ruggieri S, Murri L, Paparelli A, Fornai F (2007) DNA fragmentation and oxidative stress in the hippocampal formation: a bridge between 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) intake and long-lasting behavioural alterations. *Behav Pharmacol* in press.

Gamma A, Frei E, Lehmann D, Pascual-Marqui RD, Hell D, Vollenweider FX (2000) Mood state and brain electric activity in ecstasy users. *Neuroreport* 11:157-162.

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

Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2006) Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target. *J Biomed Biotechnol* 31825.

Gordon CJ, Watkinson WP, O'Callaghan, Miller DB. (1991) Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 38:39-344.

Gordon CJ. (1993) Twenty-four hour rhythms of selected ambient temperature in rat and hamster. *Physiol Behav* 53:257-263.

Gouzolis-Mayfrank E, Daumann J, Tuchtenhagen F, Pelz S, Becker S, Kunert HJ, Fimm B, Sass H. (2000) Impaired cognitive performance in drug free users of recreational ecstasy. *J Neurol Neurosurg Psy* 68:719-725.

Grahame-Smith DG. (1971a) Studies in vivo on the relationship between brain tryptofane, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor and L-tryptofane. *J Neurochem* 18:1053-1066.

Grahame-Smith DG. (1971b) Inhibitor effect of chlorpromazine on the syndrome of hyperactivity produced by L-tryptofane or 5-methoxy-N, N-dimethyltyptamine in rats treated with am monoamine inhibitor. *Br J Pharmacol* 43:854-864.

Green AR, Cross AJ, Goodwin GM. (1995) Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymetham-phetamine (MDMA or 'Ecstasy'). *Psychopharmacol (Berl.)* 247-260.



Green AR, Mehan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI. (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy). *Pharmacol Rev* 55:463-508.

Greer G, Tolbert R. (1986) Subjective reports of the effects of MDMA in a clinical setting. *J Psychoactive Drugs* 18:319-327.

Grotewold L, Ruther U. (2002a) Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int J Dev Biol* 46:943-947.

Grotewold L, Ruther U. (2002b) The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signalling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J* 21:966-975.

Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García JM. (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci* 26:1077-87.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4913-4917.

Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147:58-62.

Hashiguchi M, Saito T, Hisanaga S, Hashiguchi T. (2002) Truncation of CDK5 activator p35 induces intensive phosphorylation of Ser202/Thr205 of human tau. *J Biol Chem* 277:44525-30.

Hatzidimitriou G, McCann UD, Ricaurte GA. (1999) Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with (+/-)3,4-methylene-dioxymethamphetamine seven years previously: factors influencing abnormal recovery. *J Neurosci* 19:5096-5107.

Hernández F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ. (2002) Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* 83:1529-33.

Hinck L, Nelson WJ, Papkoff J (1994) Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing  $\beta$ -catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J Cell Biol* 124:729-741.

Hisanaga S, Saito T (2003) The regulation of cyclin-dependent kinase 5 activity through the metabolism of p35 or p39 Cdk5 activator. *Neurosignals* 12:221-229.

Hrnkova M, Zilka N, Minichova Z, Koson P, Novak M (2007) Neurodegeneration caused by expression of human truncated tau leads to progressive neurobehavioural impairment in transgenic rats. *Brain Res* 1130:206-213.

Huelsken J, Behrens J. (2002) The Wnt Signalling pathway *J Cell Sci* 115:3977-3978.

Insel TR, Battaglia G, Johannessen JN, Marra S, De Souza EB. (1989) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') selectively destroys brain serotonin terminals in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 249:713-720

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:198-210.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Smith AJ, George L, Tung YC, Zaidi T (1989) Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5646-5650.

Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Sato K, Arioka M, Uchida T, Imahori K (1992) Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine

derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci Lett* 148:202-6.

Ishizawa T, Sahara N, Ishiguro K, Kersh J, McGowan E, Lewis J, Hutton M, Dickson DW, Yen SH. (2003) Co-localization of glycogen synthase kinase-3 with neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in transgenic mice. *Am J Pathol* 163:1057-67.

Jacobsen LK, Mencil WE, Pugh KR, Skudlarski P, Krystal JH (2004) Preliminary evidence of hippocampal dysfunction in adolescent MDMA ("ecstasy") users: possible relationship to neurotoxic effects. *Psychopharmacology* 173:383-390.

Jeng W, Ramkissoon A, Parman T, Wells PG. (2006) Prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation of amphetamines to free radical intermediates that cause CNS regional DNA oxidation and nerve terminal degeneration. *FASEB J* 20:638-50.

Kim HS, Kim EM, Lee JP, Park CH, Seo JH, Chang KA, Yu E, Jeong SJ, Chong YH, Suh YH. (2003) C-terminal fragment of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 $\beta$  expression. *FASEB J* 17:1951-1953.

Kish SJ, Furukawa Y, Ang L, Vorce SP, Kalasinsky KS. (2000) Striatal serotonin is depleted in brain of a human MDMA (Ecstasy) user. *Neurology* 55:294-296.

Klein PS, Melton DA. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8455-9.

Knockaert M, Greengard P, Meijer L. (2002) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci.* 23:417-25.

Kramer HK, Poblete JC, Azmitia EC. (1995) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') promotes the translocation of protein kinase C (PKC): requirement of viable serotonin nerve terminals. *Brain Res* 680:1-8.

Liao X, Zhang Y, Wang Y, Wang J. (2004) The effect of cdk-5 overexpression on tau phosphorylation and spatial memory of rat. *Sci China C Life Sci* 47:251-7.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 24:1121-59.

Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405:360-4.

Lee VM, Balin BJ, Otvos L Jr, Trojanowski JQ. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251:675-678.

Leger JG, Brandt R, Lee G. (1994) Identification of tau protein regions required for process formation in PC12 cells. *J Cell Sci* 107:3403-12.

Levina E, Oren M, Ben-Ze'ev A. (2004) Downregulation of  $\beta$ -catenin and p53 involves changes in the rate of  $\beta$ -catenin phosphorylation and Axin dynamics. *Oncogene* 23:4444-4453.

Liester MB, Grob CS, Bravo GL, Walsh RN. (1992) Phenomenology and sequelae of 3,4-methylenedioxymethamphetamine use. *J Nerv Ment Dis* 180:345-352.

Lin LY, Di Stefano EW, Schmitz DA, Hsu L, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT, Cho AK. (1997) Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. *Drug Metab Dispos* 25:1059-64.

Liu F, Liang Z, Shi J, Yin D, El-Akkad E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. (2006) PKA modulates GSK-3 $\beta$ - and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners. *FEBS Lett* 580:6269-74.

Liu J, Kipreos ET. (2000) Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol Biol Evol* 17:1061-74.

Lundqvist T. (2005) Cognitive consequences of cannabis use: Comparison with abuse of stimulants and heroin with regard to attention, memory and executive functions. *Pharmacol Biochem Behav* 81:319-330.

Lyles J, Cadet JL. (2003) Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res Rev* 42:155-168.

MacDonald BT, Adamska M, Meisler MH (2004) Hypomorphic expression of *Dkk1* in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with *Lrp6*. *Development* 131:2543-52.

Maguire EA, Frackowiak RS, Firth CD. (1996) Learning to find your way: a role for the human hippocampal formation. *Proc Biol Sci* 263:1745-50.

Malpass AJ, White M, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F. (1999) Acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Sprague-Dawley and Dark Agouti rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64:29-34.

Mandelkow EM, Thies E, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow E. (2004) MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol* 167:99-110.

Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E. (1992) Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* 314:315-21.

Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Machler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinda A, Niehrs C. (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/  $\beta$ -catenin signalling. *Nature* 417:664-667.

Marston HM, Reid ME, Lawrence JA, Olverman HJ, Butcher SP. (1999) Behavioural analysis of the acute and chronic effects of MDMA treatment in the rat. *Psychopharmacol (Berl.)* 144:67-76.

McCann UD, Ridenour A, Shaham Y, Ricaurte GA. (1994) Serotonin neurotoxicity after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; 'Ecstasy'): a controlled study in humans *Neuropsychopharmacol* 10:129:138.

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



Mc Cann UD, Mertil M, Eligulashvili V, Ricaurte GA. (1999) Cognitive performance in ( $\pm$ ) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) users: a controlled study. *Psychopharmacol* 143:417-425.

McCann UD, Eligulashvili V, Ricaurte GA. (2000) (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: clinical studies. *Neuropsychobiol* 42:11-16.

Mc Cardle K, Luebbers S, Carter JD, Croft RJ. (2004) Stough Chronic MDMA (ecstasy) use, cognition and mood. *Psychopharmacol* 173:434-439.

McCreary AC, Bankson MG, Cunningham KA. (1999) Pharmacological studies of the acute and chronic effects of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine on locomotor activity: role of 5-hydroxytryptamine (1A) and 5-hydroxytryptamine( 1B/1D) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 290:965-973.

McEntee WJ, Crook TH. (1991) Serotonin, memory, and the aging brain *Psychopharmacol* 103:143-149.

Mechan AO, Esteban B, O'Shea E, Elliott JM, Colado MI, Green AR. (2002) The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) to rats. *Br J Pharmacol* 135:170-180.

Mills EM, Banks ML, Spague JE, Finkel T. (2003) Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy. *Nature* 426:403-404.

Molliver ME, Berger UV, Mamounas LA, Molliver DC, O'Hearn E, Wilson MA. (1990) Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann NY Acad Sci* 600:649-661.

Montoya AG, Sorrentino R, Lukas SE, Price BH. (2002) Long-term neuropsychiatric consequences of "ecstasy" (MDMA): a review. *Harv Rev Psychiatry* 10:212-20.

Morgan MJ. (1999) Memory deficits associated with recreational use of ecstasy (MDMA). *Psychopharmacol* 41:30-36.

Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.

Morton J. (2005) Ecstasy: pharmacology and neurotoxicity *Curr op pharmacol* 5:79-86.

Nash JF, Meltzer HY, Gudelsky GA. (1988) Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 245:873-879.

Nash JF, Meltzer HY, Gudelsky GA. (1990) Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 3,4-dihydroxyphenylalanine accumulation in the striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem* 54:1062-1067.

Nath R, Davis M, Probert AW, Kupina NC, Ren X, Schielke GP, Wang KK. (2000) Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 274:16-21.

Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K. (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6990-5.

O'Hearn E, Battaglia G, De Souza EB, Kuhar MJ, Molliver ME. (1988) Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical for neurotoxicity. *J Neurosci* 8:2788-2803.

Paris JM, Cunningham KA. (1992) Lack of serotonin neurotoxicity after intraraphe microinjection of (+)-3,4-methylenedioxymphetamine (MDMA). *Brain Res Bull* 28:115-119.

Parrot AC, Lasky J. (1998) Ecstasy (MDMA) effects upon mood and cognition: before, during and after a Saturday night dance. *Psychopharmacol* 139:261-268.

Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402:615-22.

Patzke H, Tsai LH. (2002) Cdk5 sinks into ALS. *Trends Neurosci* 25:8-10.

Paxinos G, Franklin KBJ (1997) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Second edition. Academic Press, New York.

Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH (1993) Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J Biol Chem* 268:23512-8.

Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1010-1019.

Pei JJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Bogdanovic N, Winblad B, Cowburn RF (1998) Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with

early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res* 797:267-277.

Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1997) Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:70-78.

Reneman L, Lavalaye J, Schmand B, de Wolff FA, van den Brink W, den Heeten GJ, Booij J. (2001) Cortical serotonin transporter density and verbal memory in individuals who stopped using 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or 'ecstasy'). *Arch Gen Psychiatry* 58:901-906.

Ricaurte GA, DeLanney LE, Wiener SG, Irwin I, Langston JW. (1988a) 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates. *Brain Res* 474:359-363.

Ricaurte GA Forno LS, Wilson MA, DeLanney LE, Irwin I, Molliver ME, Langston JW. (1988b) (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates. *J Am Med Assoc* 260:51-55.

Ricaurte GA. (1989) Studies of MDMA-induced neurotoxicity in nonhuman primates: a basis for evaluating long-term effects in humans. NIDA Res Monogr 94:306-322.

Ricaurte GA, McCann UD, Szabo Z, Scheffel U. (2000a) Toxicodynamics and long-term toxicity of the recreational drug, 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'). Toxicol Lett 112-113.

Ricaurte GA, Yuan J, McCann UD. (2000b) (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals 142. Neuropsychobiology 42:5-10.

Ryves WJ, Harwood AJ. (2001) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. Biochem Biophys Res Commun 280:720-5.

Scheffel U, Szabo Z, Mathews WB, Finley PA, Dannals RF, Ravert HT, Szabo K, Yuan J, Ricaurte GA. (1998) In vivo detection of short- and long-term MDMA neurotoxicity-a positron emission tomography study in the living baboon brain. Synapse 29:183-192.

Schmidt C.J. (1987) Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine methylenedioxymethamphetamine. J Pharmacol Exp Ther 240:1-7.

Schmidt CJ, Taylor VL. (1987) Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine. *Biochem Pharmacol* 36:4095-4102.

Schmidt CJ, Black CK, Abbate GM, Taylor VL. (1990) Methylenedioxymethamphetamine-induced hyperthermia and neurotoxicity are independently mediated by 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Brain Res* 529:85-90.

Schmued LC, Albertson C, Slikker Jr W (1997) Fluoro-Jade B: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 751:37-46.

Schmued LC and Hopkins KJ (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874:123-130

Screaton GR, Singer M, Cairns HS, Thrasher A, Sarner M, Cohen SL. (1992) Hyperpyrexia and rhabdomyolysis after MDMA ('ecstasy') abuse. *Lancet* 339:677-678.

Seiden LS, Sabol KE. (1996) Methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity: possible mechanisms of cell destruction *NIDA Res Monogr* 163:251-276.

Semple DM, Ebmeier KP, Glabus MF, O'Carroll RE, Johnstone EC (1999) Reduced in vivo binding to the serotonin transporter in the cerebral cortex of MDMA ('ecstasy') users. *Br J Psychiatry* 175:63-69.

Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ (1997) Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by Cdk5. *Mol Cell Biochem* 167:99-105.

Sengupta A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2006) Regulation of phosphorylation of tau by cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase-3 at substrate level. *FEBS Lett.* 580:5925-33.

Seo YR, Jung HJ (2004) The potential roles of p53 tumor suppressor in nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER). *Exp Mol Med* 36:505-509.

Sergeant N, Delacourte A, Buée L. (2005) Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 1739:179-97.

Shankaran M, Gudelsky GA. (1999) A neurotoxic regimen of MDMA suppresses behavioural, thermal and neurochemical responses to subsequent MDMA administration. *Psychopharmacol* 147:66-72.

Shou J, All-Osman F, Multani AS, Pathak S, Fedi P, Srivenugopal KS. (2002) Human Dkk-1 gene, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA



damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene* 21:878-889.

Shulgin AT. (1990) History of MDMA. *The Clinical Pharmacological and Toxicological Effects of the Drug MDMA*. 1-20.

Slikker W, Holson RR, Ali SF, Kolta MG, Paule MG, Scallet AC, McMillan DE, Bailey JR, Hong JS, Scalzo FM. (1989) Behavioral and neurochemical effects of orally administered MDMA in the rodent and nonhuman primate. *Neurotoxicol* 10:529-542.

Smith ML, Seo YR (2002) p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* 17:149-156.

Spanos LJ Yamamoto BK. (1989) Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+/-)MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 32:835-840.

Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F. (1999) Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155:2153-65.

Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156:1051-63.

Sun L, Liu SY, Zhou XW, Wang XC, Liu R, Wang Q, Wang JZ. (2003) Inhibition of protein phosphatase 2A- and protein phosphatase 1-induced tau hyperphosphorylation and impairment of spatial memory retention in rats. *Neuroscience*. 118:1175-82.

Szyndler J, Wierzbica-Bobrowicz T, Maciejak P, Siemiakowski M, Rok P, Lehner M, Czlonkowska AI, Bidzinski A, Wislowska A, Zienowicz M, Plaznik A. (2002) Pentylentetrazol-kindling of seizures selectively decreases [3H]-citalopram binding in the CA-3 area of rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 335:49-53.

Tseng HC, Zhou Y, Shen Y, Tsai LH. (2002) A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Lett* 523:58-62.

Tucker GT, Lennard MS, Ellis SW, Woods HF, Cho AK, Lin LY, Hiratsuka A, Schmitz DA, Chu TY. (1994) The demethylation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem Pharmacol* 47:1151-6.

Wang J, Shou J, Chen X. (2000) Dickkopf an inhibitor of the Wnt signalling pathway, is induced by p53. *Oncogene* 19:1843-1848.

Willert K, Nusse R. (1998)  $\beta$ -Catenin: a key mediator of Wnt signalling. *Curr Op Gen Dev* 8:95-102.

Wood SJ, Proffitt T, Mahony K, Smith DJ, Buchanam JA, Brewer W, Stuart GW, Velakoulis D, McGorry PD, Pantelis C. (2002) Visuospatial, memory and learning in first-episode schizophrenia: a functional correlate of hippocampal pathology? *Psychol Med* 32:429-438.

Yamaguchi H, Ishiguro K, Uchida T, Takashima A, Lemere CA, Imahori K (1996) Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol* 92:232-241.

Yamawaki S, Lai H, Horita A. (1983) Dopaminergic and serotonergic mechanisms of thermoregulation: mediation of thermal effects of apomorphine and dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 227:383-388.

Yau JL, Kelly PA, Sharkey J, Seckl JR. (1994) Chronic 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration decreases glucocorticoid and mineralocorticoid receptor, but increases 5-hydroxytryptamine<sub>1C</sub> receptor gene expression in the rat hippocampus. *Neuroscience* 61:31-40.

Zorn AM. (2001) Wnt signalling: antagonistic Dickkopf-1. *Curr Biol* 11:R592-R595.

## 7. LEGENDA DELLE FIGURE

Di seguito viene riportata la legenda delle figure esposte successivamente in pagine singole per evidenziarne i dettagli. La numerazione delle figure corrisponde a quella utilizzata nella tesi.

**Figura 1-**Misurazione della formazione di radicali liberi. I radicali liberi sono stati dosati nell'ippocampo, nello striato e nella corteccia di topi trattati con MDMA (25 mg/kg, i.p., due volte a distanza di due ore). I valori riportati corrispondono alla media  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  vs. i controlli trattati con salina, # $p < 0.05$  vs. i controlli trattati con MDMA.

**Figura 2-**Colorazione di Nissl e Fluoro-Jade B dell'ippocampo di topi sottoposti ad un trattamento acuto con MDMA (dose cumulativa giornaliera di 50 mg/Kg somministrata in 25 mg/kg, i.p., due volte a distanza di due ore) o a somministrazioni ripetute per 6 giorni (dose cumulativa giornaliera di 30 mg/Kg somministrata in 15 mg/kg, i.p., due volte a distanza di due ore). I gruppi di controllo venivano trattati con salina. L'analisi è stata condotta 7 giorni dopo il trattamento acuto e 90 giorni dopo il trattamento giornaliero.

**Figura 3**-Immunoistochimica per la proteina gliale fibrillare acidica (GFAP) nell'ippocampo e nello striato di animali sottoposti ad un trattamento acuto con MDMA (50 mg/Kg, i.p.) Le immagini nella parte superiore sono acquisite al confine tra ippocampo e striato a livello del ventricolo laterale in sezioni sagittali.

**Figura 4**-Immunoistochimica per GFAP nell'ippocampo di topi sottoposti ad un trattamento ripetuto con MDMA (30 mg/Kg/6 giorni, i.p.) Le immagini nella parte superiore sono acquisite al confine tra ippocampo e striato a livello del ventricolo laterale in sezioni sagittali.

**Figura 5**-Analisi Western Blot dei livelli di P-tau e di PHF tau nell'ippocampo di topi sottoposti ad un trattamento acuto con MDMA (50 mg/Kg). Sono riportati i valori medi  $\pm$  S.E.M. determinati tramite scansione densitometrica. \* $p < 0.05$  (OneWay ANOVA + Fisher's PLSD) vs i controlli trattati con salina.

**Figura 6**-Analisi Western Blot dei livelli di P-tau e di PHF tau nell'ippocampo di topi sottoposti ad un trattamento ripetuto con MDMA (30 mg/Kg/6 giorni). Sono riportati i valori medi  $\pm$  S.E.M. determinati tramite scansione densitometrica. \* $p < 0.05$  (OneWay ANOVA + Fisher's PLSD) vs i controlli trattati con salina.

**Figura 7-**Analisi Western Blot dei livelli di P-tau e di PHF tau nello striato di animali sottoposti ad un trattamento ripetuto con MDMA (30 mg/Kg/6 giorni). Sono riportati i valori medi  $\pm$  S.E.M. determinati tramite scansione densitometrica. \* $p < 0.05$  (OneWay ANOVA + Fisher's PLSD) vs i controlli trattati con salina.

**Figura 8-**Analisi immunohistochimica di P-tau e di PHF tau nell'ippocampo degli animali sottoposti ad un trattamento acuto con MDMA (50 mg/Kg). E' possibile notare che l'incremento di espressione di P-tau e PHF tau riguarda selettivamente le regioni ippocampali CA2/CA3.

**Figura 9-**Analisi immunohistochimica di P-tau e di PHF tau nell'ippocampo di topi sottoposti ad un trattamento ripetuto con MDMA (30 mg/Kg/6 giorni). E' possibile notare che l'incremento di espressione di P-tau e PHF tau riguarda selettivamente le regioni ippocampali CA2/CA3.

**Figura 10-(A)** Analisi immunohistochimica di Dkk-1 nell'ippocampo di topi sottoposti ad un trattamento i.p. con MDMA acuto (50 mg/Kg) o ripetuto (30 mg/Kg/6 giorni). E' possibile notare che l'incremento di espressione di Dkk-1 riguarda selettivamente le regioni ippocampali CA2/CA3. **(B)** Analisi Western Blot dei livelli di Dkk-1 nell'ippocampo di topi sottoposti ad un

trattamento con MDMA acuto (50 mg/Kg) o ripetuto (30 mg/Kg/6 giorni). Sono riportati i valori medi  $\pm$  S.E.M. determinati tramite scansione densitometrica. \* $p < 0.05$  (OneWay ANOVA + Fisher's PLSD) vs i controlli trattati con salina.

**Figura 11-(A)** Analisi western blot di GSK-3 $\beta$  e P-GSK-3 $\beta$  nell'ippocampo di topi trattati con MDMA. Gli animali sono stati sottoposti ad un trattamento con MDMA acuto (50 mg/Kg). **(B)** Attività di GSK-3 $\beta$  misurata nell'ippocampo di animali trattati con MDMA (trattamento acuto, dose cumulativa = 50 mg/kg., i.p.) e sacrificati ad un agiorno dal trattamento. I valori riportati in cpm sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. di 6 determinazioni.

**Figura 12-**Analisi Western Blot dei livelli di p35, p25 e Cdk5 nell'ippocampo di topi sottoposti ad un trattamento con MDMA acuto (50 mg/Kg). Sono riportati i valori medi  $\pm$  S.E.M. determinati tramite scansione densitometrica. \* $p < 0.05$  (OneWay ANOVA + Fisher's PLSD) vs i controlli trattati con salina.

**Figura 13-**Analisi Western Blot dei livelli di p35, p25 e Cdk5 nell'ippocampo di topi sottoposti ad un trattamento ripetuto con MDMA (30 mg/Kg/6 giorni). Sono riportati i valori medi  $\pm$  S.E.M. determinati



tramite scansione densitometrica. \* $p < 0.05$  (OneWay ANOVA + Fisher's PLSD) vs i controlli trattati con salina.

**Figura 14**-Analisi immunoistochimica di Dkk-1, P-tau e PHF-tau nell'ippocampo di topi ipomorfici per Dkk-1 (topi *doubleridge*) e topi wild type (C3H) dopo un giorno da un trattamento acuto con MDMA (50 mg/Kg, i.p.).

**Figura 15**-Analisi Western Blot dei livelli di Dkk-1, P-tau and PHF tau nell'ippocampo di topi ipomorfici per Dkk-1 (topi *doubleridge*) e topi wild type (C3H) dopo un giorno da un trattamento acuto con MDMA (50 mg/Kg, i.p.). Sono riportati i valori medi  $\pm$  S.E.M. determinati tramite scansione densitometrica.  $p < 0.05$  (OneWay ANOVA + Fisher's PLSD) vs i controlli trattati con salina (\*) o vs. il rispettivo gruppo di topi wild-type (#).

**Figura 16-(A)** Analisi immunoistochimica di P-tau e PHF tau nell'ippocampo di topi sottoposti ad un trattamento acuto con MDMA (50 mg/Kg, i.p.)  $\pm$  ioni litio e/o roscovitina (Rosco). Il litio è stato somministrato i.p. sottoforma di LiCl alla dose di 1 mEq/kg ogni 12 ore per i 7 giorni che precedono il trattamento con MDMA o salina. La roscovitina è stata iniettata *i.c.v.* alla dose di 30 nmol/2  $\mu$ l, due volte, 30 min prima di ciascuna iniezione di MDMA o salina. Il veicolo era costituito da DMSO al 50% in

salina. Gli animali sono stati sacrificati 24 h dopo il trattamento con salina o MDMA. **(B)** Analisi western blot dei livelli di P-tau e PHF tau negli animali trattati come riportato in (A). Sono espressi i valori medi  $\pm$  S.E.M. determinati tramite scansione densitometrica. \* $p < 0.05$  (OneWay ANOVA + Fisher's PLSD) vs i controlli trattati con salina.

**Figura 17**-L'apprendimento spaziale è stato valutato mediante il test di Morris water maze in sessioni di allenamento costituite da 5 prove al giorno eseguite per 3 giorni. L'analisi è stata condotta in topi trattati intraperitonealmente per 6 giorni con salina o MDMA (30 mg/kg, i.p., somministrata in due dosi di 15 mg/Kg a intervalli di 2 ore) 7 giorni dopo l'ultima iniezione. I valori riportati corrispondono alla media  $\pm$  S.E.M. di 6 determinazioni per gruppo sperimentale. \* $p < 0.05$  vs. i controlli trattati con salina.

**Figura 18**-L'apprendimento spaziale è stato valutato mediante il test di Morris water maze in sessioni di allenamento costituite da 5 prove al giorno eseguite per 3 giorni. L'analisi è stata condotta in topi trattati intraperitonealmente per 6 giorni con salina o MDMA (30 mg/kg, i.p., somministrata in due dosi di 15 mg/Kg a intervalli di 2 ore) 30 giorni dopo l'ultima iniezione. I valori riportati corrispondono alla media  $\pm$  S.E.M. di 6 determinazioni per gruppo sperimentale. \* $p < 0.05$  vs. i controlli trattati con salina.